

Скворцова Галина Алексеевна, студентка института биологии и биомедицины ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»; д. 23, пр. Гагарина, г. Нижний Новгород, Россия, 603950; тел.: +7 (831) 462 32 11, e-mail: kafedra2577@mail.ru

Сидей Кристина Руслановна, студентка института биологии и биомедицины ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»; д. 23, пр. Гагарина, г. Нижний Новгород, Россия, 603950; тел.: +7 (831) 462 32 11, e-mail: kafedra2577@mail.ru

Author affiliation:

Deryugina Anna Vyacheslavovna, D. Sc. in Biology, Associate Professor, Head of the Department of Physiology and Anatomy of the Institute of Biology and Biomedicine of FSAEI HPE «National Research Nizhny Novgorod State University named after N. I. Lobachevsky»; house 23, Gagarin Avenue, Nizhny Novgorod city, Russia, 603950; phone: +7 (831) 462 32 11; e-mail: derugina69@yandex.ru

Samodelkin Alexander Gennad'evich, D. Sc. in Biology, Professor, Head of the Department of Physiology and Biochemistry of Animals of the FSBEI HPE «Nizhny Novgorod State Agricultural Academy» of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation; house 97, Gagarin Avenue, Nizhny Novgorod city, Russia, 603107; phone: +7 (831) 462 66 56, e-mail: kafedra2577@mail.ru

Ivaschenko Marina Nikolaevna, Ph. D in Biology, Associate Professor of the Department of Physiology and Biochemistry of Animals of the FSBEI HPE «Nizhny Novgorod State Agricultural Academy» of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation; house 97, Gagarin Avenue, Nizhny Novgorod city, Russia, 603107; phone: +7 (831) 462 66 56; e-mail: marina.31@rambler.ru

Ignat'ev Pavel Sergeevich, Ph. D in Physics and Mathematics, Head of the Department of Medical Products and Microscopy of JSC «Production Association Ural Optical and Mechanical Plant named after E. S. Yalamova»; house 33-b, Vostochnaya str., Yekaterinburg city, Russia, 620100; phone: +7 (343) 229 80 75; e-mail: kancelyariya@uomz.com

Skvortsova Galina Alekseevna, Student of the Institute of Biology and Biomedicine of FSAEI HPE «National Research Nizhny Novgorod State University named after N. I. Lobachevsky»; house 23, Gagarin Avenue, Nizhny Novgorod city, Russia, 603950; phone: +7 (831) 462 32 11, e-mail: kafedra2577@mail.ru

Sydey Kristina Ruslanovna, Student of the Institute of Biology and Biomedicine of FSAEI HPE «National Research Nizhny Novgorod State University named after N. I. Lobachevsky»; house 23, Gagarin Avenue, Nizhny Novgorod city, Russia, 603950; phone: +7 (831) 462 32 11, e-mail: kafedra2577@mail.ru

УДК 636.611:018.54

Пономарев А. П.

ОЧИСТКА СЫВОРОТКИ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ОТ КОНТАМИНИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ключевые слова: бактерии, биосубстрат, микрофилтрация, лантаноиды, сыворотка крови, экстракт шунгита, сепаратор.

Резюме: В работе приведены результаты исследований по очистке сыворотки крови крупного рогатого скота от контаминирующих агентов. Сущность предлагаемого метода очистки заключается в том, что к сыворотке, прошедшей этап осветления пропуском через микрофильтр

450 нм, добавляют 1 % очищенного и концентрированного водного экстракта минерала шунгита, содержащего лантаноиды с показателем по содержанию 4 000–5 000 μS . Сыворотку выдерживают 18–20 часов при комнатной температуре, что сопровождается образованием взвеси, включающей в свой состав контаминанты. Затем сыворотку осветляют сепарированием, и процесс завершается стерилизующей микрофльтрацией через фильтр с диаметром пор 220 нм и расфасовкой по 500 мл в стерильные флаконы объёмом 600 мл. Сохранение биохимического и минерального состава компонентов сыворотки на этапах очистки свидетельствует о том, что происходит избирательное коагулирование контаминантов сыворотки, содержащих ДНК или РНК. Высокая реакционная способность лантаноидов обусловлена тем, что в нормальных условиях они трехвалентно положительные. Феномен избирательной коагуляции обусловлен реакцией комплексообразования катионов лантаноидов с фосфатными группами нуклеиновых кислот микроорганизмов.

Введение

Современные биотехнологические производства, связанные с выпуском различного рода противовирусных и противобактериальных препаратов, используют сыворотку крови животных, которая является одним из главных компонентов питательной среды, используемой для культивирования клеток [1, 2]. Сыворотки, получаемые из крови убойного скота различного вида и возраста, как правило, содержат контаминанты в виде различных вирусов, дрожжей, грибов, *L*-форм бактерий, микоплазм, нанобактерий, тяжелых белков, ингибиторов, что отрицательно сказывается на росте и размножении клеток и вирусов в клеточных культурах [3]. Более качественными являются сыворотки крови молодых животных и эмбриона коровы, а также ягнят и молодых телят. Дефицитность и высокая стоимость являются основными недостатками данных сывороток. Но, учитывая их происхождение нельзя исключать и того факта, что в их составе также присутствуют контаминирующие агенты, в частности, пестивирусы [4, 5]. Проблема деконтаминации сыворотки крови крупного рогатого скота от агентов бактериальной и вирусной этиологии является одной из актуальных проблем в области биотехнологии.

