

УДК 619:617.636.087.72:636.2

Стрельчя И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Полоз С.В., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Андруевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского», г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт рыбного хозяйства» РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», г. Минск, Республика Беларусь

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЫВОРОТОК КРОВИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ CV-1

Резюме

Изучена эффективность применения сыворотки крови производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского», полученной от крупного рогатого скота, для культивирования перевиваемой клеточной линии CV-1 с целью производства вакцин и ветеринарных иммунобиологических препаратов. Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что для перевиваемой клеточной линии CV-1 применение сыворотки крови крупного рогатого скота производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского» по своим иммунобиологическим свойствам и качественным характеристикам не уступает эмбриональной сыворотке телят производства SIGMA.

Ключевые слова: сыворотка, культура клеток, пролиферация, фибробласты.

Summary

The effectiveness of using serum produced by the RUP «Institute of Experimental Veterinary Science of S.N. Vysheslesky», obtained from cattle, for culturing the transplanted cell line CV-1 for the purpose of producing vaccines and veterinary immunobiological preparations, was studied. The received results of researches demonstrate that for the intertwined cellular CV-1 line the use of serum of blood of cattle produced by the RUP «Institute of Experimental Veterinary Science of S.N. Vysheslesky» on the immunobiological properties and quality characteristics doesn't concede to embryonic serum of calfs of production SIGMA.

Keywords: serum, cell culture, proliferation, fibroblasts.

Поступила в редакцию 26.10.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

В решении современных теоретических и практических проблем ветеринарной биотехнологии значительное место занимает культивирование клеток животных и человека [8, 4]. Современная ветеринарная вирусология и вся ветеринарная биопромышленность невозможна без широкого использования культур клеток *in vitro*. В связи с этим остается актуальной проблема разработки условий наиболее экономически эффективного их выращивания.

Важнейшей составной частью питательных сред, содержащей факторы роста клеточных популяций, является сыворотка крови животных. Сыворотка является необходимым компонентом большинства питательных сред для культивирования клеток. Она играет роль предохранительного физиологического буфера, участвует в процессах адгезии, распластывания и миграции клеток, является источником питательных

веществ и продолжает оставаться незаменимым компонентом ростовой среды для большинства клеточных и органных культур [5, 11, 13]. Сыворотка крови служит источником защитных веществ, предохраняющих клетки от повреждений.

В состав сыворотки входят факторы роста, которые способствуют клеточной пролиферации, а также факторы адгезии и вещества, обладающие антитрипсиновой активностью, способствующие прикреплению клеток к субстрату. Сыворотка является источником минеральных веществ, липидов и гормонов. Эмбриональная телячья сыворотка по сравнению с сывороткой крупного рогатого скота (КРС) содержит повышенное количество эстрадиола, эстриола и прогестерона.

Значение сыворотки крови для роста клеток, стимулирующих их пролиферацию, являются предметом интереса многих исследователей [1, 2, 7, 10, 12].

Чаще всего в культуральных средах используют эмбриональную сыворотку телят или сыворотку крупного рогатого скота. Из литературных источников [2, 5] следует, что лучшей является эмбриональная телячья сыворотка, но ее широкое использование лимитировано прежде всего дефицитом и высокой стоимостью. Для уменьшения применения дорогостоящей эмбриональной сыворотки при культивировании производственных клеточных линий прибегают к замене ее сывороткой крови взрослого крупного рогатого скота [3, 4, 13], которая является менее дорогостоящей и дефицитной. Поиск более дешевых и доступных ростостимулирующих компонентов перспективен.

Сыворотка играет роль предохранительного физиологического буфера, участвует в процессах адгезии, пролиферации и миграции клеток, является источником питательных веществ [9, 13].

Высокомолекулярные фракции сыворотки служат источником защитных веществ, предохраняющих клетки от повреждений. Сыворотка выполняет ряд других важных функций: стимулирует усвоение регуляторных молекул, воздействуя на клеточную мембрану, участвует в регуляции плотности культуры и контактной ингибиции, стимулирует внутриклеточное содержание критически необходимых для роста клеток питательных компонентов [5].

Одним из важнейших факторов в культивировании клеток остается выбор, состояние и концентрация добавляемой в культуральную среду сыворотки, которая обеспечит длительное культивирование и высокую пролиферативную активность различных клеток животных.

