

УДК 619:615.9.-37:636:611.018.1

БОРИСОВЕЦ Д.С., канд.вет.н, e-mail: borisovets_biev@mail.ru**ЗУЙКЕВИЧ Т. А.**, канд.с-х.н, e-mail: biev@mail.tut.by.**КОСТЮК Н.И.**, канд.вет.н, e-mail: onlyk@mail.tut.by.**СТРЕЛЬЧЕНЯ И.И.**, канд.вет.н, e-mail: onlyk@mail.tut.by.**ТКАЛИЧ Е.С.**, e-mail: onlyk@mail.tut.by.*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь***КРАСОЧКО П.А.**, д-р вет. н., д-р биол.н, профессор, e-mail: krasochko@mail.ru*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь*

ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НЕИНФИЦИРОВАННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК И ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ ИХ МЕТАБОЛИЗМА

В статье приведены результаты исследований обмен белков, макро- и микроэлементов ростовых питательных сред до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма. Теоретически обоснован состав препаратов на основе ростовых сред неинфицированных культур клеток, проведен подбор компонентов и изучены их физико-химические свойства. Полученные при проведении исследований результаты свидетельствуют о возможности создания ветеринарных препаратов на основе продуктов метаболизма ростовых питательных сред после культивирования монослойных культур клеток.

Ключевые слова: питательные среды, культуры клеток, ветеринарные препараты.

Введение. Использование клеточных культур играет важную роль для накопления вирусов с целью изготовления противовирусных вакцин [1]. Изолированные от внутренней среды организма клетки животных сохраняют основные требования к создаваемой искусственной среде. Для роста и развития клеток вне организма необходимо создать условия максимально сходные со средой, в которой клетки существовали *in vitro* [2]. Для роста и развития клеток позвоночных вне организма необходимы тринадцать аминокислот, витамины, углеводы, минеральные вещества и т.д. Следовательно, основное условие успешного проведения технологического процесса культивирования клеток – подбор питательных сред, обеспечивающих максимальное накопление целевого продукта. Для выращивания животных клеток применяют питательные среды, имеющие сложный состав [3, 4]. Они компонуется из высококачественного, сравнительного дорогого сырья с последующим внесением питательных и ростовых добавок. Это создает предпосылки для использования отработанной питательной среды, содержащей продукты метаболизма неинфицированных культур клеток, с целью создания ветеринарных препаратов, обладающих общим биотонизирующим и иммуномодулирующим действием, стимулирующих рост и развитие молодняка животных, увеличивающих общую устойчивость животных к инфекционным заболеваниям и стрессовым факторам [5, 6].

Цель работы. Исследовать обмен белков, макро- и микроэлементов ростовых питательных сред до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма и теоретически обосновать состав препаратов на основе

ростовых сред неинфицированных культур клеток, провести подбор компонентов и изучить их физико-химические свойства.

Материал и методы исследований.

Исследования проводились на базе отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

При выполнении научно-исследовательской работы были использованы образцы ростовых питательных сред до и после культивирования перевиваемых культур клеток (таблица 1).

Таблица 1

Ростовые питательные среды до и после культивирования перевиваемых культур клеток

№ п/п	Питательная среда
1	Ростовая среда к.кл. ЗКГ (ФГМС+Игла DMEM) 2-е сутки
2	Ростовая среда к.кл. СПЭВ (Игла MEM+199) 7-е сутки
3	Ростовая среда к.кл. Магс-145 (Игла DMEM) 2-е сутки
4	Ростовая среда к.кл. ВНК 21/13 (ФГМС+Игла DMEM) 5-е сутки
5	Ростовая среда к.кл. MDBK 3-е сутки
6	Питательная среда Игла MEM+199
7	Питательная среда ФГМС+Игла DMEM C-5
8	Питательная среда Игла MEM C-9
9	Питательная среда Игла DMEM C-28

Исследования по изучению обмена белков ростовых питательных сред до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма проводили путем определения содержания общего белка рефрактометрическим методом (рефрактометр – УРЛ-1), который основан на определении показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества — отношения синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления.