При производстве сывороток крови принято считать, что только с использованием самых современных фильтрационных установок возможно достижение максимального качества. В качестве примера следует привести данные по сывороткам NuClone для культуры клеток (США). Фирма NuClone применяет тройную фильтрацию через фильтры с диаметром пор 100 нм, что позволяет полностью освободиться от микоплазм. Также следует отметить, что на данной фирме разработана уникальная система фильтрации с диаметром пор 40 нм, способная удерживать вирусные частицы размером 60 нм [6].

Другие пути повышения качества сыворотки предполагают очистку сыворотки на фильтрах ЕКС с последующим замораживанием в полиэтиленовых канистрах при минус 15 ÷ 20 °С не менее 7-ми суток, затем размораживают и удаляют 5 % нижних гемолизованных слоев, а светлую сыворотку подвергают 1-кратной стерилизующей фильтрации при плюс 2–6 °С. Авторы утверждают, что удаление из нативной сыворотки крови бычков веществ, ингибирующих рост клеток, достигается методом замораживания–оттаивания [7].

К известным способам в плане деконтаминации сыворотки относится метод обработки полиэтиленгликолем (ПЭГ). Водорастворимый полимер ПЭГ используют для очистки сыворотки от специфических протеинов, микоплазм, вирусов и других контаминантов. Недостатком метода является то, что растворенный ПЭГ остается в составе сыворотки, а также изменяется биохимический состав сыворотки в сторону уменьшения ряда компонентов, например, общего белка до 30 % от исходного [8].

Задачей настоящей работы являлось улучшение качества сыворотки крови крупного рогатого скота за счет обогащения её минерального состава лантаноидами и освобождения от контаминирующих агентов вирусной и бактериальной этиологии с целью предотвращения их попадания в состав питательной среды. Для решения поставленной задачи было необходимо:

– отработать методику получения очищенного и концентрированного водного экстракта минерала шунгита с заданными параметрами;

– провести поэтапную обработку сыворотки, включающую осветление сыворотки микрофльтрацией, обработку её водным экстрактом минерала шунгита, сепарирование и стерилизующую микрофльтрацию.

Материалы и методы исследований

Биоматериал. В работе использовали партии сывороток крови крупного рогатого скота, которые в замороженном виде доставляли с боенских предприятий для обработки на научно-производственном предприятии «БИОХИМСЕРВИС» г. Владимир (главный технолог кандидат ветеринарных наук Белик Е. В).

Минерал шунгит. Для приготовления водного экстракта использовали покупной камень природный шунгит в виде щебня, изготовленный в соответствии с ТУ 5714-007-12862296-01 «Дробленые и молотые шунгиты Зажогинского месторождения». Из «Паспорта безопасности» изготовителя следует, что данная горная порода не токсична, экологически безопасна и не требует утилизации.

В качестве экстрагента минералов из щебня шунгита использовали дистиллированную воду. Для интенсификации и повышения выхода минералов водную среду со щебнем шунгита подкисляли до pH 2,0–2,5 добавлением концентрированной соляной кислоты с экспозицией не менее 72 часов. Экстракцию проводили при комнатной температуре, а затем экстракт концентрировали выпариванием, очищали от макро- и микроэлементов в реакции нейтрализации до получения раствора содержащего лантаноиды с концентрацией солей 4000–5000 μS [9].

Методы. Минеральный состав водных экстрактов шунгита исследовали методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно связанной плазме (ELAN DRC II, «PerkinElmer», США).

Биохимический анализ сыворотки крови на этапах очистки проводили с помощью автоматического биохимического анализатора «BioChemFC-360» («НТИ», США).

Для определения содержания в экстрактах шунгита использовали кондуктометр TDS/EC Meter (в μS), показания которого основаны на прямой зависимости электропроводности раствора от количества растворенных в воде химических соединений.

Проверку ростовых свойств питательной среды с очищенной сывороткой крови крупного рогатого скота проводили в специализированной лаборатории ФГБУ «ВНИИЗЖ» по культивированию клеток эукариот для целей биотехнологии.

Исследование микрофлоры сыворотки выполнялись биологом Иваненко Е. А. на базе микробиологической лаборатории

Владимирского филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту».

