

Сопоставив полученные в результате исследования данные содержания селена в крови телят первой и третьей группы на 10-й день после применения испытуемых препаратов, отметили статистически значимые ($P < 0,001$) различия (на 41,4%). Лечебно-профилактическая эффективность при беломышечной болезни у телят используемых препаратов в проведенных опытах составила 95-100% как в первой, так и второй группах, в то время как в третьей группе – 70-90%, так как за время наблюдения (35 дней) отмечали падеж телят, и при патологоанатомическом вскрытии диагноз беломышечная болезнь был подтвержден. В результате применения животным препарата «Витафарм Е–Селен» экономическая эффективность ветеринарных мероприятий в расчете на 1 рубль затрат составляет 2,92 рубля, препарата-аналога «Интровит–Е–Селен» – 2,41 рубля, в то время как при использовании инъекционных препаратов – 1,58 рубля.

Заключение. Проведенные исследования показывают, что селенсодержащий препарат для орального применения – «Витафарм Е–Селен» – по параметрам острой оральной токсичности относится к веществам малоопасным (4 класс опасности).

Препарат «Витафарм Е–Селен» обладает выраженным лечебно-профилактическим эффектом при беломышечной болезни у телят, не уступает по эффективности иностранному препарату-аналогу «Интровит–Е–Селен» при более высокой окупаемости.

Литература. 1. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007-76. – Введ. 01.01.77 – М.: Изд-во стандартов, 1976. – с. 81-85. 2. Выращивание и болезни молодняка: практическое пособие / А. И. Ятусевич [и др.]; ред. А. И. Ятусевич [и др.]; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 816 с.: ил. – Библиогр. в конце разд. 3. Иванов, В. Н. Зависимость содержания минеральных веществ в крови нетелей от количества их в рационе / В.Н. Иванов // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства: материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и преподавателей сельскохозяйственных учебных заведений и научно-исследовательских учреждений, (г. Витебск, 22-23 мая 2001 года) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2001. – С. 92-93. 4. Иванов, В.Н. Препарат «Витафарм Е–селен»: токсикологическая характеристика, лечебно-профилактическая эффективность / В.Н. Иванов, И.А. Ятусевич // Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии: материалы V Международного съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов, Витебск, 26-30 мая 2015 г. / УО ВГАВМ; редкол.: А.И. Ятусевич (гл.ред.) [и др.]. Витебск, 2015. – С. 250-253. 5. Кормление, содержание и внутренние болезни высокопродуктивных коров: учебное пособие для студентов вузов / А. П. Курдеко, и др.: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. – Горки: БГСХА, 2010. – 160 с. 6. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / НАН Белоруссии. Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского; сост. А.Э. Высоцкий [и др.] – Минск, 2007 – 156 с. 7. Ятусевич, И.А. Токсикологическая характеристика и эффективность применения препарата «Витафарм Е–селен» / И.А. Ятусевич, В.Н. Иванов, В.Ю. Сорокина // Аграрна наука – виробництво: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, м. Біла Церква (6 листопада 2014 року). – БНАУ, 2014. – С. 15.

Статья передана в печать 20.04.2017 г.

УДК 619:578.824.11

АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ СПОСОБОВ НАКОПЛЕНИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

*Красочко П.А., **Ковалев Н.А., **Бучукури Д.В., **Золотарев К.С.

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

**РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск, Республика Беларусь

Приведен анализ литературы по современным способам накопления вируса бешенства. Спектр чувствительных к вирусу бешенства линий культур клеток достаточно широк. Выбор конкретной линии клеток обуславливается ее чувствительностью, культуральными характеристиками и предполагаемым способом накопления вирусной биомассы. Проанализированы различные способы культивирования клеток. Роллерное, суспензионное и псевдосуспензионное культивирование клеток позволяет получать урожай вируса бешенства в 2-10 раз выше, чем при стационарном культивировании. Наиболее приемлемо суспензионное культивирование клеток для накопления вирусов при производстве вакцин, которое обладает, по сравнению с другими способами культивирования, следующими преимуществами: однородность суспензии, возможность длительного поддержания клеток в логарифмической фазе роста, удобство многократного исследования физиологического состояния клеток в суспензии, высокая экономичность метода, возможность математического моделирования процессов клеточного роста в зависимости от влияния факторов внешней среды. **Ключевые слова:** культура клеток, роллерные установки, биореакторы, питательные среды, вирусы, вакцины.

ANALYSIS OF MODERN METHODS OF RABIES VIRUS ACCUMULATION FOR THE MANUFACTURE OF RABIES VACCINES

*Krasochko P.A., **Kovalev N.A., **Buchukuri D.V., **Zolotarev K.S.

* Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

** Institute of Experimental Veterinary Medicine name S.N Vyshelieski, Minsk, Republic of Belarus

The analysis of literature at modern methods of accumulation of rabies virus is given. Spectrum sensitive to rabies virus cell culture lines is wide enough. The choice of cell line caused its sensitivity, cultural characteristics and the intended

*route of viral accumulation of biomass. We analyzed various methods of cell culture. Roller, suspension and pseudosuspension culture of cells produces rabies virus harvest 2-10 times higher than that in stationary culture. The most acceptable suspension culture cells for accumulation of virus during vaccine production, that has other methods following advantages culturing homogeneity of the suspension, the possibility of long-term maintenance of cells in logarithmic growth phase, the convenience of multiple studies physiological state of cells in suspension, high efficiency of the method, the possibility of mathematical simulation of cell growth, depending on the influence of environmental factors. **Keywords:** cell culture, roller installations, bioreactors, culture media, viruses, vaccines.*

Введение. Бешенство - особо опасная остропротекающая вирусная инфекционная болезнь теплокровных животных всех видов, а также человека, передающаяся главным образом через укус больного животного и характеризующаяся признаками поражения ЦНС и заканчивающаяся смертью. В естественных условиях заражение происходит в результате попадания слюны больного животного, содержащей вирус, на поврежденный кожный покров здорового животного. С места внедрения в организм и до пункта своего основного размножения и накопления – центральной нервной системы – вирус бешенства распространяется по нервам; но наряду с этим допускается возможность распространения возбудителя и лимфогематогенным путем. В слюну вирус попадает по нервным путям из центральной нервной системы. В слюнных железах происходит размножение в местных нервных узелках, лежащих весьма поверхностно под слизистой оболочкой языка и щек. Клетки этих нервных узелков в результате поражения вирусом дегенерируют, разрушаются, и вирус переходит на поверхность слизистой оболочки или в проток слюнных желез. По клиническому проявлению болезни различают abortивную, возвратную, атипическую, буйную и тихую формы [1, 5, 22].

В настоящее время дикие плотоядные животные являются основным источником инфекции и фактически определяют эпизоотическую обстановку по данному заболеванию [2]. Ситуация по бешенству усугубляется ростом численности безнадзорных животных, нарушениями правил содержания домашних животных, неудовлетворительным проведением охото-хозяйственных мероприятий по регулированию численности диких животных в природных условиях (за последние 10 лет поголовье лисиц и енотовидных собак в Беларуси почти удвоилось) [2]. Имеет место слабая организация работ по учету и паспортизации животных, недостаточный охват домашних животных профилактической иммунизацией [2, 3].

Положение по бешенству в мире и в Беларуси характеризуется активизацией природных очагов и тенденцией их к распространению [3]. В такой ситуации важным фактором является возможность блокирования распространения вируса бешенства животными дикой фауны.

Воздействие на природные очаги бешенства до недавнего времени сводилось к регуляции численности животных, являющихся резервуаром инфекции. Мероприятия по сокращению численности животных путем систематического отстрела, газации нор, по применению ядов и гормональных препаратов мало отразились на распространении природных очагов вируса бешенства.

Помимо огромной социальной значимости, характеризующейся смертностью людей в результате заболевания, бешенство наносит серьезный экономический ущерб, который определяется затратами на вакцинацию и оказание медицинской помощи, связанной с применением иммуноглобулина, используемого для лечения обратившихся за антирабической помощью людей. В сельском хозяйстве ущерб состоит из потерь от падежа и вынужденного убоя заболевших животных [3, 5, 6].

Приоритет в выяснении сущности заболевания и разработке метода вакцинации против него принадлежит Пастеру. Дальнейшее изучение бешенства связано с именами Babes, Negri, Femi, Н.Ф. Гамалеи, Н.А. Михина, О.А. Германа и других исследователей.

Существенный прогресс в изучении бешенства достигнут в последние годы. Успешно разрабатывалась диагностика: иммуноферментный анализ, метод флуоресцирующих антител (МФА), твердофазный иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР), выделение вируса *in vitro* с использованием культур клеток, биопроба на новорожденных лабораторных животных. Предложены эффективные препараты для специфической профилактики заболевания: антирабический гетерологичный или гомологичный иммуноглобулин, антирабические живые и инактивированные вакцины.

На базе отдела вирусных инфекций РУП «Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского» разработан ряд моно- и ассоциированных антирабических вакцин: вакцина «БЕЛ-РАБ» для иммунизации домашних и сельскохозяйственных животных, бивалентная вакцина против бешенства и парвовирусного энтерита, трехвалентная вакцина против бешенства, чумы и парвовирусного энтерита, поливалентная инактивированная вакцина против бешенства, чумы, парвовирусного энтерита и инфекционного гепатита [2, 8, 11].

Одним из основных способов профилактики бешенства является профилактическая и вынужденная антирабическая вакцинация диких плотоядных животных. В связи с тем, что основным источником бешенства в Беларуси являются дикие плотоядные, в основном лисицы, введение антирабической вакцины которым традиционным методом (парентерально) в естественных условиях не выполнимо, в БелНИИЭВ впервые в СССР под руководством академика Ковалева Н.А. был разработан пероральный метод их вакцинации и вакцина для этой цели [2, 6].

