

СЕЛЕНИТНЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Белявцева Е.А. – кандидат вет. наук, ст. науч.сотр. (ЮФ «КАТУ» НАУ)

Успешное выращивание клеточных культур во многом зависит от качества питательных сред, сбалансированности необходимыми питательными веществами и различными микроэлементами.

Одним из жизненноважных микроэлементов для функционирования клеточных систем является селен – катализатор окислительно-восстановительных процессов в клетках, обеспечивающий окислительное декарбоксилирование пируватов, предохраняющий липиды клеточных мембран от окисления и разрушения [4]. Однако, в состав известных питательных сред не входит этот важный для жизнедеятельности элемент. В наших исследованиях было показано, что добавление к питательной среде селенита натрия в концентрации 10^{-7} – 10^{-8} г/мл активизирует рост клеточной культуры, повышает митотическую активность, стабилизирует морфологический состав клеток, обеспечивает однородность популяции, без признаков патологических изменений в ядре и цитоплазме клеток [2, 3].

Ведение клеточных культур требует постоянного увеличения числа клеток. Поэтому естественно, что продолжавшийся много лет выбор условий культивирования был направлен на обеспечение максимальной скорости клеточной пролиферации.

Задачей наших исследований являлось разработать методические приемы получения селенитных сред, определить возможность длительного культивирования из них клеток.

Материалы и методы.

В качестве основы использовали питательные среды фабричного производства: 0,5% раствор лактальбумина в растворе Хенкса, среда 199, среда Игла. Непосредственно перед использованием в среды вносили сыворотку крови крупного рогатого скота – 10%; пенициллин натриевую соль, стрептомицина сульфат в количестве 100 ЕД/мл каждого и добавляли заранее приготовленный базисный раствор селенита натрия до конечной концентрации в питательной среде 10^{-7} – 10^{-8} г/мл.

Культуру клеток почки телянка (ПТ) выращивали на синтетической питательной среде 199.

Для приготовления питательной среды и рабочих растворов селенита натрия использовали раствор Хенкса.

В состав среды 199 входит более 60 компонентов, не считая антибиотиков, в том числе 20 аминокислот, 17 витаминов, составные части нуклеиновых кислот, глюкоза, 8 минеральных солей и некоторые другие вещества. Среду готовят на сбалансированном солевом растворе Хенкса.

Приготовление базисного раствора селенита натрия

Навеску селенита натрия 10 мг помещали в стерильный стеклянный флакон (пенициллиновый флакон). Вносили в него 10 мл раствора Хенкса, что соответствует концентрации селенита натрия 10^{-3} г/мл или 1 мг/мл. Путем десятикратного разведения готовили растворы селенита натрия 10^{-4} г/мл и 10^{-5} г/мл. Указанные растворы являются базисными при получении селенитных сред.

Селенит натрия легко растворяется в растворе Хенкса. Полученный раствор прозрачный, фиолетового или красно-фиолетового цвета (рН-8,0) против красно-оранжевого цвета раствора Хенкса до внесения селенита натрия. Щелочные свойства селенита натрия корректируют концентрацию водородных ионов в щелочную сторону.

Расчет необходимого количества основного раствора селенита натрия

На заданный объем питательной среды (500-1000 мл) при конечной концентрации 10^{-7} г/мл необходимо основного раствора селенита натрия концентрации 10^{-4} г/мл следующее количество:

$$500 \cdot 10^{-7} = 0,5 \cdot 10^{-4}$$

$$1000 \cdot 10^{-7} = 1,0 \cdot 10^{-4}$$

Следовательно, на 1000 мл питательной среды необходимо основного раствора селенита натрия – 1 мл; на 500,0 мл питательной среды – 0,5 мл.

Ниже представлен расчет основного раствора селенита натрия на ряд объемов питательной среды.

1. Расчет основного раствора селенита натрия (10^{-4} г/мл)

№ п/п	Объем питательной среды, мл	Объем основного раствора селенита натрия 10^{-4} г/мл	
		Конечная концентрация селенита натрия	
		10^{-7} г/мл	10^{-8} г/мл
1	100,0	0,1	0,01
2	200,0	0,2	0,02
3	450,0	0,45	0,045
4	1000,0	1,0	0,1

