УДК: 619:577.3:636

ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ РЕЖИМІВ ВИРОБНИЦТВА ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ГЕОСГІДРОЛІЗИН ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ССАВЦІВ ПТИЦІ

Белявцева О.А., к.вет.н., ПФ НУБіП України «Кримський агротехнологічний університет»

У статті викладена технологія виготовлення живильного середовища геосгідролізин, яке використовується для культивування клітин ссавці й птиці. Аргументовано використання складників, що утворюють геосгідролізин. Встановлено, що для виготовлення геосгідролізину необхідно брати компоненти у наступних співвідношеннях, об'єм%: геосен - 15,0; розчин гідролізину- 5,0; збалансований фізіологічний розчин Хенкса -80,0. Наведено приклад поєднання складових частин середовища. Технологічна схема виробництва включає наступні операції: прийомка і підготовка сировини, виготовлення сироватки крові великої рогатої худоби, фізіологічного розчиніу Хенкса, поєднання 20% розчину плазмозамінників у розчині Хенксу, стерильна фільтрація, фасовка, укупорка й зберігання середовища.

Ключові слова: *біотехнологія, живильні середовища, геосгідролізин, технологія виготовлення.*

Постановка проблеми та аналіз останніх публікацій. В останні два десятиріччя швидко розвиваються не тільки наукові досдідження в області клітинної біотехнології, а й практично відбувся перехід до великомасштабного культивування клітинних культур, на яких базується виробництво різних за призначенням біологічно активних препаратів медичного, ветеринарного, сільськогосподарського й харчового призначення. Постійне збільшення об'ємів виробництва клітин-продуцентів для створення нових біопрепаратів викликає необхідність розробки економічних й доступних живильних середовищ, білкових гидролізатів, сольових й диспергуючих розчинів.

Питання виробництва живильних середовищ представлені в працях вітчизняних й закордонних вчених: Сперанская И.Д., 1979; Сергеев А.А., Собко Ю.А., 1990; Дьяконов Л.П., 1984, 2008; Eagle H.,1962; Hanks J., Wallase R ., 1964; Morgan J., et al.,1950 та інш. Важливим напрямком при розробці економічних середовищ є конструювання вірусологічних живильних середовищ на основі білкових гідролізатів, конструювання живильних середовищ без вмісту сироватки, забезпечуючих ріст и розмноження клітин. При цьому особливого значення набувають питання стандартизації живильних середовищ, комплексного підходу до оцінки їх якості й розробці ефективних методів контрол. [4, 6 - 9].

Живильне середовище геосгідролізин являє собою 20% розчин білкових гідролізатів геоссену та гідролізину у розчині Хенксу. Середовище випускається із додаванням 10% сироватки крові або без сироватки крові. За зовнішнім виглядом геосгідролізин – прозора , червоно-померанчева рідина. Колір залежить від індикатора фенол-червоного, що відповідає pH 7,0 – 7,2.

Живильне середовище геосгідролізин застосовують для культивування клітин первинно-трипсинізованих (фібробласти курячих ембріонів) або перещеплюваних клітинних ліній (нирки теляти, трахеї теляти, нирки вівці та інш.). Геосгідролізин з додаванням сироватки крові використовують як ростове середовище, без додавання – як підтримуюче [3, 5].

Матеріали і методи досліджень. До складу середовища геосгідролізин компоненти входять у наступних співвідношеннях, об'єм%:

1. Геосен - 15,0
2. Розчин гідролізину - 5,0
3. Збалансований фізіологічний розчин Хенкса -80,0