Ранее в качестве приманок, в которые вводили антирабическую вакцину, использовались куриные головы. Однако, при удовлетворительной поедаемости таких приманок, наибольшими их недостатками являются невозможность крупномасштабного применения, низкий уровень технологии производства и низкая сохранность вируса в приманке. Технология изготовления приманок с вакциной в блистерной упаковке является более перспективной, поскольку позволяет изменять ее размер, форму, запах, вкус и структуру материала, что делает приманки более эффективными в борьбе с бешенством диких плотоядных животных [3, 14].

При изготовлении оральных вакцин из фиксированных штаммов вируса бешенства одним из основных технологических этапов является накопление вируса бешенства на культуре клеток. Для

этого используются различные методы культивирования клеток и накопления вируса: стационарный, роллерный, суспензионный и на микроносителях.

Методы культивирования клеток и накопления на них вируса бешенства.

1. Стационарный метод.

В настоящее время для выделения и размножения вирусов животных используются первичные культуры клеток и установившиеся клеточные линии. В общих чертах процедура оказывается одинаковой для всех вирусов. Для накопления вируса бешенства используют первичные клетки и их субкультуры – ФЭК (фибробласты эмбрионов кур), а также перевиваемые – ВНК 21, Vero, FRHK, MDCK и другие.

Стационарный метод основан на использовании стеклянных или пластиковых сосудов (матрасов), объемом от 100 мл до 3 литров.

Для накопления вируса бешенства используют 2 методических подхода – заражение вирусом на сформированный монослой или инфицирование суспензии клеток перед внесением их в матрас.

Заражение сформированного монослоя клеток вирусом производят после удаления ростовой среды, отмывания клеток сбалансированными буферными солевыми растворами (СБСР) или фосфатно-солевым буфером (ФСБ) для удаления ингибиторов (антител), которые могут присутствовать в среде. Вирусные частицы вносятся в небольшом количестве СБСР или ФСБ из расчета 0,1-1,0 вирусных частиц на 1 клетку, адсорбируются клетками в течение 30-60 мин. После этого вирус удаляют и на инфицированный монослой клеток добавляют поддерживающую среду.

Заражение вирусом бешенства культивируемых клеток не вызывает видимых характерных морфологических изменений клеток. Детали морфологических изменений оказываются различными в случае разных штаммов вирусов.

В первых пассажах вирус размножается медленно. На выход его в клеточной культуре влияют: тип культуры, штамм вируса, количество вирусных частиц на клетку при заражении, температура инкубации, рН среды и присутствие в среде белка. Максимальный выход вируса получается при культивировании в условиях 32-7-35°C и рН среды 7,6-8. При адаптации вируса бешенства добавление в питательную среду (при заражении культуры клеток) ДЕАЕ-декстрана или протаминсульфата (1 мг/мл) способствует ускорению адсорбции и проникновения вируса в клетки. При адаптации вируса к культурам клеток влияют такие факторы, как изменение температуры культивирования, множественность заражения клеток, рН питательной среды. Интенсивность репродукции вируса бешенства подтверждают с помощью иммунофлуоресцирующих или иммуноферментных антирабических конъюгатов, а также с использованием полимеразной цепной реакции [1, 5, 7].

2. Метод Роллерного культивирования клеток.

До недавнего времени тканевые культуры применялись в вирусологии преимущественно в виде однослойных стационарных культур. Во многих случаях этот метод выращивания клеток является незаменимым. Многолетний опыт показывает, что при использовании однослойных стационарных культур встречается ряд трудностей, связанных с огромными затратами рабочего времени и материалов. С этой точки зрения, более выгодны роллерные культуры, которые экономичны, характеризуются оптимальным отношением полезной площади культивирования к объему питательной среды и открывают благоприятные возможности для накопления клеточной массы.

Термин «роллерные культуры» обозначает метод культивирования, при котором клеточный монослой располагается по всей цилиндрической поверхности горизонтально вращающихся сосудов и периодически омывается питательной средой. В силу определенных причин некоторое количество клеток может в отдельных случаях быть взвешено в культуральной среде. В подобном варианте культуру клеток называют роллерно-суспензионной. «Урожайность» клеточной культуры будет тем больше, чем больше площадь, с которой собирают клетки. Исследователи использовали различные пути увеличения площади поверхности, на которой происходило прикрепление и размножение клеток. Для этого применяли различного характера основы с большой удельной поверхностью: твердую, губчатую, из шерсти, коллагена, на стеклянных спиралях и т. д. Широкого распространения эти методы не получили, так как значительно затрудняли манипуляции с клетками, но следует отметить описанную Л.С. Ратнером и В.А. Крикуном методику многоярусного культивирования. Клетки культивировали в 1,5, 10 и 15-литровых бутылках, полностью загруженных овальными стеклянными трубками, расположенными параллельно продольной оси сосудов. Полезная площадь при этом возрастала по сравнению со стационарными однослойными культурами в сосудах того же объема в 20 раз. Культивирование проходило в 2 этапа. На первом этапе бутылки вращали вокруг горизонтальной оси с целью равномерного распределения клеток. В дальнейшем, когда клетки прикреплялись к стеклу, культивирование продолжалось в стационарном положении. Описанная культуральная система была успешно использована для культивирования вируса ящура [3, 4, 17].

