

А. И. Гуславский, А. В. Канарский, З. А. Канарская

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ В КЛЕТОЧНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Ключевые слова: сепарация, фильтрование, стерилизация, очистка крови северных оленей, культивирование клеток.

Рассмотрены способы очистки крови северных оленей и показана пригодность сыворотки крови северных оленей для культивирования клеток животных. Для повышения качества и выхода сыворотки крови северных оленей предложено ее дополнительно осветлять на сепараторах, предварительно фильтровать через стекловолоконные фильтрующие материалы и стерилизовать холодным способом.

Keywords: separation, filtration, sterilization, cleaning the blood of reindeer, cell culture.

The methods of cleaning the blood of reindeer and show the suitability of serum reindeer for the cultivation of animal cells. To improve the quality and yield of serum reindeer prompted to further clarify on separators, pre-filtered through glass fiber filter media and sterilized Cold.

В настоящее время развиваются научные исследования в области клеточной биотехнологии и осуществляется крупномасштабное культивирование клеточных культур, на которых базируется производство разнообразных по назначению биологически активных препаратов медицинского, пищевого и сельскохозяйственного назначения. Метод культур тканей и клеток животных и человека применяется в вирусологических исследованиях, в клинике для выращивания аутотрансплантатов кожи и в других целях, а также в биологической промышленности для изготовления диагностических, профилактических препаратов и получения физиологически активных веществ в крупномасштабном производстве [1, 2].

Постоянно возрастающие масштабы производства клеток-продуцентов для создания новых биопрепаратов вызвали необходимость разработки экономичных и доступных питательных сред, белковых гидролизатов, солевых и диспергирующих растворов [3].

Питательные среды, которые условно можно разделить на естественные, основой которых являются солевые растворы Эрла или Хэнкса, и среды из химически определенных веществ – MEM, RPMI 1640, 199 и др. весьма сложного состава. Последние содержат почти все аминокислоты, витамины, некоторые предшественники нуклеиновых кислот, факторы роста и источники липидов. Однако, несмотря на сложность состава, обязательным компонентом всех питательных сред является сыворотка крови сельскохозяйственных животных или человека. До настоящего времени одним из самых значимых ингредиентов питательных сред является сыворотка крови, компоненты которой выполняли важнейшие функции в процессе культивирования клеток (стимулирование роста, пролиферации и дифференциации клеток, прикрепление клеток к поверхности, транспорт компонентов среды в клетки, связывание токсических веществ). Практикуется добавлять в среды сыворотку крови крупного рогатого скота, лошадей, овец и свиней [4, 5].

Показано, что сыворотка крови животных является предохранительным физиологическим буфером, участвует в адгезии, распластывание и мигра-

ции клеток, а также источником питательных веществ. Высокомолекулярные белки сыворотки крови животных выполняют функции защитных веществ, предохраняя клетки от повреждения [6, 7].

Применение сыворотки крови животных в составе питательной среды выполняет множество функций: стимулирует усвоение регуляторных молекул, воздействуя на клеточную мембрану; регулирует плотность культуры и контактную ингибицию, стимулирует внутриклеточное содержание критически необходимых для роста клеток питательных веществ, регулирует уровень внутриклеточных циклических нуклиотидов, что стимулирует фосфорилирование ядерных белков, активирует ассоциированные с мембраной системы протеаз, выполняет функции носителей для низкомолекулярных веществ и многое другое [2, 8, 9].

Применение сыворотки в питательных средах, однако, имеет весьма существенные недостатки. Непостоянство состава сыворотки, зависящего от возраста животного, его происхождения, питания и времени года, часто не дает возможности получать воспроизводимые и сопоставимые результаты [10, 11]. Кроме того, существуют риски заражения культур клеток грибами, бактериями, вирусами, микоплазмой. В ряде случаев компоненты сыворотки загрязняют конечный продукт и существенно осложняют процесс его выделения и очистки [12, 13, 14].

