

УДК 57.085.23

### МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИРОДНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ – ОСНОВЫ ДЛЯ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ КУЛЬТУР КЛЕТОК

\*Красочко П.А., \*Красочко И.А., \*Кашпар Л.Н., \*Овчинникова В.В., \*\*Костюк С.В., \*\*Зубец О.В.

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

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

*В статье показаны результаты изучения морфологии модифицированных полисахаридов, которые используются как микроносители для культур клеток. Морфологическую оценку микроносителей проводили визуально и при помощи сканирующей электронной микроскопии. Визуальная оценка, морфологическая оценка микроносителей на основе микрокристаллической целлюлозы свидетельствует, что это однородный порошковый или гранулированный материал белого цвета, допускается с желтым и серым оттенками. При сканирующей электронной микроскопии частицы микрокристаллической и древесной целлюлозы представляют собой фрагменты волокон, имеют ассиметричную форму, их размер в пределах от 100 до 200 мкм, поверхность самих частиц достаточно рельефна, наблюдается перекручивание волокон, имеются складки. Частицы хлопковой микрокристаллической целлюлозы представляют собой фрагменты волокон целлюлозы и имеют анизотропную форму с размером до 250 мкм. Декристаллизованная древесная целлюлоза представляет частицы, аналогичные микрокристаллическим целлюлозам, многие частицы сильно агрегированы в глобулы, их размер составляет 100-150 мкм. **Ключевые слова:** модифицированная целлюлоза, визуальная оценка, сканирующая микроскопия.*

### MORPHOLOGICAL EVALUATION OF NATURAL MODIFIED POLYSACCHARIDES - BASIS FOR CELL CULTURE MICROCARRIERS

\*Krasochko P.A., \*Krasochko I.A., \*Kaspar, L.N., \*Ovchinnicova V.V., \*\*Kostyuk S.V., \*\*Zubets O.V.

\*Vitebsk state Academy of veterinary medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

\*\*Research Institute of physical and chemical problems of the Belarusian state University,  
Minsk, Republic of Belarus

*The article shows the results of the study of the morphology of modified polysaccharides, which are used as micro carriers for cell cultures. Morphological evaluation of microcarriers was performed visually and by scanning electron microscopy. Visual assessment morphological assessment of micro carriers based on microcrystalline cellulose indicates that it is a homogeneous powder or granular material of white color, allowed with yellow and gray shades. When scanning electron microscopy microcrystalline and wood pulp particles are fiber fragments, have an asymmetrical shape, their size ranging from 100 to 200 microns, the surface of the particles is quite relief, there is a twisting of fibers, there are folds. Particles of cotton microcrystalline cellulose are fragments of cellulose fibers and have an anisotropic form with a size of up to 250 microns. The decrystallized wood pulp represents particles similar to microcrystalline cellulose, many particles are strongly aggregated in globules, their size is 100-150 microns. **Keywords:** modified cellulose, visual assessment, scanning microscopy.*

**Введение.** Инфекционные болезни имеют убиквитарное распространение и представляют собой социально-экономическую проблему для многих государств мира. В настоящее время в мире зарегистрировано около 500 заразных болезней животных, 200 из которых относятся к зооантропонозам или антропозонозам. В Республике Беларусь диагностировалось около 100 инфекционных болезней, из них более 40 общих для животных и человека, в том числе особо опасные (бешенство, сибирская язва, африканская и классическая чума свиней и др.), представляющие реальную угрозу для жизни человека и животных. За последние 30 лет в мире диагностировано около 20 новых инфекционных болезней (губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, цирковирусная инфекция, репродуктивно-респираторный синдром и эпидемическая диарея свиней, высокопатогенный грипп птиц, болезнь, вызванная вирусом Шмалленберг, и др.) [1, 2, 3, 4].

Против подавляющего большинства инфекционных заболеваний разработаны средства специфической профилактики. В Беларуси на биологическом предприятии – ОАО «БелВитунифарм» освоено производство и выпускается ряд вакцин для крупного рогатого скота, свиней и птиц. На ОАО «БелВитунифарм» начато освоение и производство противовирусных вакцин по отечественным технологиям [5, 6, 7].

