

ло, а инфекционная активность с использованием ФИТЦ-конъюгата на 4-том пассаже составила  $2,33 \pm 0,25 \text{ Ig ТЦД}_{50/\text{см}^3}$

**Заключение.** Показана эффективность применения клеток Marc-145, MA-104 и Vero для репродукции вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней европейского типа, установлено, что наиболее высокое накопление вируса наблюдается при культивировании его на клетках Marc-145, MA-104, которые перспективны для масштабирования процесса наработки вирусной биомассы с последующим изготовлением биопрепаратов.

#### Литература

1. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях// - Ленинград. – 1962г., – 215.С.
2. Матвеева И.Н. Оздоровление стад от массовых респираторных болезней// - Ветеринария. - Москва. – 2008. - С. 18-20.
3. Попова В.М., Матвеева И.Н., Самуйленко А.Я., Еремец В.И. /Технологическое оборудование для культивирования клеток животных и микроорганизмов// - мат. науч. конф. ВНИТИБП – Щелково. - 2012. - С. 237-242
4. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьёв Б.В., Фомина Н.В./ Вирусные болезни животных//. - Москва, - ВНИТИБП, ил. 2001,- 552 с.
5. William A Cafruny, Richard G Duman, Grace HW Wong, Suleman Said, Pam Ward-Demo, Raymond RR Rowland /Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection// - Virology Journal, - 2006., Article number: 90.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ КЛЕТОК ПРИ РОЛЛЕРНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕДПРИЯТИЯ

*Красочко П.А.<sup>1</sup>, Красочко И.А.<sup>1</sup>, Кашипар Л.Н.<sup>1</sup>, Борисовец Д.С.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,

<sup>2</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского»  
e-mail-krasochko@mail.ru

**Резюме.** Новым методом изготовления вирусных вакцин является выращивание клеток и накопление на них вирусов с исполь-

зованием культур клеток с использованием суспензионного или псевдосуспензионного культивирования на микроносителях. Этот метод повышает эффективность при накоплении больших количеств клеток и вирусов. Цель исследований - изучение влияния микроносителей на основе аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы на накопление клеток при псевдосуспензионном и роллерном культивировании. Для выращивания клеток на микроносителях на основе модифицированной целлюлозы при псевдосуспензионном культивировании культур клеток использованы следующие материалы: перевиваемая культура клеток МДБК, СПЭВ, ПТ-80 и ВНК-21, среда Игла ДМЭМ, среда 199, сыворотка крови крупного рогатого скота, стерилизованная гамма-облучением, раствор Хэнкса, аморфизованная и хлопковая микрокристаллическая целлюлоза. Использование аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы для культивирования клеток МДБК позволило достичь концентрации клеток от 1100 до 1650 - тыс. клеток /мл, а в контроле – от 800 до 900 тыс. клеток/мл. При оценке переживаемости клеток, выращенных на аморфизованной и хлопковой микрокристаллической выявлено, что к 5 дню отмечено полное заполнение клетками поверхности целлюлозы и это продолжается без изменений до 8 дня. После этого монослой начинает отслаиваться от поверхности стекла и от поверхности микроносителя клетки: клетки при этом набухшие, начинают отслаиваться на 50-80%.

**Summary.** A novel method of making viral vaccines is to grow cells and accumulate viruses on them using cell cultures using suspension or pseudosuspension culture on microcarriers. This method increases efficiency in the accumulation of large amounts of cells and viruses. The aim of the research is to study the effect of micro-carriers based on amorphous and cotton microcrystalline cellulose on cell accumulation in pseudosuspension and roller culture. The following materials are used to grow cells on microcarriers based on modified cellulose in pseudosuspension culture of cell cultures: transportable culture of MDBC cells, SPES, ПТ-80 and ВНК-21, Needle medium DMEM, medium 199, blood serum of cattle, sterilized gamma irradiation, Hanks solution, amorphous and cotton microcrystalline cellulose. The use of amorphous and cotton microcrystalline cellulose for the culture of MDBC cells allowed

to achieve cell concentration from 1100 to 1650 - thousand cells/ml, and in control - from 800 to 900 thousand cells/ml. In assessing the survival of cells grown on amorphous and cotton microcrystalline, it was found that by day 5, the cells had completely filled the cellulose surface and this continued unchanged until day 8. After that, the monolayer begins to peel off the surface of the glass and from the surface of the microcarrier of the cell: the cells are swollen, start to peel off by 50-80%.

