



Исследование биологических свойств перевиваемой суспензионной линии клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH

М. И. Доронин¹, М. Н. Гусева², Д. В. Михалишин³, А. С. Шарыпов⁴, Н. С. Мудрак⁵, Н. Е. Камалова⁶, Б. Л. Манин⁷

^{1-3,5-7} ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

⁴ ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория» (ФГБУ ЦНМВЛ), г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3997-3390, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-1479-5479, e-mail: science@cnmvl.ru

⁵ ORCID 0000-0002-9788-9197, e-mail: mudrak@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-5671-2347, e-mail: kamalova@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin_bl@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения цитоморфологических, кариологических, культуральных характеристик перевиваемой суспензионной клеточной сублинии из почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/SUSP/ARRIAH, предназначенной для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3 крупного рогатого скота, болезни Ауески, а также для изготовления диагностических ветеринарных биопрепаратов. Сублиния клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH при суспензионном культивировании проходит селекцию в направлении гипоплоидии: модальный класс соответствует 41 хромосоме (32–40% клеток); доля клеток с количеством хромосом 40–42 составляет 78–80%; доля полиплоидов – в среднем около 1%; пределы изменчивости хромосомного набора соответствуют диапазону от 36 до 54 хромосом. Клеточная сублиния ВНК-21/SUSP/ARRIAH при суспензионном культивировании с посевной концентрацией 0,6–0,8 млн кл./см³ имеет кратность прироста 6,67–11,00 при жизнеспособности клеток 96–99%. В клеточном цикле популяции новой сублинии через 48 ч преобладает G1-фаза (диплоидная-2n), на которую приходится 30,0–75,0% клеток; в фазах подготовки к митозу (S-фаза) и митотического деления (G2+M-фаза) находится от 3,0 до 20,0% всей популяции; количество крупноядерных и многоядерных клеток (> 4n) в начале и конце стадии логарифмического роста увеличивается до 2%. Клетки сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH быстро восстанавливаются после криоконсервирования с жизнеспособностью 95–99% и кратностью прироста 3,36–5,88 на первом – третьем пассажах и 6,85–10,95 – с четвертого по двенадцатый пассаж. Перевиваемая суспензионная линия клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH обеспечивает накопление вируса ящура в титрах 7,30–8,00 Ig ТЦД₅₀/см³, вируса бешенства – 7,25–8,00 Ig ККИД₅₀/см³, вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в титрах не менее 6,00 Ig ТЦД₅₀/см³, вируса болезни Ауески – 7,50–7,80 Ig ТЦД₅₀/см³.

Ключевые слова: клеточная линия ВНК-21/SUSP/ARRIAH, биологические свойства культуры клеток, ящур, бешенство, парагрипп-3 крупного рогатого скота, болезнь Ауески

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Доронин М. И., Гусева М. Н., Михалишин Д. В., Шарыпов А. С., Мудрак Н. С., Камалова Н. Е., Манин Б. Л. Исследование биологических свойств перевиваемой суспензионной линии клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH. *Ветеринария сегодня*. 2021; 10 (3): 230–238. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-230-238.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: doronin@arriah.ru.

Studies of biological properties of continuous suspension ВНК-21/SUSP/ARRIAH cell line

М. И. Доронин¹, М. Н. Гусева², Д. В. Михалишин³, А. С. Шарыпов⁴, Н. С. Мудрак⁵, Н. Е. Камалова⁶, Б. Л. Манин⁷

^{1-3,5-7} FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

⁴ FSBI "Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory" (FSBI CNMVL), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

² ORCID 0000-0002-3997-3390, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

³ ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0002-1479-5479, e-mail: science@cnmvl.ru

⁵ ORCID 0000-0002-9788-9197, e-mail: mudrak@arriah.ru

⁶ ORCID 0000-0001-5671-2347, e-mail: kamalova@arriah.ru

⁷ ORCID 0000-0002-5263-1491, e-mail: manin_bl@arriah.ru

SUMMARY

The results of the studies of cytomorphological, karyological, cultural properties of continuous suspension BHK-21/SUSP/ARRIAH subline of newborn Syrian hamster kidney cells intended for foot-and-mouth disease, rabies, bovine parainfluenza-3, Aujeszky's disease virus reproduction, as well as for production of diagnostic veterinary biologicals are presented. When cultured in suspension, BHK-21/SUSP/ARRIAH cell subline undergoes selection towards hypoploidy: modal class is represented by cells with 41 chromosomes (32–40% of cells); the share of cells containing 40–42 chromosomes is 78–80%; the share of polyploids averages around 1%; the range of variation in the number of chromosomes is from 36 to 54. BHK-21/SUSP/ARRIAH cell subline cultured in suspension with cell seeding concentration of 0.6–0.8 million cells/cm³ demonstrates growth rate of 6.67–11.00 and 96–99% cell viability. After 48 hours, G1-phase (diploid-2n) cells prevail in the cell population of the new subline (30.0–75.0% of cells); cells that undergo preparation for mitosis (S-phase) and mitosis (G2+M-phase) account for 3.0 to 20.0% of the entire population; the number of meganucleated and multinucleated cells (> 4n) at the beginning and at the end of the logarithmic phase increases to 2%. BHK-21/SUSP/ARRIAH cells recover rapidly after cryopreservation and demonstrate 95–99% viability and growth rate of 3.36–5.88 at passages 1 to 3 and 6.85–10.95 at passages 4 to 12. Continuous suspension BHK-21/SUSP/ARRIAH cell line ensures virus accumulation at the following titres: FMD virus – 7.30–8.00 lg TCID₅₀/cm³, rabies virus – 7.25–8.00 lg CCID₅₀/cm³, bovine parainfluenza-3 virus – at least 6.00 lg TCID₅₀/cm³, Aujeszky's disease virus – 7.50–7.80 lg TCID₅₀/cm³.

