



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

М. И. Доронин<sup>1</sup>, М. Н. Гусева<sup>2</sup>, Д. В. Михалишин<sup>3</sup>, А. С. Шарыпов<sup>4</sup>, Н. С. Мудрак<sup>5</sup>, Н. Е. Камалова<sup>6</sup>, Б. Л. Манин<sup>7</sup>

<sup>1-3,5-7</sup> ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

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

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

<sup>2</sup> ORCID 0000-0002-3997-3390, e-mail: guseva\_mn@arriah.ru

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

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

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

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

<sup>7</sup> 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./см<sup>3</sup> 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 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, вируса бешенства – 7,25–8,00 Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота в титрах не менее 6,00 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, вируса болезни Ауески – 7,50–7,80 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

**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. Доронин<sup>1</sup>, М. Н. Гусева<sup>2</sup>, Д. В. Михалишин<sup>3</sup>, А. С. Шарыпов<sup>4</sup>, Н. С. Мудрак<sup>5</sup>, Н. Е. Камалова<sup>6</sup>, Б. Л. Манин<sup>7</sup>

<sup>1-3,5-7</sup> FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

<sup>4</sup> FSBI "Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory" (FSBI CNMVL), Moscow, Russia

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

<sup>2</sup> ORCID 0000-0002-3997-3390, e-mail: guseva\_mn@arriah.ru

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

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

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

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

<sup>7</sup> 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/cm<sup>3</sup> 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 TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>, rabies virus – 7.25–8.00 lg CCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>, bovine parainfluenza-3 virus – at least 6.00 lg TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>, Aujeszky's disease virus – 7.50–7.80 lg TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>.

**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 TCID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>, вирус бешенства – 7,00 lg ККИД<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup> [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 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>, перевар по Хоттингеру в объеме 2–10 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>, 8 протеиногенных аминокислот, витамины и минеральные соли. Посевная концентрация клеток составляла 0,6–0,8 млн кл./см<sup>3</sup>. 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 ×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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> клеток с 20 см<sup>3</sup> культуральной ростовой среды, содержащей 10% сыворотки крови телят (посевная концентрация клеток 0,5–0,7 млн кл./см<sup>3</sup>); 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-

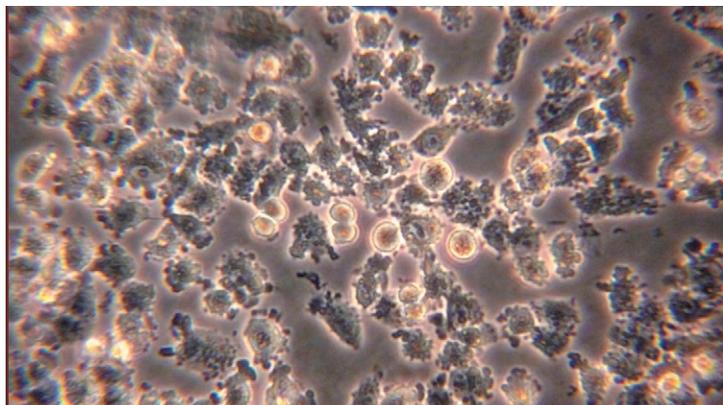


Рис. 1. Морфология клеток сублинии ВНК-21/2-17b (1-й пассаж, на момент патентования в 1986 г.; ув. ×80)

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

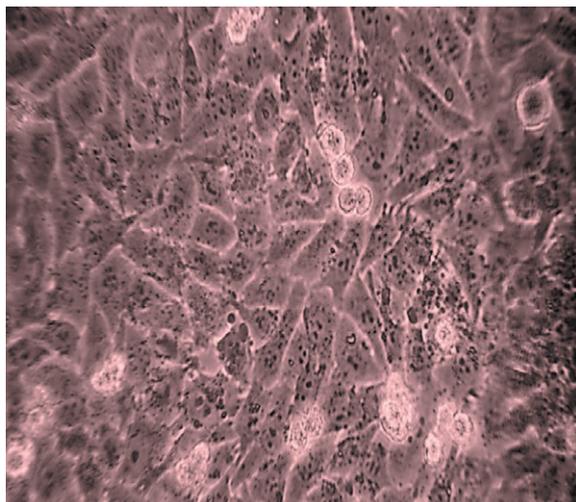


Рис. 2. Морфология клеток сублинии ВНК-21/2-17b (2-й пассив; ув.  $\times 80$ )

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.