Считается, что для культивирования клеток животных наиболее пригодна эмбриональная сыворотка [7, 15]. Однако, эмбриональная сыворотка наиболее дорогой компонент ростовых питательных сред. Рентабельность биотехнологических производств определяется наличием биологически и технологически приемлемых заменителей эмбриональной сыворотки. В качестве такого эквивалента по ростовым свойствам рекомендуется использовать сыворотку крови северного оленя.

Сыворотка крови северных оленей по содержанию хлоридов, гемоглобина, белка и фракционному составу белка сходна с таковой крупного рогатого скота, но отличается от нее большим содержанием глюкозы и высоким осмотическим давлением. Она не содержит антител к самым распространенным вирусам крупного рогатого скота, вызываю-

щим заболевание желудочно-кишечного и респираторного тракта, а также стимулирует митотическую активность клеток, образование их монослоя и накопление цитопатогенных вирусов в культуре клеток. Все это сказывается на «урожае» вирусов при создании биопрепаратов. Установлена высокая ростостимулирующая активность сыворотки крови северного оленя для первичных культур, их субкультур и перевиваемых линий клеток, обеспечивающая их стабильность. Сыворотку крови северного оленя рекомендуется применять в вирусологии, микробиологии, цитологии и в технике производства высокоспецифических диагностикумов и вакцинных препаратов [16, 17, 18].

Однако, существующая технология получения сыворотки крови оленей, предусматривающая ее декантацию (отстой), имеет недостатки, приводящие к снижению ее качества и выхода.

Цель настоящей работы – совершенствование способов очистки крови северных оленей и определение пригодности сыворотки крови северных оленей, полученной по новой технологии, для культивирования клеток животных.

Для повышения качества и выхода сыворотки крови северных оленей предложено ее дополнительно осветлять на сепараторах, предварительно фильтровать через стекловолоконные фильтрующие материалы и стерилизовать холодным способом [19, 20]. Разработанная технология получения сыворотки северных оленей проверена и сводится к следующему.

Сыворотку получали из местного сырья на базе совхоза "Тундра" Ловрозёрского района Мурманской области. В сезон массового планового забоя животных, в ноябре-декабре, производили сбор сырья от особей обоего пола в возрасте 1 - 5 лет. Животных забивали бескровным способом, вскрывали грудную клетку и с помощью торцевого полового ножа, один конец которого подсоединен к шлангу,

создавая разрежение, отбирали из области сердца кровь. Фракции крови, объемом 2 - 3 литра от каждой особи, сводили в сорока литровые сосуды, переносили в теплое помещение и выдерживали 2 - 3 часа при температуре 30 °С. Образовавшийся сгусток крови разделяли на части и медленно процеживали через мелкоячеистую сетку из нержавеющей стали. Собранную таким образом сыворотку отстаивали некоторое время, отбирали верхнюю светлую часть, содержащую меньшее количество продуктов гемолиза, и замораживали в пластиковых пакетах при температуре -10 °С ÷ - 20 °С. В замороженном виде сыворотку крови транспортировали на место дальнейшей обработки, оттаивали, сепарировали, подвергали очистки фильтрованием через стекловолоконный фильтрующий материал марки КФБЖ, стерилизовали холодным способом, используя мембраны с размерами пор 0,22 мкм компании Millipore (США), разливали в стерильные флаконы и хранили при - 20 °С.

Технологическая схема производства сыворотки северных оленей представлена на рис. 1, основные технологические этапы, оборудование и параметры которого следующие:

Кровозвятие при забое оленей, полый нож, емкость на 8 л (2 - 3 л от 1 оленя).

Выдержка крови, ванна с термостатированием, емкость на 8 л, температура - 37 °С время - 2 ч.

Охлаждение и разрушение сгустка крови, температура +6 – + 8 °С, время – 2 ч.

Отделение сыворотки, тканевый фильтр, ванна, температура +6 ÷ + 8 °С, время – 6 - 8 ч.

Сепарирование, сепаратор ОСБ (центрифуга типа ОФБА) Q = 0,2 м.

Фильтрование, фильтр для предварительного фильтрования.

Розлив и замораживание, пакеты полиэтиленовые, кюветы объемом 1 - 6 л.