Keywords: BHK-21/SUSP/ARRIAH cell line, biological properties of cell culture, foot-and-mouth disease, rabies, bovine parainfluenza-3, Aujeszky's disease

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Doronin M. I., Guseva M. N., Mikhailishin D. V., Sharypov A. S., Mudrak N. S., Kamalova N. Ye., Manin B. L. Studies of biological properties of continuous suspension BHK-21/SUSP/ARRIAH cell line. *Veterinary Science Today*. 2021; 10 (3): 230–238. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-230-238.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее часто и широко применяемых по всему миру культур клеток является перевиваемая клеточная линия почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21 клон 13, которая была получена в 1961 г. в Англии М. Stoker and J. Macpherson [1]. Результаты проведенной работы опубликованы авторами в таких научных изданиях, как *Virology* (1962) и *Journal of the National Cancer Institute* (1963). В дальнейшем были получены следующие аналоги данной культуры клеток:

– ВНК-21/13 – сублиния перевиваемых клеток почки новорожденного сирийского хомячка, полученная в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР (г. Москва) [2];

– ВНК-21/2-17b – перевиваемый монослойно-сuspensionный клон клеток почки новорожденного сирийского хомячка, полученный во Всероссийском научно-исследовательском ящурном институте (ВНИЯИ, г. Владимир) [2, 3];

– ВНК-21/13-02 – перевиваемая монослойно-сuspensionная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вируса ящура и вируса бешенства, получена в ФГУП «Щелковский биокомбинат» [4];

– ВНК-21/13-13 – перевиваемая монослойно-сuspensionная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вируса ящура типов А, О, С, Азия-1, САТ-1, САТ-2, САТ-3 и вируса бешенства штамма «Щелково-51», используемых для изготовления противовирусных вакцин против ящура и бешенства, получена в ФГУП «Щелковский биокомбинат» [5, 6].

Используемые в биотехнологии перевиваемые клеточные линии отличаются по морфологии, кариологии, ростовым свойствам, особенностям культивирования, способам поддержания и чувствительности к вирусам [7, 8]. Представленные сублинии клеток ВНК-21 характеризуются довольно высокими показателями интенсивности прироста и позволяют проводить репродукцию вирусов ящура и бешенства. При этом для промышленного получения культуральных вакцинных препаратов против ящура, бешенства, а также парагриппа-3 крупного рогатого скота (КРС) и болезни Ауески требуется суспензионная сублиния клеток ВНК-21, обеспечивающая накопление вирусов с высокими значениями титров инфекционной активности. Клеточные линии ВНК-21/13, ВНК-21/2-17b, ВНК-21/13-02 и ВНК-21/13-13 позволяют получать вирус ящура с титром инфекционной активности не более 7,00 lg TCID₅₀/cm³, вирус бешенства – 7,00 lg ККИД₅₀/cm³ [4, 5, 9, 10]. Сведения о результатах культивирования вирусов парагриппа-3 КРС и болезни Ауески в тексте патентов на указанные сублинии клеток ВНК-21 не представлены.

Для удовлетворения нужд производственного процесса по репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3 КРС и болезни Ауески с высокими титрами инфекционной активности путем селекции культуры клеток ВНК-21 клон 13 во ВНИЯИ была получена клеточная сублиния ВНК-21/2-17b, из которой через 30 лет путем перманентного культивирования в суспензии выведена новая сублиния ВНК-21/SUSP/ARRIAH. Клеточная сублиния ВНК-21/SUSP/ARRIAH задепонирована в «Специализированной коллекции культур клеток

ЦКП КККП» Института цитологии РАН под номером № РККК(П) 797 Д [11].

Цель данной работы – исследование биологических свойств перевиваемой суспензионной клеточной сублинии из почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/SUSP/ARRIAH и оценка возможности ее применения для репродукции вирусов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Суспензионное культивирование клеток проводили отъемно-доливным способом в стеклянных и металлических реакторах объемом от 40 до 2000 л отдельными циклами по 10–12 пассажей. Для культивирования использовали культуральную ростовую среду, содержащую 5% сыворотки крови КРС, гидролизат белков крови с концентрацией 15–20 см³/дм³, перевар по Хоттингеру в объеме 2–10 см³/дм³, 8 протеиногенных аминокислот, витамины и минеральные соли. Посевная концентрация клеток составляла 0,6–0,8 млн кл./см³. Каждые 12 ч проводили оценку уровня pH, концентрации живых и мертвых клеток, степени стерильности суспензии. Во время репродукции клеток происходило образование лактата, который способствовал снижению значений водородного показателя. Поэтому в клеточную суспензию добавляли 7,5%-й раствор питьевой соды и/или регулировали уровень pH с помощью барботирования.

Морфологический анализ клеток. Исследование клеток под микроскопом проводили при различной степени увеличения в фазовом контрасте. Для оценки размера ядра относительно цитоплазмы осуществляли обработку суспензионных клеток акридиновым оранжевым. В результате экспозиции с красителем ядра приобретали яркое зеленовато-желтое окрашивание и визуализировались на оранжевом фоне цитоплазмы. Жизнеспособность определялась окрашиванием с помощью трипанового синего [12].

Кариологический анализ клеток проводили с применением метода P. S. Moorhead et al. [13], позволяющего выявлять метафазные хромосомы. Клетки, отобранные из реакторов в логарифмической фазе роста, помещали на твердый субстрат в ростовой питательной среде с 0,001% колхицина и инкубировали в течение 3–4 ч. Окружившиеся метафазные клетки собирали встряхи-

ванием и затем концентрировали центрифугированием суспензии. Далее процесс осуществлялся в центрифужных пробирках в следующей последовательности: 10 мин – гипотония при температуре 36 °С; 3 обработки фиксирующим раствором по 10 мин с центрифугированием при температуре 22–25 °С. Полученную суспензию наносили на охлажденные стекла пастеровской пипеткой и окрашивали раствором Гимзы в течение 10–15 мин. После получения препарата производили фотографирование 100 метафазных пластинок, подсчет числа хромосом в них под иммерсией с помощью микроскопа с увеличением $\times 90$ и построение кариограммы [14].

Цитометрический анализ сублинии клеток. Для сравнительного анализа фаз жизненного цикла клеток проводили цитометрические исследования [15, 16] ($n = 22$) на проточном цитометре Accuri C6 с помощью набора для определения ДНК клеток «C6 Flow Cytometer Fluid Kit» (BD Accuri™, США) согласно рекомендациям производителя. Для клеток сублиний через 48 ч после пересева получали ДНК-гистограммы.

Элюаты ДНК анализировали в цитометре, выбирая программу «Анализ параметров клеточного цикла и содержания ДНК в живых клетках». Процесс длился в течение 2 ч с регистрацией флуоресцентного сигнала. Оценивали распределение клеток по G1/G0-, S- и G2/M-фазам клеточного цикла путем определения относительного содержания ДНК в клетках при помощи ДНК-связывающих флуоресцентных красителей.

Криоконсервацию суспензии клеток проводили в ампулах объемом 100 см³ в криосреде (ростовая среда с добавлением 7–10% диметилсульфоксида и 20% фетальной сыворотки телят). До температуры минус 70 °С суспензию клеток охлаждали со скоростью 2 °С/мин, до минус 150 °С – 10 °С/мин, затем ампулы помещали в жидкий азот при минус 196 °С. Размораживание клеточной суспензии осуществляли при температуре 39–42 °С в течение 2 мин.