Кровозамінник геосен створено у відділі експериментальної терапії Інституту фізіології ім.А.А.Богомольца АН УРСР (автори Спасокукоцький Ю.А., Лобачевска О.В., Черногорова З.Л., Компанець О.М., Гнідаш Т.К.). Геосен застосовується у якості кровозамінника при операціях на серці з штучним кровообігом; при гострих великих крововтрата; при шоках різного походження; при опіках тяжкого ступеня; при порожнинних операціях та в умовах швидкої хірургічної допомоги. Геосен є белково-колоїдним розчином, отриманим з видонеспецифічного білку осеїну знежирених трубчатих кісток великої рогатої худоби з молекулярною вагою у верхньої границі низькомолекулярних колоїдних розчинів. Кровозамінник геосен являє собою білково-колоїдний розчин із рівномірною опалесценцією, світло-жовтого кольору у прохідному світлі. При збовтуванні виникає стійка піна, типова для білково-колоїдних розчинів. Удільна вага геосену при температурі 20^0С дорівнює 1,015-1,025. Геосен не желатинує при кімнатній температурі та при охолодженні до -2^0С. Кольоровість визначається за оптичною щільністю, яка не повинна перевищувати 0,2. Відносна густина 1,4-1,8. pH дорівнює 7,0-7,8. Вміст білку 4-5%; загального азоту у розчині не більш 0,6-0,8 г/100 мл. Вміст хлориду натрію не більш 0,0087-0,0098 г; важких металів у препараті не більше 0,00005%; сухий залишок 4,0-5,5%.

Застосовується геосен внутрішньовенно струйно або капельно, а також при використанні апаратів штучного кровообігу. Геосен не дає реакцій тканинної несумісності.

Для виробництва геосгідролізину за прописом використовують розчин гідролізину, який випускається у відповідності із ФС 42-631-89. Білковий гідролізат є продуктом кислотного гідролізу білків крові великої рогатої худоби і у ветеринарній практиці використовується як плазмозамінний розчин. Розчин гідролізину, освітлений одержують із фібрінних згустків крові великкої рогатої худоби шляхом кислотного гідролізу. Гідроліз проводять соляною кислотою при нагріванні. Демінералізація проводиться

іонообмінною смолою – аніонітом. До сладу гідролізину входять 18 амінокислот, сумарна кількість 2мг/см^3. В дослідах використовували готовий препарат заводського виробництва.

Збалансований фізіологічний розчин Хенксу готують за схемою Л.П.Д'яконова (1980) щляхом окремого готування концентрованих розчинів солей із наступним їх поєднаннням [1,2].

Результати досліджень. Технологічна схема виробництва геосгідролізину була розроблена на Київському заводі медпрепаратів у співавторстві із науковцями ННЦ «ІЕКВМ»

Технологічна блок-схема виробництва живильного середовища геосгідролізин на ведена на рисунку 1.

Рис. 1. Блок-схема виробництва живильного середовища геосгідролізин

Операція 1. Виготовлення сироватки крові великої рогатої худоби.

Сировиною для виготовлення сироватки крові є кров молодняка великої рогатої худоби. Кров збирають при забої тварин відповідно до «Технологічної інструкції по збиранню і переробці крові тварин», що затверджена у відповідному порядку.

Відбирають кров із яремної вени за допомогою порожнистого ножа в скляні бутлі ємкістю 10 дм^3, у які попередньо наливають 5% розчин натрію хлористого (із розрахунку 40 см^3 на 1 літр крові). У кожен бутель наливають 4-6 дм^3 крові. Бутлі закривають стерильними салфетками із пергаменту, які закріплюють за допомогою кілець обхвату. Зібрану у 10-ти літрові бутлі кров видержують за температури 18-20^{0}С 20 годин; потім перевозять у камеру, де вона відстоюється за температури 4-6^{0}С 48-72 години. Після відстоювання сироватку зливають у 10-ти літрові бутлі, використовуючи правила асептики. Зібрану в бутлі сироватку передають по трубопроводу за допомогою вакууму в стерильну ємність – реактор.