Массовую долю микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии на спектрометре с индуктивно связанной плазмой - ICP ActivaM (HORIBA Jobin Yvon SAS, Франция). Данный метод основан на возбуждении атомов исследуемой пробы в индуктивно связанной плазме и измерении интенсивности

аналитической спектральной линии определяемого элемента при распылении анализируемой пробы и подаче в виде аэрозоля в индуктивно связанную плазму.

Ростовые питательные среды исследовали на наличие таких микро- и макроэлементов, как железо, калий, натрий, магний и кальций.

Для конструирования препаратов на основе ростовых сред неинфицированных культур клеток исходили из того, что в их состав входит большое количество аминокислот, белков, микро- и макроэлементов, а также продукты метаболизма клеток, обладающие биостимулирующим эффектом.

Для конструирования препаратов на основе ростовых питательных сред перевиваемых культур клеток теоретическое обоснование выполнялось по следующим параметрам:

- обеспечение стерильности;
- необходимость введения в состав препарат сорбентов.

Подбор компонентов для конструирования лабораторных образцов препаратов проведен с учетом изучения их физико-химических свойств - внешнего вида, стерильности, активности.

Физико-химические свойства оценивались по показателям внешнего вида, обеспечению стерильности, сорбционной активности сорбентов.

Для определения внешнего вида, цвета препарата, наличия посторонних примесей содержимое упаковки высыпали на отдельный лист фильтровальной бумаги и просматривали визуально.

С целью оценки обеспечения стерильности консерванты вносили в ростовую питательную среду перевиваемой культуры клеток MDBK в рабочих концентрациях, после чего инактивировали в течение 24-48 часов при температуре 37°C. Испытание полученных препаратов на стерильность проводили по ГОСТ 28085 на тиогликолевой среде, с последующим пересевом на питательные среды (МПБ, МПА, среду Сабуро, среду Китта-Тароцци). По истечении 10 суток в посевах препаратов на питательных средах (среде тиогликолевой, МПБ, МПА, среде Сабуро, среде Китта-Тароцци) оценивали наличие роста бактерий и грибов.

С целью определения сорбционной активности сорбентов проводили построение калибровочного графика, с его помощью находили концентрацию метиленовой сини, соответствующую полученной оптической плотности. Данную концентрацию метиленовой сини умножали на 10 (разведение), получая остаточную равновесную концентрацию метиленовой сини.

По величине остаточной равновесной концентрации метиленовой сини в растворе рассчитывали сорбционную способность препарата по формуле (1):

$$A = \frac{C_0}{2} - C_r, \text{ мг/см}^3 \quad (1)$$

где:

C_0 - начальная концентрация метиленовой сини (мг/см³);

2 - снижение концентрации в 2 раза, возникающее при смешивании препарата с раствором метиленовой сини;

C_r - равновесная концентрация метиленовой сини (мг/см³);

A - сорбционная способность препарата.

За результат исследования принимали среднее арифметическое значение величины оптической плотности, полученное при проведении не менее трех параллельных измерений. Сорбционная активность должны быть не менее 0,1 мг/см³.

Результаты исследований и их обсуждение.

При проведении исследований по изучению обмена белков ростовых питательных сред до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма отмечалось снижение количества общего белка в ростовых питательных средах после культивирования монослойных культур клеток во всех испытуемых образцах в зависимости от сроков культивирования клеточной линии. Так, содержание общего белка в среде Игла MEM+199 уменьшается на 18,6% через 7 суток культивирования линии клеток СПЭВ, среда ФГМС+Игла DMEM (к.кл. ЗКГ) – на 7,04% на 2-е сутки культивирования, ФГМС+Игла DMEM (к.кл. ВНК 21/13) – на 14,3% к 5-м суткам, ростовая среда Игла MEM –

на 9,67% на 3-е сутки, питательная среда Игла DMEM – на 7,14% на 2-е сутки культивирования.