Для размораживания клеток использовали метод непосредственной посадки, который включает следующие этапы работы: быстрая разморозка суспензии при температуре 37 °С на водяной бане; смешение 1,0 см³ клеток с 20 см³ культуральной ростовой среды, содержащей 10% сыворотки крови телят (посевная концентрация клеток 0,5–0,7 млн кл./см³); инкубирование клеток в течение 12 ч с последующей сменой среды для удаления криоконсерванта.

Вирусы. В работе использовали вирус ящура штаммов А/Турция/2006, О/Саудовская Аравия/2008, Азия-1/Таджикистан/2011, вирус бешенства штаммов «ВНИИЗЖ» и «РВ-97», вирус болезни Ауески штаммов «ВК» и «К», вирус парагриппа-3 КРС штамма «ВГНКИ-4».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое исследование клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH в сравнении с ВНК-21/2-17b. Исследовали морфологическое состояние клеток сублинии ВНК-21/2-17b на момент патентования в 1986 г. (рис. 1).

Морфология клеток была определена как аморфная, иными словами, при посеве на субстрат в первом пассаже клетки не имели постоянной формы, активно перемещались и только во время деления приобретали сферическую форму. На втором пассаже клетки данной сублинии полноценно адгезировались и при-

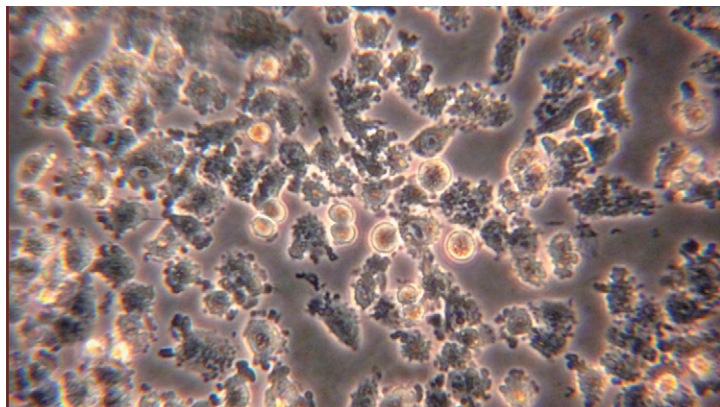


Рис. 1. Морфология клеток сублинии ВНК-21/2-17b (1-й пассаж, на момент патентования в 1986 г.; ув. $\times 80$)

Fig. 1. Cell morphology of ВНК-21/2-17b subline (passage 1, at the time of patenting in 1986; magnification 80 \times)

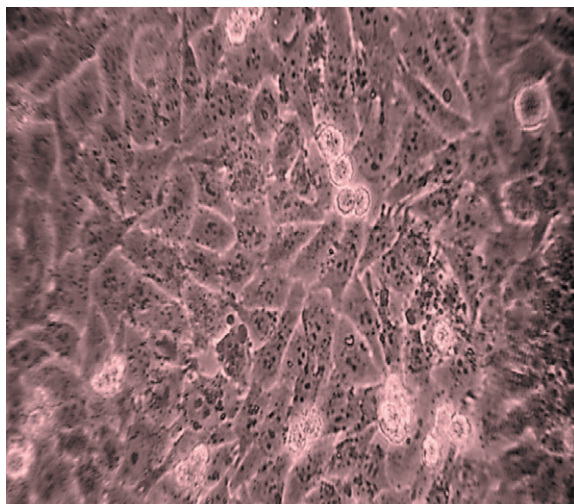


Рис. 2. Морфология клеток сублинии ВНК-21/2-17b (2-й пассив; ув. $\times 80$)

Fig. 2. Cell morphology of BHK-21/2-17b subline (passage 2; magnification 80 \times)

нимали эпителиоподобную форму (рис. 2). После полного покрытия субстрата часть клеток переходила в суспензионное состояние и характеризовалась высокими показателями пролиферативной активности (кратность прироста составляла не менее 4–6).

Морфология суспензионных клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH представлена на рисунке 3. При проведении морфологических исследований установили, что внешне клетки практически не менялись по сравнению с сублинией ВНК-21/2-17b. В популяции преобладала доля мелких клеток размером 8–10 мкм (до 90%). При этом в процессе пассирования на горизонтальной поверхности клетки слабо адгезировались (исключение составляли полиплоиды) и интенсивно перемещались. В результате многократных митотических делений в культуральном флаконе наблюдалось значительное увеличение концентрации клеток в суспензионном состоянии. Таким образом, созданная клеточная линия ВНК-21/SUSP/ARRIAH представляет собой исключительно суспензионную сублинию клеток.

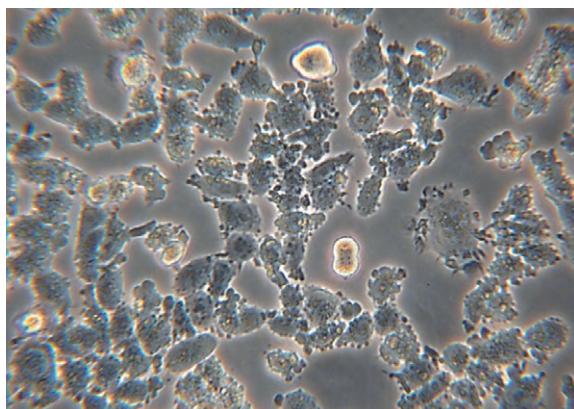


Рис. 3. Морфология клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH (ув. $\times 80$)

Fig. 3. Cell morphology of BHK-21/SUSP/ARRIAH subline (magnification 80 \times)

Для оценки размера ядра относительно цитоплазмы отбирали 50 образцов суспензии клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH после их выращивания в стеклянных и металлических реакторах и проводили обработку акридиновым оранжевым. В результате экспозиции с красителем ядра приобретали яркое зеленовато-желтое окрашивание и были визуализированы на оранжевом фоне цитоплазмы (рис. 4).

По итогам измерений диаметров ядер и клеток пришли к выводу, что для новой сублинии отмечается увеличение размера ядра относительно цитоплазмы и размера клетки. В большинстве случаев размер ядра составлял 60–80% от объема клетки.

Кариологическое исследование клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH в сравнении с ВНК-21/2-17b. Для проведения кариологического анализа готовили хромосомные препараты по методу P. S. Moorhead et al. [13], затем производили микроскопирование и микрофотографирование 100 метафазных пластинок, подсчет числа хромосом и составляли кариограмму.

