

остеопороза, остеопении, анемии, амилоидоза, дилатационной кардиомиопатии и других патологий со стороны внутренних органов и систем.

Прогноз врожденного буллезного эпидермолиза значительно варьирует и зависит как от типа и подтипа заболевания, так и от общего состояния пациента. Пациенты, страдающие простыми доминантно-дистрофическим типами врожденного буллезного эпидермолиза, имеют, как правило, благоприятное течение болезни с сохранением социальной активности. В противоположность, пациенты, страдающие пограничным типом врожденного буллезного эпидермолиза имеют высокий риск возникновения смерти в течение первых пяти лет жизни, а пациенты с рецессивно-дистрофическим типом врожденного буллезного эпидермолиза – в молодом возрасте от метастазов плоскоклеточного рака кожи.

Таким образом, пациенты с врожденным буллезным эпидермолизом нуждаются в междисциплинарном подходе, в основе которого лежит защита чувствительной кожи от травмы с использованием разных перевязочных средств, медикаментозных и/или хирургических вмешательств с целью коррекции возможных осложнений. За последние два десятилетия достигнутые успехи в изучении патогенеза этой тяжелой врожденной патологии на молекулярно-биологическом уровне позволяют ученым возлагать большие надежды на создание новых методов, основанных на молекулярно-генной инженерии.

**К ВОПРОСУ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КУЛЬТУР
КЛЕТОК В ПРОИЗВОДСТВЕ
ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Миронова Л.Л., Конюшко О.И.,
Попова В.Д., Грачев В.П.

*Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов
им. М.П. Чумакова РАМН, Москва,
e-mail: ozherelkov@yandex.ru*

Успехи, достигнутые в борьбе с вирусными заболеваниями, во многом обязаны применению лечебно-профилактических препаратов, изготовленных на клеточных культурах. «Культуральная эра» в ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН началась с 1954 года – с диагностики эпидемии полиомиелита, с 1956 г. – крупномасштабный выпуск вакцины против полиомиелита на первичных культурах клеток почек обезьян. На этом же субстрате были созданы вакцины против кори и чумы плотоядных. В Институте параллельно готовили вакцину против клещевого энцефалита на первичных культурах куриных эмбрионов.

В 1974 году Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) предложила использовать для производства медицинских биологических препаратов (МИБП) линии диплоидных клеток (1),

а позднее и линии гетероплоидных клеток (2). К сожалению, в России до настоящего времени большая часть требуемых препаратов выпускается по-прежнему на первичных культурах клеток.

В лаборатории культур ткани Института было установлено более 100 линий перевиваемых клеток человека, обезьян, крупного рогатого скота, овец, свиней, хомяков, тхорзофреток, морской свинки, кролика. Наиболее перспективные из них сохраняются в жидком азоте.

Линии диплоидных клеток человека обладают неоспоримыми преимуществами перед всеми известными видами культур – способностью сохранять в пассажах стабильными биологические и генетические характеристики, присущие клеткам здорового донора. Стандартность свойств, экономичность и возможность предварительной оценки клеток на безопасность делают диплоидные культуры приемлемым клеточным субстратом для создания МИБП. Начало нашей работы с линиями диплоидных клеток относится к 1962 году. К 1987 г. Было установлено 29 линий диплоидных клеток человека и 4 линии обезьян. В основном линии клеток человека были получены из кожи и мышц эмбриона и одна – из легких эмбриона.

В настоящее время линии наиболее перспективным клеточным субстратом при производстве вакцин считаются линии гетероплоидных клеток. Они обладают высокой пролиферативной активностью, способны расти в промышленных биореакторах, хорошо сохраняются в жидком азоте. Высокая чувствительность гетероплоидных клеток к широкому спектру вирусов позволяет использовать культуры-продуценты, приготовленные из аттестованного банка одной линии, для получения различных вакцин. Нами установлены следующие линии: 455 – из клеток селезенки взрослой зеленой мартышки, 2688 С – из семенников новорожденной зеленой мартышки, 2688 П – из почек той же обезьяны, 2688 М – из мозга того же животного, 4179 – из клеток сердца и языка эмбриона зеленой мартышки, 4647 – из клеток почек взрослой зеленой мартышки, 4921 – из кожи и мышц эмбриона зеленой мартышки, 10251 – из мозжечка зеленой мартышки, 4184 – из клеток почек эмбриона овцы, Таурис 1-3 – из почек теленка.

