

**П. А. Красочко¹, Д. С. Борисовец², Т. А. Зуйкевич²,
Т. М. Прокопенкова², Л. Н. Кашпар¹**

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ
НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
НА ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ**

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

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

Введение

Для накопления вирусов с целью их дальнейшего изучения наиболее удобную систему представляют культуры клеток. Успехи в области вирусологии, достигнутые с помощью тканевых культур, явились мощным стимулом их развития до современного уровня. Культивирование вирусов помогает решить ряд теоретических проблем, связанных с изучением особенностей взаимодействия «вирус–клетка» [1, 2].

В настоящее время живые и инактивированные противовирусные вакцины широко применяют в ветеринарной практике для поддержания благополучия сельскохозяйственных животных по инфекционным заболеваниям. В данный момент в Республике Беларусь потребности животноводческой отрасли в вирусных вакцинах превышают возможности действующих производств [1, 2].

Технология выращивания вакцинных вирусов, включающая культивирование различных субстратзависимых линий клеток MDBK, СПЭВ, ПТ, Vero, MARC-145 и других в монослое на поверхности матрасов и роллерных флаконов является основным ограничивающим фактором объема производства данных биопрепаратов [2].

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. Метод суспензионного культивирования привлекает внимание исследователей в связи с его высокой эффективностью при накоплении больших количеств клеток. В этих условиях клетки размножаются, не прикрепляясь к стенкам культурального сосуда, находясь в суспензионном состоянии, благодаря постоянному перемешиванию среды. Использование преимуществ этого метода невозможно без создания основы будущей суспензии, т. е. микроносителей [3, 4].

В зависимости от источника происхождения материалы могут быть условно разделены на две группы, названные далее синтетическими и природными полимерами. Первоначально в качестве материалов для микроносителей были опробованы полимеры из поливинилпирролидона, полиакрилонитрила, пористого силикагеля, полистирола, капрона, нейлона, алюмосиликатов и боросиликатов, а также их комбинаций. И хотя микроносители, полученные из синтетических полимеров обладали удовлетворительными химическими и механическими свойствами, их суммарной поверхности было недостаточно для полноценного прикрепления и размножения клеток. Именно поэтому на современном этапе развития в качестве микроносителей преимущественно используют природные полимеры, обладающие хорошей биосовместимостью с живой клеткой, малой стоимостью, масштабируемостью и экологичностью получения. К их числу относятся коллаген, целлюлоза, хитин, альгиновая кислота, декстран, а также их производные [4, 5].

Исходя из вышеизложенного, в настоящее время актуальной задачей является разработка и внедрение технологии изготовления микроносителей на основе модифицированных полисахаридов для псевдосуспензионного культивирования культур клеток и производства противовирусных вакцин для сельскохозяйственных животных.

Цель исследования – изучить влияние микроносителей на основе модифицированных полисахаридов на перевиваемую культуру клеток животных.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в условиях отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелеского», 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 были выбраны следующие виды целлюлоз, использованных в качестве микроносителей: аморфизованная, хлопковая микрокристаллическая, древесная микрокристаллическая и гранулированная гидроксилсодержащая.

Для оценки влияния микроносителей на перевиваемую культуру клеток животных изучали такие показатели, как токсичность, адгезивная активность, динамика прикрепления, срок формирования монослоя и переживания на нем клеток. В работе использовали общепринятые в вирусологической практике оборудование, материалы и питательные среды.

Результаты и их обсуждение

В работе использовали перевиваемую культуру клеток MDBK.

Для приготовления суспензии аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы

и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы, использованных в дальнейшей работе как микроноситель, провели следующие этапы: приготовление суспензии различных видов целлюлозы, для чего проводили ее замачивание в стерильной дистиллированной воде (до 5,0 % целлюлозы); 4–5-кратное отмывание аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы от остатков химических реагентов, которые были использованы при ее изготовлении; автоклавирование полученной суспензии на дистиллированной воде при 1,5–2,0 атмосферах (115–120 °С) в течение 1 ч; двухкратное отмывание целлюлозы раствором Хэнкса (для придания суспензии изотоничности).

Для изучения влияния вышеназванных видов целлюлозы использован сформированный монослой культуры клеток MDBK на матрасах объемом 100 мл в количестве 13 шт. (по 3 шт. на каждый вид целлюлозы и 1 шт. – контроль). В каждый матрас внесена суспензия изучаемого вида целлюлозы до 1,0 % конечной концентрации. В результате наблюдения в течение 5 суток не установлено отрицательных последствий влияния различных видов целлюлозы на клеточный монослой. При добавлении к клеткам 0,2 %-го трипанового синего окрашивания клеток не выявлено, т. е. все клетки оставались в жизнеспособном состоянии.

Для оценки влияния различных видов целлюлозы изучена возможность использования суспензионного и роллерного культивирования перевиваемых клеток с микроносителями. Для суспензионного культивирования использована магнитная мешалка, обеспечивающая скорость перемешивания до 100 об/мин, на роллерах – установка, обеспечивающая скорость движения до 100 об/мин. При установлении магнита 30–40 об/мин отмечено осаждение суспензии целлюлозы на дно и по краям колбы. При увеличении оборотов до 100 об/мин целлюлоза находилась во взвеси. При микроскопировании клетки не прикреплялись к носителям и до 70,0–80,0 % из них были мертвы, что подтверждено тестом с 0,2 %-ным трипановым синим.