Результаты и обсуждение

Водные экстракты получали настаиванием отмытого щебня шунгита в дистиллированной воде. Технология приготовления, а также количественный и качественный минеральный состав водных экстрактов был определен ранее и приведен в работах [9, 10]. К особенностям получаемого экстракта шунгита относится то, что наряду с макро- и микроэлементами в его составе присутствуют редкоземельные микроэлементы – лантаноиды, обладающие способностью к комплексообразованию. Другими исследователями также было показано, что помимо макро- и микроэлементов в составе минерала шунгита содержатся редкоземельные ультрамикроэлементы – лантаноиды [11, 12]. Высокая реакционная способность катионов лантаноидов обусловлена тем, что в нормальных условиях они трехвалентно положительные [13, стр.14]. Предполагается, что ионы лантаноидов, вступая во взаимодействие с фосфатными группами нуклеиновых кислот, образуют сетку сцементированных друг с другом нитей различных молекул ДНК [14, стр.355]. Данный феномен является предпосылкой для обоснования избирательного комплексообразования микроорганизмов, содержащих ДНК и РНК. В наших опытах водный экстракт шунгита для уменьшения вносимого объема концентрировали методом выпаривания.

В ВИЭВе изучали биологические свойства редкоземельных элементов и на их основе разрабатывают лечебно-профилактические препараты для животных. Исследования проводили *in vitro* (в культуре клеток), так и *in vivo* (на белых мышках, морских свинках, кроликах, собаках, крупном и мелком рогатом скоте, лошадях). Экспериментально установлено, что токсическая доза азотнокислого лантана для культуры клеток легкого плода коровы превышает 100 мкг/мл, а оптимальная концентрация, стимулирующая пролиферацию клеток, составляет 30–40 мкг/мл [15].

Сущность метода очистки сыворотки крови крупного рогатого скота с помощью водного экстракта шунгита заключается в том, что замороженный исходный материал после оттаивания осветляли микрофильтрацией пропуском через микрофильтр с диаметром пор 450 нм. К осветленной сыворотке в полипропиленовых

емкостях, заполненных по 15 л, добавляли 1 % водный экстракт шунгита при pH 3,5–4,0 с содержанием от 4000 до 5000 μS . Сыворотку оставляли при комнатной температуре на 18–20 часов.

В результате экспозиции в сыворотке образуется взвесь, размеры частиц во взвеси и их концентрация могут различаться в отдельных партиях. Данный критерий свидетельствует об эффективности действия катионов лантаноидов в плане комплексообразования.

Отделение коагулированных частиц проводили с использованием центробежного проточного сепаратора «Сокол» при скорости вращения барабана сепаратора 11000 об/мин и производительностью 100 л/час. В процессе сепарирования через верхний лоток сепаратора происходит отделение по каплям жировой эмульсии, а осветленная сыворотка выходит через нижний лоток в приемную емкость. По окончании пропуска сыворотки сепаратор останавливали и проводили разборку барабана. В процессе сепарирования в шламовом пространстве барабана сепаратора образуется гелеобразный осадок или биосубстрат из коагулированных частиц, образуемых вследствие добавления экстракта шунгита. Из шламового пространства барабана шпателем извлекали биосубстрат, который помещали в стерильный бюкс для проведения дальнейших исследований.

По завершению процесса сепарирования всего объема (100–200 л) сыворотку фильтровали через стерилизующий микрофильтр с диаметром пор 220 нм. Сыворотка крови, осветленная сепарированием с отделением биосубстрата, в процессе стерилизующей микрофильтрации не вызывает интенсивной закупорки пор фильтра, что значительно упрощает технологию микрофильтрации. Отфильтрованную сыворотку расфасовывали в стерильные бутылки емкостью 600 мл с градуировкой до 500 мл для культур клеток с винтовой крышкой и диаметром горла 22 мм. Данные бутылки изготовлены из полиэтилентерефталата, стерильны и предназначены для работы со стерильными растворами, питательными средами.

На каждом этапе очистки проводили отбор проб сыворотки для контроля. В таблице 1 представлены данные биохимического контроля одного из типовых опытов следующих образцов: нативная сыворотка, прошедшая этап микрофильтрации через фильтр 450 нм; сыворотка после вне-

сения лантаноидов и экспозиции в течение 20 часов; сыворотка после последовательных этапов сепарирования и стерилизующей микрофильтрации.

Из результатов биохимического контроля следует, что содержание компонентов белкового обмена: общий белок, альбумин, мочевины, мочевиная кислота, креатинин, билирубин в образцах сохраняются на уровне исходной сыворотки.

По содержанию кальция, магния, фосфора, калия, натрия, меди, алюминия, никеля и стронция различия отсутствуют на всех этапах очистки сыворотки. Отмечается колебания показателей по содержанию железа и марганца.

Главными липидными компонентами сыворотки крови являются холестерин и триглицериды, которые, как и ферменты сыворотки: аланинаминотрансфераза, альфа-амилаза, креатинкиназа, щелочная фосфатаза и другие в исходном образце и в образцах после сепаратора и микрофильтрации остаются на одном уровне.

Для контроля эффективности очистки из гелеобразного биосубстрата на диспергированной воде готовили 10 % суспензию, осветляли центрифугированием при **1 500 об/мин в течение 10 мин и осветленную надосадочную фазу** использовали для микробиологического и масс-спектрометрического анализа.