На рисунке 5 показан популяционный состав культуры клеток ВНК-21/2-17b на момент патентования в 1986 г. Многократные опыты указывали на стабильное преобладание популяций с 42 хромосомами (28–40% от всей популяции). Наличие 36 хромосом отмечено у 1% популяций, 37 хромосом – у 2%, 38 хромосом – у 9%, 39 хромосом – у 3%, 40 хромосом – у 8%, 41 хромосомы – у 27%, 42 хромосом – у 40%, 43 хромосом – у 7%, 44 хромосом – у 2%, полиплоиды составили 1%.

В течение трех десятилетий в производстве многослойное выращивание данной культуры клеток не применялось. В результате суспензионного культивирования в ростовой среде в течение около 100 последовательных пассажей клетки ВНК-21/2-17b трансформировались в новую клеточную сублинию ВНК-21/SUSP/ARRIAH. Популяции клеток данной линии, выращенных в культиваторах объемом 40, 250 и 2000 дм³, подвергали кариологическому анализу. Для исследования использовали по 50 образцов клеточных суспензий, полученных через 48 ч после посева. Установили, что в однородных условиях культивирования в клетках произошли некоторые кариологические изменения. Модальный класс новой сублинии стал равен 41 хромосоме и соответствует 32–40% популяции. Доля

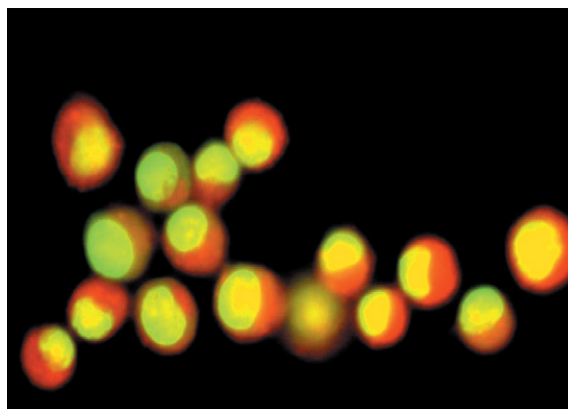


Рис. 4. Визуализация ядер суспензионных клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH при окрашивании акридиновым оранжевым

Fig. 4. Visualization of nuclei of suspension BHK-21/SUSP/ARRIAH subline cells stained with acridine orange



Рис. 5. Кариограмма популяции клеток сублинии ВНК-21/2-17b на момент патентования (1986 г.)

Fig. 5. Karyogram of BHK-21/2-17b subline cell population at the time of patenting (1986)

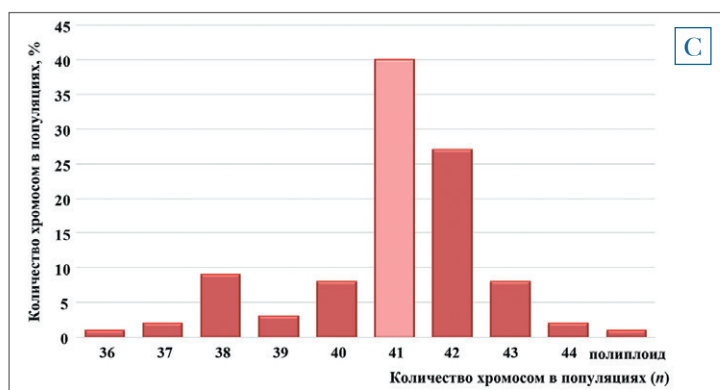
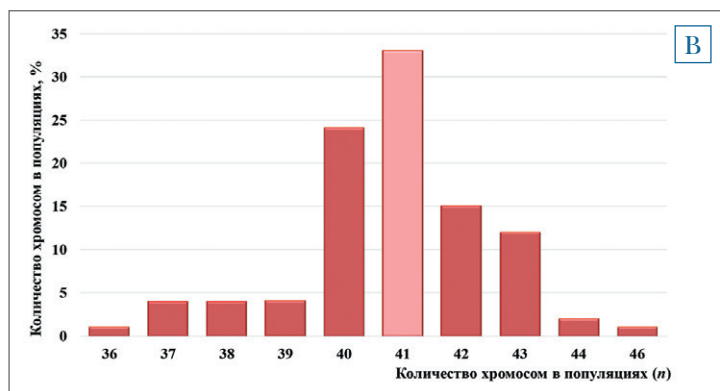
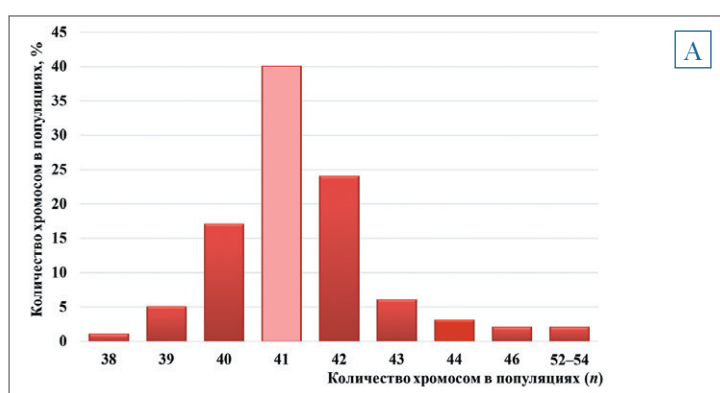


Рис. 6. Кариограмма клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH, выращенных в культиваторах объемом 50 (А), 250 (В), 2000 дм³ (С)

Fig. 6. Karyogram of BHK-21/SUSP/ARRIAH subline cells grown in 50 (A), 250 (B), 2000 dm³ (C) fermenters

клеток с количеством хромосом 40–42 составляет 78–80%, полиплоидов – в среднем около 1%. Пределы изменчивости хромосомного набора для клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH соответствуют диапазону от 36 до 54 хромосом. Наличие 36 хромосом отмечено у 0–1% популяций, 37 хромосом – у 0–4%, 38 хромосом – у 1–9%, 39 хромосом – у 3–5%, 40 хромосом – у 8–24%, 41 хромосомы – у 33–40%, 42 хромосом – у 15–27%, 43 хромосом – у 6–12%, 44 хромосом – у 2–3%, 46 хромосом – у 0–2% и 52–54 хромосом – у 0–2% (рис. 6).

Цитометрическое исследование клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH в сравнении с ВНК-21/2-17b.

