

УДК 619:579.017.8

DOI: 10.31073/vet\_biotech36-11

**КРАСОЧКО П.А.**, д-р вет. наук, д-р биол. наук, проф., e-mail: krasochko@mail.ru,

**КРАСОЧКО И.А.**, д-р вет. наук, проф., e-mail: krasochko@mail.ru,

**КАШПАР Л.Н.**, маг. вет. наук, e-mail: epizootology1926@gmail.com

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*

**БОРИСОВЕЦ Д.С.**, канд. вет. наук, доц., e-mail: borisovets\_bievm@mail.ru

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого»*

**ШАШКОВА Ю.А.**, e-mail: belvitunifarm.okk@gmail.ru

*ОАО «БелВитунифарм»*

**НЫЧИК С.А.**, д-р вет. наук, проф., чл.-корр. НААН, e-mail: snychyk@gmail.com,

**ТАРАСОВ А.А.**, канд. вет. наук, старш. науч. сотр., e-mail: tarasovaleksandr003@gmail.com

*Институт ветеринарной медицины НААН*

## **ПОДБОР ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ**

*Цель работы – провести подбор ростовых и поддерживающих питательных сред для культивирования клеток МДБК, СПЭВ, ПТ и ВНК-21 с использованием микроносителей на основе модифицированных полисахаридов в условиях промышленных предприятий. Данные исследования доказали преимущество использования сред Игла ДМЭМ+199 (1:1) для культивирования клеток МДБК, ПТ и СПЭВ, а Среды ФГМС на среде Эрла и Среды ГЛА на среде Эрла для культивирования клеток ВНК-21 с использованием микроносителей на основе модифицированных полисахаридов в условиях промышленных предприятий. Исследования способствуют дальнейшему созданию вакцин с использованием микроносителей на основе модифицированных полисахаридов.*

**Ключевые слова:** микроносители, модифицированные полисахариды, культура клеток, питательная среда.

**Введение.** Животноводства при современных тенденциях его развития нуждается в увеличении производства отечественных биопрепаратов для профилактики инфекционных болезней. В промышленных условиях для этого необходимо массовое культивирование клеток с целью получения промышленного объема антигена. Культивирование клеток на микроносителях сочетает в себе преимущества стационарного и суспензионного способа – это

наиболее предпочтительный способ для крупномасштабного культивирования клеток [1–4, 8–10].

Важное значение для культивирования клеток на микроносителях имеет питательная среда. Необходимо проводить подбор питательных сред для культивирования клеток на различных типах микроносителей. Правильный подбор питательной среды будет влиять на прямую на выход клеток, а также, на оптимизацию процесса пролиферации клеток и их качество [2–5].

При подборе состава питательных сред для культивирования микроорганизмов следует учитывать множество факторов. Один из них связан со стехиометрией роста микроорганизмов и количеством биомассы, которое необходимо получить в процессе клеточного роста низкомолекулярных органических и неорганических соединений в биомассу. Для синтеза, заданного количество биомассы в систему культивирования, необходимо ввести достаточное количество питательных веществ, взятых в определенном соотношении [4].

**Цель работы.** Провести подбор ростовых и поддерживающих питательных сред для культивирования клеток МДБК, СПЭВ, ПТ и ВНК-21 с использованием микроносителей на основе модифицированных полисахаридов в условиях промышленных предприятий.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводились в условиях ОАО «БелВитунифарм» и кафедры эпизоотологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». Для подбора питательных сред при культивировании клеток МДБК, ПТ, СПЭВ и ВНК-21 с использованием микроносителей на основе модифицированных полисахаридов использовали роллерные установки WC 349020-C (Литва) на 88 роллерных флаконов. Флаконы имеют объем 4,0 л и габариты 110 x 475 мм и диаметр горловины 51 мм. Все процедуры реконсервации и посева клеток осуществляют в ламинарах Logic тип А фирмы «Labconco».

Для проверки использовали в качестве ростовых сред следующие среды: среда Игла МЭМ, среда Игла ДМЭМ, среда 199, среда ФГМС на среде Эрла, среда ГЛА на среде Эрла. В ростовые среды была добавлена сыворотка крови крупного рогатого скота (стерилизованная гамма-лучами).

Бактериологический контроль на стерильность сред, сывороток, суспензии клеток и других материалов осуществляют путем посева на питательные среды: МПБ, МПА, Китт-Тароцци, тиогликолевую среду.

В качестве микроносителя на основе модифицированных полисахаридов использовали хлопковую микрокристаллическую целлюлозу.