Оценку содержания катионов лантаноидов в водном экстракте шунгита, 1 % которого добавляли к нативной сыворотке, и в образцах сыворотки проводили методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно связанной плазме. Результаты контроля представлены в табл. 2.

Из данных таблицы 2 следует, что при фактическом 100-кратном разведении экстракта содержание лантаноидов в сыворотке меньше расчетного. Из всей группы лантаноидов в образцах сыворотки не было выявлено четыре элемента: эрбий, иттербий, гольмий и тулий, но они присутствовали в биосубстрате. Это можно оценить, как результат полного связывания данных элементов в процессе коагулирования с последующим отделением взвеси в процессе сепарирования и микрофильтрации. Известно, что комплексообразующая способность лантаноидов увеличивается с уменьшением ионного радиуса элемента в ряду La – Lu [12, стр. 21]. По другим элементам на примере церия, неодима и лантана установлено, что их остаточные количества в сыворотке на конечном этапе меньше расчетных значений на 14,4, 17,0

Таблица 1. Результаты биохимического контроля сыворотки КРС

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	1,8	2,8	5,4
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	У/л	44	40	37
Креатинкиназа	У/л	1299	1327	1423
Лактатдегидрогеназа	У/л	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

Химические элементы	Водный экстракт шунгита (мкг/л)	Сыворотка + лантаноиды (мкг/л)	Сыворотка после сепаратора (мкг/л)	Сыворотка после фильтра (мкг/л)	Биосубстрат (мкг/л)
Церий	211,23	1,92	1,85	1,81	65,3
Неодим	162,54	1,41	1,4	1,35	29,4
Лантан	82,08	1,1	0,8	0,75	43,0
Гадолиний	46,34	0,38	0,41	0,41	7,7
Празеодим	38,24	0,3	0,32	0,32	8,5
Самарий	38,37	0,3	0,33	0,33	6,0
Диспрозий	26,9	0,23	0,2	0,24	4,2
Эрбий	11,6	-	-	-	2,0
Европий	9,24	0,16	0,17	0,21	5,1
Иттербий	6,65	-	-	-	1,2
Гольмий	4,81	-	-	-	0,8
Тулий	1,33	-	-	-	0,2
Лютеций	0,8	0,13	0,15	0,17	0,1

и 9,1 % Данные масс-спектрометрического анализа свидетельствует о том, что большая часть лантаноидов переходит в биосубстрат в составе коагулированных структур.

Повышенные концентрации лантаноидов в составе концентрируемого в шламовом пространстве сепаратора биосубстрата и их уменьшение в составе сыворотки свидетельствует о том, что лантаноиды вступают во взаимодействие с биоструктурами, отделяемыми в процессе сепарирования.

Для визуальной оценки содержимого отделяемого биосубстрата готовили пре-

параты для световой микроскопии. Каплю 10 % суспензии наносили на чистое предметное стекло, смешивали с каплей акридинового оранжевого, препарат заключали под покровное стекло, наносили каплю кедрового масла и проводили исследование под люминесцентным микроскопом «Микромед 3 ЛЮМ» при 1000-кратном увеличении. Результаты контроля фиксировали с помощью «электронного окуляра» ДСМ300, подключенного к персональному компьютеру с программным обеспечением для обработки изображений «ScorePhoto» (рис. 1)

При люминесцентной микроскопии в

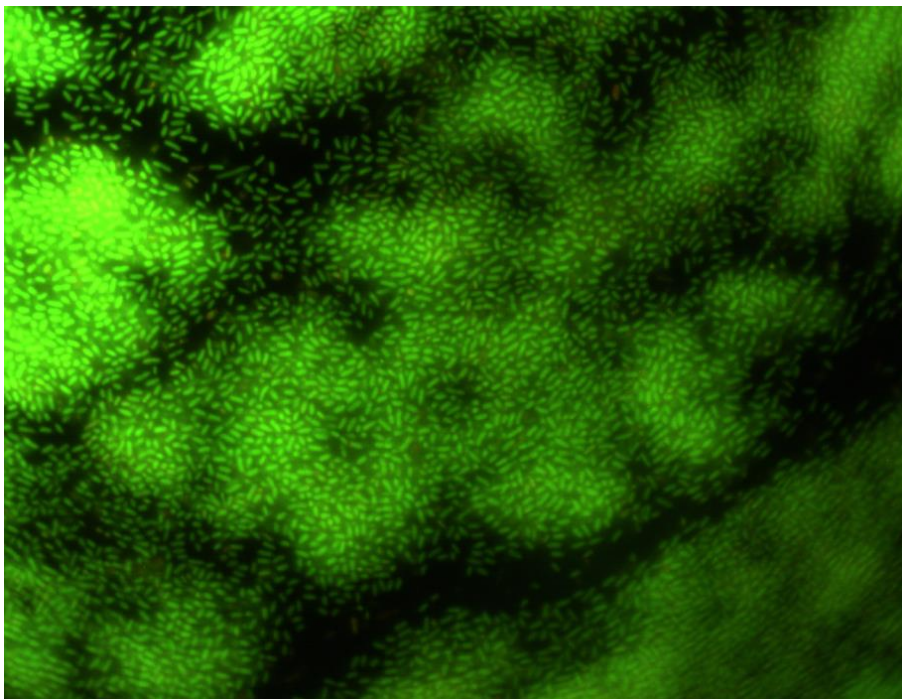


Рис. 1. Люминесцентная микроскопия содержимого 10 % суспензии биосубстрата, отделяемого в процессе сепарирования сыворотки обработанной лантаноидами

