

Литература

1. Жарникова, И. В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.06 / Жарникова Ирина Викторовна. – Ставрополь, 2004. – С. 35–36.
2. Инструкция по применению лекарственного средства «Иммунофан» для коррекции иммунодефицитных состояний у животных и птиц (организация-производитель ООО НПП «БИОНОКС», г. Москва), утв. зам. руководителя Россельхознадзора Е. А. Непоклоновым, 08.2006.
3. Люлькова, Л. С. Промышленная технология изготовления наборов (тест-систем) для диагностики хламидиоза животных (РСК, ИФА) и ИНАН лошадей (РДП, ИФА) : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.06 / Люлькова Лариса Сергеевна. – Щёлково, 2013. – 403 с.
4. Самуйленко, А. Я. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов / А. Я. Самуйленко, Е. А. Рубан. – М. : РАСХН, 2000. – Т. 1–2.

Поступила 30.06.2017 г.

УДК 619:578.017.8

**П. А. Красочко¹, Н. И. Костюк², И. А. Красочко²,
З. А. Антонова³, Д. С. Борисовец², И. И. Стрельчяня²**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ, МАКРО- И МИКРО- ЭЛЕМЕНТОВ В РОСТОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

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

*²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
имени С. Н. Вышелесского», г. Минск, Беларусь*

*³Научно-исследовательский институт физико-химических проблем
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь*

Введение

В современных условиях отмечено существенное увеличение роли вирусных инфекций в патологии сельскохозяйственных животных. В этой связи одним из наиболее эффективных средств борьбы с ними является специфическая профилактика с использованием живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин. В биотехнологическом производстве противовирусных вакцин одним из основных компонентов при их изготовлении является использование культур клеток. Использование клеточных культур играет важную роль для накопления вирусов с целью изготовления противовирусных вакцин [1, 3, 6]. Клеточные культуры нуждаются в большом числе факторов роста. Для биосинтетической деятельности клеток животных в культуре необходимо присутствие заменимых и незаменимых аминокислот, водорастворимых витаминов, углеводов, минеральных веществ и т. д. Наличие этих веществ

в питательной среде обеспечивает пластические и энергетические потребности клеток животных, необходимые для поддержания их жизнедеятельности и размножения. Следовательно, основное условие успешного проведения технологического процесса культивирования клеток – подбор питательных сред, обеспечивающих максимальное накопление целевого продукта. Для выращивания культур клеток применяют питательные среды, имеющие сложный состав. Они komponуются из высококачественного дорогостоящего сырья с последующим внесением питательных и ростовых добавок.

Процесс культивирования монослойных культур клеток для дальнейшего их заражения вакцинным вирусом проводится до момента формирования сплошного монослоя клеток на поверхности культуральных матрасов и роллеров, после чего отработанная питательная среда сливается, заменяется на поддерживающую и утилизируется в достаточно больших объемах как отходы производства. При этом утилизируемая питательная среда кроме продуктов метаболизма клеток содержит в своем составе в достаточном количестве неиспользованные клетками в процессе роста и размножения заменимые и незаменимые аминокислоты, углеводы, минеральные вещества, витамины и т. д. [1, 2, 4–6].

Цель исследований – изучить потребление белков, микро- и макроэлементов в питательных средах после выращивания на них перевиваемых культур клеток.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в условиях отделов вирусных инфекций, культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелесского». Для их осуществления были отобраны образцы ростовых питательных сред до и после культивирования перевиваемых культур клеток (табл. 1).

В процессе работы исследовали ростовые среды до внесения на монослой и среды после получения сформированного монослоя на 3–4-е сутки культивирования.

Таблица 1. Ростовые питательные среды до и после культивирования перевиваемых культур клеток

1	Питательная среда Игла DMEM C-28 от 28.11.2016 г.	→	Ростовая среда к. кл. Магс-145 (Игла DMEM) 2-е сутки от 29.04.2016 г.
2	Питательная среда Игла MEM C-9 от 18.05. 2016 г.	→	Ростовая среда к. кл. MDBK 3-е сутки
3	Питательная среда Игла MEM+199 (НИИ имени Чумакова)	→	Ростовая среда к. кл. СПЭВ (Игла MEM + 199 (НИИ имени Чумакова) (чум.) 7-е сутки от 29.04.2016 г.
4	Питательная среда ФГМС+Игла DMEM C-5 от 17.05.2016 г.	→	Ростовая среда к. кл. ЗКГ (ФГМС + Игла DMEM) 2-е сутки от 29.04.2016 г.
5	Питательная среда ФГМС+Игла DMEM C-5 от 17.05.2016 г.	→	Ростовая среда к. кл. ВНК 21/13 (ФГМС + Игла DMEM) 5-е сутки от 29.04.2016 г.

Исследования по изучению обмена белков ростовых питательных сред до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма проводили путем определения содержания общего белка рефрактометрическим методом (рефрактометр – УРЛ-1), который основан на определении показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества – отношения синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления.

Массовую долю микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии на спектрометре с индуктивно связанной плазмой – ICP ActivaM (HORIBA Jobin Yvon SAS, Франция). Данный метод основан на возбуждении атомов исследуемой пробы в индуктивно связанной плазме, а также на измерении интенсивности аналитической спектральной линии определяемого элемента при распылении анализируемой пробы и подаче в виде аэрозоля в индуктивно связанную плазму.

Ростовые питательные среды исследовали на наличие таких микро- и макроэлементов, как железо, калий, натрий, магний и кальций.

При проведении анализа отобранные пробы ростовых питательных сред предварительно разбавляли в 10,0 раз для того, чтобы обеспечить надлежащее введение аэрозоля в плазму.