Более эффективным оказалось вращение сосудов, в которых происходило размножение клеток. Вначале клетки выращивали в пробирках, но с развитием технического оснащения возросли объемы культуральных сосудов, и от выращивания клеток во вращающихся пробирках исследователи перешли к вращающимся бутылкам. Роллерные культуры стали применяться как для накопления клеток, так и для размножения вирусов.

Для роллерного культивирования используются стеллажно-ярусные аппараты для вращения бутылей или барабаны. Чаще всего для культивирования используют 0,5—3-литровые бутылки. В производственных условиях объем их может достигать 20 литров и более. Аппараты для роллерного культивирования просты, надежны и обслуживание их несложно. Большое значение имеет скорость вращения бутылей. Она не должна быть слишком большой, чтобы не препятствовать прикреплению клеток, но и не слишком низкой, так как длительное нахождение клеток в газовой фазе ухудшает условия их питания. В работах разных авторов скорости вращения бутылей варьировали от 8—12 об/час до 1 об/мин. Наиболее пригодной для различных клеточных культур оказалась скорость вращения флаконов в пределах 0,5—1 об/мин. Рекомендуется в течение первых 30 мин. после засе-

ва клеток обеспечить высокую скорость вращения флаконов (0,5—1,0 об/мин) для равномерного распределения материалов, затем перевести их на низкую скорость вращения (20—30 об/час) [8, 15, 17].

Для культивирования вируса бешенства при роллерном культивировании в основном используют клетки почки хомяка - ВНК-21. Их посевная концентрация в 1 мл среды составляет 60-80 тыс. Объем ростовой среды должен составлять 1/10, 1/20 часть объема роллерного флакона. Роллерный метод культивирования позволяет получить большее количество клеток. Так, с флакона емкостью 3 л можно получить урожай клеток ВНК-21 - в 9 раз больший, чем с монослойной стационарной культурой флакона емкостью в 1 л. Кратность экономии сред при использовании 3-литровых флаконов составляет для клеток ВНК-21 - 5,0. Для лучшего размножения клеток в роллерных аппаратах необходима адаптация их к новым условиям культивирования. Роллерный метод культивирования позволяет получить большие количества клеток. Преимуществом роллерных культур по сравнению с традиционными стационарными культурами является, в частности, более экономичное использование питательных сред и более высокий выход вирусного антигена (на 1—2 lg) [12, 19, 20].

В таблицах 1-2 приведены сведения о влиянии способа заражения, температуры культивирования и дозы инфицирования клеток на уровень накопления вируса бешенства.

Таблица 1 - Влияние способа заражения и температуры культивирования на уровень накопления вируса бешенства

Способ заражения	Температура культивирования, °С	Титр вируса в ИФА	Инфекционная активность, LD50/кл.
Монослой	32	1:64	3,1±0,5
Монослой	37	1:64	2,9±0,3
Суспензия	32	1:256	4,6±0,3
Суспензия	37	1:128÷1:256	4,1±0,3

Таблица 2 - Сведения о влиянии дозы инфицирования клеток на уровень накопления вируса бешенства

Доза заражения	Титр вируса в ИФА в зависимости от срока культивирования, сутки				
	3	4	5	6	7
0,01	1:32	1:32÷1:64	1:64	1:128	1:256
0,1	1:64	1:128	1:256÷1:512	1:128÷1:256	1:128÷1:256
1,0	1:64	1:128	1:256÷1:512	1:256	1:256

Данные таблиц 1 и 2 свидетельствуют, что культивирование целесообразно осуществлять при температуре 32°С в течение 4-5 сут. при начальной дозе заражения 0,1 LD 50/клетку с использованием поддерживающей среды с добавлением 0,1% человеческого сывороточного альбумина либо 2% сыворотки крупного рогатого скота. Оптимальный объем среды в роллерной бутылки при культивировании вируса бешенства штамма «Москва 3253» составляет от 200 до 400 мл и зависит от площади ростовой поверхности. Подобные условия обеспечивают получение культуральной жидкости с титром вируса бешенства в иммуноферментном анализе от 1:256 до 1:512. Культуральный вирус рекомендован в качестве основы для приготовления иммунизирующего материала с целью получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади [4, 11].

3. Метод Суспензионного культивирования клеток.

В 1953 году Оуенс с сотрудниками впервые показал способность клеток размножаться в жидкой среде в свободно суспендированном состоянии. С тех пор метод суспензионного культивирования привлекает внимание исследователей в связи с его высокой эффективностью при накоплении больших количеств клеток. Оказалось, что клетки перевиваемых линий, в отличие от остальных типов клеточных культур, могут длительно культивироваться во взвешенном состоянии. Клетки в этих условиях размножаются, не прикрепляясь к стенкам культурального сосуда, находясь в суспензионном состоянии, благодаря постоянному перемешиванию среды. При оптимальном режиме выращивания клетки в суспензиях быстро размножаются, имеют более высокий «урожай», чем в стационарных культурах. Первичные и перевиваемые линии клеток имеют неодинаковую способность роста в суспензии. Так, гетероплоидные и анеуплоидные постоянные линии, в отличие от псевдодиплоидных линий, адаптируются быстрее к росту в суспензии [8, 14, 17].