Производство средств специфической профилактики вирусных инфекций включает несколько стадий, в которых культивирование вирусов является одной из основных стадий процесса производства препаратов. Биотехнология культивирования вирусов включает массовое выращивание клеток в культуре и является центральным звеном любого технологического процесса, основанного на использовании клеток животных, и в первую очередь производства вирусных препаратов. Стадия культивирования определяет массу и качество клеток и тем самым в целом технологию получения вирусного сырья [8, 9]. Но при традиционном способе культивирования (стационарном или роллерном) выход вируса невысокий. Перспективным способом повышения производительности получения вирусной массы является суспензионное культивирование. Однако для этого в Республике Беларусь используется только 1 линия клеток – перевиваемая культура клеток почек хомья-

ка ВНК 21/13. На этих клетках репродуцируется небольшое количество вирусов – вирус болезни Ауески, бешенства, ящура.

В этой связи культивирование клеток с использованием псевдосуспензионного культивирования на микроносителях (МН) оказалось весьма перспективным при производстве вирусных вакцин, а также других продуктов клеточного и вирусного происхождения. Этот метод широко применяют в биологической промышленности многие высокоразвитые страны. Культуры различных клеток на микроносителе оказались достаточно эффективными для выращивания многих опасных вирусов человека и животных [8].

Основными преимуществами этого метода являются:

- 1) создание равномерных условий по всему объему сосуда, что делает возможным эффективно контролировать необходимые параметры (рН, рО<sub>2</sub> и др.);
- 2) получение высокой плотности клеточной популяции до 5-6 млн клеток в 1 мл;
- 3) культивирование одновременно несколько сотен миллиардов клеток;
- 4) введение постоянного контроля за динамикой роста клеток;
- 5) снижение роста контаминации в связи с сокращением операций, связанных с разгерметизацией культурального сосуда;
- 6) значительная экономия питательных сред;
- 7) возможность сохранять выросшие клетки непосредственно на частицах при низких температурах;
- 8) возможность искусственно создавать различные концентрации МН с выросшими на них клетками;
- 9) возможность пассирования культуры без применения трипсина путем добавления свежих порций микроносителя [10, 11].

Для получения большого урожая клеток микроносители должны обладать следующими свойствами:

Морфологическая оценка микроносителей:

- диаметр частиц - от 100 до 250 мкм, что обеспечивает площади для роста нескольких сотен клеток;
- гладкая поверхность;
- прозрачность;
- отсутствие токсичности компонентов для клеток [8, 10].

Однако имеющиеся на рынке микроносители импортного производства имеют высокую стоимость и их использование существенно увеличит себестоимость готового продукта – вакцин. В этой связи нами на основании литературных данных и предыдущих собственных исследований в качестве микроносителя применена модифицированная целлюлоза.

Цель настоящего исследования – провести разработку и изучение морфологического состава модифицированных полисахаридов (аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы), используемых в качестве микроносителя для культур клеток при псевдосуспензионном их культивировании.

**Материалы и методы исследований.** 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».

В исследованиях использовали два вида промышленных целлюлоз:

- хлопковая целлюлоза в виде ваты по ГОСТ 595-79;
- древесная целлюлоза в виде папки по ГОСТ 3914.

Для визуальной оценки целлюлозы образец при температуре 20-25 °С помещают в чистый сухой стакан из прозрачного бесцветного стекла и просматривали при естественном или искусственном освещении. При этом оценивали состояние и цвет образца.

Также для морфологической оценки различных форм целлюлозы использовали сканирующую электронную микроскопию (сканирующий микроскоп LEO-1420 (Carl Zeiss (ФРГ)). Исследуемые образцы закрепляли на металлической подложке с помощью токопроводящего скотча. Металлизацию поверхности образцов осуществляли в приставке Emitech K550X золотом в газоплазменном разряде.

