

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-324>

УДК 576.524



ОПТИМИЗАЦИЯ НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТочНЫХ ЛИНИЙ VERO И HEK293

И.И. Тузова[✉], Т.И. Чиркина, И.А. Чуркин, А.Н. Лях, К.М. Мефёд, В.А. Максимов

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Введение. Нарботка в лабораториях вирусного материала в малых количествах, как правило, проводится с использованием адгерентных линий и культуральных флаконов различной площади. Необходимость увеличения выхода продукта приводит или к увеличению количества флаконов, или смене системы накопления, например на роллерные бутылки. Одним из факторов, оказывающих влияние на эффективность адгезии клеток и формирование однородного монослоя, является частота вращения роллерной бутылки. При этом отмечено небольшое количество исследований, касающихся оценки влияния частоты вращения и определения ее оптимального показателя, особенно на основе морфологии клеток.

Цель. Оптимизировать начальный этап роллерного культивирования клеточных линий Vero и HEK293 с учетом влияния частоты вращения роллерной бутылки на прикрепление клеток при посеве и формирование монослоя.

Материалы и методы. Для проведения экспериментальной работы были использованы 2 монослойные клеточные линии: Vero и HEK293. Посевные концентрации были взяты из паспортов клеточных линий и составляли 4×10^4 кл/см². Клеточную линию засеивали на роллерные бутылки и культивировали согласно диапазону частот вращения 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 и 0,6 об/мин с использованием роллерной установки Celrol Mid, Wiggens в CO₂-инкубаторе D180, RWD. Через 1, 2 и 3 сут культивирования оценивали качество прикрепления клеток к ростовой поверхности и формирование монослоя путем просмотра под микроскопом TC5400, Meiji Techno.

Результаты. При культивировании клеточной линии Vero частота вращения до 0,6 об/мин не оказывала значительного влияния на адгезию клеток к поверхности. Наиболее равномерное расположение клеток наблюдали при частоте вращения 0,4–0,5 об/мин. Культура клеток HEK293 более чувствительна к механическим воздействиям питательной среды, и при частоте вращения свыше 0,2 об/мин наблюдали атипично округлые формы клеток и нарушение полноценного их прикрепления к ростовой поверхности. При этом дальнейшее культивирование на данной частоте вращения не приводило к формированию однородного монослоя из-за медленного чередования «фазы дыхания» и «фазы питания». Следовательно, после прикрепления клеток к поверхности необходимо увеличение частоты вращения роллерной бутылки.

Выводы. Для клеточной линии Vero оптимальной частотой вращения является 0,4–0,5 об/мин, для клеточной линии HEK293 в первые сутки необходимо устанавливать 0,2 об/мин, а через сутки увеличить до 0,5 об/мин. Апробированные условия культивирования позволяют выращивать данные клеточные линии для наработки вирусной биомассы.

Ключевые слова: культуры клеток; культивирование клеток; адгерентные культуры; клеточная линия Vero; клеточная линия HEK293; роллерные бутылки; роллерное культивирование; адгезия; формирование монослоя; морфология клеток; наработка клеточной биомассы

Для цитирования: Тузова И.И., Чиркина Т.И., Чуркин И.А., Лях А.Н., Мефёд К.М., Максимов В.А. Оптимизация начального этапа культивирования клеточных линий Vero и HEK293. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2026;28(1):61–68. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-324>

Финансирование: работа выполнена без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики: исследование не требовало заключения локального биоэтического комитета. В работе использованы клеточные линии HEK293 и Vero, предоставленные Институтом синтетической биологии и геной инженерии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Тузова Ирина Игоревна Ituzova@cspfmba.ru

Статья поступила: 04.06.2025 **После доработки:** 03.09.2025 **Принята к публикации:** 01.10.2025 **Online first:** 27.10.2025

OPTIMIZATION OF INITIAL CULTURE STAGE OF VERO AND HEK293 CELL LINES

Irina I. Tuzova[✉], Tatyana I. Chirкина, Igor A. Churkin, Anastasia N. Lyakh, Kirill M. Mefed, Vladimir A. Maximov

Centre for Strategic Planning of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia

Introduction. Laboratory production of viral material in small quantities is performed, as a rule, using adherent cell lines and culture flasks of varying surface area. The need to increase product yield leads to either an increase in the number of flasks or a switch to other accumulation systems, such as roller bottles. One factor influencing the efficiency of cell adhesion and homogeneous monolayer formation is the rotation frequency of the roller bottle. There is a lack of available research data on the impact of rotation frequency on these parameters and determination of its optimal value, particularly based on cellular morphology.

Objective. To optimize the initial stage of roller cultivation for Vero and HEK293 cell lines, taking into account the effect of roller bottle rotation frequency on cell adhesion during seeding and monolayer formation.

Materials and methods. Experiments were conducted using two monolayer cell lines, Vero and HEK293. Seeding concentrations were taken from the cell line passports, amounting to 4×10^4 cells/cm². Each cell line was seeded onto roller bottles and cultured according to the range of rotation frequencies (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 rpm) using a Celrol Mid roller (Wiggens) in a RWD D180 CO₂ incubator. Following 1, 2, and 3 days of cultivation, the quality of cell adherence to the growth surface and monolayer formation was assessed by a TC5400 microscope (Meiji Techno).