Операція 2. Виготовлення фізіологічного розчину Хенкса

Пропис збалансованого фізіологічного розчину солей Хенкса, г/л:

Натрій хлористий 8,0
Калій хлористий 0,4
Кальці хлористий 0,14
Магній сірчано-кислий 0,1
Магній хлористий 0,1
Натрій фосфорно-кислий двозаміщений 0,06
Натрій фосфорно-кислий однозаміщений 0,06
Натрій двовуглекислий 0,15
Глюкоза 1,0
Феноловий червоний 0,02

Для зручності роботи з великими об'ємами розчинів спочатку готують їх десятикратні концентрації. Потім, у визначеному порядку готують збалансований фізіологічний розчин.

2.1. Виготовлення десятикратного концентрату розчину солей. Готують наважки солей для десятикратних розчинів А, Б, С. Кількість солей на заданий об'єм води наведено у таблиці:

Таблиця

Прописи розчинів

№ п/п	Найменування солей	Кількість солей, г		
		Об'єм води, л		
		100,0	500,0	800,0
Р О З Ч И Н А				
1.	Натрій хлористий	800,0	4000,0	6400,0
2.	Калій хлористий	40,0	200,0	320,0
3.	Магній сірчано-кислий	10,0	50,0	80,0
4.	Магній хлористий	10,0	50,0	80,0
5.	Кальцій хлористий	14,0	70,0	112,0
Р О З Ч И Н Б				
6.	Натрій фосфорно-кислий двозаміщений	6,0	30,0	48,0
7.	Калій фосфорно-кислий одно заміщений	6,0	30,0	48,0
8.	Глюкоза	100,0	500,0	800,0
9.	Феноловий-червоний	2,0	9,0	16,0
Р О З Ч И Н С				
10.	Натрій двовуглекислий	15,0	75,0	120,0

Порядок виготовлення концентрованих розчинів

Розчин А. У скляний бутель ємкістю 10 л вносять 4-5 літрів дистильованої води й послідовно розчинюють наважку солей (г):

Розрахунок на 100,0 л розчину Хенкса

Натрій хлористий 800,0
Калій хлористий 40,0

Магній сірчано-кислий 10,0
Магній хлористий 10,0

Окремо розчиняють у 600-1000,0 $см^3$ дистильованої води кальцій хлористий безводний – 14,0.

При наявності кристалічного або зволоженого хлористого кальцію готують концентрований розчин, у якому кількість хлористого кальцію визначають титруванням за Мором. Отриманий розчин додають до основного за відповідним розрахунком на безводний кальцій. Розчин хлористого кальцію додають у розчин А, повільно перемішуючи його. Загальний об'єм розчину доводять до 10 л дистильованою водою.

Для приготування більших об'ємів розчину Хенкса, наприклад, 200,0-500,0 літрів готують відповідно 2-5 скляних бутлі з десятикратним концентратом солей.

Розчин Б. У бутель з 4-5 літрами дистильованої води вносять наступні наважки солей:

Розрахунок на 100,0 л розчину Хенкса

Натрій фосфорно-кислий двозаміщений	6,0
Калій фосфорно-кислий одно заміщений	6,0
Глюкоза	100,0
Феноловий червоний	2,0

Доводять об'єм розчину до 10,0 л дистильованою водою. При виготовленні більших об'ємів розчину Хенкса, наприклад, 500,0 – 800,0 літрів концентрат солей об'єм готують в одному бутлі об'ємом 10 літрів.

Розчин С. Розрахунок на 100,0 л розчину Хенкса.

Натрій двовуглекислий 15,0 розчиняють у колбі з 500,0 -1000,0 $см^3$ дистильованої води та переносять у бутель, який містить 10 літрів дистильованої води. При виготовленні більших об'ємів розчину Хенкса концентрат солей готують в одному бутлі з об'ємом 10 л дистильованої води.

Порядок виготовлення збалансованого фізіологічного розчину Хенкса. У реактор подають по трубопроводу дистильовану воду, її об'єм контролюють за водомірним склом.

Розрахунок: для приготування 100 літрів розчину Хенкса необхідно подати 70 літрів води. Потім послідовно внести розчин А – 10 літрів; розчин Б – 10 літрів, розчин С – 10 літрів. Після внесення кожного концентрованого розчину включають електромішалку на 2-3 хвилини.