При сравнительном анализе фаз жизненного цикла клеток двух сублиний через 48 ч после пересева клеточной суспензии были получены ДНК-гистограммы, представленные на рисунке 7 и в таблице 1.

На основании полученных данных установлено, что в состоянии апоптоза и дебриса было 51,0–60,0% клеток линии ВНК-21/2-17b, что на 5,0–31,0% больше, чем клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH (20,0–55,0%). В G1-фазе (пресинтетический период) находилось 30,0–75,0% клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH и 28,0–70,3% клеток сублинии ВНК-21/2-17b. Во время данной фазы клетки подготавливаются к удвоению хромосом, отмечается интенсивный синтез полипептидов, увеличивается количество митохондрий и рибосом. Доля клеток новой сублинии, находящихся в данной стадии, была на 2,0–4,7% больше по сравнению с линией ВНК-21/2-17b. Вероятно, часть клеток сублинии ВНК-21/2-17b между митотической фазой М и началом G1-фазы переходит в стадию апоптоза, что, соответственно, в дальнейшем сказывается на кратности прироста всей клеточной популяции.

В S-фазе (синтетический период), когда наблюдается репликация клеточной ДНК во многих репликациях и начинается удвоение центриолей в клеточном центре, у сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH находится 2,0–33,0% клеток, а у прототипной линии – 1,5–30,0%, что на 0,5–3,0% выше по сравнению с клетками новой сублинии.

В G2-фазе (постсинтетический период), во время которой накапливаются энергия, белки для митотического деления клетки и достигается тетраплоидный набор ДНК, а также в М-фазе (митоз) через 48 ч у сублинии ВНК-21/2-17b находится 2,6–18% клеток, у ВНК-21/SUSP/ARRIAH – 3,0–20% клеток, что на 0,4–2,0% выше и свидетельствует о большем потенциале клеток новой сублинии для продолжения деления.

Таким образом, в результате суспензионного культивирования в ростовой среде модифицированного состава в течение 100 последовательных пассажей клетки перевиваемой линии ВНК-21/2-17b трансформировались в новую сублинию ВНК-21/SUSP/ARRIAH, у которой в клеточном цикле популяции через 48 ч преобладает G1-фаза с 30,0–75,0% клеток. В фазах подготовки к митозу и митотического деления (G2+М-фаза) находится от 3,0 до 20,0% всей популяции. Количество крупноядерных и многоядерных клеток (> 4n) в начале и конце стадии логарифмического роста увеличивается до 2%. Иными словами, вероятно, произошло селекция основной популяции, что проявилось в снижении количества клеток, находящихся в стадии апоптоза и дебриса на 5,0–31,0%, и в увеличении числа клеток, участвующих в G1-, S- и G2+М-фазах на 2,0–4,7; 0,5–3,0 и 0,4–2,0% соответственно, обеспечивающих клеточный рост.

Оценка ростовых свойств клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH в сравнении с прототипными сублиниями.

Клетки сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH, полученные в результате длительного суспензионного культивирования (100 последовательных пассажей), исследовали на предмет ростовых свойств в сравнении с клетками прототипных сублиний ВНК-21/13, ВНК-21/2-17b, ВНК-21/13-02 и ВНК-21/13-13. Результаты анализа представлены в таблице 2, из данных которой видно, что при суспензионном культивировании клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH отъемно-доливым способом при посевной концентрации 0,5–0,6 млн кл./см³ через 48 ч культивирования в оптимальном режиме концентрация составляет 4,0–5,5 млн кл./см³. Таким образом, кратность прироста равна 6,67–11,00 при жизнеспособности клеток 96–99%. Суспензионные клетки сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH при выращивании в культуральных флаконах в статичных условиях характеризовались низкими показателями адгезии, имели аморфную форму со множеством цитоплазматических выростов, динамика которых составляла несколько минут.

Оценка жизнеспособности клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH, рекультивированных после криоконсервирования. В суспензии после криоконсервации определяли количество живых клеток (n = 10). По результатам исследования выявили, что жизнеспособность клеток после криоконсервирования на первом пассаже составляла 85–90%, со второго пассажа увеличивалась до 96–99%.

После реконсервации клеток и выращивания непосредственно в суспензии в течение первого пассажа происходила задержка пролиферации на сутки. На рисунке 8 показана кратность прироста клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH в течение 12 последовательных пассажей после криоконсервации. Интенсивность пролиферации на первом – третьем пассажах варьировала от 3,36 ± 0,21 до 5,88 ± 0,15 (p < 0,005). Начиная с 4-го пассажа значения кратности прироста составляли от 6,85 ± 0,18 до 10,95 ± 0,31 (p < 0,005). Считается,

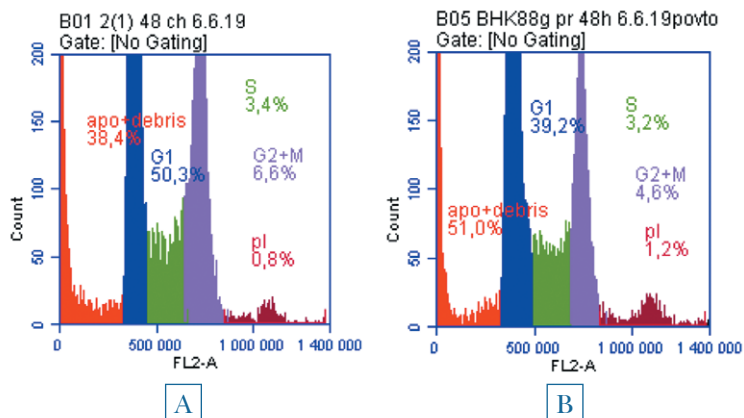


Рис. 7. ДНК-гистограмма клеток сублиний ВНК-21/SUSP/ARRIAH (A) и ВНК-21/2-17b (B)

Fig. 7. DNA histogram of BHK-21/SUSP/ARRIAH (A) and BHK-21/2-17b (B) subline cells

Таблица 1
Сравнительный анализ жизненных циклов клеток сублиний ВНК-21/SUSP/ARRIAH и ВНК-21/2-17b по данным цитометрического исследования

Table 1
Comparative analysis of life cycles of BHK-21/SUSP/ARRIAH and BHK-21/2-17b subline cells based on cytometry data

| Стадия клеточного цикла | Доля клеток, находящихся в стадии клеточного цикла, % | | Различия в долях клеток, % |
|-------------------------|---|--------------|----------------------------|
| | ВНК-21/SUSP/ARRIAH | ВНК-21/2-17b | |
| Стадия апоптоза | 20,0–55,0 | 51,0–60,0 | 31,0–5,0 |
| G1-фаза | 30,0–75,0 | 28,0–70,3 | 2,0–4,7 |
| S-фаза | 2,0–33,0 | 1,5–30,0 | 0,5–3,0 |
| G2+M-фаза | 3,0–20,0 | 2,6–18,0 | 0,4–2,0 |