**Результаты исследований.** Для получения микроносителя на основе хлопковой микрокристаллической целлюлозы хлопковую вату подвергали кислотному гидролизу. При этом использовали хлористоводородную кислоту как наиболее активную. Для этого хлопковую целлюлозу в количестве 70 г загружают в стеклянный реактор объемом 2000 мл и заливают 1200 мл 7-10%-ного раствора соляной кислоты. После заливки в реактор раствора соляной кислоты систему оставляют на 30 мин. для пропитки реагентом целлюлозы. По истечении этого срока реактор нагревают, а в обратный холодильник подают охлажденную воду. При достижении кипения раствора соляной кислоты начинается интенсивный процесс деструкции природного полимерного волокна. Хлопковая вата через некоторое время (1,5-2 ч) распадается до порошкового состояния. По окончании процесса

отключают нагрев, реактору дают остыть до комнатной температуры. После чего содержимое реактора переносят на фильтр и фильтруют, отделяя продукт от реакционной среды. Отделенный осадок промывают дистиллированной водой до удаления остатков соляной кислоты, полноту отмывки проверяют на реакцию промывных вод на остаточную кислоту с помощью лакмусовой бумажки. Водородный показатель промывных вод должен быть на уровне 6-7. Промытый целлюлозный осадок помещают на поддон и сушат тонким слоем в сушильном шкафу при температуре 100-105<sup>o</sup>C в течение 4-6 часов. По окончании сушки продукт помещают в мельницу и размалывают, после чего просеивают на ситах с размером ячеек до 250 мкм, крупные фрагменты снова направляют на домол и просеивание.

В качестве исходного сырья для получения микроносителя древесной целлюлозы использовали древесную целлюлозу по ГОСТ 3914. 70 г ее нарезают на фрагменты 1x1 см и помещают в стеклянный реактор объемом 2000 мл и заливают 1200 мл приготовленного 10-15%-ного раствора азотной кислоты. После заливки в реактор раствора азотной кислоты систему оставляют на 30 мин. для пропитки реагентом целлюлозы. По истечении этого срока реактор нагревают, а в обратный холодильник подают охлажденную воду. При достижении кипения раствора азотной кислоты начинается интенсивный процесс деструкции природного полимерного волокна. Папка древесной целлюлозы через некоторое время (1,5-2 ч) распадается до порошкового состояния. По окончании процесса отключают нагрев, реактору дают остыть до комнатной температуры. После чего содержимое реактора переносят на фильтр и фильтруют, отделяя продукт от реакционной среды, отделенный осадок промывают дистиллированной водой до удаления остатков азотной кислоты, полноту отмывки проверяют на реакцию промывных вод на остаточную кислоту с помощью лакмусовой бумажки. Водородный показатель промывных вод должен быть на уровне 6-7. Промытый целлюлозный осадок помещают на поддон и сушат тонким слоем в сушильном шкафу при температуре 100-105<sup>o</sup>C в течение 4-6 часов. По окончании сушки продукт помещают в мельницу и размалывают, после чего просеивают на ситах с размером ячеек до 250 мкм, крупные фрагменты снова направляют на домол и просеивание.

Второй вариант получения микроносителя заключается в воздействии на древесную целлюлозу азотной кислоты умеренной концентрации. Азотная кислота концентрации 65-68% является высокоактивным по отношению к целлюлозе реагентом, способным вызывать глубокие структурные преобразования волокна, практически не изменяя химический состав биополимера. Для этого берут древесную целлюлозу в количестве 100 г, нарезают на фрагменты 1x1 см и помещают в широкогорлый стеклянный реактор объемом 2000 мл и заливают 1500 мл, приготовленного раствора 65-68%-ной азотной кислоты, охлажденной до 0<sup>o</sup>C. Реактор помещают в ледяную баню. В таких условиях выдерживают систему в течение 1 ч, при этом постоянно поддерживая температуру в сосуде, близкую к нулю. По истечении заданного времени отделяют на стеклянном (или полипропиленовом фильтре) азотную кислоту от порошковой массы. Отжимают и измеряют объем слитой кислоты. Затем отжимают на стеклянном или полипропиленовом фильтре избыток азотной кислоты. Отжатую целлюлозную массу переносят набухшую в кислоте в стеклянный реактор объемом 3000 мл и заливают расчетным количеством дистиллированной воды, чтобы получить раствор азотной кислоты около 15-20%. Реактор снабжен обратным холодильником и термометром. После заливки в реактор дистиллированной воды содержимое реактора перемешивают, в обратный холодильник подают охлажденную воду, а реактор начинают нагревать. При достижении температуры кипения раствора засекают время начала реакции. Через 1 ч отключают нагрев, реактору дают остыть до комнатной температуры. После чего содержимое реактора переносят на фильтр и фильтруют, отделяя продукт от реакционной среды, отделенный осадок промывают дистиллированной водой до удаления остатков азотной кислоты, полноту отмывки проверяют на реакцию промывных вод на остаточную кислотность с помощью лакмусовой бумажки. Водородный показатель промывных вод должен быть на уровне 6-7. Промытый осадок помещают на поддон и сушат тонким слоем в сушильном шкафу при температуре 100-105<sup>o</sup>C в течение 4-6 часов. По окончании сушки продукт помещают в мельницу и размалывают, после чего просеивают на ситах с размером ячеек до 250 мкм, крупные фрагменты снова направляют на домол и просеивание.

