

1989. 3. Пашкевич, В.А. Пригодность перевиваемых клеточных линий для производства препаратов, вводимых людям. // Культивирование клеток животных и человека. Мат. III Всесоюз. совещания. – Пущино, 1992. – С. 88-89. 4. Медуницин, Н.В. Вакцинология. – М.: Триада-Х, 1999. – 272 с. 5. Биотехнология / Тихонов И.В., Рубан Е.А., Грязнева Т.Н. и др. – СПб.: ГИОРД, 2005. 792 с. 6. Полетаев, А.И. Прочная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине. Общие проблемы физико-химической биологии. Итоги науки и техники ВИНИТИ. – М., 1989. – Т. 12. – С. 3-87. 7. Мораска, Л., Эрба, Э. Проточная цитометрия. Культура животных клеток. Методы. – М.: Мир, 1989. – С. 182-213. 8. Колышкин, В.М., Ночевный, В.Т., Новохатский, А.С. Апоптоз клеток в культуре: особенности проявления и влияние на эффективность биотехнологического производства (обзор) // ЖМЭИ, 2005. – №6. – С. 99-105. 9. Криоконсервирование клеточных суспензий (под ред. А.А. Цуцаевой) – Киев: «НАУКОВА ДУМКА», 1983. – 240 с. 10. Пушкар, Н.С., Капрелянц, А.С., Панков, Е.А. Ультраструктура клетки при низких температурах. – Киев, «НАУКОВА ДУМКА», 1978. – 140. 11. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение (Под ред. С.В. Хайдукова, А.В. Зурочки) – Челябинск, 2008. – 195 с.

## EFFICIENCY OF FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS USED TO STUDY OF MECHANISMS OF REPARATION OF BHK-21 CELLS IN THE PROCESS OF CULTIVATION AND CRYOCONSERVATION

Manin B.L., \* Nochevny V.T., \*\* Khaidukov S.V., \*\*\* Laskavy V.N. \*\*

FGI "ARRIAH", Vladimir, \*\*SRVS RAAS, Saratov, \*\*\*Institute of Bioorganic Chemistry named after M.M. Shemyakin of RAS

Results of studies of effect of non-standard cultivation and cryoconservation on the extent of apoptosis and distribution of the BHK-21 cell subline populations in cell cycle phases are presented in the article.

УДК 330.341.1.001.13:615.35:001.892

## ВИКОРИСТАННЯ НАНОТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ НОВИХ ВЕТПРЕПАРАТІВ ДЛЯ РИНКУ УКРАЇНИ

Мельниченко О.М., Бітюцький В.С., Соломонюк Я.В., Бітюцька Н.В., Маляр Д.Д.

Білоцерківський національний аграрний університет

У нашій країні нанотехнологіям приділяється з кожним роком все більше уваги навіть в умовах дуже обмеженого і явно недостатнього фінансування науки. Сьогодні термін «нанотехнологія» значно розширив свій сенс і охоплює та поєднує технологічні системи та процеси машин і механізмів, які здатні виконувати надточні операції у масштабі кількох нанометрів.

У НДІ екології та біотехнології Білоцерківського національного аграрного університету (БНАУ) проведені необхідні дослідження щодо розроблення антианемічних препаратів, нанотехнологія одержання яких та механізм впливу на метаболічні процеси відповідають напряду інноваційної діяльності виробників ветеринарних препаратів – створення іншої лікарської форми препарату, що певним чином змінює його дію [1-2]. З метою приведення національної системи стандартизації та сертифікації до міжнародних вимог нами проведена робота щодо розроблення стандартів для ветеринарних препаратів для профілактики та лікування анемічного стану поросят-сисунів та телят – Полімет-В12 та Вітамет, впровадження яких дозволить споживачеві підвищити рентабельність тваринництва та отримати безпечну продукцію високої якості. Для виробників таких препаратів наукова документація дасть чітку регламентацію технічних вимог щодо цієї продукції [3].

З огляду на особливості метаболізму у моногастрічних і полігастрічних тварин нами було сформовано мету щодо отримання багатокомпонентних ін'єкційних препаратів для профілактики і лікування анемії новонароджених телят та визначено завдання для досягнення поставленої мети.