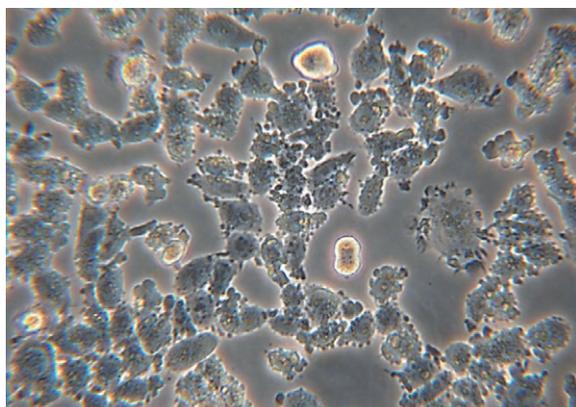


Рис. 3. Морфология клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH (ув.  $\times 80$ )

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 дм<sup>3</sup>, 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

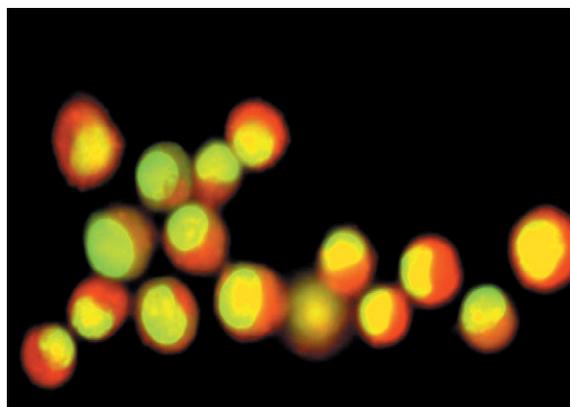


Рис. 4. Визуализация ядер суспензионных клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH при окрашивании акридиновым оранжевым

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

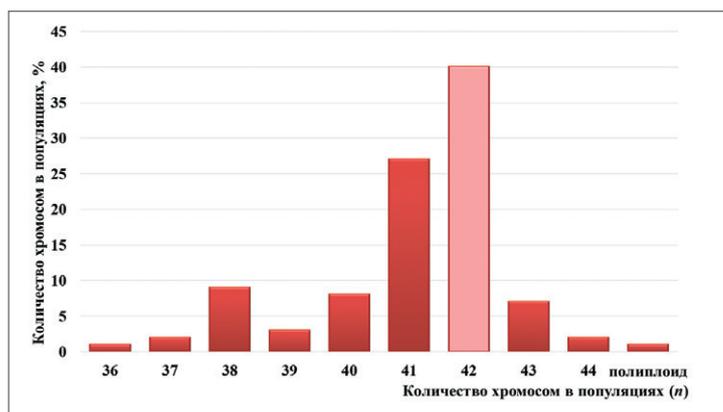


Рис. 5. Кариограмма популяции клеток сублинии ВНК-21/2-17b на момент патентования (1986 г.)

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

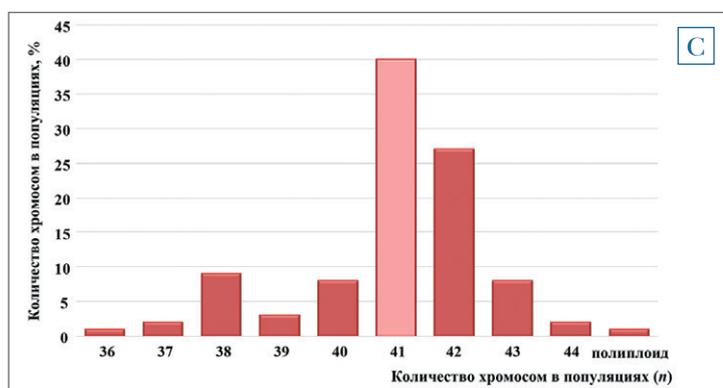
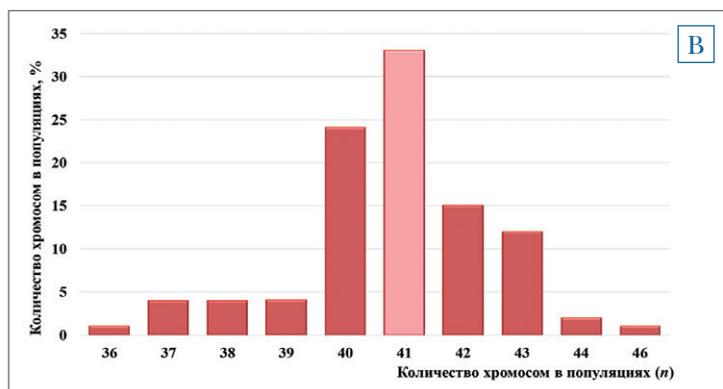
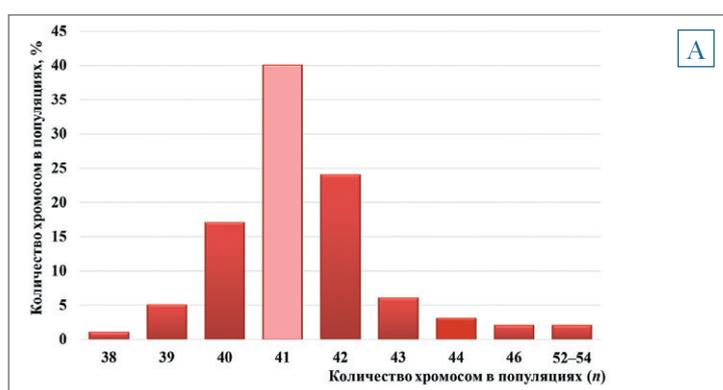