Получение микроносителя на основе гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы основано на многофакторном воздействии растворов азотной кислоты. При нагревании природного полимера в растворах азотной кислоты умеренной концентрации происходит частичное окисление макромолекул целлюлозы до карбоксилатных групп. Взвешивали хлопковую целлюлозу в количестве 100 г, и помещали в широкогорлый стеклянный реактор объемом 3000 мл и заливали 1500 мл приготовленного раствора 55-58%-ной азотной кислоты при комнатной температуре. Содержимое реактора тщательно перемешивают. В таких условиях выдерживают систему в течение 30 мин. По истечении заданного времени нагревают реактор до 60-70<sup>o</sup>C в течение 5 ч. После окончания реагирования выключают нагрев, остужают реактор до комнатной температуры. На стеклянном (или полипропиленовом фильтре) отделяют азотную кислоту от порошковой массы. Отжимают осадок, промывают его дистиллированной водой до удаления остатков азотной кислоты, полноту отмывки проверяют на отсутствие реакции промывных вод с дифениламиноом (с нитрат ионами дает синее окрашивание). Водородный показатель промывных вод должен быть на уровне 4-5. Промытый осадок помещают на поддон и сушат тонким слоем в сушильном шкафу при температуре не выше

100<sup>0</sup>С в течение 4-6 часов. По окончании сушки продукт помещают в мельницу и размалывают, после чего просеивают на ситах с размером ячеек до 250 мкм, крупные фрагменты снова направляют на домол и просеивание. Полученный материал помещают в соответствующую емкость и отбирают пробы для проведения анализов. В отдельной пробе определяют содержание карбоксильных групп (химическим методом), после чего порошок замачивают в пятикратном объеме дистиллированной воды, прибавляют расчетное количество растворенного в воде натрия углекислого для нейтрализации карбоксильных групп. При этом образуется пастообразная масса, которую продавливают сквозь фильтры заданного размера (сито) в насыщенный раствор нитрата кальция. Обязующиеся при этом гранулы отделяют на фильтре и промывают дистиллированной водой от нитрат-ионов, контролируя реакцию по дифениламину. После чего материал сушат в сушильном шкафу при температуре, не превышающей 100<sup>0</sup>С.

Морфологическую оценку различных видов модифицированной целлюлозы проводили визуально и при помощи сканирующей электронной микроскопии.

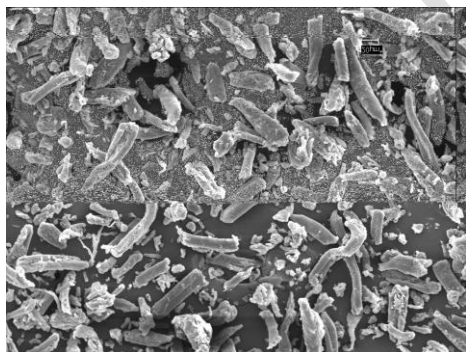
Визуальная оценка различных видов модифицированной целлюлозы представлена в таблице 1.