© И.И. Тузова, Т.И. Чиркина, И.А. Чуркин, А.Н. Лях, К.М. Мефёд, В.А. Максимов, 2025

Results. During cultivation of the Vero cell line, the rotation frequency up to 0.6 rpm did not significantly affect cell adhesion to the surface. The most homogenous cell distribution was observed at rotation frequencies of 0.4–0.5 rpm. The HEK293 cell culture is more sensitive to mechanical disturbances of the nutrient medium; as a result, at rotation frequencies above 0.2 rpm, abnormally rounded cell shapes and impaired adherence to the growth surface were observed. Furthermore, continued cultivation at this rotation frequency did not lead to the formation of a homogenous monolayer due to slow alternation between the respiration and nutrition phases. Consequently, after cell adherence to the surface, the rotation frequency of the roller bottle should be increased.

Conclusions. For the Vero cell line, the optimal rotation frequency was established to be 0.4–0.5 rpm. For the HEK293 cell line, the rotation frequency should be at least 0.2 rpm during the first day followed by its increase to 0.5 rpm after 24 h. The tested cultivation conditions enable an efficient growth of these cell lines for the production of viral biomass.

Keywords: cell cultures; cell cultivation; adherent cultures; Vero cell line; HEK293 cell line; roller bottles; roller cultivation; adhesion; monolayer formation; cell morphology; cell biomass production

For citation: Tuzova I.I., Chirkina T.I., Churkin I.A., Lyakh A.N., Mefed K.M., Maximov V.A. Optimization of initial culture stage of Vero and HEK293 cell lines. *Extreme Medicine*. 2026;28(1):61–68. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-324>

Funding: the study was carried out without sponsorship.

Compliance with the ethical principles: the study did not require approval from a local bioethics committee. HEK293 and Vero cell lines were provided by the Institute of Synthetic Biology and Genetic Engineering of Centre for Strategic Planning of FMBA.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Irina I. Tuzova ITuzova@cspfmba.ru

Received: 4 June 2025 **Revised:** 3 Sep. 2025 **Accepted:** 1 Oct. 2025 **Online first:** 27 Oct. 2025

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время подавляющее большинство биотехнологических процессов основано на использовании адгерентных линий клеток, таких как MRC5, Vero, MDCK и HEK293, в качестве субстратов для накопления вирусов [1].

Линия клеток Vero была получена в 1962 году из клеток почек самки африканской зеленой марышки и является перевиваемой клеточной линией, подходящей для продолжительного культивирования без приобретения туморогенных свойств [2]. В связи с низким уровнем экспрессии интерферона и биологической безопасностью данная клеточная линия является первой клеточной линией, одобренной Всемирной организацией здравоохранения для использования в качестве субстрата для вакцин и не теряющей с тех пор своей значимости [3].

Клеточная линия HEK293 представляет иммортализованные клетки почки из абортированного эмбриона человека фрагментом генов аденовируса 5. В связи с этим использование HEK293 в качестве субстрата — накопителя рекомбинантных белков, требующих посттрансляционных модификаций, особенно актуально. Наличие встроенных генов *E1A* и *E1B* в 19 хромосому позволяет получать рекомбинантные аденоассоциированные частицы. В отличие от клеточной линии Vero, HEK293 склонна к геномной нестабильности [4, 5].

Потребность в быстром получении большого объема биомассы субстрата накопления антигена может быть связана с рядом причин как экономического, так и социального характера. Пандемия SARS-CoV-2 наглядно показала такую острую необходимость, когда потребность в больших количествах разработанных, в том числе *de novo*, профилактических биопрепаратах приобрела первостепенную значимость [6, 7].

Одной из основных задач при использовании монослойных клеточных линий в промышленных масштабах является увеличение количества получаемой биомассы клеток [8]. Существуют 4 способа выращивания

больших объемов клеточных культур: стационарный [9], динамичный [10], суспензионный [10, 11] и использование микро- и макроносителей [10, 12].

Преимуществами роллерного (динамичного) способа культивирования по сравнению с другими являются:

- экономичное использование питательной среды и других реагентов при более высоком титре получаемого вирусосодержащего материала на единицу объема по сравнению с культивированием в матрасах и клеточных фабриках: увеличение площади ростовой поверхности в несколько раз обусловлено ребристыми стенками сосуда при сохранении относительно компактного размера культуральной бутылки и незначительном увеличении объема используемой среды; производителем рекомендовано заполнение роллерной бутылки (1900 см²) 300–400 мл питательной среды, а в роллерном флаконе такого же объема, но с гладкими стенками (площадью 850 см²) — до 250 мл, таким образом более чем двукратное увеличение площади приводит к увеличению объема среды менее чем в 1,5 раза;
- меньшая стоимость необходимого оборудования для получения биомассы, особенно при использовании роллерных установок, которые помещаются в стандартный CO₂-инкубатор или термостат, по сравнению с системами культивирования с использованием биореакторов и макроносителя;
- количество выполняемых персоналом операций при работе с роллерами соответствует количеству при работе с культуральными матрасами, но при этом площадь ростовой поверхности значительно больше [13].

Несмотря на то что частота вращения является одним из важнейших факторов, влияющих на прикрепление клеток и формирование монослоя [14], исследований по данной теме недостаточно. В рамках разработки методики культивирования вируса бешенства на клеточной культуре Vero с использованием роллерных бутылок приведены данные, которые указывают

на косвенную связь между частотой вращения и качественной адгезией клеток к ростовой поверхности, не оценивая при этом изменение морфологии клеток на этапах культивирования, а только используя индекс пролиферации. Приведенное исследование скорее отражает оценку влияния частоты вращения на итоговое количество клеток и интенсивность деления клеток [15]. Для клеточной линии HEK293 упомянут конкретный протокол культивирования: 0,25 об/мин с последующей сменой до 1 об/мин для проведения трансфекции аденоассоциированным вирусом, причем не указаны обоснования изменения диапазона частот вращения [16].