В результате некачественного хранения культур в криобанке часть линий была утеряна. Теперь мы располагаем 11 линиями диплоидных клеток человека, 1 линией диплоидных клеток зеленой мартышки и 12 линиями гетероплоидных клеток животных. Все оставшиеся линии были обследованы в соответствии с рекомендациями ВОЗ к вакцинным субстратам и полностью им удовлетворяют. Две линии М-22 и 4647 прошли национальное лицензирование. Линию М-22 разрешено использовать для выпуска всех видов медицинских препаратов, а линию 4647 – для получения инактивированных вакцин.

Характеристика линии М-22. Линия клеток М-22 получена из кожи и мышц 8-недельного эмбриона, выделенного путем аборта от здоровой женщины 32 лет, в анамнезе которой не было онкологических, венерических, генетических заболеваний и врожденных аномалий, а также гепатита и туберкулеза. В фазе становления культура характеризовалась неоднородностью клеточного состава и была представлена фибробластоподобными и эпителиоподобными клетками. К 4-5 пассажам культура стала мноморфной и состояла из фибробластоподобных клеток. Лишь со вступлением в фазу старения вновь появились клетки различной морфологии – полигональные и гипертрофированные. Время жизни линии М-22 вне организма составляет 70 пассажей и складывается из трех фаз: становление – на уровнях 1-3 пассажей, активного роста – на уровнях 4-39 пассажей и старения – на уровнях 40-70 пассажей. При анализе 4000 метафаз, по 1000 метафаз на уровнях 12, 20, 32, 40 пассажей, установлено, что диплоидный набор хромосом имеют 89,7; 92,0; 89,7; 82,0% метафаз соответственно. Полиплоидные метафазы составляют 1,0; 2,3; 1,7; 1,6%, гипоплоидные – 9,2; 5,3; 6,9; 4,7%, гиперплоидные – 0,1; 0,4; 0,2; 0,1%, разрывы – 0,3; 0,5; 0,2; 0,2%, пробелы – 1,7; 0,5; 1,3; 0,3% в той же последовательности.

При обследовании М-22 на стерильность (наличие грибов, бактерий, микоплазм, вирусов) получены отрицательные результаты на уровнях 10, 20, 24, 30, 33, 40 и 42 пассажей. При исследовании культуральных жидкостей и самих клеток на уровнях 10, 20, 30 и 40 пассажей в чувствительных клеточных системах, а также в реакциях гемдсорбции вирусы-контаминанты не обнаруживались. При обследовании клеток М-22 на тех же уровнях пассажей в опытах на взрослых и сосунках белых мышей, кроликах, морских свинках, куриных эмбрионах, иммунодепрессированных мышцах линии СВА посторонних агентов также не установлено. Онкогенная активность клеточной линии М-22 не выявлена и в опытах *in vitro* в органной культуре кожи куриного эмбриона.

Изучение изоферментов в клетках линии М-22 выявляет энзимограмму человека и Г6-ФДГ медленного типа. Клетки линии М-22 сохраняют жизнеспособность при длительном хранении в жидком азоте – порядка 70%.

Линия М-22 чувствительна к заражению вакцинными штаммами А. Сэбина вируса полиомиелита. Титр вируса типа I на уровне 16 пассажа равен 7,74 Ig БОЕ/мл, а на уровне 20 пассажа – 7,71, соответствующие показатели для II типа 7,60 и 7,75, а для III типа – 7,63 и 7,65. Клетки линии М-22 также чувствительны к заражению вирусами из групп ЕСНО, Коксаки, рино-. Титр вируса ЕСНО-11 составлял $10^{7,5}$ ТЦД₅₀/мл, а рино – $7 \cdot 10^7$ ТЦД₅₀/мл.