**Ключевые слова:** модифицированные полисахариды, целлюлоза, микроносители, культура клеток, культивирование.

**Key words:** modified polysaccharides, cellulose, microcarriers, culturing.

**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]. Перспективным методом изготовления вирусных вакцин является выращивание клеток и накопление на них вирусов с использованием культур клеток с использованием суспензионного или псевдосуспензионного культивирования.

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 [4, 5]. Наши исследования связаны с изучением микроносителей на основе модифицированной целлюлозы, являющихся основой для суспензии.

**Цель исследований** - изучение влияния микроносителей на основе аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы на накопление клеток при псевдосуспензионном и роллерном культивировании.

**Материалы и методы.** Исследования проводились в условиях кафедры эпизоотологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», ОАО «БелВитунифарм» и РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского».

Для выращивания клеток на микроносителях на основе модифицированной целлюлозы при псевдосуспензионном культивировании культур клеток использованы следующие материалы: перевиваемая культура клеток МДБК, СПЭВ, ПТ-80 и ВНК-21, среда Игла МЭМ, среда Игла ДМЭМ, среда 199, сыворотка крови крупного рогатого скота, стерилизованная гамма-облучением, раствор Хэнкса, аморфизованная и хлопковая микрокристаллическая целлюлоза.

Для отработки культивирования клеток МДБК, СПЭВ, ПТ и ВНК-21 с использованием микроносителей использовали роллерные установки WC 349020-C (Литва) и флаконы имеют объем 4,0 л.

Для приготовления суспензии использованы аморфизованная целлюлоза и хлопковая микрокристаллическая целлюлоза хлопковая микрокристаллическая целлюлозы, использованной нами в качестве микроносителя, провели следующие этапы работы:

- приготовление суспензии хлопковой микрокристаллической целлюлозы, для чего проводили ее 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 (115-120°C) 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 2,5% 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.

Нами проведено изучение:

- цитотоксичности аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы на культуры клеток MDBK, СПЭВ, ПТ и ВНК-21 в условиях промышленного биотехнологического предприятия

- влияния аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы на концентрацию клеток при роллерном культивировании в условиях промышленного биотехнологического предприятия.

- влияния аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы на переживание на них клеток при роллерном культивировании в условиях промышленного биотехнологического предприятия.

После завершения культивирования, которое проводили в течение 3 суток и полноценного формирования монослоя как на поверхности роллерного флакона, так на частичках микроносителя, проведено отделение клеток следующим способом.

Сформировавшийся монослой на поверхности роллерного флакона и микроносителя снимали бесцентрифужным способом. Флаконы с микроносителями оставляли в вертикальном положении на 2-3 минуты для осаждения микроносителя с клетками. Затем из флаконов удаляли ростовую среду, пласт клеток на поверхности роллерного флакона и микроносителях дважды ополаскивали смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1:9. Культуру укладывали на роллерную установку (20-25 оборотов в минуту) и в таком положении она находится 10-15 минут. Все манипуляции проводили при комнатной температуре, растворы и среда имели эту же температуру. Отслоившиеся от стекла и микроносителя клетки ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды (50 мл) путем энергичного встряхивания, затем добавляют количество питательной среды в объеме, равное исходному (равное внесенной

суспензии клеток до культивирования).

Для изучения влияния аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы использован сформированный монослой культур клеток MDBK, СПЭВ, ПТ и ВНК-21 в условиях ОАО «БелВитунифарм» на матрасах объемом 500 мл. Для проведения работы использовано 8 матрасов (по 2 на каждый вид клеток). В каждый матрас со сформированным монослоем культур клеток MDBK, СПЭВ, ПТ и ВНК-21 внесена аморфизованная и хлопковая микрокристаллическая целлюлоза до 1% конечной концентрации (по сухой массе целлюлозы). За состояние монослоя наблюдали в течение 5 суток. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева под малым увеличением микроскопа.

**Результаты исследований.** В результате проведенных исследований не установлено отрицательных последствий влияния аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы на клеточный монослой культур клеток MDBK, СПЭВ, ПТ и ВНК-21. Подтверждением чему явилось добавление к клеткам 0,2% трипанового синего окрашивания клеток не выявлено, т.е. все клетки оставались в жизнеспособном состоянии.

