

Мартыненко Яна Николаевна, студентка 4-го курса факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина» д. 13, ул. Калинина, г. Краснодар, Россия, 350044; тел.: +7 (989) 805 63 26; e-mail: yana.martynenko@mail.ru.

Author affiliation:

Tishchenko Alexander Sergeevich, Ph. D. in Veterinary Medicine, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology and Epizootology of the Federal State Budgetary Educational Institution (FSBEI) of Higher Education (HE) «Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin»; house 13, Kalinina str., Krasnodar city, Krasnodar Territory, Russia, 350044; phone: +7 (928) 469 23 99; e-mail: mephisto83@inbox.ru.

Terekhov Vladimir Ivanovich, D. Sc. in Biology, Professor, Lecturer of the State Budget Professional Educational Institution (SBPEI) of the Krasnodar region «Pashkowski Agricultural College»; house 220, E. Bershanskoy str., Krasnodar city, Russia, 350910; phone: +7 (988) 474 21 15; e-mail: vterekhov@list.ru

Martynenko Yana Nikolaevna, Student of fourth year of the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal State Budgetary Educational Institution (FSBEI) of Higher Education (HE) «Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin»; house 13, Kalinina str., Krasnodar city, Krasnodar Territory, Russia, 350044; phone: +7 (989) 805-63-26; e-mail: yana.martynenko@mail.ru.

УДК 57082.26:576.535:611.018.54

Пономарев А. П., Манин Б. Л., Коган М. М.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЫВОРОТКИ КРОВИ, ОЧИЩЕННОЙ ЛАНТАНОИДАМИ

Ключевые слова: культуры клеток, культивирование, лантаноиды, микроорганизмы, питательные среды, сыворотка крови, экстракт шунгита.

Резюме: В биологической промышленности используются культуры клеток человека и животных, на основе которых получают средства защиты и профилактики различных заболеваний. При этом сами препараты могут быть потенциальными источниками возбудителей различной этиологии для живых биосистем. Это обусловлено тем, что в процессе культивирования клеток используются питательные среды, обязательным компонентом которых является сыворотка крови животных. К недостаткам сывороток относится непостоянство их состава, обусловленного возрастом животных, их питанием, происхождением и временем года получения сыворотки. Общеизвестным фактом является то, что сыворотки контаминированы различными микроорганизмами, которыми они загрязняют клеточные культуры, а, следовательно, и конечный продукт, получаемый на их основе. Принято считать, что наиболее эффективным способом деконтаминации сыворотки является микро- и ультрафильтрация, которая не является препятствием для вирусов, микоплазм, нанобактерий и др. Нами разработан способ очистки сыворотки крови с использованием водного экстракта шунгита, содержащего лантаноиды. Механизм очистки обусловлен тем, что высокореакционные катионы лантаноидов вступают во взаимодействие со структурами, содержащими нуклеиновый компонент. Избирательное взаимодействие лантаноидов сопровождается комплексообразованием с включением структур, содержащих ДНК или РНК, которые затем легко удаляются сепарированием или микрофильтрацией.

Введение

Эффективность биотехнологий по разработке и производству средств защиты человека и животных от различных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии зависит от качества питательных сред, используемых для выращивания культур клеток.

Сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) являются одним из главных компонентов ростовых питательных сред, основным недостатком которых являются контаминанты в виде различных вирусов, дрожжей, грибов, L-форм бактерий, микоплазм, нанобактерий, ингибирующих белков неясной этиологии, что отрицательно сказывается на размножении клеток и репродукции вирусов в клеточных культурах [1, 2]. В настоящее время принято считать, что для достижения высокого качества сывороток крови животных необходимо использовать современные фильтрационные установки для удаления контаминирующих агентов. Однако известно, что фильтры с диаметром пор 220–100 нм, используемые для очистки сывороток, не служат препятствием для L-форм бактерий, вирусов, микоплазм и нанобактерий, несущих угрозу здоровью человека и животных. Кроме того, животные сыворотки (препараты из крови животных) являются достаточно труднофильтруемым продуктом и требуют нескольких этапов предфильтрации и финишной стерилизующей фильтрации [3].

При изготовлении медицинских и ветеринарных препаратов для специфической профилактики альтернативным вариантом сыворотке КРС является сыворотка крови северных оленей, эмбриональная сыворотка и её искусственные заменители. Следует отметить, что сыворотка крови северных оленей малодоступна, а её производство возможно в сезон массового забоя животных в возрасте 1–5 лет [4, 5].

Производство эмбриональной сыворотки в РФ отсутствует, а её импортные варианты почти в 90 % случаев контаминированы нецитопатогенным пестивирусом BVDV – вирусом диареи – болезни слизистых оболочек КРС, что создает условия для появления на рынке препаратов сомнительного качества. Исследователи указывают, что этот вирус является мощным иммуносупрессором, на фоне которого активируются другие инфекционные агенты. Кроме того, дефицитность и высокая стоимость также являются недостатками данных сывороток [6, 7].

Перспективным направлением, позволяющим устранить вышеуказанные недостатки сыворотки крови при масштабном выращивании перевиваемых монослоевых и суспензионных культур клеток, является использование «искусственных» заменителей сыворотки. Фирмой HyClone разработаны заменители эмбриональных сывороток FetalClone I – III для культур клеток. Однако высокая стоимость данных препаратов и отсутствие производства их в РФ, ограничивает использование их при производстве биопрепаратов [8].

