

ПОВЫШЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

П. А. Красочко, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор¹

Д. С. Борисовец, кандидат ветеринарных наук, доцент²

Т. А. Зуйкевич, кандидат сельскохозяйственных наук²

Л. Н. Кашпар, магистр ветеринарных наук, аспирант¹

В. И. Еремец, доктор биологических наук, профессор³

Т. А. Прокопенкова, аспирант²

¹*Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,
г. Витебск, Республика Беларусь*

²*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышесского,
г. Минск, Республика Беларусь*

³*Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической
промышленности, г. Щелково, Российская Федерация*

Резюме. Приведены результаты исследований по повышению адгезивной способности микроносителей на основе растительных полисахаридов. Установлено, что обработка целлюлозы 0,5–1%-м раствором желатина позволяет повысить адгезивную активность целлюлозы с 0 до 75 %.

Ключевые слова: культура клеток, адгезия, желатин, микроноситель, целлюлоза.

Summary. The results of studies on increasing the adhesive capacity of microcarriers based on plant polysaccharides are given. Treatment of cellulose with 0.5–1 % gelatin solution has been found to increase the adhesive activity of cellulose from 0 to 75 %.

Keywords: cell culture, adhesion, gelatin, microcarrier, cellulose.

Введение. В настоящее время культуры клеток нашли самое широкое применение в лабораторной и биотехнологической практике, а именно для выделения и изучения свойств вирусов и в получении противовирусных вакцин, других продуктов биотехнологии – ферментов, моноклональных антител, биологически активных веществ, противораковых препаратов [1, 2, 4, 7].

Технология накопления вакцинных штаммов вирусов, включающая культивирование субстратзависимых линий клеток в монослое на поверхности матрасов и роллерных флаконов, является основным ограничивающим фактором объема производства данных биопрепаратов.

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 [2, 6–8].

Метод суспензионного культивирования привлекает внимание исследователей в связи с его высокой эффективностью при накоплении больших количеств клеток. 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. Использование преимуществ этого метода невозможно без создания основы будущей суспензии, то есть микроносителей.

Нами проведены исследования по разработке технологии изготовления микроносителей на основе модифицированных полисахаридов для псевдосуспензионного культивирования

культур клеток и производства противовирусных вакцин для сельскохозяйственных животных с целью повышения производительности получения вирусных вакцин и тем самым обеспечения потребности республики в средствах специфической профилактики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

При этом были сконструированы микроносители на основе модифицированных полисахаридов (аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы), определено их действие на перевиваемую культуру клеток животных (токсичность, адгезивная активность, динамика прикрепления, сроки формирования монослоя). При отработке параметров роллерного культивирования при микроскопировании флаконов, куда вносилась 1%-я суспензия целлюлозы, отмечено полноценное формирование монослоя на поверхности роллерного флакона. Кроме того, на 50–60 % частиц целлюлозы отмечено прикрепление (адгезия) клеток, их рост в виде «ежиков». При использовании теста с трипановым синим клетки были жизнеспособны на 85–95 %. Однако эти результаты были не стабильны, так как не на всех образцах микроносителей отмечалась высокая степень адгезии клеток, что послужило основанием для разработки способа повышения адгезивной способности микроносителей [3, 5, 6].

Целью данных исследований является повышение адгезивных свойств микроносителей на основе модифицированных полисахаридов путем нанесения на поверхность микроносителя белковых молекул.

Материалы и методы. Исследования проводились в условиях отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», лаборатории катализа полимеризационных процессов Учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» и кафедры эпизоотологии УО «Витебская ордена “Знак Почета” государственная академия ветеринарной медицины».

При проведении исследований нами изучена адгезивная активность, динамика прикрепления, сроки формирования монослоя и переживания клеток на активированных микроносителях. В работе использовали общепринятое в вирусологической практике оборудование, материалы и питательные среды.