Результаты определения концентрации клеток после культивирования различных клеток на роллерных флаконах с микроносителями - аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозой приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты определения концентрации различных клеток после культивирования на роллерных флаконах с микроносителями в условиях промышленного биотехнологического предприятия

№№ п/п	Вид клеток	Концентрация клеток тыс/мл		
		Аморфизованная целлюлоза	Хлопковая микро- кристаллическая целлюлоза	Роллерное культи- вирование без микроносителя
1	МДБК	1100,0	1300,0	800,0
2	СПЭВ	1250,0	1550,0	850,0
3	ПТ	1000,0	1200,0	800,0
4	ВНК-21	1300,0	1650,0	900,0

Из таблицы 1 видно, что все на поверхности аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы отмечен суще-

ственный рост различных клеток по сравнению с контролем без микроносителя.

Для оценки переживания перевиваемых клеток на микроносителях при роллерном культивировании изучение проводили путем ежедневного наблюдения в течение 10 суток.

В таблице 2 приведены результаты оценки переживания перевиваемых клеток МДБК, СПЭВ, ПТ и ВНК-21 на микроносителе на основе хлопковой микрокристаллической целлюлозы при роллерном культивировании.

Использование аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы для культивирования клеток МДБК позволило достичь концентрации клеток 1300,0 тыс. кл /мл, СПЭВ – 1550 тыс. кл /мл, ПТ - 1200 тыс. кл /мл, ВНК 21 - 1650 - тыс. кл /мл, а в контроле – от 800 до 900 тыс. кл/мл. Оценка переживаемости клеток, выращенных на аморфизованной и хлопковой микрокристаллической показало, что к 5 дню отмечено полное заполнение клетками поверхности целлюлозы и это продолжалось без изменений до 8 дня. После этого монослой начинает отслаиваться от поверхности стекла и от поверхности микроносителя клетки: клетки при этом набухшие, начинают отслаиваться на 50-80%.

**Заключение.** Использование аморфизованной и хлопковой микрокристаллической целлюлозы целесообразно использовать в качестве микроносителя для культивирования клеток МДБК, СПЭВ, ПТ и ВНК-21.

#### Литература

1. Красочко П.А. и др. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / под ред. Н. А. Ковалева. – Минск: Беларуская навука, 2016. – 492 с.
2. Красочко П.А. и др. Болезни крупного рогатого скота и овец – Махачкала, 2007. - 657с.
3. Красочко П.А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / ФГУ ВНИТИБП РАСХН. – Щелково, 2009. – 483с.
4. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. - Москва: «Спутник+», 2009. – 656 с.
5. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск: БГУ, 2004. – 78 с.

Таблица 2 - Результаты оценки переживания перевиваемых клеток МДБК и СПЭВ на микроносителе на основе аморфизованной и целлюлозы при роллерном культивировании

Дни наблюдения	Клетки с микроносителем				Клетки без микроносителя			
	МДБК	СПЭВ	ПТ	ВНК-21	МДБК	СПЭВ	ПТ	ВНК-21
1	Монослой сформирован на стекле на 20% и на поверхности микроносителя на 25-40%				Монослой сформирован на стекле на 25-35%			
2	Монослой сформирован на стекле на 75-80% и на поверхности микроносителя на 60-80%				Монослой сформирован на стекле на 70-80%			
3	Монослой сформирован на стекле на 100% и на поверхности микроносителя на 90-95%				Монослой сформирован на стекле на 95%			
4	Монослой сформирован на стекле на 100% и на поверхности микроносителя на 100%				Монослой сформирован на стекле на 100%			
5-7	Монослой сформирован на стекле на 100% и на поверхности микроносителя на 100% без видимых изменений				Монослой сформирован на стекле на 100% без видимых изменений			
8	Монослой сформирован на стекле на 100% и без видимых изменений; на поверхности микроносителя клетки набухшие, начинают отслаиваться от микроносителя				Монослой без видимых изменений			
9	Монослой начинает отслаиваться от поверхности стекла; на поверхности микроносителя клетки набухшие, начинают отслаиваться на 50-60%				Монослой начинает отслаиваться от поверхности стекла			
10	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			