В последние десятилетия проводятся интенсивные исследования по получению бессывороточных синтетических питательных сред (БС). Прописи БС являются предметом собственности компаний Gibco, HyClone и др. и недоступны для широкого использования. Имеются сообщения о разработке российскими учеными БС ВекторВак-ПС1, пригодной для культивирования клеток и вирусов при получении вакцинных препаратов. Поскольку универсальной БС не существует, возникает необходимость разработки БС для каждого типа клеток, что относится к существенному недостатку данного препарата [9, 10].

В качестве альтернативы заменителям сыворотки и фетальным препаратам нами был разработан метод очистки сыворотки крови КРС с использованием водного экстракта из горной породы – шунгита, содержащего лантаноиды.

Цель настоящей работы состояла в совершенствовании технологии получения сыворотки крови крупного рогатого скота свободной от контаминирующих агентов и её испытания в составе питательных сред при выращивании постоянных клеточных культур.

В основные задачи работы входило:

- получение водного экстракта из горной породы шунгита, содержащего лантаноиды;
- включение в технологию очистки сыворотки крови крупного рогатого скота водного экстракта минерала шунгита;
- проверка роста культур клеток на средах с сывороткой очищенной лантаноидами в сравнении с сывороткой фирмы «БиолоТ».

Материалы и методы исследований

Биоматериалы. Очистку сыворотки крови крупного рогатого скота (далее «сыворотка») осуществляли на ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС» г. Владимир. Сыво-

ротку в замороженном состоянии получали с боенских предприятий. В качестве сравнительного препарата было использовано медицинское изделие, зарегистрированное на территории РФ – «Сыворотка крови крупного рогатого скота для культур клеток жидкой» производство ООО «БиолоТ».

Водный экстракт шунгита. Для приготовления экстракта использовали горную породу – шунгит в виде щебня, изготовленный в соответствии с ТУ 5714-007-12862296-01 «Дробленые и молотые шунгиты Зажогинского месторождения». В качестве экстрагента химических элементов из щебня шунгита использовали дистиллированную воду. Для интенсификации и повышения выхода элементов водную среду со щебнем шунгита подкисляли до pH 2,0–2,5 добавлением концентрированной соляной кислоты с последующей экспозицией не менее 72 часов. Более детально процесс получения экстракта шунгита изложен в работе [11].

Культивирование клеточных линий. Клинические испытания двух серий сыворотки № 12 и № 13, очищенной лантаноидами, были выполнены на базе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург в соответствии с приказом Росздравнадзора № 7279 от 13.10.2015 года. В процессе клинических испытаний были использованы клеточные линии McCoy, Vero и HEp-2.

На основании клинических испытаний исполнителями был составлен акт оценки результатов № 6/2-4-2017 от 22 сентября 2017 года, данные из которого приведены в настоящем сообщении (исполнители А. М. Миличкина, Н. Г.Рощина, А. В. Закровская).

В 2017 году подобные испытания были проведены в ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир с использованием клеточных линий: Vero-V (почка зеленой мартышки), ЯДК-04 (гонады козы), СПЭВ, ППК (почка поросенка), ПСГК-30 и первично – трипсинизированные клетки почки поросенка (СП), ВНК-21 – Шведская из музея лаборатории культивирования клеток.

Микробиологические исследования по выявлению контаминации в сыворотке, очищенной лантаноидами, проводились на базе микробиологической лаборатории Владимирского филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии на железнодорожном транспорте».

Минеральный состав водных экстрактов шунгита исследовали методом масс-

спектрометрии с ионизацией в индуктивно связанной плазме (ELAN DRC II, «PerkinElmer», США). Опыты выполнены в испытательном центре ФГБУ «ВНИИЗЖ» кандидатом химических наук И. В. Подколзиным.

Биохимический анализ сыворотки крови на этапах очистки проводили с помощью автоматического биохимического анализатора «BioChemFC-360» («НТИ», США). Исследования выполнены в испытательном центре ФГБУ «ВНИИЗЖ» кандидатом химических наук Д. С. Большаковым.

Для определения солесодержания в экстрактах шунгита использовали кондуктометр TDS/ECMeter (микросименс/см), показания которого основаны на прямой зависимости электропроводности раствора от количества растворенных в воде химических соединений.

Результаты и обсуждение

Водный экстракт горной породы – шунгита. Щебень шунгита служил исходным материалом для получения водных экстрактов, содержащих макро-, микро- и ультрамикроэлементы – лантаноиды. Технология приготовления, а также количественный и качественный минеральный состав водных экстрактов был определен ранее и приведен в работе [12]. В процессе пассивного экстрагирования из щебня шунгита в водную среду (при pH 2,0–2,5), переходят все 15 лантаноидов. При этом максимально возможный выход дает церий, что соответствует известным сведениям по данному элементу [13].