Суспензионные культуры готовят из однослойных культур. Клетки отслаивают от стекла с помощью растворов версена и трипсина. Осадок клеток после центрифугирования (1000 об/мин) ресуспендируют в свежей питательной среде. Приготовленную суспензию помещают в культуральные сосуды (реакторы, ферментеры) и выращивают при постоянном перемешивании. В научных исследованиях концентрация клеток в исходной суспензии колеблется от 0,3 до 10x10 в 1 мл. По мнению Эрла и его сотрудников, концентрация клеток в суспензированной культуре должна быть такой, чтобы фаза логарифмического роста наступала не позднее 16-24 часов после приготовления культуры. Суспензионные клеточные культуры проходят характерные стадии: лагфазу, фазу логарифмического роста, стационарную фазу и фазу логарифмического отмирания. В первой стадии, как правило, количество клеток уменьшается, во второй стадии популяция клеток увеличивается (логарифмическая стадия роста), в третьей стадии увеличения количества клеток не наблюдается (стационарная фаза). Если культивирование продолжить дальше, то обнаружится период уменьшения численности клеток - фаза логарифмического отмирания (фаза разрушения). Скорость размножения клеток в логарифмической фазе роста выражают временем генерации. Под временем генерации имеется в виду период, необходимый для удвоения популяции клеток в культуре. Для суспензионного выращивания клеток важным условием является перемешивание жидкости, которое должно быть непрерывным и достаточно интенсивным, чтобы поддерживать клетки во взвешенном состоянии, препятствовать их осаждению и

прикреплению к стенкам сосуда и в то же время не вызывать их механического повреждения [9, 13, 20].

Перемешивание суспензионных культур проводят лопастными магнитными мешалками, а также круговыми качалками. В настоящее время широко применяют вращение флаконов и бутылей вокруг продольной оси (15-40 об/мин). На магнитных мешалках скорость вращения составляет 100—200 об/мин. Скорость перемешивания зависит от объема культуры; малые объемы культуры требуют невысокой скорости, тогда как ее необходимо увеличить при больших объемах. Для предотвращения оседания клеток на внутренней поверхности сосуда производят силиконирование. Силиконовое покрытие в силу своей гидрофобности препятствует прикреплению клеток к стенке сосуда.

Внутренние стенки культурального сосуда смачивают 5% или 10%-ным раствором силикона и после испарения растворителя (бензольного, ацетонового) сосуда выдерживают при 85°C и 200° (соответственно в течение 30 и 60 мин). После охлаждения сосуда наполняют горячей бидистиллированной водой и оставляют на 2 часа, затем их 3 раза ополаскивают бидистиллированной водой и высушивают при 100°C. Сосуды стерилизуют в сушильном шкафу при 170°C в течение 2 часов [13, 14, 16].

Максимальный рост клеток в суспензии наблюдают при pH 7,0-7,2. Питательные среды, применяемые для выращивания клеток в суспензии, не отличаются от сред, используемых для выращивания клеточных линий в однослойной культуре. Чаще всего при культивировании клеток в суспензиях берут среду Игла с двукратной концентрацией аминокислот и витаминов. Суспензионные культуры потребляют в 2-7 раз больше глюкозы, чем монослойные. В процессе потребления глюкозы клетки выделяют в среду токсичную для них молочную кислоту. Потребление клетками глюкозы и выработка молочной кислоты идут параллельно и находятся в прямой зависимости от плотности клеточной популяции. Полезным оказалось прибавление к питательной среде инсулина в количестве от 40 до 200 ЕД на 1 л. Прибавление к питательной среде инсулина изменяет соотношение между количеством поглощенной глюкозы и выделенной молочной кислоты. Для клеток линии L указанный коэффициент может быть снижен с 74-81 до 37-38%. Различные аминокислоты потребляются из питательной среды растущими клетками с неодинаковой скоростью. Отмечено, что регулярное прибавление аргинина (20-40 мг/л) и увеличение количества глутамин до 450 мг/л благоприятствуют росту взвешенных культур. Прибавление инозитола (0,4 мг/л) позволяет ускорить рост культур амниотических клеток человека. Желательным является добавление к среде каталазы (1 мг/л) и тироксина (12 мг/л). Большой интерес представляют работы, посвященные получению взвешенных культур клеток в синтетической среде, не содержащей сыворотки крови. Предпринимаются попытки увеличить вязкость питательной среды за счет безбелковых ингредиентов. С этой целью используется метилцеллюлоза и гиалуроновая кислота.