**Матеріали та методи.** Для виробництва комплексних антианемічних препаратів Полімет-В12 та Вітамет сконструйовано та придбано прилади і обладнання для здійснення технологічного процесу: зворотноосмотична система для нанофільтрації хелатів металів та вітамінів, одержання апірогенної води, багатофункціональні хімічно та термостійкі керамічні фільтри для здійснення розподілу реагентів (хелатів, вітамінів) у режимі тангенціальної ультрафільтрації та нанофільтрації. Використано нанофільтраційні керамічні мембрани на основі оксидів різних металів з регульованими пористістю, розмірами пор, адсорбційною здатністю, каталітичною активністю та електроповерхневими властивостями [4]. Проведено моделювання та розрахунки процесів очищення, розділення та концентрування розчинів хелатів, вітамінів та нанодисперсних систем.

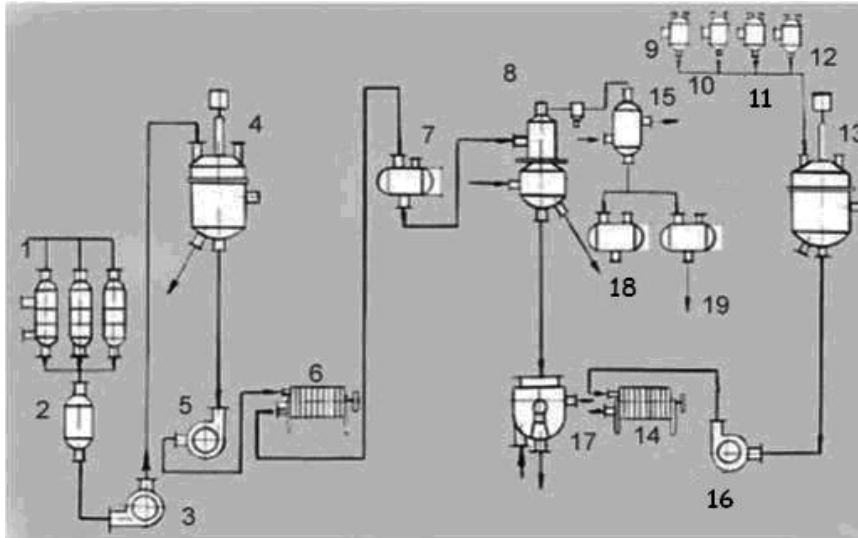
Методи дослідів на тваринах, визначення та контролювання вмісту вітамінів та металів в організмі тварин, препаратах, технології синтезу наноматеріалів, клінічні та доклінічні випробування створених препаратів опубліковані в попередніх статтях та працях [5-8].

**Результати досліджень.** Важливим аспектом феротерапії, особливо молодяку сільськогосподарських тварин, зокрема телят, є терапевтична безпека препаратів Феруму, що використовуються. Високий ризик виникнення побічних ефектів, інтоксикації Ферумом при терапії сольовими препаратами Феруму, зумовлені механізмом всмоктування двовалентного Феруму шляхом пасивної дифузії. Сольові препарати містять Ферум у двовалентній формі. Для того, щоб бути засвоєним,  $Fe^{2+}$  підлягає окисненню, що сприяє утворенню вільних радикалів. До нових високоефективних та безпечних препаратів Феруму належать створені в НДІ екології та біотехнології БНАУ препарати, що являють собою неіонні сполуки Феруму на основі гідроксид-декстринового комплексу (ГДК) тривалентного Феруму [5, 6]. Структура комплексу складається з багатоядерних центрів Феруму гідроксиду (III), оточених нековалентно зв'язаними молекулами декстринів. У процесі створення препаратів були використані нанотехнології для включення органічних сполук у композицію з неорганічними. Сформовані нанодисперсні структури захищених міцел Феруму, що підтверджується аналізом спектральних характеристик одержаних комплексів. У складі препаратів Полімет-В12 та Вітамет містяться вітаміни групи В в оптимальних кількостях і мікроелементи, які забезпечують оптимальне функціонування ферментних систем та метаболізм вітамінів. При створенні препаратів використано мікроелементи у структурі координаційних сполук, які є структурними та функціональними аналогами активних центрів металоферментів [7, 8]. При одержанні біохелатів застосовано принципи ефективно діючих біонеорганічних комплексів, які функціонують у клітинах *in vivo*. У процесі конструювання біокомплексів було залучено сучасні дані про шляхи утворення і транспорту біосистем, що моделюються, форми, у яких вони елімінуються з оточуючого середовища транспортуються крізь мембрани клітин і досягають кінцевого пункту, де утворюють відповідні біокомплекси.