Для увеличения содержания химических элементов, водный раствор после экстрагирования с pH 2,0–2,5 подвергали концентрированию простым выпариванием с достижением концентрации по электропроводности 8000–9000 мкСм/см. Удаление макро- и микроэлементов из экстракта проводили путем нейтрализации кислотности, добавлением раствора щелочи с достижением pH 10,0–11,0. При нейтрализации кислотности меняется состав раствора за счет перехода в осадок макро- и микроэлементов, оксиды которых образуют со щелочью соль и воду, свидетельством чему является образование взвеси по всему объёму раствора. Удаление образовавшейся взвеси фильтрованием или центрифугированием сопровождается уменьшением показателя по солесодержанию до значения 4000–5000 мкСм/см. Очищенный и концентрированный таким образом водный экс-

тракт шунгита использовали для обработки сыворотки крови.

Очистку сыворотки крови объемами 100–220 л проводили поэтапно. Первый этап включает осветление сыворотки пропуском через микрофильтр с порами диаметром 450 нм и расфасовкой по полипропиленовым бутылкам объемом 15 л. Затем в каждую бутылку вносили по 150 мл водного экстракта шунгита, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 18–20 часов. В процессе экспозиции происходит образование комплексов, в состав которых включаются клетки микроорганизмов, фрагменты гемопоэтических клеток, вирусов с образованием взвеси видимой невооруженным глазом.

На втором этапе проводили отделение образовавшихся коагулированных частиц с помощью проточного центробежного сепаратора «Сокол» при скорости вращения барабана сепаратора 11000 об/мин и производительностью 100 л/час. При разборке барабана сепаратора из шламового пространства извлекали отделившийся гелеобразный биосубстрат для контроля. Отделение коагулированных – флокулированных частиц в осадок в процессе сепарирования позволяет увеличить прозрачность

сыворотки и её фильтруемость, а, главное, провести деконтаминацию.

На третьем этапе сыворотку фильтровали через стерилизующий микрофильтр с диаметром пор 220 нм, что позволяет удалить не отделившиеся при сепарировании более мелкие комплексы. Стерильную сыворотку расфасовывали в бутылки 600 мл с градуировкой до 500 мл, с винтовой крышкой и диаметром горла 22 мм.

Данные биохимического состава сыворотки одного из типовых опытов приведены в таблице 1.

Из результатов биохимического контроля следует, что содержание компонентов в сыворотке сохраняется на уровне исходных значений.

Содержание катионов лантаноидов в водном экстракте шунгита и в образцах сыворотки контролировали методом масс-спектрометрии (ELAN DRC II, «PerkinElmer», США). Кроме того, из гелеобразного биосубстрата на дистиллированной воде готовили 10 % суспензию, осветляли центрифугированием при 3500 об/мин в течение 10 мин и надосадочную осветленную фазу использовали для масс-спектрометрического анализа. Результаты контроля представлены в таблице 2.

Таблица 1. Результаты биохимического контроля сыворотки КРС на этапах изготовления препарата

Тесты	Размерность	Сыворотка после фильтра 450 нм	Сыворотка после экспозиции с лантаноидами	Сыворотка после сепаратора и фильтра 220 нм
Общий билирубин	Мкмоль/л	4,5	4,2	4,0
Общий белок	Г/л	80	80	75
Хлориды	Ммоль/л	126	119	119
Фосфор	Ммоль/л	2,37	2,3	2,24
Железо	МкМоль/л	24,7	28,9	23,6
Триглицериды	Ммоль/л	0,25	0,21	0,22
Холестерин	Ммоль/л	2,61	2,43	2,29
Глюкоза	Ммоль/л	6,2	6,1	6,0
Мочевая кислота	МкМоль/л	142	138	111
Кальций общий	Ммоль/л	2,57	2,32	1,89
Альбумин	Г/л	32,6	30,3	28,9
Фосфатаза щелочная	Е/л	81	80	77
АЛТ	Е/л	21	19	22
АСТ	Е/л	58	57	55
Амилаза	U/l	44	40	37
Креатинкиназа	U/l	1299	1327	1423
Лактатдегидрогеназа	U/l	1198	1173	1197
Азот мочевины	Ммоль/л	6,5	6,5	5,8
Креатинин	МкМоль/л	130	130	126

Таблица 2. Содержание лантаноидов в экстракте и после добавления к сыворотке в процессе очистки

№ п/п	Хим. элементы	Водный экстракт шунгита (мкг/л)	Сыв. + лантаноиды (мкг/л)	Сыв. после сепаратора (мкг/л)	Сыв. после фильтра (мкг/л)	Биосубстрат (мкг/л)
1	Церий	211,23	1,92	1,85	1,81	65,3
2	Неодим	162,54	1,35	1,4	1,41	29,4
3	Лантан	82,08	1,1	0,8	0,75	43,1
4	Гадолиний	46,34	0,38	0,41	0,41	7,7
5	Празеодим	38,24	0,3	0,32	0,32	8,5
6	Самарий	38,37	0,3	0,33	0,33	6,0
7	Диспрозий	26,9	0,23	0,2	0,24	4,2
8	Эрбий	11,6	-	-	-	2,0
9	Европий	9,24	0,16	0,17	0,21	5,1
10	Иттербий	6,65	-	-	-	1,2
11	Гольмий	4,81	-	-	-	0,8
12	Тулий	1,33	-	-	-	0,2
13	Лютеций	0,8	0,13	0,15	0,17	0,1

Из данных табл. 2 следует, что при фактическом 100-кратном разведении экстракта содержание большей части лантаноидов в сыворотке уменьшается в среднем в 120 раз. Из всей группы лантаноидов в образцах сыворотки не выявлено четыре элемента: эрбий, иттербий, гольмий и тулий. В то же время все лантаноиды присутствуют в более высокой концентрации в отделяемом биосубстрате, который в процессе сепарирования сыворотки концентрируется в шламовом пространстве барабана сепаратора.

