

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-В₁₂ 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

Melnichenko O.M., Bityutsky V.S., Solomonyuk Ya.V., Bityutsky 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 ТЦД₅₀/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 γ -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 γ -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.

Результаты исследований. Адаптация перевиваемой культуры ЛЭК в лаборатории культур клеток и гибридной технологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в течение 40 последовательных пассажей в питательной среде ГЛА с необлученным гидролизом лактальбумина и дрожжевым экстрактом привела к появлению в монослое длительно не зарастающих «окон», а также нечеткости границ, между клетками и изменению их морфологии (рис. 1Б). В ходе опытов показано, что при культивировании ЛЭК в ростовой среде на основе ГЛА происходит сдвиг pH в кислую сторону уже через 24 ч инкубации. Ростовые среды на основе MEM и ГЛА, используемые нами в ходе эксперимента, различаются между собой по буферной емкости.

При γ -облучении дрожжевого экстракта и гидролизата лактальбумина на установке «Исследователь» хорошие результаты были достигнуты при 700 Гр и 3006 Гр.

После выращивания культуры клеток LEK в среде с облученными гидролизатом лактальбумина и дрожжевым экстрактом морфология их восстанавливается и становится аналогичной, как и на контрольной среде, что видно на рис. 1А.

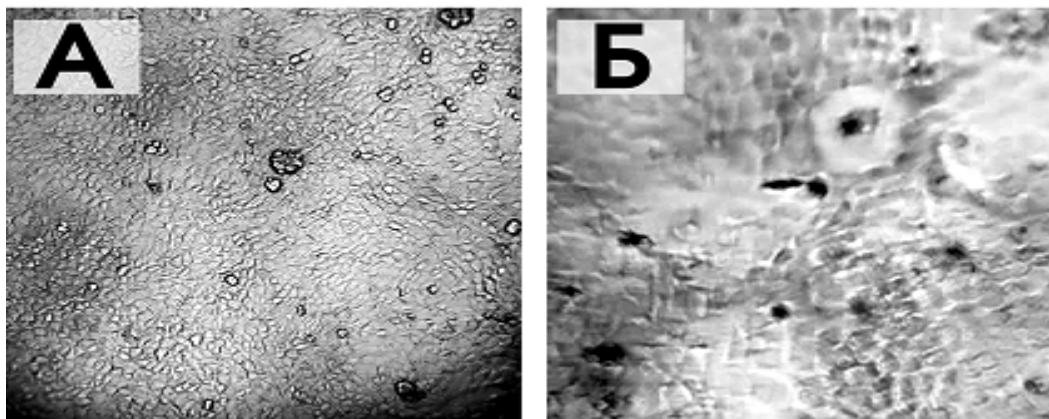


Рис.1 Монослой ЛЭК через 48ч культивирования на контрольной (А) и опытной (Б) среда ГЛА до облучения ее компонентов Ок.х10, об. х10.

Показано, что инфекционная активность вируса ИРТ в культуре клеток ЛЭК, выращенных на опытной среде ГЛА с облученными компонентами, составляла 5,5 lg ТЦД₅₀/мл, в то время как в контроле она была 6,5 lg ТЦД₅₀/мл. По литературным данным, вирус ИРТ предпочитает щелочную pH (от 7,3 до 9,0) среды. При репродукции вируса ИРТ на культуре клеток ЛЭК, выращенной с использованием ростовой среды ГЛА, через 72 ч pH становится ниже 6,0, что снижает его репродукцию в клетках. Добавлением в культуральную среду ГЛА 9%-ного бикарбоната натрия в процессе культивирования клеток нам удалось повысить инфекционную активность вируса ИРТ крупного рогатого скота на 0,75 lg ТЦД₅₀/мл, доведя ее до 6,25 lg ТЦД₅₀/мл.

Выводы. Результатами проведенных исследований установлено, что серии сухих гидролизата лактальбумина и дрожжевого экстракта, полученные ФГУ ФЦТРБ и используемые для приготовления рабочих растворов среды, непригодны без их предварительного облучения на гамма установке «Исследователь». Эти компоненты, по всей вероятности, содержат в своем составе или не обнаруживаемые при бакпосевах микроорганизмы, или вещества, ингибирующие пролиферацию клеток, что в свою очередь ведет к снижению накопления в них вирусной массы. Гамма облучение гидролизата лактальбумина и дрожжевого экстракта, используемых для приготовления культуральной среды, способствует улучшению ростовых качеств и соответственно пролиферации, стабилизации морфологии культуры клеток ЛЭК и репродукции на них вируса ИРТ крупного рогатого скота. Увеличивая буферную емкость культуральной среды ГЛА, содержащей облученные биологически активные компоненты, бикарбонатом натрия в процессе культивирования клеток, нам удалось повысить репродукцию вируса ИРТ крупного рогатого скота в клетках ЛЭК до 6,25 lg ТЦД₅₀/мл, что лишь незначительно ниже, по сравнению с выращиваемыми на среде Игла MEM.

Таким образом, при культивировании клеток ЛЭК и репродукции вируса ИРТ крупного рогатого скота дорогостоящую среду Игла MEM можно успешно заменить средой 0,5 %-ным ГЛА на растворе Хенкса с 10 % сыворотки крови бычков.

Список литературы

1. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Под ред. проф. Л.П. Дьяконова, проф. В.И. Ситькова – М.: Компания Спутник+. – 2000. – 400 с.
2. Цыренов, В.Ж. Основы биотехнологии: культивирование клеток человека и животных. Учебно-методическое пособие/ В.Ж. Цыренов – Улан-Удэ: ВСГТУ. – 2005. – 48 с.
3. Методы культивирования клеток/ под ред.: Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. – 2008.-278 с.

THE IRRADIATION OF LACTALBUMIN HYDROLYZATE AND YEAST EXTRACT IRRADIATION ON QUALITY OF NUTRIENT CULTURE MEDIUM

Plotnikova E.M., Guryanov N.I., Khamzina E.Yu., Kirillova Yu.M., Khusaenov R.K., Tsyganova V.G.

FSI "Federal Center for Animals Radiation and Toxicological Safety", Kazan

The opportunity of reproduction of bovine virus IRT on established cell culture LEK, with cultivated on nutrient culture medium containing bad lactalbumin hydrolyzate and yeast extract was determined.