При выполнении измерений последовательно вводили в плазму образцы для градуировки и измеряли интенсивности аналитической линии определяемого элемента за вычетом фона (интенсивности излучения спектра рядом с аналитической линией определяемого элемента). Для анализа ростовых питательных сред в плазму последовательно вводили растворы контрольного опыта и анализируемых проб, предварительно разбавленных бидистиллированной водой. На контрольном образце проводили процедуру поиска пиков для определяемого элемента. Далее измеряли интенсивности аналитической линии элементов (Fe, K, Na, Mg, Ca) (за вычетом фона) в контрольном образце и анализируемых пробах. Для каждого раствора выполняли по три измерения и вычисляли среднее значение. Содержание микро- и макроэлементов в образце устанавливали с помощью градуировочного графика.

Градуировочную зависимость получали в координатах: среднее значение интенсивности – массовая концентрация определяемого элемента в образце для градуировки. Для калибровки использовали стандартный образец ICP на 24 элемента концентрацией 1000 ppm. Градуировочную зависимость строили для диапазона концентраций элементов от 0,1 до 100 ppm. Непосредственное содержание элементов в анализируемом препарате вычисляли по формуле

$$C = C_x \cdot 10,$$

где C – концентрация ионов элементов в препарате, мг/дм³, соответствующая содержанию в мкг/см³; C_x – концентрация ионов элементов, найденная из градуировочной зависимости, мг/дм³; 10 – кратность разбавления.

За результат измерений принимали среднее арифметическое значение результатов четырех параллельных определений.

Содержание микро- и макроэлементов изучали методом атомно-адсорбционной спектроскопии.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных исследований по изучению обмена белков ростовых питательных сред до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма представлены в табл. 2, анализируя данные которой, необходимо отметить снижение количества общего белка в ростовых питательных средах после культивирования монослойных культур клеток во всех испытуемых образцах в зависимости от сроков культивирования клеточной линии. Так, содержание общего белка в среде Игла MEM + 199 уменьшается на 18,6 % через 7 суток культивирования линии клеток СПЭВ, среда ФГМС + Игла DMEM (к. кл. ЗКГ) – на 7,04 % на 2-е сутки культивирования, ФГМС + Игла DMEM (к. кл. ВНК 21/13) – на 14,3 % к 5-м суткам, ростовая среда Игла MEM – на 9,67 % на 3-и сутки, питательная среда Игла DMEM – на 7,14 % на 2-е сутки культивирования.

Таблица 2. Уровень общего белка в ростовых питательных средах до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма

Ростовые питательные среды	Общий белок, г/л	
	до культивирования	после культивирования
Игла MEM + 199 (к. кл. СПЭВ)	7,0	5,7
ФГМС + Игла DMEM (к. кл. ЗКГ)	7,1	6,6
ФГМС + Игла DMEM (к. кл. ВНК 21/13)	6,3	5,4
Игла MEM (к. кл. MDBK)	6,2	5,6
Игла DMEM (к. кл. Marc-145)	7,0	6,5

Результаты проведенных исследований по изучению массовой доли микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах представлены в табл. 3. Анализируя содержание микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах, следует отметить незначительное снижение уровня железа после культивирования монослойных культур клеток во всех исследуемых образцах, за исключением ФГМС + Игла DMEM, в которой данный показатель через 2 суток культивирования культуры клеток ЗКГ снижается практически в 9,0 раз. Наиболее выраженные колебания уровня калия наблюдаются в среде ФГМС + Игла DMEM на 5-е сутки культивирования культуры клеток ВНК 21/13, где его количество повышается до 53,16 % в сравнении с первоначальным уровнем.

Таблица 3. Содержание микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах до и после культивирования монослойных культур клеток

Элемент	Концентрация, мг/л									
	Игла MEM + 199 (к. кл. СПЭВ)		ФГМС + Игла DMEM (к. кл. ЗКГ)		ФГМС + Игла DMEM (к. кл. ВНК 21/13)		Игла MEM (к. кл. MDBK)		Игла DMEM (к. кл. Marc-145)	
	до	после	до	после	до	после	до	после	до	после
Fe	18,1	18,1	18,3	2,04	18,3	18,1	18,2	18,0	18,0	18,2
K	323,4	318,6	251,2	222,9	341,4	222,9	337,2	327,0	340,1	316,7
Na	4324	4076	4289	614,59	4289	4026	4316	4209	3919	3733
Mg	35,8	34,9	41,5	70,11	44,0	41,5	39,0	38,6	42,6	38,1
Ca	101,1	90,0	113,5	71,24	137,3	113,5	125,4	121,7	141,9	131,1

Выводы

1. Культивирование монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма в течение 2–7 суток приводит к уменьшению содержания в ростовых питательных средах уровня общего белка на 7,04–18,60 %.

2. Содержание микро- и макроэлементов в ростовых питательных средах в процессе культивирования перевиваемых линий клеток подвергается незначительным колебаниям в пределах 1,0–17,0 %, за исключением среды ФГМС + Игла DMEM (культура клеток ЗКГ), где отмечается снижение содержания железа – в 9,0 раз, натрия – в 7,0 раз, Са – на 37,2 %.

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. Блажевич, О. В. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с.
3. Дитченко, Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений : метод. рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007. – 46 с.
4. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – М. : «Спутник+», 2009. – 656 с.
5. Ковалев, Н. А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека / Н. А. Ковалев, П. А. Красочко. – Минск : Беларуская навука, 2012. – 426 с.
6. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток : практ. руководство / Р. Я. Фрешни ; пер. 5-го англ. изд. – М. : БИНОМ, Лаборатория знаний, 2014. – 691 с.

Поступила 10.07.2017 г.