ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МДБК

[1]КРАСОЧКО П.А., [1]КАШПАР Л.Н., [1]БАБАХИНА Н.В., [2]Борисовец Д.С., [2]Зуйкевич Т.А., [1]БРИТИК С.Е.,
[1]УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь
[2]РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

Проведен анализ адгезивных свойств микроносителей на основе модифицированных полисахаридов. Установлено, что выращивание клеток на матрасах помещенных на платформу шуттель-аппарата и концентрация микроносителя от 1до 3% способствует прикреплению клеток к целлюлозе и формированию монослоя клеток как на поверхности матраса, так и на микроносителе.
Ключевые слова *микроносители на основе модифицированной целлюлозы, культивирование, адгезия, культура клеток.*

STUDY OF THE ADHESIVE PROPERTIES OF MICROCARRIERS BASED ON MODIFIED POLYSACCHARIDES ON MDBC CELL CULTURE

[1]KRASOCHKO P.A., [1]KASHPAR L.N., [1]BABAKHINA N.V., [2]BORISOVETS D.S., [2]Zuykevich T.A., [1]BRITIK S.E.,
[1]EE "Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine", Vitebsk
[2]RUE "Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S.N. Vyshelessky", Minsk

The analysis of adhesive properties of microcarriers based on modified polysaccharides is carried out. It has been established that the cultivation of cells on mattresses placed on the platform of the shuttel apparatus and the concentration of the micro-carrier from 1 to 3% promotes the attachment of cells to cellulose and the formation of a monolayer of cells both on the surface of the mattress and on the micro-carrier. ***Keywords*** *microcarriers based on modified cellulose, cultivation, adhesion, cell culture.*

Введение. В промышленном производстве вирусных вакцин для увеличения промышленных объемов необходимо сочентание двух типов культивирования культур клеток таких как монослойное и суспензионное и позволяет использование системы с микроносителями.[1,2]

Суть метода заключалась в том, что клетки совершали адгезивный контакт с поверхностью микроносителя и впоследствии пролиферировали, находясь на поверхности этих частиц. [8].

Культивирование монослойных клеток на микроносителях дает максимальное соотношение площади поверхности, занимаемой культурой, к объему среды [7]

Большинство вариацией этого метода является результатом выбора бусин или конструкции культурального сосуда и перемешивающего устройства. Состав, или покрытие, бусин также будет влиять на прилипание клеток, более чувствительные клетки могут предпочитать желатиновые или коллагеновые бусины, которые растворяются при действии протеаз. Стеклянные бусины являются самым легким материалом для обработки и повторного использования.[4,5,6,7]

Целью наших исследований изучить адгезивные свойства микроносителей на основе модифицированных полисахаридов

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в условиях отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» и ОАО «БелВитунифарм».

Для культивирования клеток МДБК в монослое использовали среду ИГЛА (МЕМ) и 199 на растворе Хенкса и 10% нормальной сыворотки крови крупного рогатого скота. Синтетические питательные среды Игла (МЕМ) и 199 были приготовлены в производственных условиях из сухих готовых смесей импортного производства – Sigma, США согласно ТНПА изготовителя.

Для приготовления питательных среда на ОАО «БелВитунифарм» среды растворяют в 2 этапа. На первом этапе используют реактор SRTJ -10 фирмы «DGM Pharma Apparate», в котором готовят концентраты сред. Далее до рабочей концентрации сред используют реактор RTGX - 300 фирмы «DGM Pharma Apparate» объемом 300 литров.

Полученные растворы, стерилизовали фильтрованием через стерилизующие пластины. По окончании фильтрации емкости с соблюдением правил асептики отсоединили от фильтра и на них

укрепили этикетки с указанием номера партии среды, даты изготовления. Профильтрованную питательную среду проверили на стерильность. Бактериологический контроль на стерильность сред, сывороток, суспензии клеток и других материалов осуществляют путем посева на питательные среды: МПБ, МПА, Китт-Тароцци, тиогликолевую среду.