поле зрения наблюдали высокие концентрации микроорганизмов зеленого цвета в форме палочек с признаками бинарного деления. Зеленая окраска бактерий характерна для микроорганизмов, содержащих двуспиральную ДНК. Высев данной культуры на твердую питательную среду в чашках Петри в разведении до 10^{-7} сопровождался образованием на поверхности агара блестящих колоний. В конечном разведении образовалось 32 крупные колонии (рис. 2).

Результаты микроскопии показали, что

в биосубстрате присутствуют бактериальные клетки в высокой концентрации. Для дальнейшего исследования биосубстрата на предмет содержащихся в нем микроорганизмов готовили десятикратные разведения исходного материала и производили посев на питательные среды трех видов:

- 5 % кровяной агар (специальная среда для выделения стрептококков, пневмококков);
- среда «Эндо» (среда для выделения и первичной идентификации энтеробактерий);

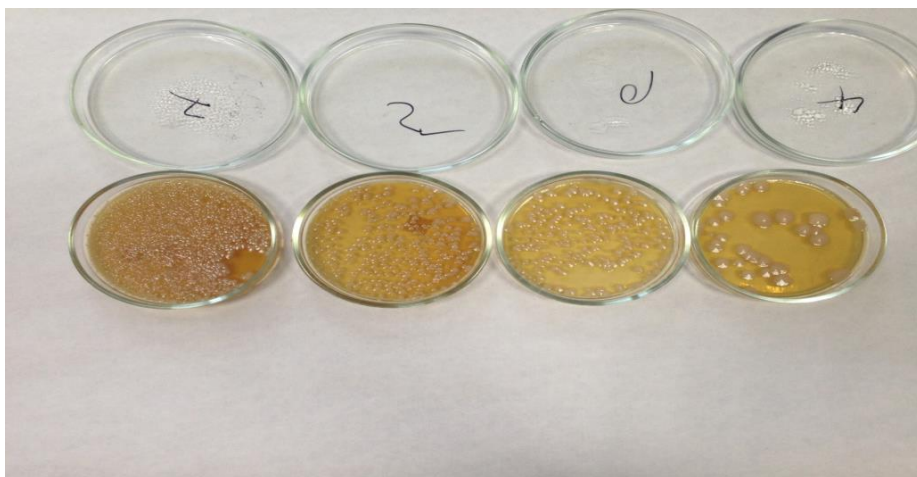


Рис. 2. Посев 10 % суспензии биосубстрата на чашки Петри с агаром

- среда «Чистовича» (среда для выделения и первичной идентификации стафилококков).

На 2-е сутки исследования на 5 % кровяном агаре был обнаружен массивный рост серых слизистых колоний. На среде «Эндо» – лактозонегативные, возвышенные, слизистые колонии, склонные к слипанию. На среде «Чистовича» множественный рост пигментированных лецитиназоположительных колоний.

Далее методом микроскопии было выявлено, что на среде «Эндо» и 5 % кровяного агара находятся грамтрицательные толстые короткие палочки с закругленными концами, расположенные попарно или одиночно, окруженные капсулой. А на среде «Чистовича» – грамположительные кокки, расположенные одиночно или гроздьями.

Из результатов микробиологических исследований выполненных в 4-х кратной повторности с различными сериями сыворотки следует, что осветленная 10 % суспензия из гелеобразного биосубстрата содержит 1×10^{11} КОЕ/мл *Klebsiella pneumoniae* и 1×10^4 КОЕ/мл *Staphylococcus aureus*. Фактически эти данные подтверждают высокую концентрацию бактериальных клеток, выявляемых при люминесцентной микроскопии.

При контроле собственно сыворотки отмечено отсутствие роста микроорганизмов во всех питательных средах на протяжении всего срока инкубации (7 дней). Установлено, что образцы сыворотки крови КРС нативные неспецифические без консерванта первой категории, очищен-

ные лантаноидами, произведённые ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС» (г. Владимир) стерильны. Относительно присутствия в сыворотке микоплазм и вирусов следует привести сведения входного контроля трех серий сыворотки объёмом 97, 105 и 110 л, изготовленных НПП «БИОХИМСЕРВИС» и поставленных ФГБНУ «ФНЦИРИП» им. М. П. Чумакова РАН. Из аналитических листов входного контроля сырья № 009, 010 и 176 следует, что сыворотка крови микоплазм и вирусов не содержит, то есть стерильна и по данным микроорганизмам.