Таблица 2
Оценка ростовых свойств клеток суспензионной сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH в сравнении с данными для прототипных клеточных сублиний

Table 2
Evaluation of growth properties of suspension BHK-21/SUSP/ARRIAH subline cells in comparison with prototype cell sublines

| Сублиния клеток | Монослойное культивирование | | | | Суспензионное культивирование | | |
|-----------------|---|---------------------------------|--------------------------------|--|--|--|-------------------------------------|
| | коэффициент посева | срок формирования монослоя, сут | время сохранения монослоя, сут | количество клеток с культурального флакона, млн* | кратность прироста | концентрация клеток, млн/см ³ | количество жизнеспособных клеток, % |
| ВНК-21/13 | 1:3 | 2–3 | 3 | 40–45 | поддерживается в суспензионном состоянии** | | |
| ВНК-21/2-17b | 1:3 | 2–3 | 5 | 40–45 | 6,00–7,00 | 2,30–2,80 | 95–99 |
| ВНК-21/13-02 | 1:2–1:3 | 2–3 | 5 | 40–45 | 6,00–8,00 | до 4,00 | 95–99 |
| ВНК-21/13-13 | 1:2–1:3 | 2–3 | 5–6 | 40–45 | 6,00–8,00 | 2,40–4,00 | 95–98 |
| ВНК/SUSP/ARRIAH | низкие адгезивные свойства, клетки аморфной формы со множеством цитоплазматических выростов | | | | 6,67–11,00 | 4,00–5,50 | 96–99 |

* используется клинкий матрас с площадью рабочей поверхности 375 см² (a cultivation flask with a growth surface area of 375 cm² is used);

** подробные сведения по суспензионному культивированию [6, 10] не отражены (detailed information on suspension cultivation [6, 10] is not reflected).



Рис. 8. Изменение кратности прироста клеток сублинии BHK-21/SUSP/ARRIAH, рекультивированных после криоконсервации (указаны средние значения кратности прироста; $n = 30$, $p < 0,005$)

Fig. 8. Growth rate variations of BHK-21/SUSP/ARRIAH subline cells recultivated after cryopreservation (mean growth rate values are provided; $n = 30$, $p < 0.005$)

что для клеток линий BHK-21 нормальное значение кратности прироста соответствует 4 и выше [9, 17]. Иными словами, со 2-го пассажа клеточная линия BHK-21/SUSP/ARRIAH достигает требуемой кратности прироста клеток. Максимальное значение пролиферативной активности клеток исследуемой линии отмечается на 9-м пассаже. Следует отметить, что на 12-м пассаже кратность прироста составляла 7,02, что выше нижней нормы на 3,02 единицы. Таким образом, клеточная сублиния BHK-21/SUSP/ARRIAH быстро рекультивируется после криоконсервирования и отличается высокими показателями интенсивности пролиферации (до $10,95 \pm 0,31$) с жизнеспособностью клеток 95–99%.

Репродукция вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3 КРС и болезни Ауески в клетках сублинии BHK-21/SUSP/ARRIAH в сравнении с прототипными сублиниями (по литературным данным). В клетках перевиваемой суспензионной сублинии BHK-21/SUSP/ARRIAH провели репродукцию вируса ящура штаммов А/Турция/2006 ($n = 100$), О/Саудовская Аравия/08 ($n = 100$), Азия-1/Таджикистан/2011 ($n = 80$), вируса бешенства штаммов «ВНИИЗЖ» ($n = 40$) и «РВ-97» ($n = 40$),

вируса болезни Ауески штаммов «ВК» ($n = 40$) и «К» ($n = 40$), вируса парагриппа-3 КРС штамма «ВГНКИ-4» ($n = 50$) с целью получения вируссодержашего сырья для изготовления противовирусных вакцин (табл. 3).

Сравнительный анализ полученных результатов с данными литературы для прототипных клеточных сублиний [4, 5] показал, что вирус ящура в клетках сублинии BHK-21/SUSP/ARRIAH вызывал 95–99%-е цитопатическое действие (ЦПД) с титром инфекционной активности $7,30 \pm 0,13 - 8,00 \pm 0,21 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ($n = 280$), а в культурах клеток BHK-21/2-17b, BHK-21/13-02 и BHK-21/13-13 – с титрами до $7,00 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

При репродукции вируса бешенства в полученной сублинии клеток титр инфекционности составил от $7,25 \pm 0,20$ до $8,00 \pm 0,13 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$ ($n = 80$) с проявлением ЦПД 95–99%, а в культурах клеток BHK-21/13-02 – $6,50 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$, в BHK-21/2-17b и BHK-21/13-13 – до $7,00 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$. Вирус болезни Ауески при культивировании в культуре BHK-21/SUSP/ARRIAH вызывал ЦПД у 95–97% клеток и накапливался в пределах $7,50 \pm 0,19 - 7,80 \pm 0,15 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ($n = 80$), а вирус парагриппа-3 КРС обеспечивал ЦПД клеток на 95–98% с титром инфекционной активности до $6,00 \pm 0,15 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ($n = 50$).

Таким образом, клетки сублинии BHK-21/SUSP/ARRIAH, полученной для производства противовирусных вакцин, а также для изготовления диагностических ветеринарных биопрепаратов, позволяют осуществлять репродукцию вируса ящура с титром на $1,00 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ выше (до $8,00 \pm 0,21 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) по сравнению с аналогами (не более $7,00 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$). Предложенная сублиния обеспечивает накопление вируса бешенства с титром на $0,25 - 1,00 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$ (до $8,00 \pm 0,13 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$) выше по сравнению с прототипными линиями (не более $7,00 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$), а также получать вирусы парагриппа-3 КРС и болезни Ауески в количествах $6,00 \pm 0,15$ и до $7,80 \pm 0,15 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы биологические свойства перевиваемой суспензионной клеточной сублинии из почки новорожденного сирийского хомячка BHK-21/SUSP/

Таблица 3

Культивирование вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3 КРС и болезни Ауески в суспензионной сублинии клеток BHK-21/SUSP/ARRIAH ($p < 0,005$)