Процес створення ветеринарних препаратів включав етапи визначення програми досліджень та методів контролю одержаної продукції, а також розробку нормативної документації (Технічних умов, ДСТУ), виготовлення та випробування

вання нового обладнання, доклінічні та клінічні дослідження, реєстрацію ветеринарного препарату. Одержані препарати екологічно безпечні та стабільні, захищені патентами України [10-12]. Для одержання комплексних метало- та вітаміновмісних препаратів продовжені дослідження з вдосконалення раніше розроблених технологій концентрування біокомплексів. Нами використані керамічні мембранні фільтри, що мають низку переваг порівняно з полімерними (органічними) фільтрами, які використовувалися нами в попередніх дослідженнях. Це, перш за все, їх висока термо- та механічна стійкість, а також стійкість до хімічного та мікробіологічного впливу, можливість використання зворотних потоків крізь мембрану, висока пропускна здатність, значний термін використання.

Під час технології одержання препаратів нами було враховано всі аспекти успішного виробництва: забезпечення якості кінцевого продукту, виконання принципів GMP, захист персоналу від впливу небезпечних та шкідливих факторів, захист навколишнього природного середовища, які перераховані у ТУУ на препарати Полімет-В12 та Вітамет та патентах [6, 10-12]. Розроблена установка для нанофільтрації складається з зворотно осмотичної системи, біореактора, відцентрових pomp, попереднього керамічного фільтра, ємностей для одержання і збору концентрованих біосубстанцій та мембран рулонного типу для зворотного осмосу, котрі вмонтовано в корпус з фланцями, в які підводиться циркулюючий у системі розчин вітамінів. Загальна схема пілотного виробництва мінерально-вітамінних препаратів подана на рис.1



**Рис. 1** Апаратурно-технологічна схема виробництва мінерально-вітамінних антианемічних препаратів:

1. Зворотно-осмотична система для одержання апірогенної води. 2. Ємність для апірогенної води. 3. Помпа. 4. Реактор для одержання кластерних сполук Fe. 5. Помпа. 6. Керамічні попередні фільтри. 7. Автоклав для кислотного гідролізу крохмалю. 8. Реактор для одержання металовітамінних препаратів. 9,10,11,12. Ємності для одержання металохелатів. 13. Ємність для збору одержаних металохелатів. 14. Нанофільтраційна керамічна система для концентрування металохелатів та вітамінів. 15. Ємність для розчинів вітамінів. 16,17. Помпи. 18. Ємність з концентрованим розчином вітамінів та металохелатів. 19. Розлив, етикетування та пакування продукції.

Для забезпечення екологічної безпеки виробництва комплексних антианемічних препаратів розроблена та затверджена відповідна документація, яка необхідна для дотримання всіх параметрів технологічного процесу, технологічних настанов та інструкцій, вимог з охорони праці, пожежної безпеки і промислової санітарії. Впровадження цієї промислової біотехнології дозволяє підвищити як рентабельність виробництва, так і застосування комплексних металохелатних сполук для біологічно безпечної корекції порушень мікро мінерального живлення молодяку сільськогосподарських тварин з одночасним вирішенням економічних, екологічних та соціальних завдань.

Аналіз даних хімічного складу отриманої продукції свинарства за використання антианемічних препаратів Полімет-В<sub>12</sub> та Вітамет дозволило встановити, що концентрації Феруму, Купруму, Цинку, Кобальту у різних органах і тканинах телят була меншою від ГДК.

**Висновки.** Розроблена інноваційна технологія отримання препаратів для профілактики аліментарної анемії сільськогосподарських тварин. У процесі створення препаратів були використані нанотехнології для включення органічних сполук у композицію з неорганічними. Препарати Полімет-В<sub>12</sub> та Вітамет пропонується використовувати з метою профілактики аліментарної анемії сільськогосподарських тварин, отримання екологічно чистої продукції, запобігання забрудненню продовольчої сировини, харчової продукції, навколишнього середовища важкими металами.