**Таблица 1 - Результаты визуальной оценки различных видов модифицированной целлюлозы**

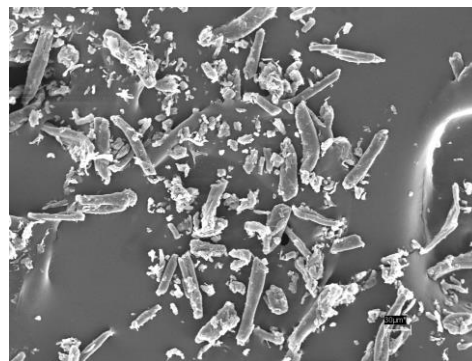
Вид целлюлозы	Внешний вид
Хлопковая микрокристаллическая целлюлоза	Однородный порошковый материал белого цвета, допускается желтый и серый оттенки
Древесная микрокристаллическая целлюлоза	Однородный порошковый материал белого цвета, допускается желтый и серый оттенки
Аморфизованная порошковая целлюлоза	Однородный порошковый материал белого цвета, допускается желтый и серый оттенки
Карбоксилсодержащая (гидроксилсодержащая) гранулированная целлюлоза	Гранулированный материал белого цвета допускается желтый и серый оттенки

*Сканирующая электронная микроскопия.* Использовали сканирующий микроскоп LEO-1420 (Carl Zeiss (ФРГ)).

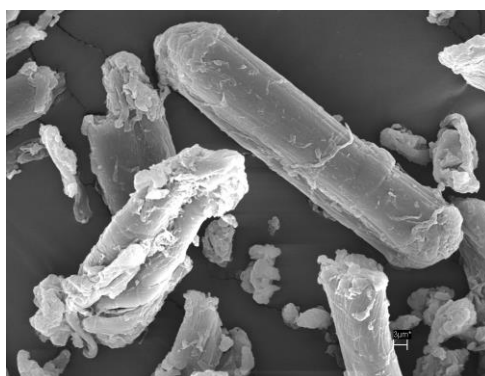
На рисунках 1-3 представлены частицы микроносителя из хлопковой микрокристаллической целлюлозы. Поскольку деструкция целлюлозных волокон протекает по аморфным областям, то частицы порошка представляют собой фрагменты этих волокон и имеют анизотропную форму. Основная масса частиц находится в пределах до 250 мкм.



**Рисунок 1 – Микрофото хлопковой целлюлозы**



**Рисунок 2 – Микрофото хлопковой целлюлозы**



**Рисунок 3 – Микрофото хлопковой целлюлозы**

МКЦ на основе древесной целлюлозы получали по схеме аналогично хлопковой целлюло-

зы. Здесь следует отметить, что получаемые порошковые частицы также представляют собой фрагменты продеструктурировавшего волокна и практически совпадают с формой хлопковой МКЦ. Это хорошо видно на представленных электронных микрофотографиях. Фотографии порошков хлопковой и древесной микрокристаллических целлюлоз и их фрагментов были сняты в одинаковых условиях и при одинаковом увеличении (рисунки 4-6).