Для культивирования клеток различного происхождения чаще используется эмбриональная сыворотка телят. По сравнению с сыворотками особей различных возрастов она содержит повышенное количество эстрадиола, эстриола и прогестерона, хотя содержание их варьирует в широких пределах от партии к партии. Добавление сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, новорожденных телят при выращивании различных клеток остается неизбежной необходимостью [11]. В связи с этим многие исследователи получают сыворотку из крови взрослого клинически здорового крупного рогатого скота на убойных пунк-

тах, благополучных по инфекционным и паразитарным заболеваниям [11], которая значительно дешевле.

Получение сыворотки крови от взрослых животных и ее переработка проводится в соответствии с регламентом, изложенным в нормативно-технических документах.

Вновь приготовленные серии сыворотки крупного рогатого скота контролируют на отсутствие загрязнения вирусами и бактериями. Для стерилизации сыворотки предложена специальная ультрафиолетовая обработка, которая не ухудшает ее ростовые свойства.

В связи с тем, что одним из основных назначений сыворотки является способствование росту и размножению клеток, необходимым параметром при контроле ее качества является проверка биологических свойств по ростовым свойствам, физико-химический контроль и показатель цитотоксичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Все работы проводились в боксовом помещении, непосредственно в ламинарном шкафу, с соблюдением всех правил асептики и антисептики, с использованием стерильных материалов и реактивов.

Объектом исследований являлась готовая эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) производства SIGMA и сыворотка крупного рогатого скота, подвергнутая облучению гамма-лучами. Радиационная обработка проводилась на гамма-установке УГУ-420 с использованием закрытых радионуклидных источников гамма-излучения кобальт-60. После стерилизации контрольные флаконы сыворотки выдерживали в термостате в течение 7 дней и проводили контроль сыворотки на отсутствие контаминации микоплазмами, бактериями, грибами путем посева на селективные питательные среды МПА, МПБ, агар Сабуро. Физико-химические показатели, цитотоксичность, ростовые свойства проверяли в соответствии с нормативно-техническими документами ТУ ВУ 600049853.102-2017, а также [6, 14].

Для сравнительной характеристики действия этих сывороток использовали перевиваемую клеточную линию CV-1 (почка обезьяны). В работу брали 5 культуральных флаконов объемом 25 см² с добавлением в ростовую питательную среду ДМЕМ 10 % сыворотки крови КРС и 5 культуральных флаконов объемом 25 см² с ростовой питательной средой ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телят производства SIGMA. Инкубировали в термостате при температуре (+37,7±1) °С. Ежедневно вели наблюдение за качеством сформирования монослоя визуальным и с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив ×10) оценивали морфологию клеток. Для определения ростостимулирующей активности сыворотки было проведено 5 последовательных пассажей. Пересев клеток проводили каждые пять суток после формирования 100%-ной конfluence монослоя.

Об адгезивных свойствах исследуемой культуры судили по двум показателям: эффективности прикрепления и скорости распластывания клеток. Эффективность прикрепления определяли путем подсчета неприкрепившихся клеток через 24 ч после посева, скорость распластывания культуры – путем подсчета клеток, находящихся в разной степени распластности через 1,5; 3,5 и 24 ч после посева. В указанные сроки клеточный монослой фиксировали и окрашивали гематоксилином. Степень распластывания оценивали визуальным в световом микроскопе по площади, занимаемой клеткой данного субстрата, и ее форме.

Для дезагрегации клеток использовали растворы Версена и трипсина в соотношении 1:4. Удаляли ростовую питательную среду из культуральных флаконов, вносили раствор Версен-трипсина, инкубировали в термостате при температуре (+37,7±1) °С до полного отслоения клеток от стекла. В суспензию клеток вносили ростовую среду, ресуспензировали клетки пипетированием. Для определения жизнеспособности клеток и с целью их подсчета отбирали клеточную суспензию в пенициллиновый флакон, добавляли к ней равный объем 0,1 %-ного раствора трипанового синего, который окрашивает только мертвые клетки (живые остаются неокрашенными). В приготовленной суспензии определяли концентрацию живых клеток путем их под-

счета в камере Горяева. Предварительно необходимо подготовить гемоцитометр, протерев покровное стекло камеры бумажной салфеткой, смоченной в 70%-ном этиловом спирте с целью обезжиривания стекла. Покровное стекло необходимо плотно притереть к предметному стеклу до появления колец Ньютона так, чтобы прикрыть заштрихованные области. Количество живых клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной определяли по формуле 1:

$$x = \frac{A \times 1000 \times 2}{0,9}, \quad (1)$$

где x – количество клеток;

A – среднее арифметическое значение количества клеток трех проб;

1000 – коэффициент пересчета, см³;

2 – коэффициент разведения клеточной культуры красителем;

0,9 – объем счетной камеры Горяева, мм³.