### Список літератури

1. Коцюмбас, І.Я., Гаврилюк, О.Г., Тесляр, Г.Ю. Інноваційна діяльність та розробка нових ветеринарних препаратів для ринку України // Наук. техн. бюл. Ін-ту біології тварин та ДНДК1 ветпрепаратів та корм. добавок. – Львів, 2005. – Вип.6, №3,4. – С. 188-196.
2. Буднікевич, І.М. Становлення регіонального ринку інновацій: теорія та практика: Автореф. дис. ... канд. екон. наук: 08.10.01 / Чернівець. нац. ун-т. – Львів, 2002. – 16 с.
3. Ветеринарія. Препарати для профілактики та лікування анемічного стану поросят-сисунів. Технічні умови: ДСТУ 4919:2008. / В.С. Бітюцький, В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, О.М. Мельниченко. – [Чинний від 2009-07-01]. Уведено вперше. – К.: Держспоживстандарт України, 2008. – 9 с.
4. Czermak, P., Ebrahimi, M., Catapano, G. New generation ceramic membranes have the potential of removing endotoxins from dialysis water and dialysate // *Int. J. Artif. Organs*. – 2005. – Jun. 28 (7). – С. 694-700.
5. Полімет-В12 / В.Г. Герасименко, В.С. Бітюцький, О.М. Мельниченко, М.О. Герасименко. Технічні умови України (ТУ У) 24.4.00493712.003-2002. ОКП. 933730. – К., 2002.
6. Вітамет / В.Г. Герасименко, В.С. Бітюцький, О.М. Мельниченко, М.О. Герасименко. Технічні умови України (ТУ У) 24.4.00493712.0C5-2002. ОКЛ933730. – К., 2002.
7. Мельниченко, О.М. Дослідження гострої токсичності антианемічних мінерально-вітамінних препаратів / О.М. Мельниченко // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква, 2008. – Вип. 53. – С. 94-98.
8. Мельниченко, О.М. Дослідження гострої токсичності антианемічних мінерально-вітамінних препаратів / О.М. Мельниченко // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква, 2008. – Вип. 53. – С. 94-98.

ко, О.М. Теоретичні і практичні аспекти біотехнології виробництва мінерально – вітамінних препаратів та вивчення їх впливу на гомеостаз і продуктивність молодняку сільськогосподарських тварин. – Дисерт. докт. с.-г наук: 03. 00.20- Білоцерк. нац. агр. ун-т. Біла Церква, 2009. с. 307. 9. Hathcock J. N. Vitamins and minerals: Efficacy and safety // Amer. J. Clin. – Nutr. – 1997. – Vol. 66. – P. 427–437. 10. Геропротекторні властивості оригінального мікроелементно- вітамінного засобу Вітам / Мохорт М.А., Григор'єва Г.С., Мисливець С.О. та ін.// Тези доп. 2-ї НПК «Григор'євська старіння та шляхи його профілактики». – Одеса, 2001. – С. 154-155. 11. Пат. 68862, 7 А61 К33/26. ІІА. Спосіб профілактики та лікування анемії новонароджених поросят / В.Г. Герасименко, В.С. Бітюцький, О.М. Мельниченко, М.О. Герасименко, П.І. Веред, В.М. Оксамитний. – № 2003110200; заявл. 12.11.03; опубл. 16.08.04, Бюл.№8. 12. Пат. 6101 А, 7 А 61К33/26. ІІА. Комплексний мінерально-вітамінний препарат для профілактики мікроелементозів новонароджених поросят /В.Г. Герасименко, В.С. Бітюцький, О.М. Мельниченко, М.О. Герасименко. – № 20040907693; заявл. 22.09.04; опубл. 15.04.05, Бюл. № 4. 13. Пат. 6102 А, 7 А 61К33/26. ІІА. Препарат Полімет-В<sub>12</sub> для профілактики та лікування анемії новонароджених поросят /В.Г. Герасименко, В.С. Бітюцький, О.М. Мельниченко, М.О. Герасименко. – № 20040907694; заявл. 22.09.04; опубл. 15.04.05, Бюл. № 4.

## APPLYING OF NANOTECHNOLOGIES FOR OBTAINING OF NEW VETERINARY PREPARATIONS FOR UKRAINIAN MARKET

**Melnychenko O.M., Bityutsky V.S., Solomonyuk Ya.V., Bityutska N.V., Malyar D.D.**

*Bila Tserkva State Agrarian University*

*The paper highlights the innovation activity on applying of nanotechnologies in development of biopreparations, that is developing a different form of the preparation that changes in some way, it also adopts the national standards and certificates system to the standards for veterinary preparations for prevention and treatment of anemia in animals.*

УДК 619:611.018.54:591.111

## ВЛИЯНИЕ ГАММА ОБЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТА ЛАКТАЛЬБУМИНА И ДРОЖЖЕВОГО ЭКСТРАКТА НА КАЧЕСТВО КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

**Плотникова Э.М., Гурьянов Н.И., Хамзина Е.Ю., Кириллова Ю.М., Хусаенов Р.Х., Цыганова В.Г.**

*ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», г. Казань*

Определена возможность репродукции вирусов ИРТ крупного рогатого скота на перевиваемой культуре клеток ЛЭК, выращенной на ростовой среде 0,5 %-ный ГЛА на основе раствора Хэнкса с 10 % сыворотки крови бычков. При культивировании вируса ИРТ было выявлено снижение инфекционной активности на  $1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  в опыте по сравнению с контролем.