Следует отметить, что сведения об определении оптимальной частоты вращения при культивировании, ее влиянии на адгезию клеток на начальном этапе роста, а также на увеличение роста биомассы клеток и ее итоговое количество представлены ограниченно.

Цель работы — оптимизация начального этапа роллерного культивирования клеточных линий Vero и HEK293 с учетом влияния частоты вращения роллерной бутылки на прикрепление клеток при посеве и формировании монослоя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали клеточные линии HEK293 и Vero, предоставленные Институтом синтетической биологии и геной инженерии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. В качестве сосуда для культивирования применяли роллерные бутылки с площадью ростовой поверхности 2125 см² (максимальный объем 2300 мл, диаметр 122 мм, ребристые стенки, TC-treated полистирол; производитель Greiner) и культуральные флаконы с площадью 175 см² (TC-treated полистирол, ServiceBio, Китай).

В качестве питательной среды для клеточной линии HEK293 была применена среда Игла, модифицированная по Дульбекко (ServiceBio, Китай), с добавлением 10 мл антибиотика пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Российская Федерация) на 1 л готовой среды, 1% по объему раствор GlutaMAX (Gibco, Великобритания) и 10% фетальная бычья сыворотка (Capricorn, Великобритания).

Для клеточной линии Vero использовали среду Игла с солями Эрла («ПанЭко», Российская Федерация) с добавлением 1% гентамицина сульфата («ПанЭко», Российская Федерация), 146 мг глутамин («ПанЭко», Российская Федерация) и 7,5% заменителя сыворотки эмбриональной FetalClone III (HyClone, Соединенные Штаты Америки).

В процессе исследования начальные посевные концентрации для обеих исследуемых клеточных линий, определенные согласно рекомендациям данным в паспортах клеточных культур, являлись одинаковыми и составляли 4×10^4 кл/см², или $2,13 \times 10^5$ кл/мл. Клеточную суспензию добавляли в количестве $85 \times 10^6 \pm 10\%$ клеток на роллерную бутылку. Объем полной питательной среды в роллерной бутылки составлял 400 мл (рабочий объем согласно рекомендациям производителя). Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе D180, RWD с использованием роллерной установки Centrol Mid (WIGGENS)

на постоянных частотах вращения 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 и 0,6 об/мин. Указанные диапазоны выбраны на основании ранее проведенных исследований по культивированию различных клеточных линий в роллерных бутылках [15, 16]. Оценивали наличие прикрепленных клеток, их морфологию, формирование монослоя с помощью микроскопа TC5600 и TC5400 (Meiji Techno, Япония) при увеличении объектива $\times 10$, окуляра $\times 10$.

Итоговое количество клеток определяли с использованием счетчика и анализатора жизнеспособности клеток C200FL RWD (Life Science, Китай). Предварительно клетки диссоциировали 0,25% раствором трипсина («ПанЭко», Российская Федерация) и ресуспензировали в питательной среде, состав которой описан ранее для каждой из культур клеток. Пробу клеточной суспензии разводили с 0,4% трипановым синим (AbiDye, Российская Федерация) в соотношении 1:1. Подсчет производили трижды и высчитывали среднее значение концентрации клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы при культивировании клеточной линии Vero на частоте вращения роллерной бутылки 0,2–0,5 об/мин на 1 сут адгезия клеток наблюдалась во всех исследуемых роллерных бутылках: более 90% посеянных клеток прикрепилась, при частоте вращения 0,6 об/мин клетки в меньшей степени прикреплялись к ростовой поверхности пластика, в результате чего монослой не соответствовал критериям качества из-за его неоднородности и невозможности использования для наработки вирусного материала. Критерии качества включали наличие полноценного монослоя клеток без выраженной зернистости в светлом поле микроскопа, отсутствие дефектов на поверхности монослоя и многослойного роста клеток с заполнением пространства для роста. Такого рода высокая способность к адгезии клеток обусловлена достаточно высокой экспрессией интегринов и связана с особенностями тканевого происхождения: клетки эпителиальной ткани плотно располагаются между собой и образуют слои.

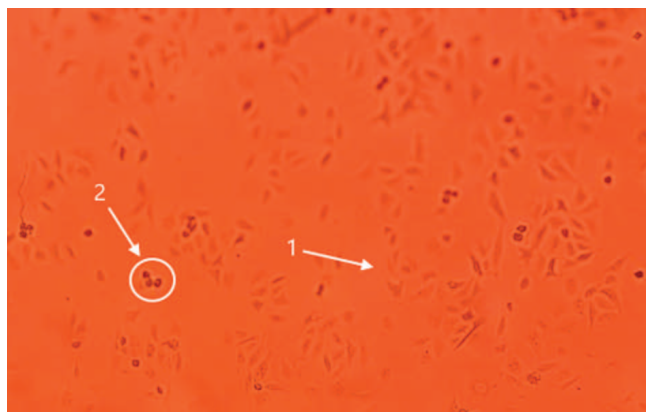
Клетки сохраняли типичную морфологию в соответствии с изображением в паспорте клеточной линии. Хотя тенденция к формированию монослоя наблюдалась на частотах вращения 0,2–0,5 об/мин, на 2 и 3 сут культивирования при частоте вращения 0,2 об/мин на его поверхности было отмечено довольно большое образование конгломератов клеток. При частоте вращения в диапазоне 0,3–0,4 об/мин количество конгломератов клеток на поверхности монослоя снижалось пропорционально увеличению частоты вращения. При этом на частоте вращения 0,5 об/мин замечено, что конгломераты клеток не находятся на поверхности, а плавают в толще среды. Данное явление показывает, что при увеличении частоты вращения (более быстрое чередование «фазы питания» и «фазы дыхания») создаются более оптимальные условия для роста клеток, однако при скорости вращения свыше 0,5 об/мин поток культуральной среды, индуцированный силой гравитации и вращением роллерной установки, может затрагивать конгломераты клеток, которые затем открепляются от поверхности.