На линии М-22 приготовлены экспериментальные серии живой коревой вакцины с

вакцинным штаммом ЭШЧ. На клетках линии М-22 активно размножается отечественный вакцинный штамм краснухи «Орлов-Д», вакцинные штаммы Сэбина вируса полиомиелита, клещевого энцефалита. Линия М-22 успешно применяется для лечения ожоговых ран в НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (Патент на изобретение № 2373944 от 27.11.09).

Характеристика линии 4647. Линия клеток 4647 получена в 1974 г. из почек взрослой зеленой мартышки. Линия 4647, названная по регистрационному номеру обезьяны, была использована в производстве живой полиовакцины и контрольные культуры были обследованы на отсутствие контаминантов. Сама линия 4647 установлена из контрольных культур в результате первого пассажа на 24 сутки после эксплантации. При получении линии перевиваемых клеток пассировали первичные культуры 144 обезьян, также прошедших контроль. Только одна попытка оказалась успешной, когда была получена линия 4647 (3). В 1983 году был создан банк посевных клеток на 90 пассаже с всесторонним изучением их свойств. Для изучения банка клеток были восстановлены клетки на уровне 90 пассажа и проведены 40 последовательных пассажей. После криоконсервирования жизнеспособность клеток составляла $82,5 \pm 3,4\%$. Индекс пролиферации на уровнях 101-123 пассажей составлял 3,2-2,9. Число популяционных удвоений колебалось от 1,3 до 1,66, время генерации – 43,6-63,2 часа. При гистологическом изучении линии на уровнях 103-127 пассажей отмечен плотный, ровный монослой, состоящий из полигональных эпителиоподобных клеток, содержащих округлые ядра, преимущественно с 2-3 ядрышками и мелкими глыбками хроматина. Отмечалась обычная локализация и содержание ДНК и РНК, мелкие глыбки гликогена, а также щелочной и кислой фосфатаз. Цитоплазматических и внутриядерных включений не выявлено. При электронномикроскопическом исследовании никаких посторонних образований не обнаружено. Аналогичные данные были получены в опытах на чувствительных культурах клеток и животных. Наличие онкогенных потенциалов посевного банка клеток исследовано в системе *in vivo* на иммуносупрессированных мышцах линии СВА и в системе *in vitro* в органной культуре кожи куриного эмбриона. Видовая принадлежность клеток посевного банка определена с помощью биохимического исследования и кариологического анализа. Энзимограммы изоферментов глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) линии 4647 показали, что клетки имеют Г-6-ФДГ, обладающую подвижностью типа А (быстрая форма), и 5 изоформ ЛДГ, характерных для клеток зеленых мартышек. Кариологическое исследование банка было проведено на 96, 105, 115 и 130 уровнях пассажей. Установлено, что

кариотип идентичен кариотипу зеленой мар- тышки, модальный класс представлен 120 хро- мосомами. Анализ 200 метафазных пластинок выявил, что количество тетраплоидных клеток составляет 44-48%, гиперплоидных – 34-40%, диплоидных – 10-16%, гипоплоидных – 4-6%. В клетках линии 4647 хорошо размножаются аде- но-, цитомегаловирус обезьян, пенящий вирус, вирус простого герпеса, вакцинные вирусы без- шенства, клещевого энцефалита, чумы плотояд- ных, вакцинные штаммы вируса полиомиелита и многие энтеровирусы, кори, паротита. Спе- цифичность цитопатических изменений ряда ви- русов была подтверждена с помощью непрямо- го метода флюоресцирующих антител.

Таким образом, созданный банк линии 4647 полностью удовлетворяет рекомендациям ВОЗ. Отмечено, что все изученные характеристики клеток оставались стабильными в течение сро- ка наблюдений (40 пассажей). Показано, что линия 4647 свободна от посторонних агентов, не обладает онкогенной активностью, чувстви- тельна к заражению различными вирусами, в том числе к ряду вакцинных штаммов. С ис- пользованием клеток 4647 выпущены производ- ственные серии вакцины против чумы плотояд- ных. Созданы экспериментальные серии вакцин против полиомиелита, клещевого энцефалита, диагностикумы клещевого и японского энцефа- литов, лимфоцитарного хориоменингита.