Метилцеллюлоза в концентрации 0,1-0,2% обладает максимальным защитным действием на взвешенные в среде клетки. Протективное действие метилцеллюлозы заключается в том, что молекулы образуют защитный слой вокруг клетки, предотвращающий повреждение клеток при перемешивании среды. Весьма важным показателем состояния суспензионной культуры является парциальное давление кислорода в жидкой фазе. Концентрация кислорода в газовой фазе зависит от плотности клеточной популяции и нередко бывает ниже атмосферной. Недостаток кислорода ведет к появлению грануляции цитоплазмы, клетки теряют правильную округлую форму. При небольшом избытке кислорода клетки имеют хорошо очерченную, правильную, округлую форму, и становятся очень крупными при повреждающем действии избытка кислорода. Оптимальная концентрация кислорода для различных клеточных культур находится в пределах от 9 до 17% или 293 мм рт. столба. При концентрации кислорода выше 20% происходит ингибция клеточного роста. Так, при концентрации кислорода 24% размножение клеток почек эмбриона кролика (линия ERK) снижалось наполовину, а при 30% - сводилось к нулю. Повышение концентрации кислорода токсически воздействует на клеточный метаболизм [6, 14, 16, 20].

Таким образом, размножение клеток в суспензии зависит от концентрации клеток в исходной суспензии, аэрации и pH среды, состава питательной среды, способа перемешивания, объема суспензии и других факторов.

Однородность суспензии, возможность длительного поддержания клеток в логарифмической фазе роста, перспективы математического моделирования процессов клеточного роста в зависимости от влияния факторов внешней среды, удобство многократного исследования физиологического состояния культуры клеток в суспензии, высокая экономичность метода - это далеко не полный перечень преимуществ суспензионных культур.

Суспензионные культуры широко используются в вирусологических исследованиях и для накопления больших количеств вирусосодержащего материала, при изготовлении вакцин и диагностических препаратов [13, 14].

Однако не все имеющиеся в арсенале вирусологов клетки активно растут при суспензионном культивировании. Одна из наиболее используемых линий – ВНК 21/13. По данным отечественных исследователей (Д.В. Бучукури, Н.А. Ковалев и др., 2010-2015 гг.) при культивировании на линии клеток ВНК 21/13 вируса бешенства в биореакторе и заражении во взвесь растущих клеток, установлено, что оптимальное количество клеток при множественности заражения $0,15 \pm 0,07$ ТКИД₅₀/кп составляет 500–700 тыс.кп/мл, и 800–1000 – при дозе $0,6 \pm 0,14$ ТКИД₅₀/кп. Заражение вирусом при концентрации клеток менее 500 тыс.кп/мл создает неблагоприятные условия для выращивания высокого количества клеток вследствие ингибции вирусом, а конечная наивысшая концентрация клеток менее 1500 тыс.кп/мл не дает возможности получить требуемое накопление вируса (lg МЛД₅₀/мл) [11, 16, 21].

4. Метод культивирования клеток на микроносителях.

В 1967 г. Van Werel предложил метод культивирования, сочетающий элементы монослойного и суспензионного выращивания клеток, который он назвал методом «микроносителей». Суть его заключается в том, что клетки прикрепляются и размножаются на поверхности полимерных шариков-

частиц «микроносителей» (МН), которые содержатся в суспензии с помощью перемешивающего устройства, например мешалки. На одной частице МН диаметром 160—230 мкм может поместиться 350-630 (или в среднем 460) клеток. В одном мл среды можно суспензировать несколько тысяч частиц микроносителя, при этом общая площадь их составит от нескольких до 50 см²/мл.

Инокулированные в культиватор клетки прикрепляются к поверхности частиц МН и, размножаясь, образуют сплошной монослой на каждой отдельной частице.

Основными преимуществами этого метода являются:

- 1) создание равномерных условий по всему объему сосуда, что делает возможным эффективно контролировать необходимые параметры (рН, рО₂ и др.);
- 2) получение высокой плотности клеточной популяции до 5-6 млн клеток в 1 мл;
- 3) культивирование одновременно несколько сотен миллиардов клеток;
- 4) введение постоянного контроля за динамикой роста клеток;
- 5) снижение роста контаминации в связи с сокращением операций, связанных с разгерметизацией культурального сосуда;
- 6) значительная экономия питательных сред;
- 7) возможность сохранять выросшие клетки непосредственно на частицах при низких температурах;
- 8) возможность искусственно создавать различные концентрации МН с выросшими на них клетками;
- 9) возможность пассирования культуры без применения трипсина путем добавления свежих порций микроносителя.

Микроносители должны иметь:

- небольшой положительный заряд в пределах 1,5-1,8 МЭКВ/г. В связи с тем, что большинство клеток животных имеют слабо отрицательный заряд, они легче будут прикрепляться к такому МН;
- плотность 1,05—1,15 г/см³; указанная плотность является оптимальной для поддержания МН во взвешенном состоянии;
- диаметр частиц от 100 до 250 мкм, что обеспечивает площади для роста нескольких сотен клеток;
- гладкая поверхность;
- прозрачность;
- отсутствие токсичности компонентов для клеток;
- незначительное впитывание компонентов среды;
- универсальность, обеспечивающая возможность использования их для первичных, диплоидных и гетероплоидных клеток. Немаловажное значение имеют свойства МН, которые позволяют использовать их многократно [9, 15, 17].