Для наибольшей наглядности нами сделаны фотографии клеток линии Vero при частоте вращения роллерной установки 0,5 об/мин, отражающие процесс формирования монослоя при культивировании (рис. 1). Цветовой фон у фотографий отличается в связи с различной настройкой светодиода (встроенного блока светофильтров) у используемого микроскопа при фотографировании, а также из-за изменения цвета фенолового красного в составе питательной среды при кислотном pH.

На рисунке 1 представлено изображение клеток через 5 ч после засева, которые в большей степени уже прикрепилась к ростовой поверхности пластика и приобрели типичную полигональную морфологию.

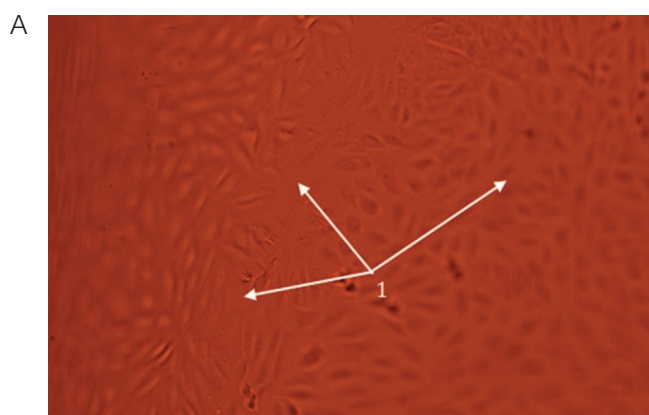
На рисунке 2 представлен процесс формирования монослоя в процессе культивирования. Наблюдали постепенное заполнение клетками ростового пространства и уплотнение межклеточных контактов в связи с ограниченным пространством для роста.

В связи с тем что поверхность роллера ребристая и наблюдается размытие фокуса ближе к краям поля зрения, показать развивающийся монослой полностью в 1 кадре не представляется возможным.



Фотография выполнена авторами

Рис. 1. Прикрепление клеток линии Vero через 5 ч культивирования при частоте вращения роллерной бутылки 0,5 об/мин: 1 — клетки, прикрепившиеся к поверхности; 2 — плавающие клетки; увеличение $\times 100$



Фотография выполнена авторами

Рис. 2. Формирование монослоя клеточной линии Vero на 1 сут (А) и 2 сут (Б) культивирования при частоте вращения роллерной бутылки 0,5 об/мин: 1 — участки ростовой поверхности пластика; 2 — плотные контакты между клетками; увеличение $\times 100$

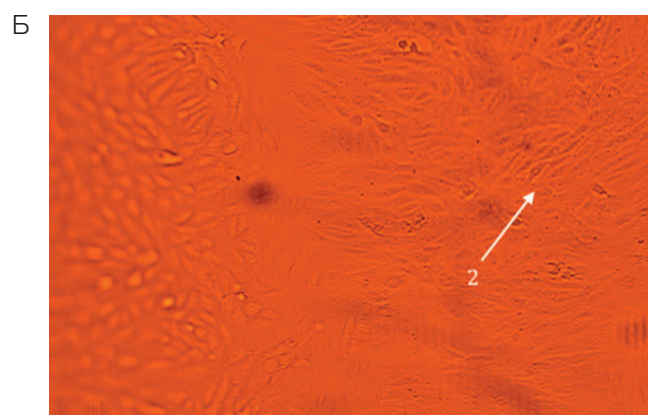
После культивирования в течение 3 сут был получен плотный монослой с конfluентностью более 90% (рис. 3), при этом скопления конгломератов клеток и признаков деградации монослоя не наблюдалось.

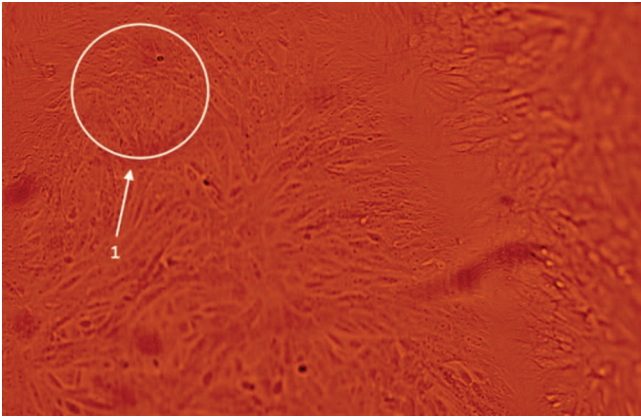
Таким образом, частота вращения роллерной бутылки 0,4–0,5 об/мин обеспечивала нормальный рост клеточной культуры ввиду того, что формирование монослоя было сопряжено с наименьшим образованием конгломератов клеток. Клетки прикреплялись и росли более равномерно, а формирующийся монослой не деформировался. Согласно данным литературы [15], клетки действительно лучше прикрепляются на частоте вращения в диапазоне 0,4–0,5 об/мин и увеличения частоты вращения после начала формирования монослоя не требуется. При культивировании клеточной линии Vero в диапазоне значений pH от 7,0 до 7,4 значимых различий в адгезии клеток к ростовой поверхности не отмечено. Колебания температуры в пределах ± 2 °C от стандартной (37 °C) при культивировании клеточной линии Vero также не оказывали значительного влияния на прикрепление клеток.