Из результатов проведенных исследований следует, что в процессе микрофльтрации с использованием фильтра с диаметром пор 450 нм контаминанты сыворотки в виде бактериальных клеток полностью не задерживаются. Высокая реакционная способность катионов лантаноидов обусловлена тем, что в условиях нормальной диссоциации они трехвалентно положительные. Феномен избирательной коагуляции бактериальных клеток обусловлен реакцией комплексообразования высокоактивных катионов лантаноидов с нуклеиновыми кислотами микроорганизмов. Реакция нуклеиновой кислоты с металлом осуществляется посредством фосфатных групп [14, 15]. При этом компоненты сыворотки, в составе которых отсутствуют ДНК или РНК, не принимают участия в реакции комплексообразования, так как их содержание в исходной нативной

сыворотке не изменяется по сравнению с конечным продуктом (табл. 2).

Из результатов микробиологических исследований выполненных в 4-х кратной повторности с различными сериями сыворотки следует, что осветленные 10 % суспензии из гелеобразного осадка-биосубстрата содержат 1×10^{11} КОЕ/мл *Klebsiella pneumoniae* и 1×10^4 КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*.

При контроле собственно сыворотки, очищенной с лантаноидами, отмечено отсутствие роста микроорганизмов во всех питательных средах на протяжении всего срока инкубации (7–10 дней). Установлено, что образцы сыворотки крови КРС: нативные, неспецифические без консерванта, первой категории, очищенные лантаноидами, произведенные НПП «БИОХИМСЕРВИС» (г. Владимир), стерильны.

Относительно присутствия в сыворотке микоплазм и вирусов следует привести сведения по результатам входного контроля 6 серий сыворотки объемом от 100 до 200 л изготовленных НПП «БИОХИМСЕРВИС» и поставленных ФГБНУ «ФНЦИРИП» им. М. П. Чумакова РАН для использования в биотехнологических процессах. Из аналитических листов входного контроля следует, что протестированные сыворотки крови КРС не содержат микроскопических грибов, бактерий, микоплазм и вирусов, то есть стерильны по данным показателям.

Культивирование клеточных линий человека и животных. Тест-культуру в виде клеточной линии McCoу культивировали в 5 пассажах на среде RPMI-1640 с L-глутамином и гентамицином и с добавлением 10 % испытуемой сыворотки КРС. Посевная доза (100–120) × 10³ клеток в 1 см³. Клеточные культуры инкубировали в пластиковых культуральных флаконах площадью 25 см² при температуре 37 ± 1 °С. Состояние клеточного слоя оценивали микроскопированием на 3-и сутки культивирования.

Для посева клетки снимали с пластика подогретой до 35 ± 2 °С смесью раствора версена и трипсина в соотношении 1:1. Рассев проводили с кратностью 1:4. В течение пяти пассажей определяли кратность прироста, как отношения исходной концентрации жизнеспособных клеток к конечной концентрации жизнеспособных клеток. Подсчет жизнеспособных (неокрашенных) клеток проводили в счетной ка-

мере Горяева.

Аналогично, проводили культивирование клеток на ростовой среде с добавлением сыворотки сравнения производства фирмы БиолоТ в 2-х параллельных пробах и определяли кратность прироста клеток для данной ростовой среды. Результаты определения кратности прироста испытуемой и сыворотки сравнения представлены в таблице 3. При оценке состояния клеточного монослоя, после пятого пассажа путем микроскопирования, было отмечено, что клетки на испытуемых питательных средах образовывали плотный клеточный монослой хорошего качества. Клетки отличались четкими границами, отсутствием вакуолизации и зернистости в цитоплазме. Визуальной разницы между клетками, выращенными на среде с испытуемой сывороткой и клетками, выращенными на среде с сывороткой сравнения, обнаружено не было. Результаты сравнительного исследования двух серий сыворотки при куль-

Таблица 3. Определение кратности прироста для клеточной линии McCoу

№ п/п	Сыворотки для приготовления ростовой среды	Индекс пролиферации (ИП)		
		Параллельные пассажи		Среднее значение (ИП)
		1 культурал. флакон	2 культурал. флакон	
1	Испытуемая КРС сер. 12	3,8	3,4	3,60 ± 0,20
2	Испытуемая КРС сер. 13	4,0	3,5	3,75 ± 0,25
3	Испытуемая КРС сер. 13	3,7	3,9	3,80 ± 0,10
4	Сыворотка сравнения	4,2	3,7	3,95 ± 0,25

тивировании клеток линии McCoу в двух параллельных пассажах показали идентичные результаты по кратности прироста. Внутрисерийная воспроизводимость подтверждается идентичностью результатов кратности прироста для параллельных пассажей клеток, выращенных на ростовой среде, приготовленной на сыворотке одной серии, но из разных флаконов (3,75 ± 0,25 и 3,80 ± 0,10). При сравнении испытуемой сыворотки и сыворотки сравнения не выявлено существенных различий.