Проведено исследование многих гранулированных препаратов различной химической природы, в том числе из поперечно-сшитого (ПС) декстрана, ПС-агарозы, ПС-поливинилпирролидона, полиакрилонитрила, пористого селикагеля, полистирола, капрона, нейлона, алюмосиликата с целью использования их как микроносителей.

Пригодными являются только некоторые из них, главным образом имеющие в своей основе ПС-декстран.

Несколько зарубежных фирм разработали коммерческие препараты микроносителей, готовые к употреблению: Цитодек-1, 2, 3 (Франция, Швеция), Супербит (США, Англия), Биосилон (Дания). Стоимость перечисленных препаратов довольно высока, поэтому необходимо проводить исследования по разработке и производству отечественных МН.

Культивирование клеток на микроносителях проводят в обычных ферментерах для суспензионного культивирования. В ферментере не должно быть каких-либо выступов, карманов, чтобы предотвратить накопление микроносителей в застойных зонах. Поэтому разумно использовать ферментеры с круглым дном и гладкими стенками. Внутренняя поверхность ферментера должна быть силиконизирована для предотвращения прилипания микроносителей к стеклу или нержавеющей стали ферментера. Для контроля за окружающими культуру условиями, такими, как рН и О₂, может быть использовано стандартное оборудование. Скорость перемешивания суспензии с носителем должна быть 40-60 об/мин. Для выращивания на МН применяются различные типы клеток.

Концентрация цитодекса может варьировать от 0,5 до 5 мг/мл. Однако при производстве профилактических вакцин применяют обычно конечную концентрацию цитодекса, не превышающую 1 мг/мл. Повышение концентрации до 3 мг/мл и выше создает дополнительные трудности, связанные с необходимостью перфузии питательной среды и частичной ее замены, что осложняет технологический процесс.

Посевная концентрация клеток, а также условия культивирования на МН в первые часы в значительной степени определяют оптимальные параметры для пролиферации и максимального накопления клеток. Показано, что посев 10 клеток/мл перевиваемой линии почек обезьян (Vero) и диплоидных клеток фибробластов эмбриона человека (MRC-5) в уменьшенном до 1/3 объема питательной среды и при периодическом включении мешалки (30 об/мин) на одну минуту через каждый час в течение 4 часов, с последующим добавлением питательной среды до конечного объема, ведет к увеличению пролиферации клеток и их количества по сравнению с контролем (полный объем питательной среды в момент посадки клеток и непрерывная работа мешалки с начала культивирования) [15, 17, 20]. Большое значение для культивирования клеток на МН имеет питательная среда. Правильный подбор питательной среды также будет способствовать оптимизации процесса пролиферации клеток и их качеству. Необходимо проводить подбор питательных сред для культивирования клеток на различных типах МН. Показано, что перевиваемая линия клеток почек обезьян (Vero) на цитодексе дает наибольший выход при использовании среды Игла ДМЕ (посадочная концентрация клеток 10⁵ мл) по сравнению со средой ВМЕ и 199. Если же количество клеток при посадке снизить до 10⁴, то лучшие

результаты дает среда 199. Все испытуемые среды содержали 10% фетальной сыворотки [15, 17].

По данным литературных источников, наиболее оптимальными условиями для накопления вируса в псевдосуспензионной культуре клеток являются: посевная доза клеток- $2,0 \times 10^5$ кл/мл, множественность инфекции - 0,01 ЛД₅₀/КЛ, концентрация микроносителей Цитолар 2-3 мг/мл. Инфекционный титр вируса при этом варьирует от 7,1 lg ЛД₅₀/МЛ до 8,0 lg ЛД₅₀/мл.

Для наилучшего прикрепления клеток к микроносителям и увеличения урожая вируса в процессе культивирования важен режим перемешивания суспензии. Интенсивность и время перемешивания взвеси зависели от объемов биореакторов. Для 3 л биореактора оптимальным режимом работы является периодическое перемешивание со скоростью вращения мешалки 25 об/мин в течение 1 мин., остановка - 30 мин. в первые 4-5 суток с последующим постоянным перемешиванием со скоростью 30 об/мин. Для 10 и 50 л биореакторов перемешивание проводится 5 мин. со скоростью 25 об/мин, остановка - 90 мин., и далее время покоя уменьшается ежедневно на 30 мин.

Заключение.

1. Изготовление антирабических вакцин с использованием культур клеток позволяет получать безопасные, эффективные, ареактогенные препараты, а крупномасштабное производство клеток и вируса экономически более целесообразно.

2. Спектр чувствительных к вирусу бешенства линий культур клеток достаточно широк. Выбор конкретной линии клеток обуславливается ее чувствительностью, культуральными характеристиками и предполагаемым способом накопления вирусной биомассы.