Способ очистки сыворотки крови защищен патентом РФ [17] и сыворотка, очищенная и обогащенная лантаноидами, успешно используется при культивировании различных культур клеток в ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир). 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.

Выводы и заключение

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. При добавлении к осветленной сыворотке крови экстракта шунгита происходит коагуляция, по-видимому, тяжелых белков, в состав которых включаются и клетки микроорганизмов с образованием взвеси. Отделение

коагулированных частиц в осадок в процессе сепарирования позволяет увеличить прозрачность сыворотки, что обеспечивает более эффективную стерилизующую микрофилтрацию и, как следствие, получение сыворотки свободной от бактериальных клеток, микоплазм и вирусов.

Относительно механизма коагуляции следует отметить, что водный экстракт минерала шунгита содержит катионы лантаноидов, высокая реакционная способность которых обусловлена тем, что в нормальных условиях они трехвалентно положительные. В соответствии с известным правилом Шульце – Гарди отношение порогов коагуляции одно-, двух- и трехвалентных противоионов равно 1:60:700, то есть трехвалентных ионов для коагуляции нужно в

700 раз меньше, чем одновалентных [16]. Феномен избирательной коагуляции бактериальных клеток обусловлен реакцией комплексообразования катионов лантаноидов с нуклеиновыми кислотами бактерий и вирусов. Реакция нуклеиновой кислоты с металлом осуществляется посредством фосфатных групп [13, 14]. 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. Сыворотка успешно используется на биопредприятиях при культивировании клеток человека и животных.

Библиографический список:

1. Гурьянов Н. И. Преимущество использования сыворотки крови из сердца бычков для культивирования клеток / Н. И. Гурьянов // – Ветеринария. – 2008. – Том 7. – С. 58–61.
2. 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.
3. Животная клетка в культуре / ред. Л. П. Дьяконов. «Спутник»+, 2009. – 656 с.
4. Колокольцева Т. Д. Патологические аспекты микоплазменной контаминации клеточных культур / Т. Д. Колокольцева, И. Н. Сабурин // Патогенез. Изд.: ИП Иршикин Д. А. – 2013. – Т.11. – № 3. – С. 29–31.
5. Плотов А. Г. О контаминации импортируемой фекальной сыворотки крови крупного рогатого скота пестивирусами как факторе распространения вирусной диареи в условиях глобализации: мини-обзор / А. Г. Плотов, Т. И. Плотова, С. В. Котенева // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Том 53. – № 3. – С. 248–257.
6. docplayer.ru/30945871-1-syvorotki-hyclone-dlya-kultur-kletok.html. Дата обращения 25.03.2018
7. Пат. № 2460786 (RU) МПКС12N5/07. Способ получения сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота для культивирования клеток животных и человека / Иванов А. В., Плотникова Э. М., Гурьянов Н. И. и др., заявитель и патентообладатель ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», – заявл. 19.04.2011, опубл. 10.09.2012. Режим доступа www.findpatent.ru.
8. Костина Г. А. Сыворотка крови, обработанная полиэтиленгликолем, и её использование для культивирования клеток / Г. А. Костина, И. Ф. Радаева // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 31–36.
9. Пономарев А. П. Извлечение редкоземельных ультрамикроразделов – лантаноидов из при-

- родного нанотехнологического минерала шунгита / А. П. Пономарев, Д. С. Большаков, С. Д. Дынчик // Научный журнал «Русис». Санкт-Петербург. – 2016. – № 1(1). – С.10–19.
10. Пономарев А. П. Макро-, микро- и ультрамикроразделов в экстрактах из природного нанотехнологического минерала – шунгита / А. П. Пономарев, И. В. Подколзин, В. Г. Амалин // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2012. – Т. IV. – № 2. – С. 48–55.
11. Хромушин В. А. Шунгиты, как природная нанотехнология (обзор литературы). Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал / В. А. Хромушин, Т. В. Честнова, В. В. Платонов и др. // – 2014. – № 1. – С. 1–8. Дата обращения 1.03.2018.
12. www.eko-prod.com/images/ШунгитВАгрономии.docx. Дата обращения 25.03.2018 года
13. Рябчиков Д. И. Аналитическая химия редкоземельных элементов и иттрия / Д. И. Рябчиков, В. А. Рябухин. – М. Наука, 1966. – 379 с.
14. Крисс Е. Е. Взаимодействие нуклеиновых кислот с металлами / Е. Е. Крисс, К. Б. Яцемирский // Успехи химии. – 1966. – Т. 35. – № 2. – С. 349–363.
15. Искандеров М. И. Биологические свойства препаратов на основе редкоземельных элементов / М. И. Искандеров // Ветеринария и кормление. – 2016. – № 3. – С. 13–15.
16. Зонтаг Г. Коагуляция и устойчивость дисперсных систем / Г. Зонтаг, К. Штрэнге // – Л.: Химия, 1973. – 152 с.
17. 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. Preimuschestvo ispolzovaniya syvorotki krovi iz serdca bychkov dlya kultivirovaniya kletok [The advantage of using of blood serum from the heart of bulls for cell culture] / N. I. Guryanov // – Veterinariya. – 2008. – Tom 7. – S. 58–61.
2. Gunenkov V. V. Svoystva syvorotki krovi severnyh oleney i rezultaty primeneniya eyo v virusologii i biotekhnologii [Properties of blood serum of reindeer