Результаты сравнительного исследования кратности прироста при культивировании клеток линии Vero и HEp-2 испытуемой сыворотки и сыворотки сравнения приведены в таблицах 4 и 5.

Сравнительные исследования двух серий сыворотки КРС при культивировании клеток линии Vero и HEp-2 были получе-

ны идентичные результаты по значению кратности прироста. Подтверждена внутрисерийная воспроизводимость результатов определения кратности прироста для параллельных пассажей клеток, выращенных на ростовой среде, приготовленной на сыворотке одной серии, но из разных флаконов. При сравнении испытуемой сыворотки с сывороткой сравнения существенных различий выявлено не было, что дает основание для заключения о возможности использования сыворотки очищенной с лантаноидами для выращивания культур клеток. Кроме того, полученные данные позволяют заключить об отсутствии токсичности сыворотки очищенной с лантаноидами.

В опытах по изучению ростовых свойств клеток на питательной среде с сывороткой крови КРС, проведенные на ба-

Таблица 4. Определение кратности прироста для клеточной линии Vero

№ п/п	Сыворотки для приготовления ростовой среды	Индекс пролиферации (ИП)		
		Параллельные пассажи		Среднее значение (КП)
		1 культурал. флакон	2 культурал. флакон	
1	Испытуемая КРС сер. 12	4,8	4,5	4,65 ± 0,15
2	Испытуемая КРС сер. 13	5,0	4,4	4,7 ± 0,30
3	Испытуемая КРС сер. 13	4,7	5,1	4,9 ± 0,20
4	Сыворотка сравнения	4,9	4,5	4,7 ± 0,20

**Таблица 5. Определение кратности прироста для клеточной
линии Нер-2**

№ п/п	Сыворотки для приготовления ростовой среды	Индекс пролиферации (ИП)		
		Параллельные пассажи		Среднее значение (ИП)
		1 культурал. флакон	2 культурал. флакон	
1	Испытуемая КРС сер. 12	3,6	3,4	3,50 ± 0,10
2	Испытуемая КРС сер. 13	3,2	3,5	3,35 ± 0,15
3	Испытуемая КРС сер. 13	3,7	3,2	3,45 ± 0,25
4	Сыворотка сравнения	3,3	3,7	3,50 ± 0,20

зе ФГБУ «ВНИИЗЖ», наиболее показательные положительные свойства ростовой среды с испытуемой сывороткой проявились при работе с клеточной культурой ЯДК-04, которая очень чувствительна к изменению условий культивирования, в том числе и к качеству сыворотки. Следует отметить, что клеточная линия ЯДК-04 при культивировании на комбинированной питательной среде ПСП + 1/3 среды 199 с эмбриональной сывороткой элиминируется (деградирует) через 2-3 пассажа при расसेве 1:2 или 1:3. В тоже время в опытах с ис-

пытуемой сывороткой в трехкратной повторности при расसेве 1:6 через 3-4 суток получали плотный конфлюентный монослой (рис. 1) При данной кратности рассева количество митозов в логарифмической фазе роста возрастает в 2 раза, популяция клеток омолаживается, уменьшается число некротических клеток и в стадии апоптоза. Кариологическое обследование показало, что видовая принадлежность культуры сохранилась. При этом увеличилась частота появления в метафазных клетках метацентрических хромосом до 10

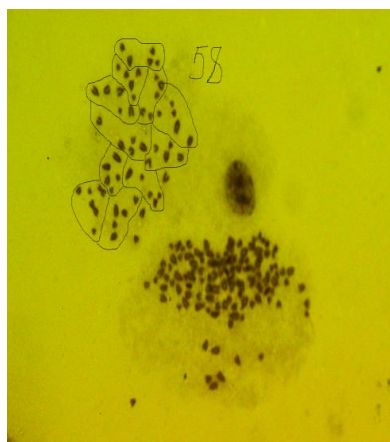
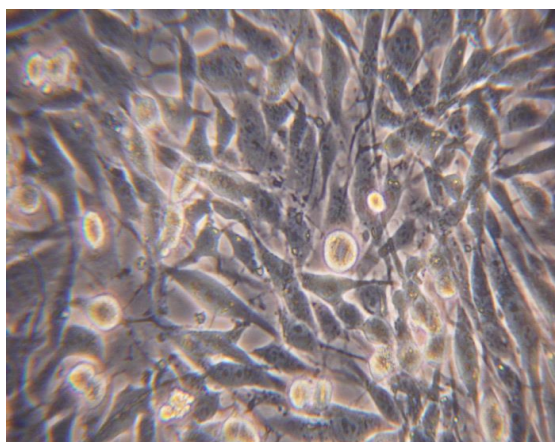


Рисунок Морфология и метафазная пластинка клеточной линии ЯДК-04, выращенной с применением сыворотки обработанной лантаноидами

% (рис. 1).

В опытах с клеточной линией ППК использовали питательную среду с 5% сыворотки, обработанной лантаноидами. В 7-ми последовательных пассажах снижения интенсивности роста клеток не установлено. В морфологии отмечалась однородность клеток, минимум зернистости, присутствие митозов в логарифмической фазе роста. Длительность непрерывного выращивания увеличивалась до 15–20 пассажей.