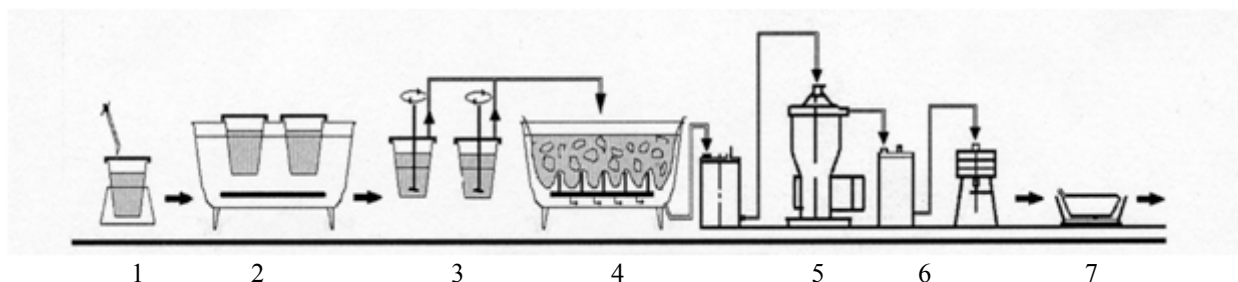


Рис. 1 – Технологическая схема производства сыворотки крови северных оленей

Полученную описанным способом сыворотку крови северного оленя сравнивали с эмбриональной бычьей сывороткой, сывороткой крови лошади производства «Flow Laboratories» (Англия) и отечественной сывороткой крупного рогатого скота по их воздействию на рост клетки мышинной миеломы Sp2/0 Ag14, фибробластов NIH 3T3 белых мышей линии Balb/c, первичной культуры гибридных клеток и клеток линии RH-PA.

Тестирование сыворотки крови северного оленя проводили посредством пролиферативного теста. Культуру клеток поддерживали в 96 - луночных планшетах для культуры клеток (Libro, Flow

Laboratories, Англия) на среде RPMI с добавлением глутамина, пирувата, β-меркаптоэтанола, буфера HEPES (4 - (2 - hydroxyethyl) - 1 - piperazineethanesulfonic acid) и антибиотиков. Пролиферативные свойства исследуемой сыворотки оценивали по включению ³H - тимидина в ядра растущих клеток. Продолжительность пульса - 24 - 36 часа. Клетки переносили на нитроцеллюлозные фильтры, фиксировали трихлоруксусной кислотой и метанолом и помещали в диоксанафталиновой сцинтиллятор для детекции ³H на β - счетчике. Для нормировки счета по количеству клеток в необходимых случаях использовали метод двойной метки: прединкубацию

культуры с ^{14}C - тимидином.

Сравнивали пролиферативные свойства исследуемой сыворотки и эмбриональной бычьей сыворотки на культуре плазмоцитомы Sp2/0. Установлено, что одинаковые количества сывороток от 0,5 % до 10 % дают идентичные значения инкорпорации ^3H - тимидина в пролиферативном тесте. Комбинации сывороток в разных пропорциях: 0,5 % + 10 %, 5 % + 5 %, 10 % + 0,5 % - одинаково влияли на пролиферацию клеток.

Сопоставляли действие исследуемой сыворотки с эмбриональной бычьей сывороткой и сывороткой крови лошади на рост фибробластов ЗТЗ. При содержании исследуемой сыворотки в питательной среде от 1 % до 10 % пролиферативный индекс исследуемой сыворотки совпадал с пролиферативным индексом эмбриональной бычьей сыворотки и превышал в 2 раза пролиферативный индекс сыворотки крови лошади.

Оценивали токсическое действие исследуемой сыворотки на рост первичной культуры гибридных клеток. Установлено, что 20 % сыворотки, добавленной в питательную среду, не токсичны для клеток. Скорость роста первичных культур одинакова как при добавлении в питательную среду 20 % исследуемой сыворотки, так 20 % эмбриональной бычьей сыворотки.

Изучена возможность использования исследуемой сыворотки в производстве активатора плазминогена - тромболитического фермента. В основу производства положено культивирование клеток продуцентов линии ЕН-РА в биореакторе на развитой губчатой поверхности. Показано, что добавление в 199 питательную среду 5 % и 10 % исследуемой сыворотки по сравнению с теми же количествами сыворотки крупного рогатого скота улучшает ростовые характеристики культуры, сокращает в 1,5 раза время образования моно слоя и повышает выход активатора плазминогена.