Для приготовления суспензии микроносителя, провели следующие этапы работы:

- приготовление суспензии хлопковой микрокристаллической целлюлозы, для чего проводили ее замачивание в стерильной дистиллированной воде (до 5% целлюлозы);
- 4–5-х кратное ее отмывание от остатков химических реагентов, которые были использованы при ее изготовлении;
- автоклавирование полученной суспензии на дистиллированной воде при 1,5–2 атмосферах (115–120°C) в течение 1 часа;
- 2-х кратное отмывание целлюлозы раствором Хэнкса (для придания суспензии изотоничности).

В суспензию клеток в концентрации от 300 до 500 тыс. клеток в 1 мл в роллерные флаконы вносили 2,5% микроносителя. После установили роллерного флакона в роллерные установки WC 349020-C (Литва) с режимом перемешивания клеток 40–50 оборотов в минуту.

Для изучения влияния различных сред на концентрацию клеток при псевдосуспензионном (роллерном) культивировании с использованием микроносителей в условиях промышленного биотехнологического предприятия проведены следующие исследования.

После завершения культивирования, которое проводили в течение 3-х суток и полноценного формирования монослоя как на поверхности роллерного флакона, так на частичках микроносителя, проведено отделение клеток следующим способом.

Сформировавшийся монослой с поверхности роллерного флакона и микроносителя снимали бесцентрифужным способом. Флаконы с микроносителями оставляли в вертикальном положении на 2–3 минуты для осаждения микроносителя с клетками. Затем из флаконов удаляли ростовую среду, пласт клеток на поверхности роллерного флакона и микроносителях дважды ополаскивали смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1:9. Культуру укладывали на роллерную установку (20–25 оборотов в минуту) и в таком положении она находится 10–15 минут. Все манипуляции проводили при комнатной температуре, растворы и среда имели эту же температуру. Отслоившиеся от стекла и микроносителя клетки ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды (50 мл) путем энергичного встряхивания, затем добавляли питательные среды в объеме, равное исходному (равное внесенной суспензии клеток до культивирования).

Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева под малым увеличением микроскопа.

**Результаты исследования и их обсуждения.** Результаты определения концентрации клеток после культивирования различных их культур (МДБК, ПТ, СПЭВ, ВНК-21) на роллерных флаконах с микроносителем – хлопковой микрокристаллической целлюлозой с различными питательными средами приведены в таблице 1.

Таблица 1

**Результаты определения концентрации клеток после культивирования на роллерных флаконах с микроносителями в условиях промышленного биотехнологического предприятия с различными питательными средами**

№№ п/п	Вид среды	Концентрация клеток, тыс./мл
<b>МДБК</b>		
1	Среда Игла МЭМ	800,0±75,0
2	Среда Игла ДМЭМ	1050,00±110,0
3	Среда Игла ДМЭМ+199 (1:1)	1300,0±90,0
4	Среда ФГМС на среде Эрла	600,0±90,0
5	Среда ГЛА на среде Эрла	650,0±85,0
<b>СПЭВ</b>		
1	Среда Игла МЭМ	1000,0±120,0
2	Среда Игла ДМЭМ	1200,0±95,0
3	Среда Игла ДМЭМ+199 (1:1)	1550,0±150,0
4	Среда ФГМС на среде Эрла	800,0±70,0
5	Среда ГЛА на среде Эрла	800,0±85,0
<b>ПТ</b>		
1	Среда Игла МЭМ	700,0±70,0
2	Среда Игла ДМЭМ	950,0±95,0
3	Среда Игла ДМЭМ+199 (1:1)	1200,0±90,0
4	Среда ФГМС на среде Эрла	700,0±110,0
5	Среда ГЛА на среде Эрла	750,0±65,0
<b>ВНК-21</b>		
1	Среда Игла МЭМ	900,0±95,0
2	Среда Игла ДМЭМ	1000,0±120,0
3	Среда Игла ДМЭМ+199 (1:1)	1200,0±125,0
4	Среда ФГМС на среде Эрла	1650,0±155,0
5	Среда ГЛА на среде Эрла	1500,0±145,0

Данные таблицы показывают, что не все среды способствуют достаточно высокому накоплению клеток. Так, для культивирования клеток МДБК, ПТ и СПЭВ оптимальной является использование среды, состоящей из сред Игла ДМЭМ+199 (1:1). Использование данной среды для культивирования клеток МДБК позволило достичь их концентрации клеток 1300,0±90,0 тыс./мл, СПЭВ – 1550±150,0 тыс./мл, ПТ – 1200±90,0 тыс./мл. Но при культивировании клеток ВНК-21 оптимальной является среда ФГМС на среде Эрла и Среда ГЛА

на среде Эрла. Концентрация клеток при культивировании на этих средах достигает  $1500\text{--}1650\pm 155,0$  тыс./мл. Синтетические для культивирования этих клеток менее активны.