Рис. 6. Кариограмма клеток сублинии ВНК-21/SUSP/ARRIAH, выращенных в культиваторах объемом 50 (А), 250 (В), 2000 дм³ (С)

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 M-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+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%. 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+M-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./см<sup>3</sup> через 48 ч культивирования в оптимальном режиме концентрация составляет 4,0–5,5 млн кл./см<sup>3</sup>. 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  $3,36 \pm 0,21$  до  $5,88 \pm 0,15$  ( $p < 0,005$ ). Начиная с 4-го пассажа значения кратности прироста составляли от  $6,85 \pm 0,18$  до  $10,95 \pm 0,31$  ( $p < 0,005$ ). Считается,

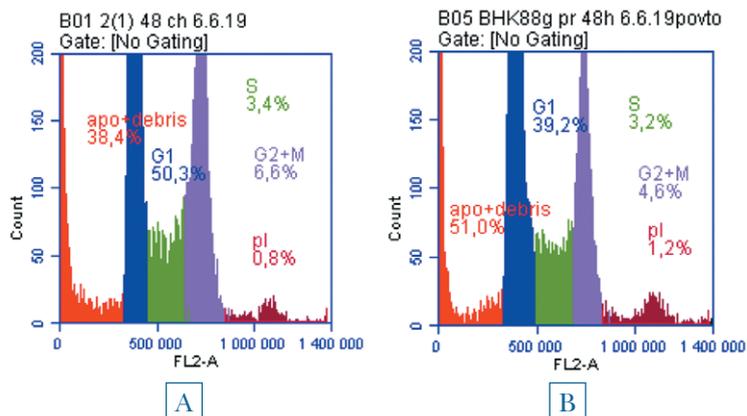


Рис. 7. ДНК-гистограмма клеток сублиний ВНК-21/SUSP/ARRIAH (А) и ВНК-21/2-17b (В)

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 <sup>3</sup>	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 см<sup>2</sup> (a cultivation flask with a growth surface area of 375 cm<sup>2</sup> 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  $7,30 \pm 0,13 - 8,00 \pm 0,21$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> ( $n = 280$ ), а в культурах клеток BHK-21/2-17b, BHK-21/13-02 и BHK-21/13-13 – с титрами до  $7,00$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

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

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  $1,00$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> выше (до  $8,00 \pm 0,21$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) по сравнению с аналогами (не более  $7,00$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>). Предложенная сублиния обеспечивает накопление вируса бешенства с титром на  $0,25 - 1,00$  Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (до  $8,00 \pm 0,13$  Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) выше по сравнению с прототипными линиями (не более  $7,00$  Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), а также получать вирусы парагриппа-3 КРС и болезни Ауески в количествах  $6,00 \pm 0,15$  и до  $7,80 \pm 0,15$  Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> 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	$7,30 \pm 0,13$ Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	100
вирус ящура штамм О/Саудовская Аравия/08	95–98	$7,80 \pm 0,23$ Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	100
вирус ящура штамм Азия-1/Таджикистан/11	95–99	$8,00 \pm 0,21$ Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	80
вирус бешенства штамм «ВНИИЗЖ»	95–99	$8,00 \pm 0,13$ Ig ККИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	40
вирус бешенства штамм «РВ-97»	95–99	$7,25 \pm 0,20$ Ig ККИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	40
вирус болезни Ауески штамм «ВК»	95–97	$7,80 \pm 0,15$ Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	40
вирус болезни Ауески штамм «К»	95–97	$7,50 \pm 0,19$ Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	40
вирус парагриппа-3 КРС штамм «ВГНКИ-4»	95–98	$6,00 \pm 0,15$ Ig ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	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: 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.

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 ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>; бешенства с титрами 7,25–8,00 Ig ККИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>; парагриппа-3 КРС с титром не менее 6,00 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>; болезни Ауески с титрами 7,50–7,80 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

## 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., Смылова 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 [Parameteri biologicheskoy tolerantnosti 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., Litenskova 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., Litenskova 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*. 2<sup>nd</sup> 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., Smylova 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.