При проведении исследований по изучению массовой доли микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах установлено незначительное снижение уровня железа после культивирования монослойных культур клеток во всех исследуемых образцах, за исключением ФГМС+Игла DMEM, в которой данный показатель через 2 суток культивирования культуры клеток ЗКГ снижается практически в 9 раз. Наиболее выраженные колебания уровня калия, наблюдается в среде ФГМС+Игла DMEM на 5-е сутки культивирования культуры клеток ВНК 21/13, где его количество повышается 53,16% в сравнении с первоначальным уровнем. В отношении макроэлементов Na, Mg и Ca наиболее выраженные изменения также отмечены в образце ростовой среды ФГМС+Игла DMEM через 2 суток культивирования культуры клеток ЗКГ, в которой содержания натрия снижается практически в 7 раз, количество Ca – на 37,2%, при этом количество Mg повышается на 40,8% в сравнении с исходным уровнем. В остальных образцах колебания микро- и макроэлементов незначительны и находятся в диапазоне значений от 1 до 17%.

Для конструирования лабораторных образцов препаратов подобраны компоненты:

- в качестве консервантов – теотропин или формалин;
- в качестве сорбентов – цеолит, целлюлоза, хитозан, гидроксал.

При оценке физико-химических свойств оценены внешний вид, обеспечение стерильности, сорбционная активность сорбентов.

По внешнему виду, цвету и наличию посторонних примесей все компоненты препарата (теотропин, формалин, цеолит, целлюлоза, хитозан, гидроксал) соответствовали качественным удостоверениям производителя.

Результаты исследований по определению стерильности ростовой питательной среды перевиваемой культуры клеток MDBK после добавления консервантов (теотропин и формалин) показали, что в течение 10 суток (время наблюдения) в пробирках с посевами образцов на бактериологических питательных средах (МПА, МПБ, среде Китта-Тароцци и среде Сабуро) рост бактерий и грибов отсутствовал, изменений (цвета, наличия осадка и т.д.) не выявлено, что свидетельствует об их стерильности.

Результаты изучения сорбционной активности показали, что все исследуемые сорбенты (цеолит, целлюлоза, хитозан и гидроксал) обладали сорбционной активностью не менее 0,1 мг/см³, что позволяет использовать для конструирования препаратов на основе ростовых питательных сред.

Выводы и перспективы дальнейших исследований.

1. Культивирование монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма в течение 2-7 суток приводит к уменьшению содержания в ростовых питательных средах уровня общего белка на 7,04%-18,6%.

2. Содержание микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах в процессе культивирования перевиваемых линий клеток подвергается незначительным колебаниям в пределах 1-17%, за исключением среды ФГМС+Игла DMEM (культура клеток ЗКГ), где отмечается снижение содержания железа – в 9 раз, натрия – в 7 раз, Ca – на 37,2%.

3. Используя результаты исследований обмена белков, макро- и микроэлементов ростовых питательных сред до и после культивирования монослойных культур клеток, теоретически обоснован состав препаратов, для конструирования лабораторных образцов. В качестве консервантов – теотропин или формалин, в качестве сорбентов – цеолит, целлюлоза,

хитозан, гидроксал, которые по своим физико-химическим свойствам обеспечивают стерильность и сорбционную активность препаратов.

4. Полученные результаты послужили основой для изготовления лабораторных образцов препарата на основе ростовых сред с целью продолжения исследований по данному направлению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голубев Д. Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. / Д. Б. Голубев, А. А. Соминина, М. Н. Медведева – Л.: Медицина – 1976. – 224 с.
2. Культура животных клеток. Методы. / Под ред. Р. Фрешни. - М.: Мир – 1989 – 333 с.
3. Вирусология. Методы. / Под ред. Б. Мейхи – М.: Мир – 1988 – 344 с.
4. Сергеев В. А. Репродукция и выращивание вирусов животных – М.: Колос – 1976 – 303 с.
5. Руководство по ветеринарной вирусологии. / Под ред. В. Н. Сюрица. – М.: Колос – 1965 – 687 с.
6. Феннер Ф. Биология вирусов животных / Ф. Феннер, Б. Мак-Ослен, С. Мимс, Дж. Сэмбрук, Д. Уайт. – М.: Мир, 1977 – т. 1, – 447 с.

ДОСЛІДЖЕННЯ РОСТОВИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ НЕІНФІКОВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН І ОБГРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ЇХНІХ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ / Борисовец Д.С., Зуйкевич Т.А., Костюк М.І., Стрельченя І.І., Ткалич Е.С. Красочко П.А.