При использовании выбранной нами оптимальной частоты вращения роллерной бутылки при культивировании выход клеточной биомассы достигал $386 \times 10^6 \pm 10\%$ клеток в 1 роллерной бутылки.

Для клеточной линии HEK293 при посеве наблюдали адгезию на частоте вращения от 0,1 до 0,4 об/мин, что указывало на меньшую способность клеток к адгезии по сравнению с клеточной линией Vero и большую чувствительность к механическим внешним воздействиям вследствие генетических особенностей и иной тканевой принадлежности. На частоте вращения 0,2 об/мин клетки соответствовали типичной морфологии: уплощенная, слегка вытянутая форма с наблюдаемыми отростками (рис. 4).

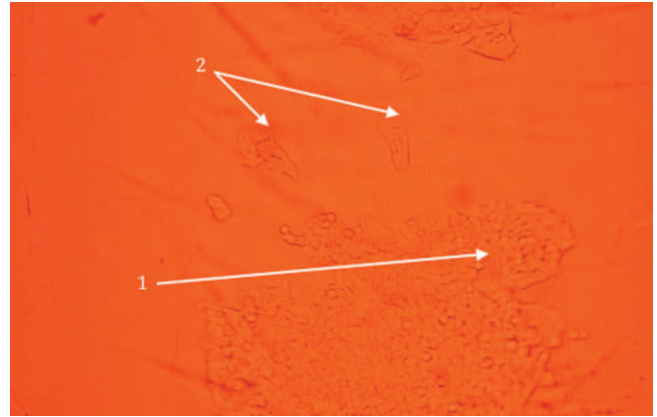
При культивировании клеток линии HEK293 в течение 6 ч на частоте вращения роллерной бутылки 0,4 об/мин клетки приобретали атипичную морфологию (рис. 5). Их форма оставалась округлой, несмотря на прикрепление к ростовой поверхности, и при делении в дальнейшем формировались небольшие точечные скопления клеток. Предположительно данное явление связано с достаточно сильным механическим воздействием культуральной среды, которая





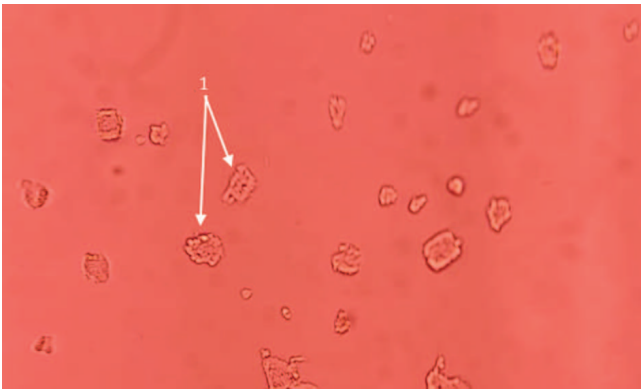
Фотография выполнена авторами

Рис. 3. Сформированный монослой клеточной линии Vero через 3 сут культивирования при частоте вращения роллерной бутылки 0,5 об/мин: 1 — плотный монослой клеток; увеличение $\times 100$



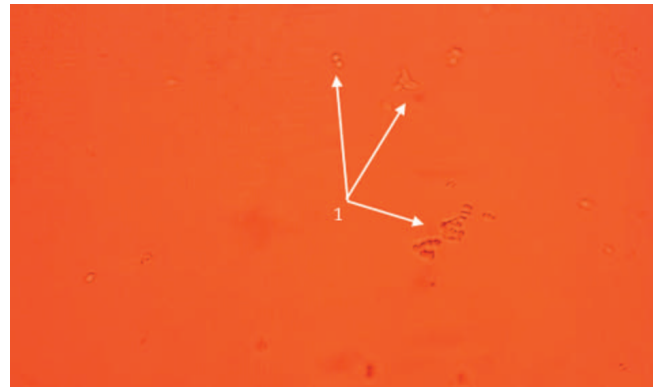
Фотография выполнена авторами

Рис. 4. Морфология клеток линии HEK293 при культивировании в течение 8 ч и частоте вращения роллерной бутылки 0,2 об/мин: 1 — клетки, прикрепившиеся к ростовой поверхности; 2 — клеточные отростки; увеличение $\times 100$



Фотография выполнена авторами

Рис. 5. Морфология клеток линии HEK293 при культивировании в течение 6 ч и частоте вращения роллерной бутылки 0,4 об/мин: 1 — округлые скопления растущих клеток; увеличение $\times 100$



Фотография выполнена авторами

Рис. 6. Морфология клеток линии HEK293 при культивировании в течение 5 ч и частоте вращения 0,5 об/мин: 1 — прикрепившиеся клетки; увеличение $\times 100$

под действием сил гравитации при вращении роллерной установки оказывает влияние на клеточную оболочку и дестабилизирует связь между структурами на ее поверхности и химическими группами культурального пластика [17, 18].

В то же время при культивировании в течение 5 ч клеток линии HEK293 и вращении роллерной бутылки на частоте 0,5 об/мин прикрепилось менее 50% от количества засеянных клеток, при этом большая их часть имела округлую форму, аналогичную клеткам, полученным при частоте вращения роллерной бутылки более 0,2 об/мин (рис. 6). Это также объясняется достаточно сильным влиянием внешних механических сил при вращении роллерной бутылки на форму клетки и возможность ее прикрепления к ростовой поверхности. При повышении частоты вращения до 0,6 об/мин адгезии клеток к поверхности не наблюдалось.