3. Суспензионное культивирование клеток и вирусов при производстве вакцин обладает, по сравнению с другими способами культивирования, следующими преимуществами: однородность суспензии, возможность длительного поддержания клеток в логарифмической фазе роста, удобство многократного исследования физиологического состояния клеток в суспензии, высокая экономичность метода, возможность математического моделирования процессов клеточного роста в зависимости от влияния факторов внешней среды.

Литература. 1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков. - М.: Мир, 1983. - 263 с. 2. Бенюмович, М. С. Суспензии клеток человека и животных / М. С. Бенюмович. - М., 1990. - Т. 6 : Итоги науки и техники ВИНТИ, серия «Цитология». - Ч. 1. - 300 с. 3. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных : разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. В. Насонов, А. С. Ястребов, Д. В. Бучукур, М. М. Усеня, П. П. Красочко, Д. С. Борисовец, В. П. Красочко, Н. М. Авласко ; под ред. Н. А. Ковалева. - Минск : Беларуская навука, 2016. - 492 с. 4. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена / С. В. Генералов и др. // Пробл. особо опасных инф. - 2012. - № 2(112). - С. 78-81. 5. Голубев, Д. Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / Д. Б. Голубев, А. А. Сомнина, М. Н. Медведев. - Л.: Медицина, 1976. - 224 с. 6. Культивирование клеток и тканей животных / Л. П. Дьяконов и др. - Ставрополь: Ставроп. Правда, 1988. - Ч. 2. - 91 с. 7. Животная клетка в культуре / под ред. Л. П. Дьяконова, В. И. Ситькова. - М., 2000. 8. Культура животных клеток. Методы / под ред. Р. Фрешни. - М.: Мир, 1989. - 333 с. 9. Ковалев Н. А., Красочко П. А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека : монография / Н. А. Ковалев, П. А. Красочко. - Минск : Беларуская навука, 2012. - 426 с. 10. Самуйленко, С. А. Потребность в кислороде и его снабжение культуры клеток / С. А. Самуйленко, Е. А. Рубан, А. Я. Самуйленко // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов : материалы Международ. науч. практ. конф. - Покров, 2003. - Ч. 2. - С. 562-566. 11. Сафина, А. Н. Стационарное и роллерно-суспензионное культивирование межвидовой гибридной культуры клеток свинья х лошадь (а4х1) / А. Н. Сафина, Л. П. Дьяконов, Т. В. Гальнбек // Успехи современного естествознания. - 2004. - № 3. - С. 65-66. 12. Сергеев, В. А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии / В. А. Сергеев, Ю. А. Собко. - К. : Урожай, 1990. - 152 с. 13. Тартаковский, А. Д. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих / А. Д. Тартаковский // Методы культивирования клеток / А. Д. Тартаковский. - Л. : Наука, 1988. - С. 44-63. 14. Усеня, М. М. Титрация вируса бешенства в культуре клеток / М. М. Усеня // Ветеринарная наука - производству. - 2002. - Вып. 36. - С. 151-155. 15. Биология вирусов животных / Ф. Феннер и др.. - М.: Мир, 1977. - Т. 1. - 447 с. 16. Частная эпизоотология : учебное пособие / В. В. Максимович, Н. В. Сеница, В. Ф. Багрецов, А. В. Бублов, Г. Э Дремач, О. Р. Билецкий, П. А. Красочко, И. А. Красочко, В. А. Машеро, Н. А. Ковалев, Ю. Г. Лях, С. Л. Гайсенко, А. А. Вербицкий. - Минск, 2010. - 628 с. 17. Griffiths, J. B. Scale-up of suspension cells and anchorage-dependent cells / J. B. Griffiths // Methods in molecular Biology. - 1990. - Vol. 5. - P. 49-63. 18. Griffiths, J. B. Closing the culture gap / J. B. Griffiths // BioTechnology. - 1991. - Vol. 10. - P. 30-32. 19. Griffiths, J. B. Cultural revolutions / J. B. Griffiths // Chemistry and Industry. - 1991. - Vol. 18. - P. 682-684. 20. Griffiths, J. B. Scaling-up of animal cells culture / J. B. Griffiths // Animal Cell Culture: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, UK. - 1992. - P. 47-93. 21. Vieuchange, J. In vitro rabies virus cultivation on culture of cells / J. Vieuchange, R. Bequignon, J. Gruet // Bull. Acad. Nat. Med., Paris. - 1956. - Vol. 5-6. - P. 77. 22. Эпизоотология и инфекционные болезни : учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В. В. Максимович, В. Ф. Багрецов, О. Р. Билецкий, А. В. Бублов, А. А. Вербицкий, С. Л. Гайсенко, В. А. Головки, М. И. Гулюкин, А. А. Гусев, Г. Э Дремач, Н. А. Ковалев, П. А. Красочко, И. А. Красочко, Ю. Г. Лях, В. А. Кузьмин, В. А. Машеро, Н. В. Сеница ; ред. В. В. Максимович. - Минск : ИВЦ Минфина, 2012. - 775 с.

Статья передана в печать 21.04.2017 г.