Відповідного порядку дотримуються при одержанні інших об'ємів розчину Хенкса.

Розрахунок: Необхідна кількість розчину Хенкса – 500 л. готують концентрати розчину А – 50,0 л; розчину Б – 10,0 л; розчину С – 10,0 л.

У реактор необхідно подати дистильованої води (500,0 – 70,0) = 430,0 літрів. Спочатку додають 400,0 л води, потім вносять послідовно розчин А – 50,0 л; розчин Б – 10,0 л; розчин С – 10,0 л. Загальний об'єм води доводять до 500,0 л. На цій стадії здійснюють технохімічний контроль проміжного продукту – визначають величину pH фізіологічного розчину за допомогою

шкали буферних розчинів або за допомогою потенціометра. Рівень pH повинен складати 7,0 – 7,2.

Корегування концентрації водневих іонів здійснюють за допомогою 8%-ного розчину натрію двовуглекислого. Для встановлення у 100 літрах фізіологічного розчину pH 7,0 – 7,2 потрібно 15-25,0 г $NaHCO_3$ (в залежності від значення pH дистильованої води).

Операція 3. Виготовлення живильного середовища – 20% розчину білкових плазмозамінників у розчині Хенкса.

Для виробництва живильного середовища використовують білкові плазмозамінюючі розчини: розчин гідролізину, який випускають за Ф.С.42-631-89 та геосен N.P. 75.933.4. До складу середовища компоненти входять у наступних співвідношеннях, об'єм%:

1. Геосен - 15;
2. Розчин гідролізину - 5;
3. Збалансований фізіологічний розчин Хенкса - 80

Поперше готують окремі компоненти в необхідній розрахунковій кількості.

Приклад. Кількість живильного середовища в літрах:

	500,0	800,0	1000,0
Кількість основних компонентів в літрах:			
1.Геосен	75,0	120,0	150,0
2.Розчин гідролізину	25,0	40,0	50,0
3.Фізіологічний розчин Хенкса	400,0	640,0	800,0

Приклад виконання. Для виробництва 500,0 л живильного середовища готують 400,0 л розчину Хенкса, додають 75,0 л геосену, перемішують суміш електромішалкою 1-2 хвилини. Потім додають 25,0 літрів гідролізину. Препарат подають для стерилізуючої фільтрації.

Операція 4. Стерильна фільтрація, фасування, укупорка. Стерилізацію живильного середовища проводять шляхом фільтрації через азбестово-паперові пластини марки СФ, які вмонтовані в фільтри «Оріон» або фільтри Сальнікова. Перед фільтрацією пластини промивають фізіологічним розчином із розрахунку 2-3 літра на одну пластину діаметром 30 см. Потім починають фільтрацію середовища. Першу порцію середовища не використовують, а зливають в окремі флакони, підлягає зливанню в середньому 3 касети препарата. Фасування проводять вручну в спеціальній кабіні, обладнаній стерильним боксом із транспортерами. В кожну пляшку наливають 450,0 $см^3$ середовища. Наповнені пляшки закривають стерильними гумовими пробками. Закриті пляшки завальцовують алюмінієвими ковпачками й направляють для маркування, пакування й зберігання.

Висновки. 1. Живильне середовище геосгідролізин являє собою 20% розчин білкових плазмозамінювачів (геосену і гідролізину) у розчині Хенкса.

2. Технологічна схема виробництва включає наступні операції: прийомка і підготовка сировини, виготовлення сироватки крові великої рогатої худоби, фізіологічного розчиніу Хенкса, поєднання 20% розчину

плазмозаміників у розчині Хенксу, стерильна фільтрація, фасовка, укупорка й зберігання середовища.

3. Технологічна схема виготовлення живильного середовища увійшла у Технічні умови (ТУУ 46.15 198-97) та інструкцію по виготовленню й контролю живильного середовища геосгідролізин.