- and the results of its application in Virology and biotechnology] / V. V. Gunenkov, O. I. Suharev, V. F. Sirota // Voprosy virusologii. – 2003. – № 6. – S. 37–41.
3. Zhivotnaya kletka v culture [Animal cells in culture] / red. L. P. Dyakonov. «Sputnik»+, 2009. – 656 s.
4. Kolokolceva T. D. Patologicheskie aspekty mikoplazmennoy kontaminatsii kletochnyh kultur [Pathological aspects of Mycoplasma contamination

- of cell cultures] / T. D. Kolokolceva, I. N. Saburina // Patogenez. Izd.: IP Irishkin D. A. – 2013. – T.11. – № 3. – S. 29–31.
5. Glotov A. G. O kontaminacii importiruemyo fetalnoy syvorotki krovi krupnogo rogatogo skota pestivirusami kak faktore rasprostraneniya virusnoy diarei v usloviyah globalizacii [On contamination of imported fetal blood serum of cattle with pestiviruses as a factor of viral diarrhea spread in the conditions of globalization]: mini-obzor / A. G. Glotov, T. I. Glotova, S. V. Koteneva // Selskochozyaystvennaya biologiya. – 2018. – Tom 53. – № 3. – S. 248–257.
 6. dooplayer.ru/30945871-1-syvorotki-hyclone-dlya-kultur-kletok.html. Data obrascheniya 25.03.2018
 7. Pat. № 2460786 (RU) MPKS12N5/07. Sposob polucheniya syvorotki krovi vzroslogo krupnogo rogatogo skota dlya kultivirovaniya kletok zhivotnyh i cheloveka [A method of obtaining blood serum of adult cattle for the cultivation of cells of animals and humans] / Ivanov A. V., Plotnikova E. M., Guryanov N. I. i dr., zayavitel i patentoobladatel FGU «FCTRB-VNIV», – zayavl. 19.04.2011, opubl. 10.09.2012. Rezhim dostupa www.findpatent.ru.
 8. Kostina G. A. Syvorotka krovi, obrabotannaya polietilenglikolem, i eyo ispolzovanie dlya kultivirovaniya kletok [A blood serum treated with polyethylene glycol and its use for cell cultivation] / G. A. Kostina, I. F. Radaeva // Biotehnologiya. – 2001. – № 6. – S. 31–36.
 9. Ponomarev A. P. Izvlechenie redkozemelnyh ultramikroelementov – lantanoidov iz prirodno nanotehnologicheskogo minerala shungita [Extraction of rare earth ultramicroelements – lanthanides from natural nanotech mineral shungit] / A. Ponomarev, D. S. Bolshakov, S. D. Dynchik // Nauchnyy zhurnal «Pyxis». Sankt-Peterburg. – 2016. – № 1(1). – S.10–19.
 10. Ponomarev A. P. Makro, - mikro- i ultramikroelementy v ekstraktah iz prirodno nanotehnologicheskogo minerala – shungita [Macro, - micro-and ultramicroelements in extracts from natural nanotechnological mineral – shungite] / A. P. Ponomarev, I. V. Podkolzin, V. G. Amelin // Nanotehnologii i ohrana zdorovya. – 2012. – T. IV. – № 2. – S. 48–55.
 11. Hromushin V. A. Shungity kak prirodnyaya nanotehnologiya [Shungites as natural nanotechnology] (obzor literatury). Vestnik novyh medicinskih tehnologiy. Elektronnyy zhurnal / V. A. Hromushin, T. V. Chestnova, V. V. Platonov i dr. // – 2014. – № 1. – S. 1–8. Data obrascheniya 1.03.2018.
 12. www.eko-prod.com/images/ShungitVAgronomii.docx. Data obrascheniya 25.03.2018 goda
 13. Ryabchikov D. I. Analiticheskaya himiya redkozemelnyh elementov i ittriya [Analytical chemistry of rare earth elements and yttrium] / D. I. Ryabchikov, V. A. Ryabuhin. – M. Nauka, 1966. – 379 s.
 14. Kriss E. E. Vzaimodeystvie nukleinykh kislot s metallami [Interaction of nucleic acids with metals] / E. E. Kriss, K. B. Yacemirskiy // Uspehi himii. – 1966. – T. 35. – № 2. – S. 349–363.
 15. Iskanderov M. I. Biologicheskie svoystva preparatov na osnove redkozemelnyh elementov [Biological properties of preparations based on rare earth elements] / M. I. Iskanderov // Veterinariya i kormlenie. – 2016. – № 3. – S. 13–15.
 16. Zontag G. Koagulyaciya i ustoychivost dispersnyh sistem [Coagulation and stability of disperse systems] / G. Zontag, K. Shtrengel // – L.: Himiya, 1973. – 152 s.
 17. Pat. 2664729 Rossiyskaya Federaciya, MPK G01N 33/49. Sposob ochistki syvorotki krovi krupnogo rogatogo skota ot kontaminiruyuschih agentov [The method of purification of blood serum of cattle from contaminating agents] / 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.