В решении современных как теоретических, так и практических проблем ветеринарной биотехнологии значительное место занимает культивирование клеток *in vitro* [1]. Они являются важным объектом при проведении вирусологических, биохимических, молекулярно-генетических и других исследований. В связи с этим актуальна проблема разработки условий наиболее эффективного их выращивания [2].

Необходимо отметить, что во время становления технологии культур клеток для их выращивания использовали сначала простые среды или даже физиологический раствор с применением в качестве биологических добавок сывороток крови животных или гидролизатов животного и растительного происхождения. Наибольшее применение в это время для культивирования клеток имела среда 0,5 % гидролизата лактальбумина (ГЛА) на растворе Хэнкса с добавлением в нее 10 % сыворотки крови животных. Данная среда была универсальной для большинства первичных культур клеток сельскохозяйственных животных. Но для отдельных линий клеток млекопитающих, в том числе человека, в дальнейшем разработаны специальные среды, обеспечивающие оптимальный рост этих клеток или возможность их культивирования в бессывороточной среде [3].

В 2009 году в ФГУ ФТЦРБ поступили серии сухих гидролизата лактальбумина и дрожжевого экстракта фирмы «Sigma», негативно влияющие как на пролиферацию, морфологию клеток животного происхождения, так и репродукцию в них вирусов животных. Посев профильтрованного готового 0,5 %-ого ГЛА на растворе Хэнкса на стандартные бактериальные и микоплазменные среды не выявил контаминантов. Мы были поставлены перед дилеммой: данные сухие компоненты культуральной питательной среды содержат в своем составе или микроорганизмы, не обнаруживаемые при бакпосевах и проходящие через стерилизующие фильтры, или вещества, ингибирующие пролиферацию клеток, что в свою очередь ведет к снижению накопления в них вирусной массы.

Общеизвестно, что надежным способом стерилизации биологических жидкостей и сухих веществ является их  $\gamma$ -облучение, но, оно, кроме того, вызывает изменения структуры белков, ферментов, аминокислот, с последующей активацией ферментов метаболизма, катализирующих обмен веществ даже у растений, человека и животных.

Цель данной работы состояла в том, чтобы некачественные серии гидролизата лактальбумина и дрожжевого экстракта были пригодны для производства культуральных питательных сред, используемых при выращивании клеток животного происхождения, которые служат субстратом для репродукции вирусов при производстве вакцин и диагностикумов против заболеваний животных.

Для устранения возможной микробной контаминации и изменения структуры дрожжевого экстракта и гидролизата лактальбумина проведено их  $\gamma$ -облучение на установке «Исследователь», при этом перед нами не стояла задача в изучении изменения структуры данных биологически активных веществ.

В связи с вышеизложенным была проведена работа по экспериментальному обоснованию возможности культивирования перевиваемой линии клеток ЛЭК (легкое эмбриона коровы) на среде ГЛА, содержащей, облученные гидролизат лактальбумина и дрожжевой экстракт, а также репродукции в этих клетках вируса ИРТ крупного рогатого скота.

**Материалы и методы.** Исследования проводили в лаборатории культур клеток и гибридной технологии и вирусологии ФГУ «ФТЦРБ-ВНИВИ».

Тестовую клеточную культуру ЛЭК /ЛЕК – перевиваемая культура легкого эмбриона крупного рогатого скота, культивировали при 37 °С в течение нескольких последовательных пассажей на среде, содержащей 90 % ГЛА на основе раствора Хэнкса, 10 % сыворотки крови бычков с добавлением классического комплекса антибиотиков. В качестве контроля была та же линия клеток, но выращенная на питательной среде Игла MEM с 10 % сыворотки крови бычков. Для изучения накопления вирусной массы был использован вирус ИРТ крупного рогатого скота. Инфекционную активность вируса определяли титрованием в культуре клеток ЛЭК. Титр вируса вычисляли по методу Риди и Менча. Было проведено 4 последовательных пассажа вируса с последующим определением его титров.