Table 3

Cultivation of FMD, rabies, bovine parainfluenza-3 and Aujeszky's disease viruses in suspension BHK-21/SUSP/ARRIAH cell subline ($p < 0.005$)

| Культивируемые вирусы | Цитопатическое действие, % | Титр инфекционной активности вируса | Количество опытов |
|--|----------------------------|--|-------------------|
| вирус ящура штамм А/Турция/06 | 95–98 | $7,30 \pm 0,13 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ | 100 |
| вирус ящура штамм О/Саудовская Аравия/08 | 95–98 | $7,80 \pm 0,23 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ | 100 |
| вирус ящура штамм Азия-1/Таджикистан/11 | 95–99 | $8,00 \pm 0,21 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ | 80 |
| вирус бешенства штамм «ВНИИЗЖ» | 95–99 | $8,00 \pm 0,13 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$ | 40 |
| вирус бешенства штамм «РВ-97» | 95–99 | $7,25 \pm 0,20 \text{ Ig ККИД}_{50}/\text{см}^3$ | 40 |
| вирус болезни Ауески штамм «ВК» | 95–97 | $7,80 \pm 0,15 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ | 40 |
| вирус болезни Ауески штамм «К» | 95–97 | $7,50 \pm 0,19 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ | 40 |
| вирус парагриппа-3 КРС штамм «ВГНКИ-4» | 95–98 | $6,00 \pm 0,15 \text{ Ig ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ | 50 |

ARRIAN и проведена оценка возможности ее применения для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3 КРС и болезни Ауески.

Определено, что сублиния клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAN при суспензионном культивировании проходит селекцию в направлении гипоплоидии: модалный класс соответствует 41 хромосоме (32–40% клеток); доля клеток с количеством хромосом 40–42 составляет 78–80%; доля полиплоидов – в среднем около 1%; пределы изменчивости хромосомного набора соответствуют диапазону от 36 до 54 хромосом.

Выявлено, что клеточная сублиния ВНК-21/SUSP/ARRIAN при суспензионном культивировании объемно-долживным способом имеет экспоненциальный характер роста клеток со снижением интенсивности пролиферации через 48 ч и кратностью прироста 6,67–11,00 при жизнеспособности клеток 96–99%.

Установлено, что клетки суспензионной сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAN при выращивании в статичных условиях проявляют низкие адгезивные свойства, имеют аморфную форму со множеством цитоплазматических микровыростов и в процессе митотического деления накапливаются в культуральной среде в суспензии.

Определено, что в клеточном цикле популяции сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAN через 48 ч преобладает G1-фаза, на которую приходится 30,0–75,0% клеток; в фазах подготовки к митозу и митотического деления (G2+M-фаза) находится от 3,0 до 20,0% всей популяции; количество крупноядерных и многоядерных клеток (> 4n) в начале и конце стадии логарифмического роста увеличивается до 2%.

Обнаружено, что клетки сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAN быстро восстанавливаются после криоконсервирования с жизнеспособностью 95–99% и кратностью прироста 3,36–5,88 на 1–3-м пассажах и 6,85–10,95 – с 4-го по 12-й пассаж.

Выявлено, что клетки суспензионной сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAN позволяют осуществлять репродукцию следующих вирусов: ящура с титрами 7,30–8,00 Ig ТЦД₅₀/см³; бешенства с титрами 7,25–8,00 Ig ККИД₅₀/см³; парагриппа-3 КРС с титром не менее 6,00 Ig ТЦД₅₀/см³; болезни Ауески с титрами 7,50–7,80 Ig ТЦД₅₀/см³.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

(п. п. 1, 13, 16, 17 см. REFERENCES)

- Манин Б. Л., Михалишин В. В., Корпусова Т. И., Стегний Б. Т., Лаврик А. А. Параметры биологической толерантности производственной клеточной культуры ВНК-21. *Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб.* Харків; 2002; 80: 404–408.
- Сокова В. В., Алиева Л. А., Бондаренко А. Ф., Худяков Г. А. Клеточная линия почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/2-17b. Авторское свидетельство № 240289 СССР. ВНИИЯИ; 1986.
- Елисеев А. К., Мельник Н. В., Зенов Н. И., Литенкова И. Ю., Богач В. Н., Иванов В. С. и др. ВНК-21/13-02-перевиваемая монослойно-суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вируса ящура и вируса бешенства. Патент № 2614074 Российская Федерация, МПК C12N 5/07 (2010.01). ФКП «Щелковский биокombинат». № 2005116301. Заявл. 31.05.2005. Оpubл. 22.03.2017. Бюл. № 9.
- Елисеев А. К., Зенов Н. И., Красуткин С. Н., Мельник Н. В., Хайкина Л. С., Литенкова И. Ю. и др. ВНК-21/13-13-перевиваемая монослойно-суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вируса ящура и вируса бешенства. Патент № 2553552 Российская Федерация, МПК C12N 5/071 (2010.01). ФКП «Щелковский биокombинат». № 2014131866/10. Заявл. 01.08.2014. Оpubл. 20.06.2015. Бюл. № 17.
- Российская коллекция клеточных культур (РККК): каталог. Под ред. Г. П. Пинаева, Г. Г. Полянской. СПб.; 2004. 315 с.

- Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. Пер. с англ. в 2-х частях. Ч. 1. М.: Мир; 1989. 692 с.
- Методы культивирования клеток: сборник научных трудов АН СССР. Отв. ред. Г. П. Пинаев. Л.: Наука; 1988. 319 с.
- Каталог Российской коллекции клеточных культур. Отв. ред. Г. П. Пинаев, Г. Г. Полянская. Омск: ОмГПУ; 1999. 429 с.
- Юрков С. Г., Зуев В. В., Сидоров С. И., Кушнир С. Д., Смыслова Н. Ю., Неверовская Н. С. и др. Каталог коллекции клеточных культур ВНИИВВиМ. Покров; 2000; 60–62. eLIBRARY ID: 21632428.
- Лозовой Д. А., Гусева М. Н., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Манин Б. Л., Шишкова А. А. и др. ВНК-21/SUSP/ARRIAN – перевиваемая суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3, болезни Ауески при производстве противовирусных вакцин, а также для изготовления диагностических и профилактических ветеринарных биопрепаратов. Патент № 2722671 Российская Федерация, МПК C12N 5/10 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2019131190. Заявл. 01.10.2019. Оpubл. 02.06.2020. Бюл. № 16.
- Полянская Г. Г. Закономерности кариотипической изменчивости в клеточных культурах при длительном культивировании в разных линиях: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб.; 2000. 38 с.
- Мамаева С. Е. Хромосомный анализ культивируемых клеток. *Методы культивирования клеток*. Л.: Наука; 1987; 78–98.
- Худрявцев И. В., Хайдуков С. В., Зурочка А. В., Черешнев В. А. Проточная цитометрия в экспериментальной биологии. Екатеринбург: УрО РАН; 2012. 192 с.