Первичную клеточную культуру СП выращивали с соблюдением стандартных условий трипсинизации и культивирования. При посевной концентрации клеток 100–150 тыс/мл на 4–5 сутки формировался конфлюэнтный монослой с полиморфными клетками при минимальной вакуолизации и гранулярности. В предварительных опытах с вирусом ящура отмечено увеличение на 10 % чувствительной данной клеточной культуры.

Способ очистки сыворотки крови защищен патентом РФ [16] и сыворотка, очищенная и обогащенная лантаноидами, успешно используется на регулярной основе при культивировании различных культур клеток в ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир. При контроле методом ПЦР в составе сыворотки геном вируса ВД КРС не обнаружен. Положительное заключение на качество очищенной сыворотки получено из НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург и из предприятия АО «Генериум», г. Покров, пос. Вольгинский.

Заключение

В результате выполненных исследо-

ваний установлены важные для теории и практики сведения по работе с сывороткой крови животных – одного из главных компонентов питательных сред для клеточных культур.

1. На основе горной породы шунгита отработана технология получения водного экстракта, содержащего редкоземельные ультрамикроэлементы – лантаноиды, высокая реакционная способность катионов которых обусловлена тем, что в условиях нормальной диссоциации они трехвалентно положительные.

2. Избирательное удаление контаминантов сыворотки обусловлено феноменом комплексообразования катионов лантаноидов с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и РНК микроорганизмов-контаминантов. Комплексы, образуемые бактериальными клетками, вирусами и микоплазмами, эффективно удаляются последовательным сепарированием и микрофильтрацией через фильтры с пораи 220 нм.

3. Сравнительные испытания сыворотки, очищенной лантаноидами, и сыворотки фирмы БиолоТ показали, что практически все постоянные клеточные культуры положительно реагируют на применение испытуемой сыворотки. Установлено увеличение количества проводимых пассажей без дегенерации клеток и уменьшения их гранулярности в монослое. На примере культуры клеток ЯДК-04 установлено, что испытуемая сыворотка оказалась предпочтительней дорогостоящей импортной эмбриональной. Отмечен также факт омоложения клеток и формирование их однородной популяции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят ученых НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера г. Санкт-Петербург к.м.н. А. М. Миличкину, к.б.н. Н. Г. Рошину, к.м.н. А. В. Закревскую за выполненные исследования по сравнительному культивированию клеток. Отдельная благодарность микробиологу Е. А. Иваненко за детальные микробиологические исследования на этапах очистки сыворотки.

Библиографический список:

1. Гурьянов Н. И. Преимущество использования сыворотки крови из сердца бычков для культивирования клеток / Н. И. Гурьянов // Ветеринария. – 2008. – № 7. – С. 58–61.
2. Пономарев А. П. Исследование контаминации постоянных клеточных культур методом электронной микроскопии / А. П. Пономарев, Б. Л. Манин, В. Н. Герасимов // Цитология. – 2006. – № 48 (9). – С. 792–793.
3. Попова В. М. Разработка и оптимизация технологий производства ветеринарных препаратов и ферментов / В. М. Попова, И. И. Кочиш, И. Л. Боро, А. Я. Самуйленко и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № (4). – С. 45–50.
4. Гуненков В. В. Свойства сыворотки крови северных оленей и результаты применения её в вирусологии и биотехнологии / В. В. Гуненков, О. И. Сухарев, В. Ф. Сирота // Вопросы вирусологии. – 2003. – № (6). – С. 37–41.
5. Гуславский А. И. Перспективы применения сыворотки крови северных оленей в клеточной биотехнологии / А. И. Гуславский, А. В. Канарский, З. А. Канарская // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – № (4). – С. 192–194.
6. Урываев Л. В. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами /

- Л. В. Урываев, К. С. Ионова, А. В. Дедова, Л. В. Дедова и др. // Вопросы вирусологии. – 2012. – № (5). – С. 15–21.
7. Глотов А. Г. О контаминации импортируемой фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота пестивирусами как факторе распространения вирусной диареи в условиях глобализации: мини-обзор / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, С. В. Котенева // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – № 53 (3). – С. – 248–257.
8. HyClon. FetalClone. Engineered serum products [Электронный ресурс]. General Electric Company. Электрон. дан. Sweden. 2015. Режим доступа: https://betastatic.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_EU/promotions/GEHealthcareLifeSciences/FetalClone_flyer.pdf (дата обращения 16.03.2019 г.)
9. Трошкова Г. П. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток Vero / Г. П. Трошкова, Л. Д. Мартынец, Е. В. Кирова, Т. П. Сумкина и др. // Фундаментальные исследования. – 2005. – № (5). <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=6105> (дата обращения: 06.04.2019 г.)
10. Нечаева Е. А. Бессывороточная питательная среда для культивирования клеток и вирусов / Е. А. Нечаева, И. Ф. Радаева, Н. Б. Думченко, Т. П. Сумкина и др. // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология. – 2018. – № (4). – С. 85–96. Doi: 10.15593/2224-9400/2018.4.07
11. Пономарев А. П. Извлечение редкоземельных ультрамикроэлементов – лантаноидов из природного нанотехнологического минерала шунгита / А. П. Пономарев, Д. С. Большаков, С. Д. Дынчик // Научный журнал «Pyxis». – Санкт-Петербург. – 2016. – № 1 (1). – С. 10–19.
12. Пономарев А. П. Макро-, микро- и ультрамикроэлементы в экстрактах из природного нанотехнологического минерала – шунгита / А. П. Пономарев, И. В. Подколзин, В. Г. Амелин // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2012. – № 4 (2). – С. 48–55.
13. Хромушин В. А. Шунгиты как природная нанотехнология (обзор литературы) / В. А. Хромушин, Т. В. Честнова, В. В. Платонов и др. // Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал. – 2014. – № (1). – С. 1–8.
14. Рябчиков Д. И. Аналитическая химия редкоземельных элементов и иттрия / Д. И. Рябчиков, В. А. Рябухин. – М.: Наука, 1966. – 379 с.
15. Крисс Е. Е. Взаимодействие нуклеиновых кислот с металлами / Е. Е. Крисс, К. Б. Яценевский // Успехи химии. – 1966. – № 35 (2). – С. 349–363.
16. Пат.2664729 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ очистки сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих агентов / Пономарев А. П., Белик Е. В., Манин Б. Л., Коган М. М.; заявитель и патентообладатель ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС». – № 2017117994; заяв. 23.05.17; опубл. 22.08.18, Бюл. № 24.