Индекс пролиферации клеток определяли по формуле 2:

$$ИП = \frac{x}{y}, \quad (2)$$

где ИП – индекс пролиферации;

x – количество клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраса) после культивирования культуры клеток;

y – количество засеянных клеток из расчета на 1,0 см³ среды питательной (или на 1,0 см² рабочей поверхности матраса).

Сравнительное изучение клеток проводили на одной стадии роста и одинаковой клеточной плотности, на одной и той же среде и субстрате.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При культивировании клеток CV-1 было установлено, что вскоре наблюдаемое уменьшение популяции клеток легко может быть устранено, если для последующего субкультивирования использовать клетки в период логарифмического роста с добавлением 10%-ной сыворотки крупного рогатого скота. Если при первичном культивировании клеток при посеве 5×10⁴ клеток/мл логарифмическая фаза роста наступала после лаг-периода, длящегося в течение 24 ч, то клетки, перенесенные из такой культуры в любой период лог-фазы (концентрация не ниже 5×10⁴ клеток/мл), сразу

начинали размножаться в субкультуре с логарифмической скоростью. Культура клеток могла длительно поддерживаться в логарифмической фазе роста при периодическом замещении культуральной среды с добавлением сыворотки крупного рогатого скота, чтобы поддерживать концентрацию клеток в пределах 10^5 – 10^6 . Клетки сохраняли стабильность всех биологических свойств в течение всего срока культивирования (количества пассажей). Культура клеток представляла собой гомогенную популяцию фибробластоподобных веретенчатых клеток мультиполярной формы с четкими границами. Ядра овальные, удлинённые, ядрышки крупные, от 1 до 5 штук в ядре. Цитоплазма имела характерную мелкую зернистость. Ядро содержало 1–4 ядрышка. Клетки прозрачные, расположенные параллельными группами в различных направлениях. Хроматин распределен в ядре в виде мелкой зернистости. Отсутствовала грануляция и вакуолизация вокруг ядра. Среднее время генерации (10^5 клеток/мл) в логарифмической фазе роста равнялось 70–80 ч. При пересеве монослой образовывался на 2-3-и сутки роста. На 5-6-е сутки культивирования образовывался монослой клеток с конфлюэнтностью 100 %. Используя стандартные условия культивирования клеток, удавалось поддерживать культуру клеток в состоянии активного размножения на протяжении многих пассажей.

При культивировании клеток с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки клетки также сохраняли морфологическую

стабильность всех биологических свойств в течение всего срока культивирования, показывали высокую пролиферативную активность, на 5-6-е сутки образовывали 100%-ный конфлюэнтный монослой. Клетки обладали высокой адгезивной способностью к субстрату в течении 24–60 ч.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами установлено, что клетки данной линии в логарифмической фазе роста с добавлением сыворотки крупного рогатого скота и эмбриональной телячьей сыворотки размножаются с постоянной скоростью при одинаковых условиях выращивания. В ходе проведенных последующих пассажей выявлено, что замещение эмбриональной сыворотки телят производства SIGMA на сыворотку крупного рогатого скота производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» при культивировании перевиваемой клеточной линии CV-1 приводит к результатам, не уступающим по пролиферативной активности и ростообеспечивающей активности. Ее применение показывает высокий индекс пролиферации и не вызывает в тестируемых клетках дегенеративных изменений.