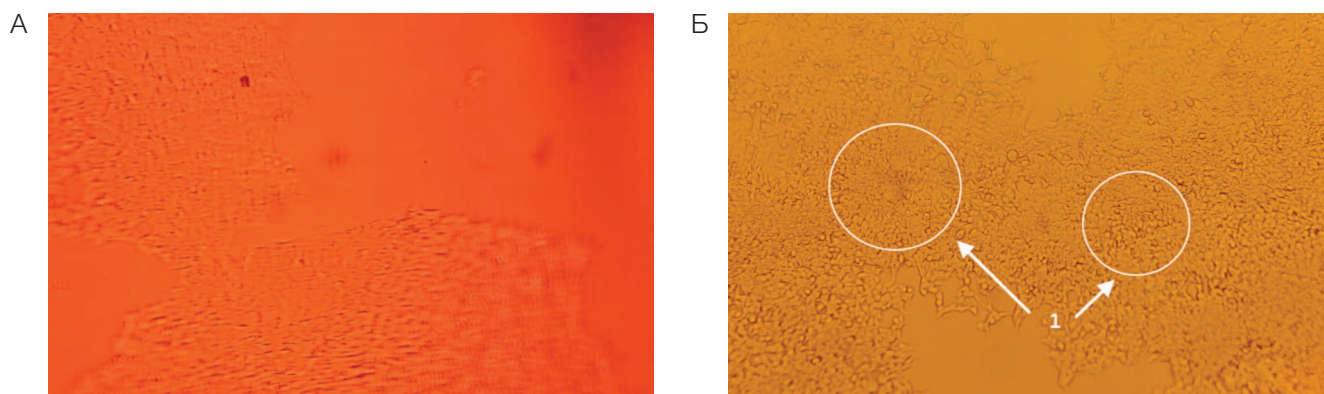
В связи с тем что частота вращения роллерной бутылки 0,2 об/мин обеспечивала наилучшее прикрепление клеток к ростовой поверхности с сохранением их

морфологии, формирование монослоя отслеживали в этих условиях.

При выращивании клеточной линии HEK293 при температуре 37 ± 2 °C и частоте вращения 0,2 об/мин в течение 1 и 2 сут наблюдали тенденцию к образованию монослоя (рис. 7). Несмотря на активные ростовые процессы, на оставшейся поверхности культурального пластика не происходило формирования полноценного монослоя, вместе с тем наблюдался многослойный рост клеточной культуры.

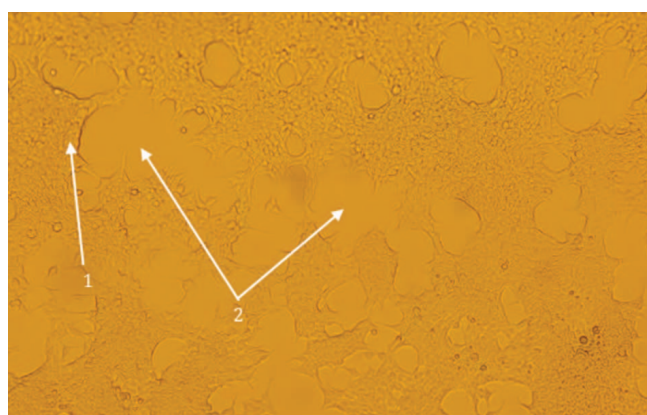
Цветовой фон у фотографий отличается из-за изменения цвета фенолового красного в составе питательной среды при закислении pH. В связи с тем что поверхность роллера ребристая и наблюдается размытие фокуса ближе к краям поля зрения, показать развивающийся монослой полностью в 1 кадре не представляется возможным.

На 3 сут при постоянной частоте вращения роллерной установки 0,2 об/мин формирования полноценного монослоя не отмечали; одновременно с этим



Фотографии выполнены авторами

Рис. 7. Формирование монослоя клеточной линии HEK293 при культивировании на 1 сут (А) и 2 сут (Б) при частоте вращения 0,2 об/мин: 1 — участки с тенденцией к многослойному росту культуры клеток; увеличение $\times 100$



Фотография выполнена авторами

Рис. 8. Нарушение формирования монослоя клеток линии HEK293 при культивировании в течение 3 сут при частоте вращения роллерной бутылки 0,2 об/мин: 1 — многослойный рост клеток; 2 — участки ростовой поверхности пластика; увеличение $\times 100$

наблюдали участки, не занятые клеточной биомассой. Частично на некоторых участках возникли очаги многослойного роста клеток с резко очерченными границами между монослоем и ростовой поверхностью пластика. В небольшом количестве отмечены клетки, открепившиеся от поверхности и плавающие в питательной среде; соответствующие данные представлены на рисунке 8.

Поэтому было проведено увеличение частоты вращения роллерной установки до 0,5 об/мин после полноценного прикрепления клеток к ростовой поверхности пластика для более быстрой смены «фазы питания» и «фазы дыхания», поскольку при медленной смене в «фазе дыхания» клетки могли высыхать и отмирать в дальнейшем, что и приводило к дефектам в монослое. Затем в местах гибели клеток контактное ингибирование прекращалось между ними без непосредственного физического контакта, вследствие этого ростовые и митотические процессы в клетках активизировались вновь. Установлено, что величина частоты вращения роллерной бутылки 0,5 об/мин являлась наиболее оптимальной для выращивания клеток.