References:

1. Guryanov N. I. Preimushchestvo ispolzovaniya syvorotki krovi iz serdsta bychkov dlya kultivirovaniya kletok [The advantage of using blood serum from the heart of gobies for cell cultivation] / N. I. Guryanov // Veterinariya. – 2008. – # 7. – S. 58–61.
2. Ponomarev A. P. Issledovanie kontaminatsii postoyannykh kletochnykh kultur metodom elektronnoy mikroskopii [The advantage of using blood serum from the heart of gobies for cell cultivation] / A. P. Ponomarev, B. L. Manin, V. N. Gerasimov // Tsitologiya. – 2006. – # 48 (9). – S. 792–793.
3. Popova V. M. Razrabotka i optimizatsiya tehnologii proizvodstva veterinarnykh preparatov i fermentov [Development and optimization of technologies for the production of veterinary drugs and enzymes] / V. M. Popova, I. I. Kochish, I. L. Bero, A. Ya. Samuylenko i dr. // Selskhozaystvennaya biologiya. – 2010. – # (4). – S. 45–50.
4. Gunenkov V. V. Svoystva syvorotki krovi severnykh oleney i rezultaty primeneniya eyo v virusologii i biotekhnologii [Properties of the blood serum of reindeer and the results of its use in virology and biotechnology] / V. V. Gunenkov, O. I. Suharev, V. F. Sirota // Voprosy virusologii. – 2003. – # (6). – S. 37–41.
5. Guslavskiy A. I. Perspektivy primeneniya syvorotki krovi severnykh oleney v kletochnoy biotekhnologii [Prospects for the use of blood serum of reindeer in cell biotechnology] / A. I. Guslavskiy, A. V. Kanarskiy, Z. A. Kanarskaya // Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta. – 2013. – # (4). – S. 192–194.
6. Uryivaev L. V. Analiz kontaminatsii kletochnykh kultur pestivirusom BVDV i mikoplazmami [Prospects for the use of blood serum of reindeer in cell biotechnology] / L. V. Uryivaev, K. S. Ionova, A. V. Dedova, L. V. Dedova i dr. // Voprosy virusologii. – 2012. – # (5). – S. 15–21.
7. Glotov A. G. O kontaminatsii importiruemyo fetalnoy syvorotki krovi krupnogo rogatogo skota pestivirusami kak faktore rasprostraneniya virusnoy diarei v usloviyakh globalizatsii [On the contamination of imported fetal blood serum of cattle by pestiviruses as a factor in the spread of viral diarrhea in the context of globalization]: mini-obzor / A. G. Glotov, T. I. Glotova, S. V. Koteneva // Selskhozaystvennaya biologiya. – 2018. – # 53 (3). – S. – 248–257.
8. Vide supra.
9. Troshkova G. P. Bessyvorotochnaya pitatel'naya sreda dlya kultivirovaniya kletok Vero [Serum-free nutrient medium for culturing Vero cells] / G. P. Troshkina, L. D. Martynets, E. V. Kirova, T. P. Sumkina i dr. // Fundamentalnye issledovaniya. – 2005. – # (5). <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=6105> (data obrascheniya: 06.04.2019)
10. Nechaeva E. A. Bessyvorotochnaya pitatel'naya sreda dlya kultivirovaniya kletok i virusov [Serum-free culture medium for the cultivation of cells and viruses] / E. A. Nechaeva, I. F. Radaeva, N. B. Dumchenko, T. P. Sumkina i dr. // Vestnik PNIPU. Himicheskaya tehnologiya i biotekhnologiya. – 2018. – # (4). – S. 85–96. Doi: 10.15593/2224-9400/2018.4.07
11. Ponomarev A. P. Izvlechenie redkozemelnykh ultramikroelementov – lantanoidov iz prirodnogo nanotekhnologicheskogo minerala shungita [Extraction of rare earth ultramicroelements – lanthanides from natural nanotechnological mineral shungite] / A. P. Ponomarev, D. S. Bolshakov, S. D. Dyinchik // Nauchnyy zhurnal «Pyxis». – Sankt-Peterburg. – 2016. – # 1 (1). – S. 10–19.
12. Ponomarev A. P. Makro-, mikro- i ultramikroelementy v ekstraktakh iz prirodnogo nanotekhnologicheskogo minerala – shungita [Macro-, micro- and ultramicroelements in extracts from natural nanotechnological mineral – shungite] / A. P. Ponomarev, I. V. Podkolzin, V. G. Amelin // Nanotekhnologii i ohrana zdorov'ya. – 2012. – # 4 (2). – S. 48–55.
13. Hromushin V. A. Shungityi kak prirod'naya nanotekhnologiya [Shungite as natural nanotechnology] (obzor literatury) / V. A. Hromushin, T. V. Chestnova, V. V. Platonov i dr. // Vestnik novykh meditsinskih tekhnologii. Elektronnyy zhurnal. – 2014. – # (1). – S. 1–8.
14. Ryabchikov D. I. Analiticheskaya himiya redkozemelnykh elementov i ittriya [Interaction of nucleic acids with metals] / D. I. Ryabchikov, V. A.