У статті наведено результати досліджень обміну білків, макро- і мікроелементів ростових поживних середовищ до та після культивування моношарових культур клітин з високим і низьким рівнем метаболізму. Теоретично обгрунтований склад препаратів на основі ростових середовищ неінфікованих культур клітин, проведено підбір компонентів і вивчені їх фізико-хімічні властивості. Отримані при проведенні досліджень результати свідчать про можливість створення ветеринарних препаратів на основі продуктів метаболізму ростових поживних середовищ після культивування моношарових культур клітин.

Ключові слова: поживні середовища, культури клітин, ветеринарні препарати.

STUDY OF GROWTH NUTRIENT MEDIUM OF UNINCEFINED CROPS OF CELLS AND RATIONALE OF THE COMPOSITION OF PREPARATIONS BASED ON THE PRODUCTS OF THEIR METABOLISM / Barysavets D.S., Zujkevich T.A., Kostiuk N.I., Strelchenia I.I., Tklich E.S., Krasochko P.A..

Introduction. For the cultivation of animal cells, nutrient media having a complex composition are used. They are composed of high-quality, comparatively expensive raw materials with subsequent addition of nutritional and growth additives. This creates the prerequisites for using the spent nutrient medium containing the products of the metabolism of uninfected cell cultures, with the goal of creating veterinary drugs that have a common biotonic and immunomodulating effect, stimulating the growth and development of young animals.

Objective. To study the exchange of proteins, macro- and microelements of growth nutrient media before and after cultivation of monolayer cell cultures with high and low metabolic rate and theoretically substantiate the composition of preparations on the basis of growth media of uninfected cell cultures, select components and study their physicochemical properties.

Material and methods of research. When performing the research work, samples of growth nutrient media were used before and after cultivation of transplantable cell cultures.

For the design of preparations based on growth culture media of transplantable cell cultures, the theoretical justification was carried out according to the following parameters:

- provision of sterility;

- the need to introduce sorbents into the formulation.

The results of the research and their discussion. When conducting studies on the study of protein metabolism, there was a decrease in the amount of total protein in growth nutrient media after culturing monolayer cell cultures in all test samples, depending on the terms of cultivation of the cell line.

When conducting studies on the mass fraction of micro- and macroelements in growth nutrient media, it was established that in all samples except FGMS + Needle DMEM, the oscillations of micro- and macroelements are insignificant and range from 1 to 17%.

For the design of laboratory samples of drugs selected components:

- as preservatives - teotropin or formalin;
- as sorbents - zeolite, cellulose, chitosan, hydroxyl.

Conclusions and prospects for further research.

1. Cultivation of monolayer cell cultures with high and low metabolic rate for 2-7 days leads to a decrease in the level of total protein in growth nutrient media by 7.04% -18.6%.

2. The content of micro- and macroelements in growth nutrient media during the cultivation of transplanted cell lines undergoes insignificant fluctuations within 1-17%, except for the medium of FGMS + Needle DMEM (cell culture 3KG).

3. The composition of the preparations is theoretically justified, for the design of laboratory samples.

Key words: nutrient media, cell cultures, veterinary preparations.

REFERENCES

1. Golubev D. B., Somnina A. A., Medvedeva M. N. (1976). *Rukovodstvo po primenenijukletochnyh kul'tur v virusologii [Manual on the use of cell cultures in virology]*. Leningrad: Medicina [in Russian].
2. Freshni, R. (Eds.). (1989) *Kul'tura zhyvotnyh kletok. Metody [Culture of animal cells. Methods]*. Moscow: Mir [in Russian].
3. Mejhi, B. (Eds.). (1988) *Virusologija. Metody [Virology. Methods]*. Moscow: Mir [in Russian].
4. Sergeev V. A. (1976) *Reprodukcija i vyrashhivanie virusov zhyvotnyh [Reproduction and cultivation of animal viruses]*. Moscow: Kolos [in Russian].
5. Sjurina, V. N. (Eds.). (1965) *Rukovodstvo po veterinarnoj virusologii [Guidelines for veterinary virology]*. Moscow: Kolos [in Russian].
6. Fenner F., Mak-Oslen B., Mims S., Sjembruk Dzh., Uajt D. (1977) *Biologija virusov zhyvotnyh [Biology of Animal Viruses]*. Moscow: Mir [in Russian].