Для проведения анализов качества микроносителей использовали следующие физические и химические методы: для определения содержания карбоксильных групп использовали химический метод (барий ацетатный), количественного определения содержания нитрогрупп использовали метод Кьельдаля, влажность материала определяли по ГОСТ 16932-93, золу в образцах определяли по ГОСТ 18461-93.

В исследованиях использовали хлопковую микрокристаллическую целлюлозу.

Для отработки нового способа повышения адгезивной активности клеток использована перевиваемая субстратзависимая линия клеток СПЭВ. В качестве питательных сред использованы: среда Игла MEM, среда Игла DMEM, среда 199, среда ФГМС, сыворотка крови крупного рогатого скота, стерилизованная гамма-облучением. В качестве средства для нанесения на микроноситель использована желатоза.

Клетки выращивали 48–72 ч при pH 7,0–7,4 и температуре 37 ± 1 °C. Через 24 ч проводили смену питательной среды. Сформировавшийся монослой на поверхности роллерного флакона снимали бесцентрифужным способом. Флаконы с микроносителем оставляли для осаживания суспензии клеток, выросших на микроносителе; сливали ростовую среду, дважды промывали раствором Хенкса, затем пласт клеток дважды ополаскивали смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1:9. Все манипуляции проводили при комнатной температуре.

Оценку жизнеспособности и адгезивной способности активированных микроносителей проводили микроскопически в камере Горяева под малым увеличением микроскопа. К 1,0 мл

клеточной взвеси добавляли равный объем 0,2%-го раствора трипановой сини, тщательно перемешивали и заправляли камеру.

Показателем адгезивности служила степень покрытия носителя клетками, а жизнеспособность – по степени окрашивания трипановым синим.

Для отработки способа повышения адгезивной способности микроносителей вначале была проведена подготовка целлюлозы. Сухой порошок целлюлозы подвергали стерилизации в сухожаровом шкафу при температуре не более 100 °С в течение 60 минут.

Стерильную целлюлозу 4 раза промыли стерильным раствором Хенкса. Для этого в колбу с целлюлозой добавили по 100,0 мл раствора Хенкса, размешали, дали отстояться в течение 20–30 минут. Целлюлозу от раствора Хенкса отделяли центрифугированием.

Желатин готовили в 2 этапа – сначала его навески по 0,5; 0,75 и 1,0 г, добавляли по 100,0 мл стерильного физраствора и оставляли для набухания и после полного растворения желатина проводили стерилизацию в автоклаве при 100 °С в течение 60 минут.

Осадок целлюлозы смешали с набухшим стерильным раствором желатина в различных концентрациях. Для полного смешивания желатина и целлюлозы смесь поместили на магнитную мешалку и перемешивали 15–20 минут при 50–100 об/мин.

Особенностью микроносителей на основе полисахаридов является их низкая сорбционная способность в отношении белков. Для повышения покрытия поверхности микроносителя требуется их сшивка с помощью глутарового альдегида.

Сшивание желатина на носителе проводили на магнитной мешалке при 80–100 об./мин путем добавления в суспензию целлюлозы и желатина (10 частей) 3%-го раствора глутарового альдегида (1 часть). Для этого по каплям добавляли раствор глутарового альдегида при постоянном перемешивании в течение 5–10 минут. Смесь оставили на мешалке и перемешивали в течение 2–3 ч при 80–100 об/мин.

После сшивания проводили 5-кратное отмывание суспензии стерильным раствором Хенкса, последний раз – средой Игла.

После оседания целлюлозы (после центрифугирования) надосадок стерильно слили, в колбу с осадком целлюлозой добавили ростовую среду (среда 199, Игла и ФГМС с 10 % сывотки) из расчета 100,0 мл среды на 5 г осадка целлюлозы.

После завершения процесса сшивки целлюлоза находилась в суспензии в течение 10–24 ч без образования осадка. Целлюлоза без желатина оседала в течение 45–60 минут.