- Ryabuhin. – M.: Nauka, 1966. – 379 s.
15. Kriss E. E. Vzaimodeystvie nukleinovyykh kislot s metallami [Interaction of nucleic acids with metals] / E. E. Kriss, K. B. Yatsimirskiy // Uspehi himii. – 1966. – # 35 (2). – S. 349–363.
16. Pat.2664729 Rossiyskaya Federatsiya, MPK G01N 33/49. Spособ ochistki syivorotki krovi krupnogo

rogatogo skota ot kontaminiruyuschiy agentov [The method of purification of blood serum of cattle from contaminants] / Ponomarev A. P., Belik E. V., Manin B. L., Kogan M. M.; zayavitel i patentoobladatel OOO NPP «BIOHIMSERSVIS». – # 2017117994; zayav. 23.05.17; opubl. 22.08.18, Byul. # 24.

Ponomarev A. P., Manin B. L., Kogan M. M. CULTIVATION OF HUMAN AND ANIMAL CELL LINES USING BLOOD SERUM PURIFIED BY LANTANIDS

Key Words: cell culture, cultivation, lanthanides, microorganisms, growth media, blood serum, shungite extract.

Abstract: In the biological industry, cultures of human and animal cells are used, on the basis of which there receive means of protection and prevention of various diseases. Moreover, the drugs themselves can be potential sources of infection for living biosystems. During cell cultivation, nutrient media are used, the obligatory component of which are animal blood serum. The disadvantages of sera include the inconstancy of their composition, due to the age of the animals, their feeding and time of year of receipt of serum. It is a generally recognized fact that sera may be contaminated with various microorganisms with which they contaminate cell cultures, and, consequently, the final product obtained on their basis. It is generally accepted that the most effective way of serum decontamination is micro- and ultrafiltration. But they are not obstacle for viruses, mycoplasmas, nanobacteria, and others. We have developed a method for purifying blood serum using an aqueous extract of shungite containing lanthanides. The purification mechanism is due to the fact that highly reactive lanthanide cations interact with structures containing a nucleic component. The selective interaction of lanthanides is accompanied by the formation of complexes with the inclusion of structures containing DNA or RNA, which are then easily removed by separation or microfiltration.

Сведения об авторах:

Пономарев Алексей Петрович, доктор биол. наук, профессор, старший научный сотрудник кафедры биологии и экологии ФГБОУ ВПО «Владимирский государственный университет имени А. Г. и Н. Г. Столетовых»; д. 87, ул. Горького, г. Владимир, Россия, 600000; тел.: +7 (910) 77 917 09; e-mail: aleksei_pp-44@mail.ru.

Манин Борис Леонидович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»; мкр. Юрьево, г. Владимир, Россия, 600901; тел.: +7(910) 09 602 41; e-mail: manin.boria@yandex.ru.

Коган Марина Михайловна, директор ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС»; д. 4В, ул. Лакина, г. Владимир, Россия; тел.: +7 (492) 242 49 31; e-mail: marina.kogan.2014@mail.ru.

Author affiliation:

Ponomarev Alexey Petrovich, D. Sc. in Biology, Professor, Senior Researcher of the Department of Biology and Ecology of the Federal State Budgetary Educational Institution (FSBEI) of Higher Professional Education (HPE) «Vladimir State University named after A. G. and N. G. Stoletovs»; house 87, Gorky str., Vladimir city, Vladimir region, Russia, 600000; phone: +7 (910) 77 917 09; e-mail: aleksei_pp-44@mail.ru

Manin Boris Leonidovich, Ph. D. in Biology, Leading Scientific Researcher of the Federal State Budgetary Scientific Institution (FSBSI) «Federal Center for Animal Health Protection»; microdistrict Yuryevets, Vladimir city, Russia, 600901; phone: +7 (910) 09 602 41; e-mail: manin.boria@yandex.ru

Kogan Marina Mikhailovna, Director of LLC SPE «BIOCHIMSERVICE»; house 4V, Lakina str., Vladimir city, Russia; phone: +7 (492) 242 49 31; e-mail: marina.kogan.2014@mail.ru