

5. Притыченко А.Н. Диагностика пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота в Республике Беларусь / Притыченко А.Н, Чернецкая И.В., Притыченко А.В. [и др.] // Ученые записки УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2012. – Т. 48, вып. 1. – С. 54-59.

6. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : [практическое пособие] / П.А. Красочко [и др.] ; ред. П. А. Красочко. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 367 с.

## **СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ**

**Красочко П.А.**, д.в.н., д.б.н., профессор УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь

**Костюк С.В.**, д.х.н., доцент Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

**Красочко И.А.**, д.в.н., профессор УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Беларусь

**Кашпар Л.Н.**, м.в.н. УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

**Кугелев И.М.**, к.в.н., доцент ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, г. Смоленск, Россия

**Зубец О.В.**, н.с. Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

***Аннотация.** Современный этап развития биотехнологии характерен созданием массового культивирования клеток с целью получения большого количества вирусного антигена, необходимого для производства биопрепаратов. Культивирование клеток на микроносителях имеет такие преимущества как масштабируемость и повышение засеваемой площади, за счет которых достигается более высокий выход вируса []. Микроносители представляют собой твердые частицы, на которых клетки растут в форме монослоя.*

***Ключевые слова:** микроносители, модифицированные полисахариды, культивирование клеток, спектральный анализ.*

**Введение.** В настоящее время живые и инактивированные противовирусные вакцины широко применяют в ветеринарной практике для поддержания благополучия здоровья молодняка сельскохозяйственных животных, а также взрослого поголовья по инфекционным заболеваниям. В

данный момент в Республике Беларусь потребности животноводческой отрасли в вирусных вакцинах превышают возможности действующих производств [1,2,3].

Технология выращивания вакцинных вирусов, включающая культивирование субстрат зависимых линий клеток MDBK, СПЭВ, ПТ, ВНК, ЯДК и др. в монослое на поверхности матрасов и роллерных флаконов является основным ограничивающим фактором объема производства данных биопрепаратов [1,2].

В современном биотехнологическом производстве вопрос повышения эффективности накопления клеток и вирусов в минимальном объеме – актуальная задача.

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. 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 - вот далеко не полный перечень преимуществ суспензионных культур. Использование преимуществ этого метода невозможно без создания основы будущей суспензии, то есть микроносителей (МН) [1, 2].

Материалы и методы. Исследования проводились в НИИ ФХП БГУ, кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней УО ВГАВМ.

Для проведения анализов использовали следующие физические методы:

Рентгенодифракционный метод - оценка фазового состояния. Использовали рентгеновский дифрактометр общего назначения Empyrean (Производитель: PANalitical (Нидерланды). Образцы готовили в виде плоских дисков массой 0,5 г методом прямого прессования в специальной пресс-форме. Запись всех образцов осуществляли в одинаковых условиях.

Качественную оценку природы содержащихся в образцах групп осуществляли, используя метод ИК-спектроскопии. Запись спектров исследуемых образцов проводили на спектрофотометре FT-IR Bruker. Спектральная область исследования: 4000—350 см<sup>-1</sup>.