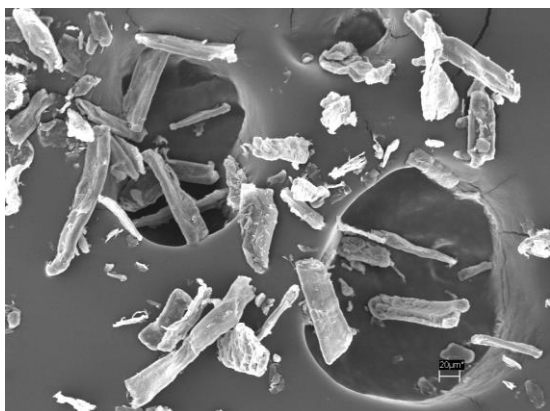


Рисунок 4 – Микрофото древесной целлюлозы

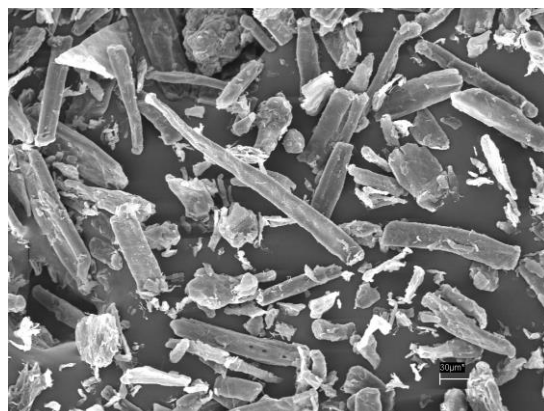


Рисунок 5 – Микрофото древесной целлюлозы

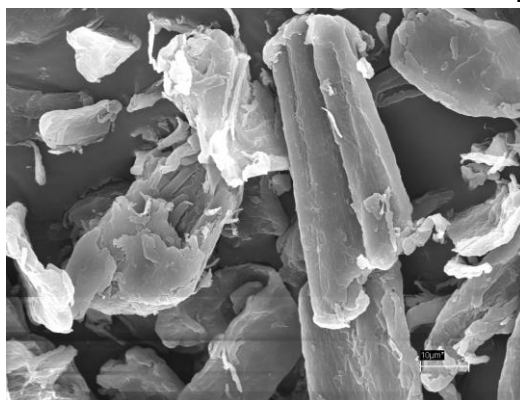


Рисунок 6 – Микрофото древесной целлюлозы

Как видно из представленных снимков, частицы микрокристаллической древесной целлюлозы имеют ассиметричную форму, основная масса которых лежит в пределах до 200 мкм. Поверхность самих частиц достаточно рельефна, наблюдается перекручивание волокон, имеются складки. Все это должно способствовать хорошей адгезии клеток на поверхности носителя.

Получение микроносителя на основе декристаллизованной древесной целлюлозы заключается в воздействии на древесную целлюлозу азотной кислоты умеренной концентрации. Таким образом, получали порошковый материал, имеющий частицы аналогичные микрокристаллическим целлюлозам (рисунки 7-8), здесь следует отметить, что многие частицы сильно агрегированы в глобулы, которые не разрушаются даже при механическом размоле. Размер глобул составляет 100-150 мкм.

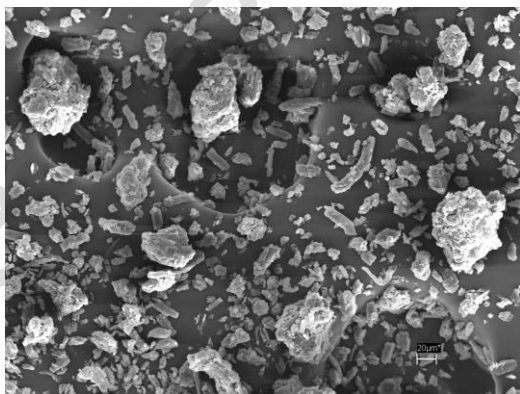


Рисунок 7 – Микрофото декристаллизованной древесной целлюлозы

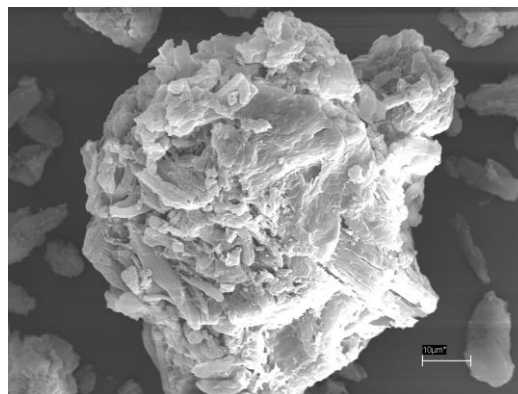


Рисунок 8 – Микрофото декристаллизованной древесной целлюлозы

Частицы гранулированного микроносителя представлены на электронных фотографиях

(рисунки 7-8). При детальном рассмотрении гранулы представляют собой все те же агрегаты из частиц волоконца (рисунки 9-10).