**Выводы и перспективы дальнейших исследований.** Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования сред Игла ДМЭМ+199 (1:1) для культивирования клеток МДБК, ПТ и СПЭВ, а среды ФГМС на среде Эрла и среды ГЛА на среде Эрла для культивирования клеток ВНК-21 с использованием микроносителей на основе модифицированных полисахаридов в условиях промышленных предприятий. Данные исследования способствуют дальнейшему созданию вакцин с использованием микроносителей на основе модифицированных полисахаридов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / П.А. Красочко [и др.]; под ред. Н.А. Ковалева. – Минск: Белнаука, 2016. – 492 с.
2. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций / О.В. Блажевич. – Минск: БГУ, 2004. – 78с.
3. Животная клетка в культуре: (методы и применение в биотехнологии) / Г.Т. Акиншина [и др.]; под ред. Л.П. Дьяконова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: Спутник+, 2009. – 652 с.
4. Биотехнология: учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по сельскохозяйственным, естественнонаучным, педагогическим специальностям и магистерским программам / И.В. Тихонов [и др.]; под ред. Е.С. Воронина. – Санкт-Петербург: Гиорд, 2008. – 703 с.
5. Соснина Д.П. Культивирование культуры клеток на микроносителях (литературный обзор) / Д.П. Соснина // Студенческий научный форум: материалы XI международной студенческой научной конференции (23 мая 2019, Научный парк МГУ, Москва). – Режим доступа: <https://scienceforum.ru/2019/article/2018013116>. – Заглавие с экрана.
6. Новые и возвращающиеся болезни животных: монография / А.И. Ятусевич [и др.]. // Витебск: ВГАВМ, 2016. – 400 с.
7. Эпизоотология и инфекционные болезни: учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В.В. Максимович [и др.]. – 2-е изд., перераб. и доп. – Минск: ИВЦ Минфина, 2017. – 824 с.
8. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней: практическое пособие / П.А. Красочко [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2018. – 375с.
9. Красочко П.А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота: автореф. дис. ... док. биол. наук: 03.00.23. – Щелково, 2009. 46 с.

**ПІДБІР ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КЛІТИН ТВАРИН З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОНОСІЇВ В УМОВАХ ПРОМИСЛОВИХ ПІДПРИЄМСТВ** / Красочко П.А., Красочко І.А., Кашпар Л.Н., Борисовець Д.С., Шашкова Ю.А., Ничик С.А., Тарасов О.А.

*Мета роботи – провести підбір ростових і підтримуючих поживних середовищ для культивування клітин МДБК, СПЕВ, ПТ і ВНК-21 з використанням мікроносіїв на основі модифікованих полісахаридів в умовах промислових підприємств. Дані дослідження довели перевагу використання середовищ Ігла ДМЕМ + 199 (1:1) для культивування клітин МДБК, ПТ і СПЕВ, а середовища ФГМС на середовищі Ерла і середовища ГЛА на середовищі Ерла для культивування клітин ВНК-21 з використанням мікроносіїв на основі модифікованих полісахаридів в умовах промислових підприємств. Дослідження сприяють подальшому створенню вакцин з використанням мікроносіїв на основі модифікованих полісахаридів.*

**Ключові слова:** мікроносії, модифіковані полісахариди, культура клітин, живильне середовище.

**SELECTION OF NUTRIENT MEDIA FOR CULTIVATION OF CONTINUOUS ANIMAL CELL USING MICROCARRIERS UNDER CONDITIONS OF INDUSTRIAL ENTERPRISES** / Krasochko P.A., Krasochko I.A., Kashpar L.N., Borisovets D.S., Shashkova Y.A., Nychyk S.A., Tarasov O.A.

**Introduction.** Selection of optimal nutrient media for the cultivation of continuous animal cells in microcarriers under industrial conditions will increase their concentration, optimize the proliferation process and quality.

**The goal of the work** was to conduct selection of growth and supportive media for cell culture MDBK, SPEV, PT and VNK-21 using microcarriers based on modified polysaccharides under conditions of industrial enterprises.

**Materials and methods.** Research was conducted under JSC “Belvitunifarm” and UO “Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine”. For the study we used: 1) cell culture MDBK, PT, SPEV and VNK-21; 2) growth media: medium Eagle MEM, medium Eagle DMEM, medium 199, medium dry enzyme muscles (DEM) with Earle’s medium, medium lactalbumin hydrolysate (LH) with Earle’s medium; 3) cotton microcrystalline cellulose was used as a microcarrier based on modified polysaccharides. The cell concentration after cultivation was counted in hemocytometer under the small magnification of the microscope.