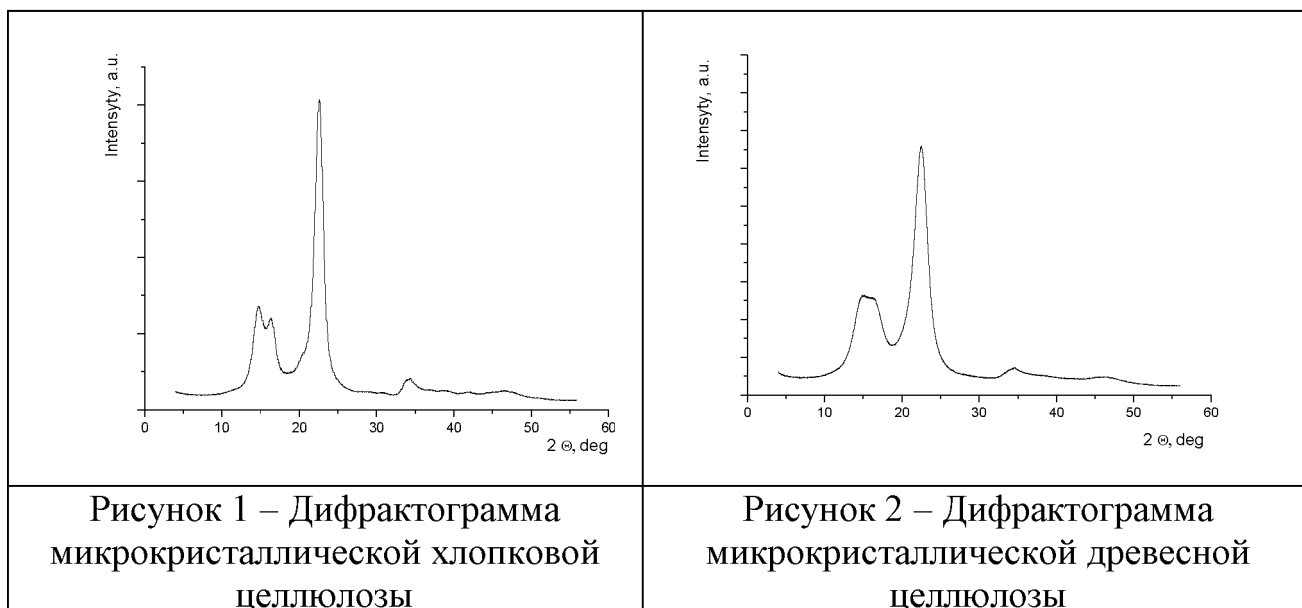
Для получения микроносителей хлопковую вату и древесную целлюлозу подвергали кислотному гидролизу, который позволяет путем гидролитической деструкции разрушить волокно до порошкообразного состояния [4-7]. В результате было получено четыре вида микроносителей для культур клеток на

основе модифицированных полисахаридов. Степень упорядоченности надмолекулярной структуры была оценена с помощью рентгенофазового анализа.

Результаты исследований. При использовании хлопка в качестве исходного сырья следует отметить, что хлопковое волокно отличается высокой чистотой, степенью упорядоченности, высокой молекулярной массой (от 50 тыс. и более). В результате кислотно-гидролитического воздействия при температуре кипения на волокнистую массу получается порошковый материал, так называемая микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ). МКЦ представляет собой химически чистую целлюлозу с высокой степенью кристалличности (> 90 %). Это хорошо видно из приведенной дифрактограммы. Так на рисунке 1 представлена дифрактограмма хлопковой микрокристаллической целлюлозы, полученной гидролизом в разбавленном растворе соляной кислоты. Как видно, в результате отражения в плоскостях (101) и (101) четко разрешаются пики в области углов  $2\Theta$  равных  $14,8^\circ$  и  $16,1^\circ$ , а в области углов  $2\Theta = 22,8^\circ$  имеется интенсивная полоса интерференции. Все это свидетельствует о высокой кристалличности природного полимера.

Как и в случае с хлопковой целлюлозой, микрокристаллическую древесную целлюлозу получают кислотным гидролизом волокна. По схеме, аналогично хлопковой целлюлозы получали МКЦ на основе древесной целлюлозы. Здесь следует отметить, что получаемые порошковые частицы так же представляют собой фрагменты продеструктированного волокна, и практически совпадают с формой хлопковой МКЦ.

Если рассматривать упорядоченность надмолекулярной структуры то, как видно из приведенной дифрактограммы, в отличие от хлопковой, она более дефектна. Это хорошо отражено на рисунке 2, где соответствующие интерференционные рефлексy в области углов  $2\Theta$  равных  $14,8^\circ$  и  $16,1^\circ$  слабо выражены, а интенсивность рефлексa в области углов  $2\Theta$  равных  $22,8^\circ$  ниже таковой у хлопковой МКЦ.



Меньшая степень кристалличности древесной целлюлозы приводит к тому, что получаемый продукт имеет большую гидрофильность и соответственно, большую набухаемость в воде. Это способствует повышенной, в сравнении с хлопковой целлюлозой, сорбционной активности в отношении к различным реагентам.