Таким образом, по исследованным параметрам роста различных видов клеток, в т.ч. высокочувствительных к условиям культивирования, обнаружено сходство в воздействии на культуры клеток сыворотки крови северного оленя и эмбриональной бычьей сыворотки производства «Flow Laboratories» (Англия).

В рассмотренных случаях представляется возможным заменить широко используемую дорогостоящую импортную эмбриональную бычью сыворотку на сыворотку крови северного оленя отечественного производства. В биотехнологическом производстве активатора плазмино - гена - тромболитического фермента, сыворотка крови северного оленя улучшает ряд технико-экономических показателей известной технологии.

Литература

1. Г. П. Трошкова. Автореф. дисс. докт. биол. наук. Кольцово, 2004. 22 с.
2. Daniel Brunner, Jürgen Frank, Helmut App, Harald Schöffl, Walter Pfaller and Gerhard Gstraunthaler Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media interactive Online Database // *Altex* 27, 1/10. P. 53 - 62.
3. Р.Р. Закиров. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Казань, 2009. 20 с.
4. Л.Н. Владимиров. Автореф. дисс. докт. биол. наук. Якутск, 1999. 25 с.
5. Г.П. Пинаев, Г.Г. Полянская Создание и развитие российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; 61с.
6. Пат. РФ № 2460786 Иванов Ар.В., Плотникова Эд.М., Гурьянов Н. Ив., Иванов Ал.Ар., Бадрутдинов Н.В, Хусаинов Р.Х. 2011.
7. Пат. РФ № 2455015. Плотникова Эд.М., Гурьянов Н.Ив., Иванов Ал.Ар. 2012.
8. Л.П. Дьяконова Живая клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии). М.: Издательство «Спутник+», 2009, 658 с.
9. П.А. Красочко, И.А. Красочко, Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в жив-ве: Материалы науч.-практ. конф. Минск, 1998. С. 15 - 18.
10. Б.Н. Гусев, А.Т. Жунушов, А.Ж. Алеева, Результаты исследования сыворотки крови яка // *Электронный журнал по ветеринарной биологии, экологии и патологии "LABORATORIUM"*.
11. Р.Г. Голбан Определение лизоцимной активности сыворотки крови новорожденных телят в зависимости от клинического статуса.
12. Д. Скородумов, Г. Амосов, Ветеринария сельскохозяйственных животных. Инфекционные болезни, № 1, 2011, С. 39 - 42.
13. В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, А.В. Кононов, Ветеринария, 2006, № 11, С. 17 - 20.
14. В.А. Мищенко, А.А. Гусев, Н.А. Яременко, Ветеринария, 2000, № 9, С. 5 - 6.
15. С.М. Сулейманов, Диагностика, патогенез, патоморфология и профилактика болезней с.-х. жив-х: Материалы науч.-практ. конф. Воронеж, 1993, С. 7 - 8.
16. А.Е. Зеленев, И.Г. Коромыслов, Ю.И. Могильный, В.Ф. Сирота, О.И. Сухарев, Ветеринар, № 1, 2013, С. 62 - 63.
17. Пат. РФ № 2363481. Луницын В. Г., Неприятель Ал. Ан. 2009.
18. Reindeer Health Aide Manual. Prepared by Robert A. Dieterich, D.V.M. Jamie K. Morton, Ph.D. First Edition 1981 Second Edition 1990 Illustrated by Susan L. Kraft AFES Misc. Pub 90-4 CES 100H-00046 Agricultural and Forestry Experiment Station, Cooperative Extension Service, University of Alaska Fairbanks and U. S. Department of Agriculture cooperating.
19. А.И. Гуславский, З.А. Канарская, «Вестник Казанского технологического университета», № 20, 2011, С. 191 - 200.
20. А.И. Гуславский., А.В. Канарский., «Вестник Казанского технологического университета», № 6, 2009, С. 236 - 241.