Список використаних джерел:

1. Культура клеток и ткани / Дьяконов Л.П., Глухов В.Ф., Поздняков А.А. [и др.]. - Ставрополь, 1980. - 241 с.
2. Пол Джон Культура клеток и тканей / Дж. Пол. - М.: 1963.- 347 с.
3. Біологічні властивості вірусологічного живильного середовища геосгідролізин / О. А. Белявцева, Кучерявенко Л.І., Бусол В.О., Герман В.В. [та ін.] // Матеріали міжнародної науково–практичної конференції. Розвиток ветеринарної науки в Україні: здобутки та проблеми. -1997. – С.191-192.
4. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Под ред. проф.Дьяконова Л.П., акад.УААН Стегния Б.Т. // Харьков, 2008. – 318 с.
5. Патент України. № 23620. Вірусологічне живильне середовище “Геосгідролізин” для культивування клітин ссавців і птахів / Белявцева О. А., Бусол В.О., Герман В.В., Стеценко В.І. та інші, всього 8 осіб.// Бюл. 4. -1998. – 3 с
6. Сергеев А.А., Собко Ю.А. Культура клеток в ветеринарии и биотехнологии / А.А. Сергеев, Ю.А. Собко. – К.: Урожай, 1990. – 152 с.
7. Влияние состава гидролизата лактальбумина на качество питательных сред / Сперанская И.Д., Миронова Л.Л., Данилова Э.Б., [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. Тез. докл. второй всесоюзной конференции, Москва, 19-21 ноября 1981. – М., 1981. - С. 134-136.
8. Eagle W. Production of malignancy in vitro; mouse fibroblast culture and changes seen in living cells / W. Eagle // J. nat. Cancer. Inst., 1943. - № 4. – P. 165.
9. Hanks J. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration / J. Hanks, R. Wallase // Proc.Soc.exp., Biol.Med., 1949. - №71 (2). – P. 196.
9. Morgan J. Nutrition of animal cells in tissue culture / J. Morgan, H. Morton, R. Parker // Biol. Med., 1950. - № 73 (1). – P. 1.

Белявцева Е.А. Обоснование технологических режимов производства питательной среды геосгидролизин для культивирования клеток млекопитающих и птицы

В статье изложена технология производства питательной среды

Belyavtseva E.A. Ground of the technological modes of production of nourishing environment of geosgidrolisin for cultivation of cages of mammals and bird

Technology of production of nourishing environment of geosgidrolisin is expounded in

геосгидролизин, которая используется для культивирования клеток млекопитающих и птицы. Обосновано использование составляющих для геосгидро-лизина.Установлено, что для приготовления геосгидролизина необходимо брать компоненты в следующих соотношениях, объем%: геоссен - 15,0; раствор гидролизина- 5,0; сбалансированный физиологический раствор Хенкса -80,0. Приведен пример соединения составвных частей среды. Технологическая схема производства включает следующие операции: приемка и подготовка сырья, приготовленение сыворотки крови крупного рогатого скота, физиологического раствора Хенкса, соединение 20% плазмозаме-щающих растворов в растворе Хенкса, стерильная фильтрация, фасовка, укупорка и хранение среды.

Ключевые слова: биотехнология, питательные среды, геосгидролизин, технология производства.

the article, that is used for cultivation of cages of mammals and bird. The use of constituents is reasonable for geosgidrolisin .It is set that for preparation of geosgidrolisin it is necessary to take components in next correlations, volume%: геоссен - 15,0; solution of gidrolisin- 5,0; balanced physiological solution of Xenks - 80,0. An example of connection of составвных parts of environment is made. The flowsheet of production includes next operations: reception and preparation of raw material, приготовленение serum of blood of cattle, physiological solution of Xenks, connection of 20% solutions in solution of Xenks, sterile filtration, packing, corking and storage of environment.

Keywords: biotechnology, nourishing environments, geosgidrolisin, technology of production.