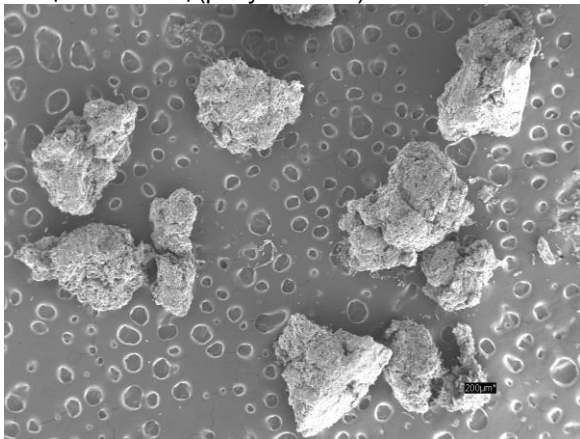


Рисунок 9 – Микрофото гранулированной целлюлозы

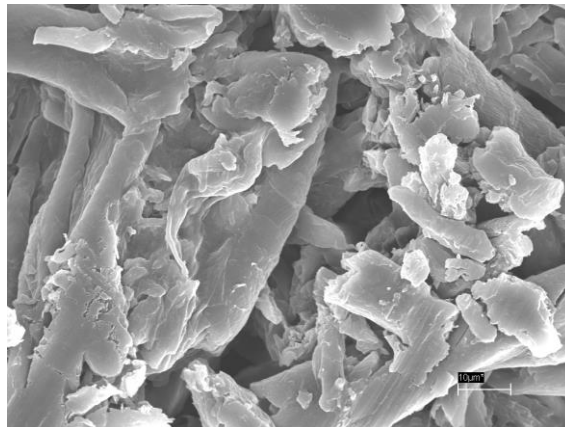


Рисунок 10 – Микрофото гранулированной целлюлозы

**Закключение.** 1. Проведено конструирование микроносителей на основе модифицированных полисахаридов (аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы) для псевдосуспензионного культивирования культур клеток. Изготовлены лабораторные образцы микроносителей.

2. Проведена морфологическая оценка модифицированных полисахаридов (аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы) для псевдосуспензионного культивирования культур клеток.

**Литература.** 1. Эпизоотология и инфекционные болезни : учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В. В. Максимович [и др.] – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 824 с. 2. Новые и возвращающиеся болезни животных / А. И. Ятусевич [и др.] – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 400 с. 3. Красочко, П. А. Инфицированность стад крупного рогатого скота возбудителями респираторных инфекций в хозяйствах Минской области / П. А. Красочко, И. П. Иванова // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию БелНИИЭВ им. С. Н. Вышелесского, 5-6 октября 2000 г. – Минск : Хата, 2000. – С. 105–106. 4. Ковалев, Н. А. Вирусы и прионы в патологии человека и животных / А. Н. Ковалев, П. А. Красочко. – Минск : Беларуская навука, 2012. – 426 с. 5. 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. 6. Болезни крупного рогатого скота и овец / П. А. Красочко [и др.]. – Махачкала, 2007. – 657 с. 7. Красочко, П. А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23 / П. А. Красочко ; ФГУ ВНИТИБП РАСХН. – Щелково, 2009. – 46 с. 8. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – Москва : «Спутник+», 2009. – 656 с. 9. Биология вирусов животных / Ф. Феннер [и др.]. – Москва : Мир, 1977. – Т. 1. – 447 с. 10. Блажевич, О. В. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с. 11. Дитченко, Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений : методические рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007. – 46 с.

Статья передана в печать 23.10.2018 г.

УДК 619:616,995.428с:636.4

#### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «ЛАКТОВЕРМ» ПРИ ПСОРОПТОЗАХ ЖВАЧНЫХ

Кузнецова Д.С.

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

Паразитарные болезни животных широко распространены в различных регионах мира и наносят огромный экономический ущерб. Особые природно-климатические условия Республики Беларусь способствуют широкому распространению паразитарных болезней. В течение многих лет проводились исследования по изучению паразитофауны домашних животных, циклов их развития, вызываемых ими болезней и разработке эффективных средств терапии и профилактики. **Ключевые слова:** чесотка, псороптоз, клеци, лактоверм, овцы, крупный рогатый скот, эффективность.

EFFICIENCY OF VETERINARY DRUG «LACTOVERM» AT PSOROPTOSIS OF RUMINANTS