Срок годности питательной среды при хранении +4-6 ^{0}С до 2-х месяцев, при -20^{0}С до 6 месяцев.

Антибиотики и сыворотку добавили непосредственно перед применением этой среды.

7,5%-ный раствор соды ($NaHCO_3$ – двууглекислая сода) – использовали для подщелачивания среды.

Для культивирования использовали клетки МДБК, хранившиеся в жидком азоте (-196^{0}С) в ампулах объемом 10-75 мл или в холодильнике при температуре -85^{0}С, в пластиковых флаконах объемом от 100 до 500 мл.

Ампулы и флаконы с суспензией клеток извлекали из хранилища, помещали в водяную баню с температурой 40^{0}С и выдерживают до полного оттаивания. В боксе ампулы протирали тампоном, смоченным в спирте, запаянный конец ампулы надрезали пилкой, отламывали, суспензию клеток переносили во флаконы стерильным шприцем; разводили в 5-10 раз ростовой питательной средой, добавляя ее небольшими порциями для предотвращения осмотического шока клеток в 4 приема с интервалом в 1 минуту. Отбирали пробу для контроля стерильности и подсчета клеток.

После реконсервации суспензию клеток доводят питательной средой для монослойного выращивания до концентрации 200-300 тыс/мл жизнеспособных клеток после чего высевают в 250 мл матрас.

Клетки выращивали 48-72 ч при pH-7,0-7,4 и температуре 37^0. Через 24 часа проводят смену питательной среды. Сформировавшийся монослой для проведения последующих пассажей сняли бесцентрифужным способом. Из матрасов удалили ростовую среду, пласт клеток дважды ополаскивали смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1:9. Культуру укладывали пластом вверх, в таком положении она находилась 10-15 минут. Все манипуляции проводили при комнатной температуре, растворы и среда имеют эту же температуру.

Отслоившиеся от стекла клетки ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды (50 мл) путем энергичного встряхивания, затем добавили удвоенное количество питательной среды. Суспензию клеток с одного матраса высевали в два 250 мл матраса, т. е. пересев провели с коэффициентом 1:2.

На следующем пассаже пересев осуществили в 1,5 л матрас проводя все операции как описано выше. Таким образом, провели ещё 3 пассажа каждый раз увеличивая количество матрасов в 3 раза, в течение которых клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства.

В дальнейшем выращивание клеток в 3 последующих пассажах провели в роллерных сосудах. Для этого использовали роллерные установки WC 349020-C (Литва) на 88 роллерных флаконов. Флаконы имеют объем 4,0 л и габариты 110 х 475 мм и диаметр горловины 51 мм. Все процедуры реконсервации и пересева клеток осуществляли в ламирнарах Logic тип А фирмы «Labconco».

Для культивирования клеток МДБК с использованием микроносителей использовали роллерные установки WC 349020-C (Литва) и флаконы имеют объем 4,0 л, а также стеклянные матрасы объемом 1,5 л.

Для приготовления суспензии хлопковой микрокристаллической целлюлозы и аморфизованной целлюлозы, использованной нами в качестве микроносителя, провели следующие этапы работы:

-приготовление микрокристаллической целлюлозы и аморфизованной целлюлозы, для чего проводили их замачивание в стерильной дистиллированной воде (до 5% целлюлозы);

- 4-5-х кратное ее отмывание от остатков химических реагентов, которые были использованы при ее изготовлении;

- автоклавирование полученной суспензии на дистиллированной воде при 1,5-2 атмосферах (115-120ºС) в течение 1 часа;

- 2-х кратное отмывание целлюлозы раствором Хэнкса (для придания суспензии изотоничности).

В суспензию клеток в концентрации от 300 до 500 тыс. клеток в 1 мл. в роллерные флаконы вносили от 1 до 3% микроносителя. После установки роллерного флакона в роллерные установки WC 349020-C (Литва) с режимом перемешивания клеток в роллерной установке является 40-50 оборотов в минуту.