CLEANING OF CATTLE BLOOD SERUM FROM CONTAMINATING MICROORGANISMS

Key Words: bacteria, biosubstrat, microfiltration, lanthanoids, blood serum, schungite extract, separator

Abstract: In the article, the results of studies on the purification of blood serum of cattle from contaminating agents are given. The essence of the proposed purification method is that a 1% purified and concentrated aqueous extract of schungite mineral containing lanthanides with a salinity index of 4,000–5,000 µS is added to the whey that passed the clarification through a 450 nm microfilter. Serum is kept for 18–20 hours at room temperature, which is accompanied by the formation of a suspension, which includes contaminants.

Then the serum is clarified by separation, and the process is ended by sterilizing microfiltration through a filter with a pore diameter of 220 nm and packaging of 500 ml in sterile 600 ml bottles. The preservation of the biochemical and mineral composition of the serum components during the purification steps indicates that selective coagulation of serum contaminants containing DNA or RNA occurs. The high reactivity of lanthanides is due to the fact that under normal conditions they are trivalently positive. The phenomenon of selective coagulation is due to the complexation reaction of lanthanide cations with phosphate groups of the nucleic acids of microorganisms.

Сведения об авторе:

Пономарев Алексей Петрович, доктор биол. наук, профессор кафедры биологии и экологии ФГБОУ ВПО «Владимирский государственный университет имени А. Г. и Н. Г. Столетовых»; д. 87, ул. Горького, г. Владимир, Владимирская область, Российская Федерация, 600000; e-mail: aleksei_pp-44@mail.ru

Author affiliation:

Ponomarev Alexey Petrovich, Sc. D. in Biology, Professor 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, Russian Federation, 600000; e-mail: aleksei_pp-44@mail.ru

УДК 619: 612.017:636

**Шахов А. Г., Сашнина Л. Ю., Владимирова Ю. Ю., Тараканова К. В.,
Карманова Н. В.**

ПРИМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИХ ИНДУКТОРОВ МОЛОДНЯКУ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ (ОБЗОР)

Ключевые слова: цитокины, интерферон, иммунодефицит, иммуномодуляторы, молодняк сельскохозяйственных животных.

Резюме: На основании данных литературы в статье рассматриваются перспективы применения препаратов, стимулирующих выработку интерферонов и собственно цитокинов, как одного из приоритетных направлений иммунофармакологии. Приводятся базовые понятия о цитокинах и механизмах их действия в организме. Обобщаются сведения об иммуномодуляторах на основе иммунных белков и их индукторах, имеющихся на российском рынке. В связи с актуальностью проблемы использования данных препаратов в ветеринарии анализируется эффективность применения их молодняку сельскохозяйственных животных с учётом незрелости иммунной системы и процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) у новорожденных животных, сведениях о влиянии интерфероновых препаратов и средств, стимулирующих выработку цитокинов на различные системы организма. Для успешного лечения острых заболеваний у новорожденного молодняка следует, как можно раньше применять препараты интерферона с добавлением антиоксидантных средств. При лечении животных старше 10-ти дневного возраста кроме интерферонов можно назначать индукторы цитокинов. При сниженном иммунном статусе и угнетении ИНФ-продуцирующей способности иммуноцитов для оптимального фармакотерапевтического эффекта целесообразно применение препаратов на основе цитокинов.

Введение

В настоящее время широко распространены иммунодефициты у новорожденных при промышленной технологии выращивания животных [1–5].

Нарушения функций иммунной системы представляют собой один из патогенетических механизмов любого патологического процесса [6, 7]. Они возникают вследствие дефекта одного или нескольких звеньев иммунного ответа и проявляются неспособностью организма полноценно реагировать на чужеродные антигены [8–10].

В связи с этим, актуальным является поиск новых, доступных в синтезе и применении, эффективных отечественных

иммуномодуляторов [11, 12]. Эти препараты назначают в медицинской и ветеринарной практике с целью коррекции нарушений антиинфекционных механизмов и повышения эффективности антибактериальной терапии, усиления специфической иммунотерапии и иммунопрофилактики, экстренной индукции неспецифической резистентности, в случае повышенного риска возникновения инфекции [11–16].

Одним из наиболее перспективных и постоянно расширяющихся направлений иммунофармакологии является терапия рекомбинантными цитокинами и их индукторами. Обладая широким спектром биологической активности, они определяют