В ГНЦ ВБ «Вектор» приготовлена вакци- на против гепатита А «Геп-А-инВАК». Здесь же запланировано производство рекомбинант- ной бивакцины против натуральной оспы и

гепатита В. Группа авторов (12 человек) сооб- щила о создании посевного и рабочего банков культуры клеток 4647. Показано, что культура клеток в составе этих банков имеет высокую пролиферативную активность, типичную для линии 4647 морфологию, биологические свой- ства и характерные для клеток африканской зеленой мартышки кариотип и энзимограмму. Линия не контаминирована бактериями, гриба- ми, микоплазмами, вирусами, в том числе и он- когенными. Планируется использование реком- бинантного штамма вируса вакцины в 7, 5S2-S и гепатита В перорального применения (в табле- тированной форме) (4).

Таким образом, мы владеем потентным кри- обанком культур клеток человека и животных, которые могут быть успешно применены в ши- рокой вирусологической практике. Неудовлет- ворительное использование имеющихся линий клеток наносит, на наш взгляд, необъяснимый ущерб национальному здравоохранению и за- медляет прогресс в деле разработки методов диагностики и средств для профилактики вирус- ных инфекций.

Список литературы

1. Всемирная Организация Здравоохранения // Серия технических докладов. – 1984. – 673 № 32. – С. 68-74.
2. Всемирная Организация Здравоохранения. Серия технических докладов. № 771. Женева, 1991. С. 12.
3. Миронова Л.Л., Хапчаев Ю.Х. Линия гетероплоид- ных клеток 4647: изучение, применение, перспективы. – М., 1994.
4. Скарнович М.О., Радаева И.Ф. Вдовиченко Г.В. и др. Культура клеток 4647 для производства рекомбинантной бивакцины против натуральной оспы и гепатита // Вопросы вирусологии. – 2007. – №2. – С. 37-41.

Фармацевтические науки

О ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НЕГОРМОНАЛЬНЫХ СРЕДСТВ В ТЕРАПИИ ПСОРИАЗА

Подгорнов В.В., Подгорнова Е.С.

*Лечебно-профилактическое учреждение поликлиника
Томского научного центра Сибирского отделения
Российской академии наук, Томск;
Муниципальное лечебно-профилактическое
учреждение «Поликлиника №10», Томск,
e-mail: pvv131@yandex.ru*

Несмотря на большое количество наружных средств для терапии псориаза, проблема лече- ния данного дерматоза остаётся по-прежнему актуальной. Известно, что псориаз – одно из наиболее распространённых кожных заболе- ваний, которым страдают от 1-5% населения Земли. Хроническое течение, частое рецидивирова- ние являются основанием для применения различных методов терапии, среди которых важное значение имеет наружное применение медикаментозные средства.

Целью настоящего исследования явилось изу- чение клинической эффективности нового пре- парата крема «Акрустал» для лечения псориаза.

Крем «Акрустал» ООО «Парацельс» (г. Ека- теринбург – г. Томск) представляет собой на- туральный, не содержащий кортикостероидных гормонов лекарственный препарат, в состав которого входят: масло кедровое, эвкалипта, тыся- челистника; масляный экстракт ромашки, кален- дулы, шиповника, зародышей пшеницы; экстракт солодки, можжевельника, алоэ; мёд натуральный, воск пчелиный, солидол жировой и т.д. Разработ- чиками крема запатентованы новые уникальные технологии на способ экстракции растительного сырья (патенты №№ 2232026, 38113, 2281109).

Материалы и методы. Наше исследование проводилось на базе МЛПУ «Поликлиника №10» г. Томска. Подбор больных в группу наблюдения осуществлялся в соответствии со следующими критериями включения: возраст 18-75 лет; диагноз – вульгарный (обыкновенный) псориаз, стационарная стадия; процесс на коже носил ограниченный или распространённый характер, лёгкая или средняя степень тяжести заболевания; письменное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: повышенная чув- ствительность к составляющим компонентам