Для культивирования клеток в суспензии целлюлозы на матрасах их помещали в на платформу шуттель-аппарата с перемешивание платформы из расчета 1-2 оборота в минуту.

Результаты исследований. Результаты исследования показали, что при использовании микрокристаллической целлюлозы и аморфизованной целлюлозы на поверхности роллерного флакона клеток не было обнаружено, так как плотность микроносителя была выше 1,0 и при перемешивании

флакона препятствовала прикреплению клеток к поверхности стекла. На поверхности микроносителя был частично сформирован монослой клеток МДБК. Концентрация клеток микроносителе составила 900-100 тыс. клеток в 1 мл.

При проведении выращивание клеток на матрасах помещенных в на платформу шуттель-аппарата с перемешивание платформы из расчета 1-2 оборота в минуту, происходило прикрепление клеток к целлюлозе, а движение платформы шуттель аппарата способствовало нахождению целлюлозы в ресуспензированном состоянии. При этом монослой был сформирован как на поверхности матраса, так и на микроносителе. В данном опыте использована аморфизованная целлюлоза, имеющая плотность 0,97-1,0.

Заключение. Изучены адгезивные свойства микроносителей на основе модифицированных полисахаридов. В результате исследований сделаны выводы что выращивание клеток на матрасах помещенных на платформу шуттель-аппарата и концентрация микроносителя от 1до 3% способствует прикреплению клеток к целлюлозе и формированию монослоя клеток как на поверхности матраса, так и на микроносителе.

Литература. *1. 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. 2. Биология вирусов животных / Ф. Феннер [и др.]. – Москва : Мир, 1977. – Т. 1. – 447 с. 3. Блажевич, О. В. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с. 4. Дитченко, Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений : методические рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007. – 46 с. 5. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. - Москва : «Спутник+», 2009. – 656 с. 6. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – Москва : «Спутник+», 2009. – 656 с. 7. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток / Р. Я. Фрешни. – Москва : БИНОМ. Лаборатории знаний, 2010. – 714 с.8. Van Wezel A.L. "Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous cultures.", Nature, 1967, 216: 64-65*

ХАРАКТЕР ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКИСЛЕННОГО ГРАФЕНА НА МОРФО-ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ

КОРОЧКИН Р.Б., КРАСОЧКО П.А., ПОНАСЬКОВ М.А.
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

За последние 50 лет исследователи материалов активно изучают вопрос использования наночастиц и наноструктурированных материалов в различных секторах биомедицины и ветеринарии. Термин «наночастица» обычно применим к мельчайшим частицам какого-то вещества, имеющим физический размер от 1 до 100 нм. В медицине и ветеринарии в последнее время находят применение наночастицы аллотропных форм углерода, в частности графена. Они обладают широким арсеналом биомодулирующих воздействий на организм. К числу положительных сторон следует отнести их антибактериальное действие. В данной статье авторы провели оценку цитотоксического действия наночастиц окисленного графена на различные типы микроорганизмов по результатам микроскопического исследования. ***Ключевые слова****: наночастицы, окисленный графен, световая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, бактериальная морфология.*

THE NATURE OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF OXIDIZED GRAPHENE NANOPARTICLES ON MORPHO-TINCTORIAL PROPERTIES OF BACTERIA

KOROCHKIN R.B., KRASOCHKO P.A., PONASKOV M.A.
Vitebsk State Academy Of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Over the past 50 years, materials researchers have been actively studying the use of nanoparticles and nanostructured materials in various sectors of biomedicine and veterinary medicine. The term "nanoparticle" is usually applied to the smallest particles of some substance having a physical size (diameter) from 1 to 100 nm. In medicine and veterinary medicine, nanoparticles of allotropic forms of carbon, in particular graphene, have recently found application. They have a wide arsenal of biomodulating effects on the body. Among the positive