3-ий вариант получения микроносителя заключается в воздействии на древесную целлюлозу азотной кислоты, умеренной концентрации 65-68%. Набухание целлюлозы в азотной кислоте указанной концентрации носит внутрикристаллитный характер и протекает с образованием молекулярного соединения включения, имеющего свою кристаллическую структуру, отличную от структуры исходного материала. Известно, что набухание целлюлозы в азотной кислоте возрастает с понижением температуры. За счет снижения температуры обработки можно сократить продолжительность процесса, уменьшить, в определенных пределах концентрацию кислоты и соотношение реагентов, свести к минимуму нитрование продукта. Таким образом, достижение необходимой структурной трансформации наблюдается уже за 20-45 мин при  $-5-0^{\circ}\text{C}$ .

В результате модификации (декристаллизации) волокна получали продукт с еще более повышенными гидрофильными и сорбционными свойствами. Далее, как по схеме с получением микрокристаллических целлюлоз, набухший в азотной кислоте материал подвергают гидролитической деструкции этой же кислотой, но меньшей концентрации. Таким образом, получали порошковый материал, имеющий частицы аналогичные МКЦ.

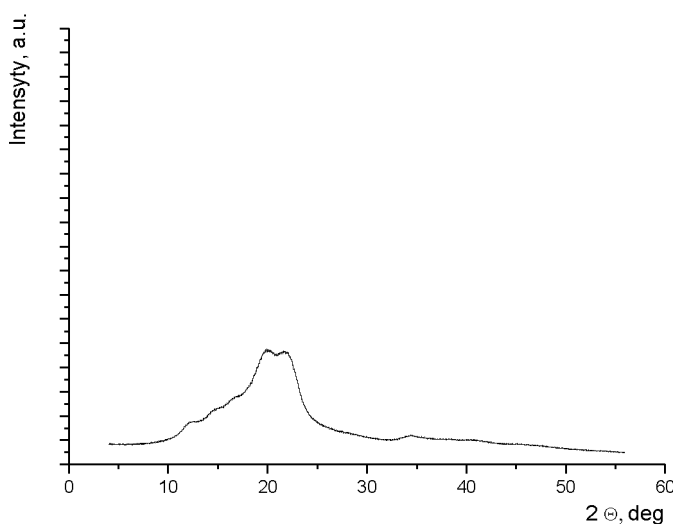
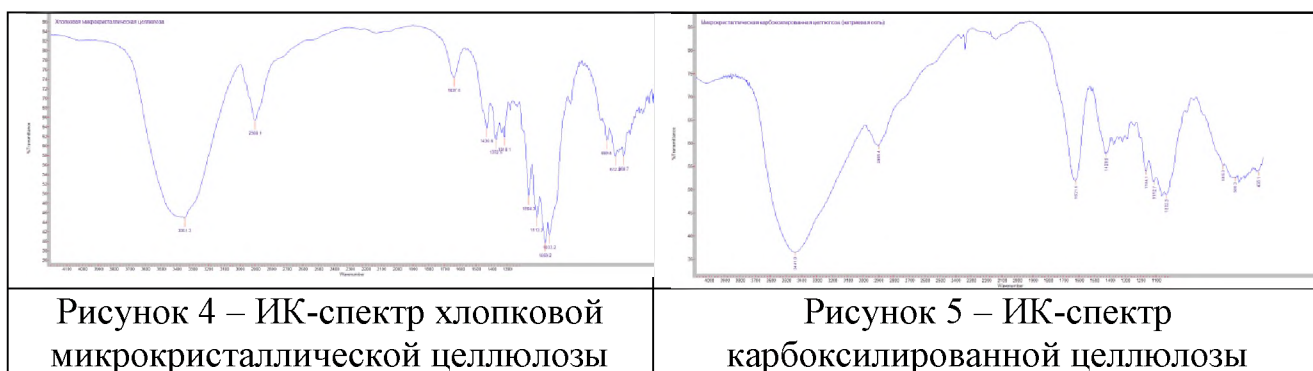


Рисунок 3 – Дифрактограмма декристаллизованной древесной целлюлозы

При этом, как видно из приведенной дифрактограммы надмолекулярная структура полимера сильно разрушается, исчезают рефлексии в области углов  $2\theta$  равных  $14,8^{\circ}$ ,  $16,1^{\circ}$  и  $22,8^{\circ}$ , а в области  $2\theta$  равных  $20^{\circ}$  и  $21,8^{\circ}$  фиксируются два слабовыраженных пика свидетельствующих о незначительном появлении полиморфа целлюлозы II (рисунок 3). Результатом воздействия на целлюлозу

азотной кислоты, указанных концентраций является не только разрушение фазовой структуры волокна, уменьшение молекулярной массы биополимера, но и незначительное нитрование макромолекул. Это проявляется в возрастании сорбционной активности полисахарида, модифицированным таким способом.