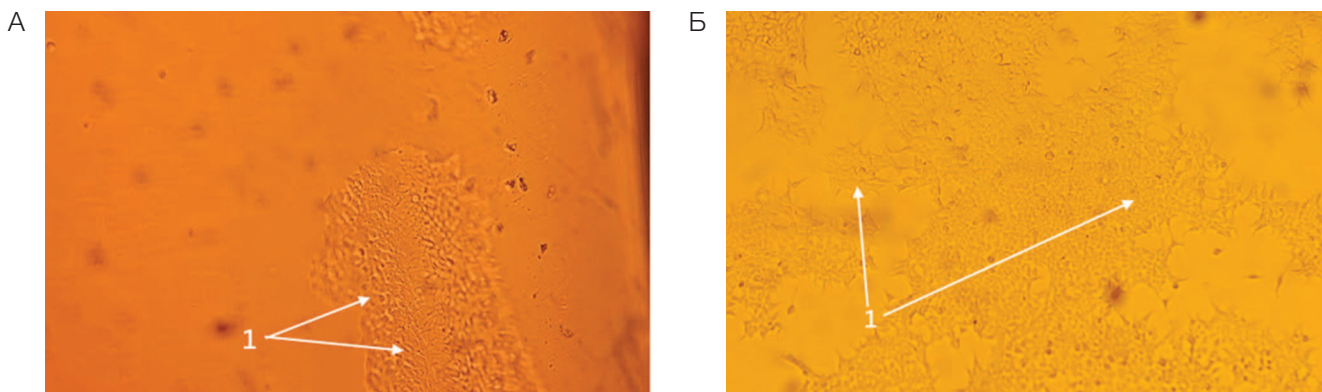
Также нами было определено, что оптимальное увеличение частоты вращения на 2 сут культивирования после посева клеток составляет не выше 0,5 об/мин, иначе повышается риск деформирования формирующегося монослоя в результате сильного механического воздействия, возникающего при вращении роллерной установки и гравитационного перемещения питательной среды. Представленные данные свидетельствуют о том, что при культивировании клеточной линии HEK293 требуется смена скоростей вращения роллерной установки для получения однородного монослоя.

Результатом культивирования в предлагаемых нами условиях при температуре 37 ± 2 °С в течение 1 сут частота вращения составляет 0,2 об/мин, на 2 сут необходимо увеличение частоты вращения до 0,5 об/мин для получения полноценного качественного монослоя, формирование которого при культивировании с изменением частоты вращения показано на фото ниже (рис. 9). Монослоем представлен клетками с характерной уплощенной формой, возникающей при прикреплении к ростовой поверхности; также наблюдали тенденцию к формированию крупных участков роста клеток.

В течение первых суток культивирования при частоте вращения роллерной бутылки 0,2 об/мин клетки прикреплялись к ростовой поверхности и формировали участки роста клеточной культуры (рис. 9А). После смены частоты вращения роллерной бутылки до 0,5 об/мин наблюдали активный рост клеток по всей ростовой поверхности (рис. 9Б) без участков с многослойным ростом клеток или резкими границами между скоплениями клеток и пластиком.

На 3 сут культивирования при частоте вращения 0,5 об/мин сформировался плотный монослой, визуально однородный, без очагов многослойного роста клеток и открепившихся клеток от поверхности (рис. 10).

Анализ данных условий культивирования клеточной линии HEK293 показал, что значения pH в диапазоне 7,0–7,4 и колебания температуры в пределах ± 2 °С от стандартной не оказывали существенного значимого влияния на процессы адгезии клеток к ростовой поверхности.



Фотографии выполнены авторами

Рис. 9. Формирование монослоя клеточной линии HEK293 при культивировании в течение: А — 1 сут (частота вращения 0,2 об/мин); Б — 2 сут (частота вращения 0,5 об/мин); 1 — участки роста клеточной культуры с тенденцией к однородному формированию монослоя; увеличение $\times 100$

При использовании выбранной нами методики с увеличением частоты вращения роллерной бутылки на 2 сут культивирования выход клеточной биомассы достигал $825 \times 10^6 \pm 10\%$ клеток в 1 роллере на 3 сут выращивания.

Полученные нами результаты в целом коррелируют с информацией других исследователей и отражают частный случай применения взятых конкретных клеточных линий в исследовании. При выборе оборудования для культивирования клеток в роллерных бутылках следует учитывать минимальную частоту вращения роллеров на роллерной установке при работе с клеточной линией HEK293 и линиями со сходными особенностями прикрепления к ростовой поверхности.

Изучение адгезии клеток к ростовой поверхности для других клеточных линий позволит повысить эффективность получения биомассы клеток как субстрата накопления и впоследствии вирусосодержащих материалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения экспериментальных исследований оптимизирован начальный этап роллерного культивирования двух клеточных линий — HEK293 и Vero. Определено, что оптимальной частотой вращения для клеточной линии Vero является 0,4–0,5 об/мин на протяжении всего периода культивирования, а для HEK293 в первые сутки необходима частота вращения 0,2 об/мин с последующим увеличением до 0,5 об/мин для формирования качественного монослоя.

Различия в выборе частоты вращения обусловлены тканевой принадлежностью линий клеток. Клеточная

Литература / References

- Shen CF, Guilbault C, Li X, Elahi SM, Ansoorge S, Kamen A, et al. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine*. 2019;37(47):6996–7002. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.003>
- Sene M-A, Xia Y, Kamen AA. Overview of recent advances in Vero cells genomic characterization and engineering for high-throughput vaccine manufacturing. *Clinical and Translational Discovery*. 2022;2(2):1–6. <https://doi.org/10.1002/ctd2.40>
- Kiesslich S, Kamen A. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnology Advances*. 2020;44:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107608>
- Malm M, Saghaleyni R, Lundqvist M, Giudici M, Chotteau V, Field R, et al. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports*. 2020;10:18996. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8>
- Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as



Фотография выполнена авторами

Рис. 10. Сформированный однородный монослой клеточной линии HEK293 при культивировании в течение 3 сут и частоте вращения 0,2 об/мин с последующей сменой частоты на 0,5 об/мин на 2 сут культивирования: увеличение $\times 100$

линия Vero проявляет более высокую степень адгезии к ростовой поверхности и устойчивость к механическим внешним воздействиям, в отличие от клеточной линии HEK293.