REFERENCES

- Stoker M., Macpherson I. Syrian hamster fibroblast cell line BHK-21 and its Derivatives. *Nature*. 1964; 203: 1355–1357. DOI: 10.1038/2031355A0.
- Manin B. L., Mikhailishin V. V., Korpusova T. I., Stegnyy B. T., Lavrik A. A. Biological tolerance parameters of production BHK-21 cell culture [Parameter biologicheskoy tolerantsnosti proizvodstvennoy kletochnoy kul'tury BHK-21]. *Veterinary Medicine: Inter-Departmental Subject Scientific Collection*. Kharkiv; 2002; 80: 404–408. (in Russian)
- Sokova V. V., Aliyeva L. A., Bondarenko A. F., Khudyakov G. A. BHK-21/2-17b line of newborn Syrian hamster kidney cells [Kletochnaya liniya pochki novorozhdennogo siriyskogo homyachka BHK-21/2-17b]. Certificate of Authorship No. 240289 USSR. All-Union Foot-and-Mouth Disease Research Institute; 1986. (in Russian)
- Eliseev A. K., Melnik N. V., Zenov N. I., Litenkova I. Yu., Bogach V. N., Ivanov V. S., et al. BHK-21/13-02-transplantable monolayer-suspension subline of newborn syrian hamster kidney cells, intended for FMD virus and rabies virus reproduction. Patent No. 2614074 Russian Federation, Int. C12N 5/07 (2010.01). FKP "Shchelkovskij biokombinat". No. 2005116301. Date of filing: 31.05.2005. Date of publication: 22.03.2017. Bull. No. 9. (in Russian)
- Eliseev A. K., Zenov N. I., Krasutkin S. N., Mel'nik N. V., Khajkina L. S., Litenkova I. Yu., et al. BHK-21/13-13-finite monolayer-suspension cell subline of kidney of new-born syrian hamster, intended for reproduction of foot-and-mouth disease virus and rabies virus. Patent No. 2553552 Russian Federation, Int. C12N 5/071 (2010.01). FKP "Shchelkovskij biokombinat". No. 2014131866/10. Date of filing: 01.08.2014. Date of publication: 20.06.2015. Bull. No. 17. (in Russian)
- Russian Cell Culture Collection (RCCC) [Rossijskaya kollekcija kletochnyh kul'tur (RKKK)]: catalogue. Ed. by G. P. Pinayev, G. G. Polyanskaya. St. Petersburg; 2004. 315 p. (in Russian)
- Bailey J. E., Ollis D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed. New Delhi: McGraw-Hill, Inc.; 1986. 984 p.
- Cell culture techniques [Metody kul'tivirovaniya kletok]: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR. Executive ed. G. P. Pinayev. L.: Nauka; 1988. 319 p. (in Russian)
- Catalogue of Russian Cell Culture Collection [Katalog Rossijskoj kollekcii kletochnyh kul'tur]. Executive ed. G. P. Pinayev, G. G. Polyanskaya. Омск: Омск State Pedagogical University (OSPU); 1999. 429 p. (in Russian)
- Yurkov S. G., Zuyev V. V., Sidorov S. I., Kushnir S. D., Smysova N. Yu., Neverovskaya N. S., et al. Catalogue of Cell Culture Collection of the All-Russian Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology (VNIIVViM) [Katalog kollekcii kletochnyh kul'tur VNIIVViM]. Pокров; 2000; 60–62. eLIBRARY ID: 21632428. (in Russian)
- Lozovoy D. A., Guseva M. N., Mikhailishin D. V., Doronin M. I., Manin B. L., Shishkova A. A., et al. BHK-21/SUSP/ARRIAN – continuous suspension subline of newborn syrian hamster kidney cells, intended for reproduction of foot-and-mouth disease viruses, rabies, parainfluenza-3, Aujeszky's disease in producing antiviral vaccines, as well as for making diagnostic and preventive veterinary biopreparations. Patent No. 2722671 Russian Federation, Int. C12N 5/10 (2006.01). FGBI "ARRIAN". No. 2019131190. Date of filing: 01.10.2019. Date of publication: 02.06.2020. Bull. No. 16. (in Russian)

12. Polyanskaya G. G. Karyotype variation patterns in cell cultures during long-term cultivation in different cell lines [Zakonomernosti kariotipicheskoy izmenchivosti v kletochnyh kul'turah pri dlitel'nom kul'tivirovanii v raznyh liniyah]: author's abstract of Candidate of Science (Biology) thesis. St. Petersburg; 2000. 38 p. (in Russian)

13. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* 1960; 20: 613–616. DOI: 10.1016/0014-4827(60)90138-5.

14. Mamayeva S. Ye. Chromosomal analysis of cultured cells [Хромосомный анализ культивируемых клеток]. In: *Cell culture techniques*. L.: Nauka; 1987; 78–98. (in Russian)

15. Kudryavtsev I. V., Khaydukov S. V., Zurochka A. V., Chereshev V. A. Flow cytometry in experimental biology [Protochnaya citometriya v ekspe-

perimental'noj biologii]. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (UB RAS); 2012. 192 p. (in Russian)

16. Ormerod M. G., Tribukait B., Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. *Analytical Cellular Pathology*. 1998; 17 (2): 103–110. DOI: 10.1155/1998/842306.

17. Rais Y., Zviran A., Geula S., Gafni O., Chomsky E., Viukov S., et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*. 2013; 502 (7549): 65–70. DOI: 10.1038/nature12587.

Поступила 12.03.2021

Принята в печать 05.05.2021

Received on 12.03.2021

Approved for publication on 05.05.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Гусева Марина Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шарыпов Андрей Сергеевич, кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник отдела координации научно-исследовательских работ ФГБУ ЦНМВЛ, г. Москва, Россия.

Мудрак Наталья Станиславовна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Камалова Наталья Евгеньевна, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник центра доклинических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Манин Борис Леонидович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора культуры клеток отдела инноваций ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Marina N. Guseva, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Dmitry V. Mikhailishin, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Andrey S. Sharypov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Researcher, Department for Research Coordination, FSBI CNMVL, Moscow, Russia.

Natalia S. Mudrak, Doctor of Science (Biology), Chief Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Natalia Ye. Kamalova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Centre for Preclinical Studies, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Boris L. Manin, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Sector for Cell Culture, Innovation Department, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.