**Results of a research and discussion.** The results of determining the cells concentration after MDBK, PT and SPEV cells cultures cultivation showed that their greatest concentration is achieved by cultivation in medium including Eagle DMEM + 199 (1:1). However for VNK-21 cells cultivation the optimal was medium DEM with Earle’s medium, medium LH with Earle’s medium. Synthetic media for the cultivation of these cells are less active.

**Conclusions and prospects for further researches.** The data obtained indicate the feasibility of using media Eagle DMEM +199 (1:1). For MDBK, PT and SPEV cell cultures and medium DEM with Earle’s medium, medium LH with Earle’s medium for VNK-21 cell culture using microcarriers based on modified polysaccharides in industrial plants.

**Keywords:** microcarriers, modified polysaccharides, cells culture, growth medium.

## REFERENCES

1. Krasochko, P.A., Kovalev, N.A., Nasonov I.V., Iastrebov, A.S., Bytchykyri, D.V., Usenya, M.M., et al. (2016). *Biologicheskie preparaty dlya profilaktiki virusnyh zabolevanij zhivotnyh: razrabotka i proizvodstvo v Belarusi [Biological preparations for prevention of animal viral diseases: development and production in Belarus]*. Minsk: Belnauka [in Russian].
2. Blazhevich, O.V. (2004). *Kultivirovaniye kletok: kurs lektsiy [Cell cultivation: lecture course]*. Minsk: BGU [in Russian].
3. Akinshina, G.T., Belokon, V.S., Bilko, N.M., Gulyukin, M.I., Galnbek, T.V., Dagdanova, A.V., et al. (2009). *Zhivotnaya kletka v kulture (metody i primeneniye v biotekhnologii) [Animal cell in culture (methods and application in biotechnology)]*. L.P. Diakonov (Ed.). (2d ed.). Moskva: Sputnik+ [in Russian].
4. Tikhonov, I.V., Ruban, E.A., Gryazneva, T.N., Samuilenko, A.Y., & Gavrilov, V.A. (2008). *Biotekhnologiya: uchebnik dlya studentov vysshikh uchebnykh zavedeniy, obuchayushchikhsya po selskokhozyaystvennym, yestestvennonauchnym, pedagogicheskim spetsialnostyam i magisterskim programmam [Biotechnology: a textbook for students of higher educational institutions studying in agricultural, natural sciences, pedagogical specialties and magisters programs]*. E.S. Voronin (Ed.). Sankt-Peterburg: Giord [in Russian].
5. Sosnina, D.P. (2019). Kultivirovaniye kultury kletok na mikronositelyakh (literaturnyy obzor) [The cultivation of cell culture on microcarriers (literature review)]. Proceedings from the *Student Science Forum: XI mezhdunarodnoy studencheskoy nauchnoy konferentsii (23 maya 2019 hoda) – XI International Student Science Conference*. Retrieved from <https://scienceforum.ru/2019/article/2018013116> [in Russian].
6. Yatusovich, A.I., Maksimovich, V.V., Krasochko, P.A., Abramov, S.S., Belko, A.A., Verbitsky, A.A., et al. (2016). *Novyye i vozvrashchayushchiyesya bolezni zhivotnykh: monografiya [New and recurring animal diseases: a monograph]*. Vitebsk: VGAVM [in Russian].
7. Maksimovich, V.V., Bagretsov, V.F., Biletsky, O.R., Bublov, A.V., Verbitsky, A.A., Gaisenok, S.L., et al. (2017). *Epizootologiya i infektsionnyye bolezni: uchebnik dlya studentov i magistrantov uchrezhdeniy vysshego obrazovaniya po spetsialnosti «Veterinarnaya meditsina» [Epizootology and infectious diseases: a textbook for students and undergraduates of higher veterinary medicine education institutions]*. (2d ed.). Minsk: IVC Minfina [in Russian].
8. Krasochko, P.A., Maksimovich, V.V., Zhurba, V.A., Dremach, G.E., Sinitsa, N.V., Motuzko, N.S., et al. (2018). *Sredstva spetsificheskoy profilaktiki infektsionnykh bolezney krupnogo rogatogo skota i sviney: prakticheskoe posobie [Specific prophylaxis of infectious diseases of cattle and pigs: practical guide]*. Minsk: IVC Minfin [in Russian].
9. Krasochko, P.A. (2009). *Biotechnologicheskiye osnovy konstruirovaniya i ispolzovaniya immunobiologicheskikh preparatov dlya molodnyaka krupnogo rogatogo skota [Biotechnological bases of design and use of immunological products for young cattle]*. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Shchelkovo [in Russian].