Замещение эмбриональной телячьей сыворотки производства SIGMA на сыворотку крупного рогатого скота позволит значительно удешевить производство ветеринарных иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Вечканов, Е. М. Клеточная инженерия: учеб. пособие / Е. М. Вечканов, И. А. Сорокина. – Ростов н/Д., 2012. – 136 с.
2. Гурьянов, Н. И. Качество сыворотки крови крупного рогатого скота / Н. И. Гурьянов // Ветеринария. – 1997. – № 10. – С. 21–22.
3. Гурьянов, Н. И. Усовершенствование технологий получения сывороток крови кур, бычков, эмбрионов коров и изучение их свойств при культивировании клеток и вирусов : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. И. Гурьянов. – Казань, 1992. – 19 с.
4. Дьяконов, Л. П. Животная клетка в культуре: методы и применение в биотехнологии / Л. П. Дьяконов, В. И. Ситьков ; под ред. проф. Дьяконова Л. П., проф. Ситькова В.И. – М. : Компания Спутник+, 2000. – 400 с.
5. Дьяконов, Л. П. Культуры клеток животных: современные аспекты биотехнологии и взаимодействие клеток с инфекционными патогенами / Л. П. Дьяконов // Цитология. – 1994. – Т. 36. – № 6. – С. 503–504.
6. Колокольцева, Т. Д. Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль / Т. Д. Колокольцова, И. Н. Сабурова, А. А. Кубатиев // Патогенез. – 2015. – Т. 13. – № 2. – С. 50–65.
7. Костина, Г. А. Сыворотка крови, обработанная полиэтиленгликолем, и ее использование для культивирования клеток / Г. А. Костина, И. Ф. Радаева // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 31–36.

8. Методы клеточной биологии, используемые в цитокинетике : учеб. пособие / И. Б. Алиева [и др.]. – М., 2010. – 132 с.
9. Опыт создания банка авторских линий перевиваемых клеток и их применение в вирусологической практике / Л. Л. Миронова [и др.] // Биотехнология. – 2000. – № 6. – С. 41–46.
10. Рянский, А. Л. Влияние комбинации сывороток крови различных видов животных на пролиферативную активность культур клеток и репродукцию вирусов / А. Л. Рянский, Н. И. Гурьянов, И. М. Ганиев // Ветеринарная патология. – 2007. – № 1. – С. 181–184.
11. Сергеев, В. А. Вирусы и вирусные вакцины / В. А. Сергеев, Е. А. Непоклонов, Т. И. Алипер. – М. : Библионика, 2007. – 524 с.
12. Фадеев, Ф. А. Возможности использования технологии автоматизированного культивирования при получении клеточных линий для терапевтического применения // Ф. А. Фадеев, Д. В. Луговец, М. В. Улитко // Клеточные технологии – практическому здравоохранению: материалы IV науч.-практ. конф. – Екатеринбург : Вестник уральской медицинской академической науки. – 2015. – С. 57–62.
13. Фреши, Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фреши ; пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 691 с.
14. Хапчаев, Ю. X. Разработка методов получения и культивирования первичных и перевиваемых культур клеток животных для производства вирусных вакцин : автореф. дисс. ... д-ра. биол. наук : 03.00.06. / Ю. X. Хапчаев. – М., 2003. – 47 с.

УДК 619:615.37:612.112

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор¹
Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент²
Станкуть А.Э., ветврач-исследователь²

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

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского», г. Минск, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАНО- И КОЛЛОИДНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА ПРИ РЕСПИРАТОРНЫХ БОЛЕЗНЯХ ТЕЛЯТ

Резюме

Цель исследований – изучение лечебно-профилактической эффективности комплексного препарата на основе нано- и коллоидных частиц серебра «Наноарговир» для профилактики и терапии респираторных инфекций телят. Установлено, что данный препарат имеет 85–91,7%-ную профилактическую и 88,4–92%-ную лечебную эффективность для телят.

Ключевые слова: наночастицы, коллоидное серебро, пневмоэнтериты, лечебная эффективность, профилактическая эффективность.

Summary

The purpose of the research is to study the therapeutic and prophylactic effectiveness of a complex drug based on nano- and colloidal silver particles «Nanoargovir» for the prevention and treatment of respiratory infections in calves. It was established that this preparation has 85-91.7% preventive and 88.4-92% therapeutic effectiveness for calves.

Keywords: nanoparticles, colloidal silver, pneumoenteritis, therapeutic effectiveness, preventive effectiveness.

Поступила в редакцию 16.11.2023 г.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие в научно-технических кругах практически всех развитых стран мира наноматериалы и нанотехнологии рассматриваются как факторы, обладающие огромным потенциалом для дальнейшего развития науки и техники. В то же время широкомасштабному их внед-

рению способствует открытие уникальных свойств наночастиц металлов и воздействие их на качество среды обитания человека, сельскохозяйственной продукции, животный и растительный мир. Это связано с особенностью наночастиц и наноматериалов, так как они легче вступают в химические превращения, чем более крупные