Для изучения адгезивных свойств покрытой желатином целлюлозы в суспензию клеток (суспензия клеток СПЭВ при концентрации 300 тыс./мл) добавили суспензию целлюлозы, покрытую желатином в среде из расчета:

5 мл 5%-й суспензии целлюлозы, покрытой желатином (0,25, 0,5 и 1 %) + 95 мл суспензии клеток (0,25%-й целлюлозы);

10 мл 5%-й суспензии целлюлозы, покрытой желатином + 90 мл суспензии клеток (0,5%-й целлюлозы);

20 мл 5%-й суспензии целлюлозы + 80 мл суспензии клеток (1%-й целлюлозы).

Суспензию клеток и целлюлозы в количестве 100,0 мл поместили в 0,5 л флакон при температуре 37 °С в термостате (для сорбции клеток на носителе) на 2 ч. Далее колбу или флакон с клетками и целлюлозой поместили в термостате на шуттель-аппарате с частотой перемешивания 15–20 об/мин при температуре 37 °С на 60 ч.

Просмотр каждой колбы проводили макроскопически и микроскопически (путем отбора проб сразу после внесения клеток к целлюлозе, через 120 мин, 24 и 48 ч после культивирования).

Результаты исследований. В табл. 1 приведены результаты адгезивной способности культуры клеток СПЭВ на хлопковой микрокристаллической целлюлозе, покрытой желатином в концентрации 0,25 %.

Приведенные результаты свидетельствуют, что добавление в суспензию клеток СПЭВ суспензии модифицированной целлюлозы различного количества позволяет повысить адгезивные свойства с 0 до 30 %.

Т а б л и ц а 1. Результаты адгезивной способности культуры клеток СПЭВ на хлопковой микрокристаллической целлюлозе, покрытой желатином в концентрации 0,25 %

№ п/п	Время культивирования	% прикрепления клеток			
		0,25 % суспензии	0,5 % суспензии	1 % суспензии	Контроль
1	0 ч	0	0	0	0
2	120 мин	5	10	15	0
3	24 ч	10	15	25	0
4	48 ч	20	25	30	0

В табл. 2 приведены результаты адгезивной способности культуры клеток СПЭВ на хлопковой микрокристаллической целлюлозе, покрытой желатином, в концентрации 0,5 %.

Т а б л и ц а 2. Результаты адгезивной способности культуры клеток СПЭВ на хлопковой микрокристаллической целлюлозе, покрытой желатином в концентрации 0,5 %

№ п/п	Время культивирования	% прикрепления клеток			
		0,25 % суспензии	0,5 % суспензии	1 % суспензии	Контроль
1	0 ч	0	0	0	0
2	120 мин	15	25	25	0
3	24 ч	25	45	50	0
4	48 ч	35	65	75	0

Приведенные результаты свидетельствуют, что добавление в суспензию клеток СПЭВ суспензии модифицированной целлюлозы различного количества позволяет повысить адгезивные свойства с 0 до 75 %.

В табл. 3 приведены результаты адгезивной способности культуры клеток СПЭВ на хлопковой микрокристаллической целлюлозе, покрытой желатином, в концентрации 1 %.

Т а б л и ц а 3. Результаты адгезивной способности культуры клеток СПЭВ на хлопковой микрокристаллической целлюлозе, покрытой желатином в концентрации 1 %

№ п/п	Время культивирования	% прикрепления клеток			
		0,25 % суспензии	0,5 % суспензии	1 % суспензии	Контроль
1	0 ч	0	0	0	0
2	120 мин	20	25	25	0
3	24 ч	35	65	60	0
4	48 ч	45	75	70	0

Приведенные результаты свидетельствуют, что добавление в суспензию клеток СПЭВ суспензии модифицированной целлюлозы различного количества позволяет повысить адгезивные свойства с 0 до 75 %.

Таким образом, покрытие целлюлозы раствором желатина от 0,25 до 1 % способствует повышению адгезивных свойств микроносителей на основе целлюлозы для культур клеток.