При отработке параметров роллерного культивирования при микроскопировании флаконов, куда вносился 1,0 % суспензии целлюлозы, отмечено полноценное формирование монослоя на поверхности роллерного флакона. Кроме того, на 50,0–60,0 % частиц целлюлозы отмечено прикрепление (адгезия) клеток и их рост в виде «ежиков». При использовании теста с трипановым синим клетки были жизнеспособны на 85,0–95,0 %. Характерно, что повышение концентрации целлюлозы до 2,5 % снижало формирование монослоя на поверхности роллерного флакона.

Для оценки переживания перевиваемых клеток на микроносителях при роллерном культивировании изучение проводили путем ежедневного наблюдения в течение 10 суток. В таблице приведены результаты оценки переживания перевиваемых клеток на микроносителях при роллерном культивировании. Они свидетельствуют о том, что различные виды целлюлозы – аморфизованная

целлюлоза, хлопковая микрокристаллическая целлюлоза, древесная микрокристаллическая целлюлоза, гранулированная гидроксилсодержащая целлюлоза – не обладают токсичностью в отношении культур клеток, имеют высокую адгезивную активность, способствуют формированию монослоя клеток как на поверхности роллерного флакона, так и на поверхности микроносителя, сохраняя эти свойства до 7 суток.

Результаты оценки переживания перевиваемых клеток на микроносителях при роллерном культивировании

Сутки наблюдения	Состояние монослоя в зависимости от вида микроносителя				
	Аморфизованная целлюлоза	Хлопковая микрокристаллическая целлюлоза	Древесная микрокристаллическая целлюлоза	Гранулированная гидроксилсодержащая целлюлоза	Без микроносителя (контроль)
1-е	Монослой сформирован на стекле на 30,0 % и на поверхности микроносителя на 30–40 %	Монослой сформирован на стекле на 30 % и на поверхности микроносителя на 20–30 %	Монослой сформирован на стекле на 30 % и на поверхности микроносителя на 35–40 %	Монослой сформирован на стекле на 30% и на поверхности микроносителя на 30–40 %	Монослой сформирован на стекле на 30 %
3–7-е	Монослой сформирован на стекле на 100 % и на поверхности микроносителя на 90–95 %				Монослой сформирован на стекле на 100 %
8-е	Монослой сформирован на стекле на 100 % и без видимых изменений; на поверхности микроносителя клетки набухшие, начинают отслаиваться от микроносителя				Монослой без видимых изменений
9–10-е	Монослой отслоился на 50–60 % от поверхности стекла; на поверхности микроносителя клетки набухшие, отслоились на 60–80 %				Монослой отслоился на 50–60 % от поверхности стекла

Заключение

Проведена оценка влияния микроносителей на основе модифицированных полисахаридов (аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы, гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы) на перевиваемую культуру клеток животных (токсичность, адгезивную активность, динамику прикрепления, сроков формирования монослоя и переживания на нем клеток).

Литература

1. Ковалев, Н. А. Вирусы и прионы в патологии человека и животных / А. Н. Ковалев, П. А. Красочко. – Минск : Беларуская навука, 2012. – 426 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.

3. Блажевич, О. В. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с.

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

5. Дитченко, Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений: метод. рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007. – 46 с.

Поступила 10.07.2017 г.

УДК 57.085.26

Н. И. Костюк, И. И. Стрельчяня, Н. В. Кныш, А. Н. Бурко, Е. С. Ткалич

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОК ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ 3 КГ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

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

Введение

Культура клеток с каждым годом находит все большее применение в самых разнообразных областях биологии, медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве. Ее используют при решении различных общебиологических проблем.

При работе с перевиваемыми клеточными культурами клеточные линии поддерживаются или приобретаются при необходимости. Будучи уникальной, перевиваемая клеточная линия не может быть воспроизведена или замещена. В лучшем случае замещение является дорогостоящей и требующей времени процедурой, поэтому существенным моментом работы с культурой клеток является предупреждение потери клеточных линий путем их консервации [1].

Наиболее эффективным методом, обеспечивающим долгосрочное хранение клеточных линий, является криоконсервирование и хранение клеточных суспензий в жидком азоте. Сегодня актуальным остается вопрос оптимизации условий криоконсервации и восстановления клеток животных и человека после оттаивания с максимальным процентом жизнеспособности [4].

Оптимальное замораживание клеток для сохранения максимальной жизнеспособности при восстановлении после размораживания зависит от минимизации образования внутриклеточных кристаллов льда, а также предотвращения образования очагов высокой концентрации солей, возникающих при замораживании внутриклеточной воды, что достигается путем:

- медленного замораживания, позволяя воде покинуть клетку, но не настолько медленно, чтобы спровоцировать рост ледяных кристаллов;
- использования криопротекторов для уменьшения содержания воды;
- хранения клеток при самой низкой температуре;