Для удобства работы с малыми количествами селенита натрия, применяли их выражения в г/мл, что соответствует следующим показателям в мг/мл, например:

$$10^{-3} \text{ г/мл} = 1 \text{ мг/мл};$$

$$10^{-7} \text{ г/мл} = 0,0001 \text{ мг/мл};$$

$$10^{-4} \text{ г/мл} = 0,1 \text{ мг/мл};$$

$$10^{-8} \text{ г/мл} = 0,00001 \text{ мг/мл};$$

$$10^{-5} \text{ г/мл} = 0,01 \text{ мг/мл};$$

$$10^{-9} \text{ г/мл} = 0,000001 \text{ мг/мл};$$

$$10^{-6} \text{ г/мл} = 0,001 \text{ мг/мл};$$

$$10^{-10} \text{ г/мл} = 0,0000001 \text{ мг/мл}.$$

В своих исследованиях мы провели испытание чувствительности к вирусам перевиваемой культуры клеток почки теленка. В качестве эталонных вирусов использовали: вакцинный вирус болезни Ньюкасла, штамм Ла-Сота; вакцинный вирус оспа-вакцины (*Vaccina variolae siccum*).

Для определения чувствительности к вирусам клеток ПТ использовали общепринятую методику заражения культуры клеток вирусным материалом, определение его цитопатогенного эффекта [3].

Для заражения использовали пробирочные культуры клеток почки теленка 2-х суточного возраста с выполненным монослоем. После микроскопии клетки отмывали раствором Хенкса. Затем приготовленными десятикратными разведениями вируса на растворе Хенкса производили заражение, внося по 0,1 мл каждого разведения в 4 пробирочные культуры. После этого в пробирки вносили питательную среду по 0,9 мл. После 3-х дневной инкубации при 37⁰С пробирки просматривали под микроскопом на наличие цитопатических изменений. Дегенерацию на два креста (++) или больше считали доказательством вирусной инфекции. За титр вируса принимали то наибольшее разведение вируса, которое вызывает ЦПД (цитопатическое действие) у 50% зараженных культур. Титр вируса выражали количеством цитопатических доз (ЦПД₅₀) в 1 мл.

Результаты исследований.

В собственных исследованиях в качестве модели для оценки качества селенитной среды применяли перевиваемую линию почки теленка. Использовали коэффициент рассева 1:6. Штамм культивировали в течение 3-х месяцев, было проведено 12 пассажей. Клетки были полигональной формы, без признаков дегенеративных изменений, обладали хорошей адгезивной способностью, формировали клеточный монослой в течение 4 суток. Индекс пролиферации составлял 9-11.

Контрольная культура ПТ имела индекс пролиферации значительно ниже 5-6.

Таким образом, селенитные среды отвечают требованиям биологического контроля, предъявляемого к качеству питательных вирусологических сред, и могут быть рекомендованы для длительного культивирования клеток.

Результаты изучения чувствительности культуры клеток ПТ, выращенной на питательных средах, содержащих селенит натрия к вирусам, представлены в таблице 2.

2. Чувствительность культуры клеток ПТ, выращенной на селенитной среде, к вирусам

№ п/п	Штаммы вирусов	Разведение вируса							
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
1.	Вакцинный вирус болезни Ньюкасла, штамм Ла-Сота	++	++	++	++	++	++	0	0
		++	++	++	++	++	++		
2.	Вакцинный вирус оспы	++	++	++	++	0	0	0	0
		++	++	++	++				

Обозначение:

++ - полное разрушение клеток;

0 - клетки нормальные, без изменений.

Эталонные штаммы вирусов болезни Ньюкасла и оспа-вакцины размножались в культуре клеток, накапливаясь в титре 10^{-6} ТЦД₅₀/мл и 10^{-4} ТЦД₅₀/мл соответственно. Такие же титры вирусов были и контрольной культуре клеток ПТ, выращенной на стандартной питательной среде без добавления селенита натрия.

Таким образом, селенитные среды не изменяли чувствительность клеточной культуры к вирусам.

Выводы.

1. Установлена биологически полезная концентрация селенита натрия для клеточных культур (10^{-7} – 10^{-8} г/мл), стимулирующая рост клеток и их митотическую активность. Предложенная селенитная питательная среда, увеличивает пролиферативную активность клеточных культур и выход клеточной биомассы.

2. Внесение селенита натрия не влияет на титр накопления вируса в культуре клеток.

Список использованной литературы

1. Белявцева Е.А. Биологические аспекты применения селенита натрия //Вет.медицина: экон.,социальные и экол.пробл.:Тез.докл.респ.конф.,20-22ноября 1990г., г.Харьков. – Х.,1990. – С.182-183.
2. Белявцева Е.А. Токсические и физиологические дозы селенита натрия в культуре клеток. //Методические рекомендации по актуальным проблемам ветеринарии. – Х., 1990.- С. 46-47.
3. Гаврилов В.И. Перевиваемые клетки в вирусологии. - М.:Медицина. 1964. – 268 с.
4. Ермаков В.В., Ковальский В.В. Биологическое значение селена. - М.: Наука, 1974. – 298 с.