Список использованных источников

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко [и др.] ; под ред. Н. А. Ковалева. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 492 с.
2. Блажевич, О. В. Культивирование клеток: курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с.
3. Изучение влияния микроносителей на основе модифицированных полисахаридов на перевиваемые культуры клеток животных / П. А. Красочко [и др.] // Современные проблемы ветеринарной патологии и биотехнологии в агропромышленном комплексе: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ.

95-летию РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», Минск, 16–17 нояб. 2017 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского. – Минск : Беларус. навука, 2017. – С. 193–197.

4. Красочко, П. А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23 / П. А. Красочко ; ФГУ ВНИТИБП РАСХН. – Щелково, 2009. – 483 с.

5. Методы оценки физико-химических показателей природных модифицированных полисахаридов, используемых в качестве микроносителей для культивирования культур клеток / П. А. Красочко [и др.] // Вет. фармакол. вестн. – Воронеж. – № 4. – 2018. – С. 21–25.

6. Подбор питательных сред для культивирования перевиваемых клеток животных с использованием микроносителей в условиях промышленных предприятий / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2020. – № 36 (36). – С. 111–117.

7. Питательные среды для культивирования культур клеток : учеб.-метод. пособие для студентов фак. ветеринарной медицины по специальности 1–74 03 02 «Ветеринарная медицина» и слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям / П. А. Красочко [и др.]; Витебск : ВГАВМ, 2021. – С. 40.

8. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) ; под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – М. : Спутник+, 2009. – 656 с.

УДК 619:615.37

БИОСИНТЕЗ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ДИАРЕИ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ КОРОВ И ТЕЛЯТ ЖИВОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВИРУС-ВАКЦИНОЙ «ТЕТРАВИР»

И. А. Красочко, доктор ветеринарных наук, профессор¹

П. А. Красочко, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор¹

В. В. Овчинникова, соискатель¹

А. Д. Забережный, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН²

В. И. Еремец, доктор биологических наук, профессор²

¹*Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,
г. Витебск, Республика Беларусь*

²*Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности, г. Щелково, Российская Федерация*

Резюме. Приведены результаты биосинтеза антител к вирусу диареи крупного рогатого скота при иммунизации животных вакциной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции. Установлено, что у вакцинированных тетравиром телят к 45-му дню титр возрос с $1,4 \pm 0,23$ до $5,8 \pm 0,36 \log_2$, а при иммунизации моновакциной против вирусной диареи – с $0,8 \pm 0,11$ до $6,0 \pm 0,36 \log_2$, при иммунизации морских свинок вакциной «Тетравир» титр возрос с $1,0 \pm 0,1$ до $4,2 \pm 0,2 \log_2$, а моновакциной – с $1,0 \pm 0,1$ до $4,4 \pm 0,3 \log_2$.

Ключевые слова: вирусная диарея крупного рогатого скота, живая культуральная вакцина, коровы, телята.

Summary. The results of antibody biosynthesis to bovine diarrhea virus in animals immunized with a vaccine against infectious rhinotracheitis, viral diarrhea, parainfluenza-3, respiratory syncytial infection are given. It was found that in vaccinated calves with «Tetravir» vaccine by day 45 the titer increased from 1.4 ± 0.23 to $5.8 \pm 0.36 \log_2$, and when immunized with monovaccine against viral diarrhea – from $0,8 \pm 0,11$ to $6,0 \pm 0,36 \log_2$. The titre in guinea pigs immunized with «Tetravir» vaccine increased from 1.0 ± 0.1 to $4.2 \pm 0.2 \log_2$, and in the monovaccine the titre increased from 1.0 ± 0.1 to $4.4 \pm 0.3 \log_2$.

Keywords: Bovine viral diarrhea, live culture vaccine, cows, calves.

Введение. При промышленном животноводстве широко распространены вирусные болезни, наносящие большой экономический ущерб животноводству. Одной из таких инфекций является вирусная диарея крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой, эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта и дыхательных