Последний вариант модификации, основанных на многофакторном воздействии растворов азотной кислоты заключается в том, что биополимер и окисляют и разрушают волокно до порошкообразного состояния раствором одной кислоты. При нагревании природного полимера в растворах азотной кислоты умеренной концентрации происходит частичное окисление макромолекул целлюлозы до карбоксилатных групп. Это хорошо иллюстрируется на ИК-спектрах (рисунок 4 и 5). В ИК-спектрах полученного материала, в сравнении нативной целлюлозой, появляется четко выраженный максимум поглощения в области  $1600-1620\text{ см}^{-1}$  соответствующая колебаниям группы  $-\text{COO}^-$ . Проведенный химический анализ показал, что в полимере присутствует до 7-8% карбоксильных групп.



При этом сильно падает молекулярная масса полисахарида, и волокно рассыпается на фрагменты. Частицы, получаемые таким образом, по форме и размерам близки таковым, описанным в предыдущих способах. Однако, в данном случае используя тот факт, что карбоксилцеллюлозы хорошо набухают и даже растворяются в щелочных растворах мы переводили, кислую форму в солевую, используя слабощелочные растворы карбонатов. При этом целлюлозная масса сильно набухала. В таком состоянии ее продавливали через фильтры и осаждали в растворе кальциевой соли.

Все выше изложенное должно способствовать хорошей адгезии клеток на поверхности микроносителя.

Заключение. Исследования спектральных анализов различных видов микроносителей для культур клеток на основе модифицированных полисахаридов позволили нам изучить их морфологию и служит методом опровержения подлинности:

- На дифрактограмме образца микроносителя на основе хлопковой микрокристаллической целлюлозы должна присутствовать интенсивная дифракционная полоса в области углов  $2\Theta = 22,8^\circ$ , а также два пика в области углов  $2\Theta$  равных  $14,8^\circ$  и  $16,1^\circ$ .

- На дифрактограмме образца микроносителя на основе древесной микрокристаллической целлюлозы должна присутствовать интенсивная дифракционная полоса в области углов  $2\Theta = 22,8^\circ$ , а также небольшое гало в области углов  $2\Theta$  равных  $14,8^\circ$  и  $16,1^\circ$ .
- На дифрактограмме образца микроносителя на основе аморфизованной порошковой целлюлозы должно присутствовать аморфное гало в области углов  $2\Theta = 20^\circ$  и  $21,8^\circ$ .
- В ИК-спектре образца микроносителя на карбоксилсодержащей (гидроксилсодержащей) гранулированной целлюлозы должна присутствовать полоса поглощения в области  $1600-1650 \text{ см}^{-1}$ .

### Список литературы:

1. Биотехнология: Учебник / И.В. Тихонов, Е.А. Рубан, Т.Н. Грязнева и др.; Под ред. акад. РАСХН Е.С. Воронина. – СПб. : ГИОРД, 2008. – 704 с.
2. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси /П. А. Красочко [и др.]; под ред. Н.А. Ковалева. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 492 с. Культивирование вируса чумы мелких жвачных животных на микроносителях / Е.О.Абдураимов [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2016. № 76 (1). – С. 43-46.
3. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практ. пособие / П.А. Красочко [и др.]; научн. ред. докт. вет. наук, докт. биолог, наук, проф. П. А. Красочко. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с.
4. Confocal laser scanning microscopy examination of cell distribution in macroporous microcarriers / S. Bancel [et al.] // Biotechnol. Prog. 1996. № 3. P. 398-402.
5. Production of reovirus type 1 and type 3 from Vero cells grown on solid and macroporous microcarriers / J. Berry [et al.] // Biotech. & Bioeng. 1998. № 62. P. 12-19.
6. Consistent selection of mutations in the 5'-untranslated region of oral poliovirus vaccine upon passaging in vitro / K. Chumakov [et al.] // J. Med. Virology. 1994. № 42. P. 79-85.
7. Химические реакции полимеров, под ред. Е. Феттеса, пер. С англ., т. 1-2, М., 1967.