Полученные данные практически значимы для масштабирования процессов наработки клеточной/вирусной биомассы при монослойном культивировании и могут представлять интерес для специалистов, проводящих работы по разработке экспериментальных вирусных препаратов с использованием адгерентных линий клеток.

- a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
6. Морозов АН, Яхин ИР, Стратонова НВ, Куцкир МВ, Потеряев ДА, Хамитов РА. Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):382–91. Morozov AN, Yakhin IR, Stratonova NV, Kutsikir MV, Poteryaev DA, Khamitov RA. An experience of scaling and intensifying the industrial production of the Gam-COVID-Vac vector adenovirus vaccine in the limiting conditions of the pandemic. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):382–91 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391>
 7. Ишмухаметов АА. Фундаментальные и прикладные науки, технология и иммунобиологический продукт. *Вестник Российской академии наук*. 2022;92(8):717–21. Ishmukhametov AA. Fundamental and applied sciences, technology, and immunobiological products. *Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2022;92(8):717–21 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0869587322080059>
 8. Бабак ВА, Ломачко ЮВ, Гусев АА, Чаплыго КЭ, Пунтус ИА, Филиппова АЕ. Оптимальные режимы культивирования линии клеток ВНК-21 (с-13). *Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*. 2011;47(2–1):7–11. Babak VA, Lomachko YuV, Gusev AA, Chaplygo KEH, Puntus IA, Filipkova AE. Optimal cultivation conditions for the BHK-21 cell line (c-13). *Transactions of the educational establishment "Vitebsk the Order of "the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine*. 2011;47(2–1):7–11 (In Russ.). EDN: [SHRRRD](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391)
 9. Рябова ЕИ, Деркаев АА, Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Довгий МА, Бырихина ДВ и др. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):266–78. Ryabova EI, Derkaev AA, Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Dovgiy MA, Byrikhina DV, et al. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):266–78 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
 10. Bellani CF, Ajeian J, Duffy L, Miotto M, Groenewegen L, Connon CJ. Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7:575146. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.575146>
 11. Седова ЕС, Щербинин ДН, Банделюк АС, Верховская ЛВ, Вискова НЮ, Авдонина ЕД, и др. Способ получения рекомбинантных антител, продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной рекомбинантными аденовирусами. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(1):48–64. Sedova ES, Shcherbinin DN, Bandelyuk AS, Verkhovskaya LV, Viskova NYu, Avdonina ED, et al. Method for obtaining recombinant antibodies produced by a cell line transduced with recombinant adenoviruses. *Fine Chemical Technologies*. 2023;18(1):48–64 (In Russ.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>
 12. Yang J, Guertin P, Jia G, Lv Z, Yang H, Ju D. Large-scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single-use bioreactors. *Applied and Industrial Microbiology*. 2019;9(70):1–14. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0794-5>
 13. Решетникова ОВ. Биотехнология культивирования вирусов. *Актуальные вопросы теории и практики современной биотехнологии*. 2015:155–61. Reshetnikova OV. Biotechnology of virus cultivation. *Current Issues in the Theory and Practice of Modern Biotechnology*. 2015:155–61 (In Russ.). EDN: [XDGYLH](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391)
 14. Alexander MH. *In vitro expansion of postpartum-derived cells in roller bottles*. Patent of United States No. 8741638B2; 2014.
 15. Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Матвеева ЖВ, Жулидов ИМ, Савицкая ЛВ, Лобовикова ОА. Оптимизация условий масштабированного культивирования фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в культуре клеток Vero. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014;2:101–3. Generalov SV, Abramova EG, Matveeva ZhV, Zhulidov IM, Savitskaya LV, Lobovikova OA. Optimization of specifications for scaled-up fixed rabies virus cultivation ("Moscow 3253" strain) in Vero cell culture. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014;2:101–3 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-2-101-103>
 16. Liu YL, Wagner K, Robinson N, Sabatino D, Margaritis P, Xiao W, et al. Optimized Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus in Roller Bottles. *BioTechniques*. 2003;34(1):184–9. <https://doi.org/10.2144/03341dd07>
 17. Chisti Y. Hydrodynamic Damage to Animal Cells. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2001;21(2):67–110. <https://doi.org/10.1080/20013891081692>
 18. Chang HY, Kao WL, You YW, Chu YH, Chu KJ, Chen PJ, et al. Effect of surface potential on epithelial cell adhesion, proliferation and morphology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;141:179–86. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.049>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.И. Тузова — выполнение экспериментальной части исследования, создание черновика рукописи, ее редактирование; Т.И. Чиркина — анализ и интерпретация полученных данных; И.А. Чуркин — концептуализация и руководство исследованием; А.Н. Лях — подбор материалов и методов для выполнения исследования; К.М. Мефёд — выбор направления экспериментальной работы и утверждение итоговой версии статьи; В.А. Максимов — администрирование проекта.

ОБ АВТОРАХ

Тузова Ирина Игоревна
ITuzova@cspfmba.ru

Чиркина Татьяна Игоревна
TCHirkinina@cspfmba.ru

Чуркин Игорь Алексеевич, канд. биол. наук
ICHurkin@cspfmba.ru

Лях Анастасия Николаевна
ALyakh@cspfmba.ru

Мефёд Кирилл Михайлович, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-7335-1982>
KMefyod@cspfmba.ru

Максимов Владимир Алексеевич, д-р мед. наук
vmaksimov@cspfmba.ru