



На правах рукописи

ЗАКИРОВ РАФИС РАФИКОВИЧ

**ПРИМЕНЕНИЕ ТКАНЕВЫХ ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВ КОРОВ ПРИ
РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСОВ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЯХ КЛЕТОК**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

19 НОЯ 2009

Казань - 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Гильмутдинов Рустам Якубович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Гаффаров Харис Зарипович
доктор биологических наук, профессор
Ежкова Галина Олеговна

Ведущее учреждение: Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РАСХН (ВИЭВ)

Защита состоится « 8 » декабря 2009 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д – 220.012.01 при ФГУ «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (420075, г. Казань, Научный городок-2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань).

Электронный вариант автореферата и текст объявления о защите размещен на сайте организации: <http://www.vnivi.ru>

Автореферат разослан « 3 » ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат ветеринарных наук  В.И. Степанов

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Проблема поиска различных биологически активных компонентов ростовой среды для наиболее эффективного культивирования клеток в вирусологии и биотехнологии актуальна. На сегодня важнейшей составной частью питательных сред, содержащей факторы роста клеточных популяций, является сыворотка крови животных. Она остается незаменимым компонентом ростовой среды для большинства клеточных культур (Хижняк Л.Н., Ночевный В.Т., 1994; Рянский А.Л., 2001; Tayler W., 1974 и др.). Для уменьшения расхода этого дорогостоящего компонента прибегают к замене его очищенными факторами роста, гормонами и белками (Нариманов А. А., 1991; Reuveny S. et al., 1986; Velez D. et al., 1986; Ludwig T. et al., 2006), многие из которых дорогостоящи и не менее дефицитны.

Имели место попытки замены сывороточного компонента питательной среды различными белковыми гидролизатами животного происхождения, в частности казеина, легкого эмбриона крупного рогатого скота (КРС), лактальбумина, мышечных белков, а также пептоном Витте и бактопептоном. Но они позволяют лишь частично заменить сыворотку в среде.

Согласно отдельным литературным источникам, перспективно использование в этом качестве препаратов на основе натуральных белков из продуктов животноводства, не подвергнутых гидролизу. Так, сырая фракция молока, полученная стерилизующей фильтрацией, являлась адекватной заменой сыворотке крови в культуральной среде для клеток L, VERO, MDCK (www.biotechnolog.ru). Можно предположить возможность ее успешного применения как добавки в питательные среды для культивирования клеток тканевых материалов из мышц, печени и почек плодов коров. Основанием для этого является более разнообразный и богатый, чем у молока, биохимический состав перечисленных препаратов.

Известно, что экстракты животного происхождения, используемые в качестве компонентов питательных сред, ускоряют рост тканей

(www.biotechnolog.ru). Между тем, в настоящее время они не нашли широкого применения (Тихонов И.В. и др., 2008), хотя обладают рядом преимуществ:

- в фетальных экстрактах отсутствуют специфические антитела к патогенным вирусам, имеющиеся, как правило, в сыворотке крови взрослых животных;

- экономически выгодно максимально полное использование плодного материала и получение от него не только сыворотки крови, но и экстрактов тканей.

1.2 Цель и задачи исследований. Цель работы состояла в изучении возможности применения экстрактов из мышц, печени и почек плодов коров в качестве биологических добавок в питательные среды для выращивания культур клеток и репродукции на них вирусов.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

1. Разработать технологию получения экстрактов тканей плодов коров (ЭТПК) на основе раствора Хэнкса;

2. Определить физико-химические и биохимические показатели ЭТПК, и сравнить их с сыворотками крови бычков и плодов коров;

3. Изучить ростостимулирующий эффект ЭТПК на перевиваемых культурах клеток MDBK, ВНК-21/13-02, LEK, SPEV, VERO и сравнить его с таковым при использовании сывороток крови крупного рогатого скота (СККРС);

4. Оценить репродукцию вирусов ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота (КРС) на перевиваемой линии клеток LEK, а также реовируса, тип 1 штамм "Lang", на перевиваемой культуре клеток VERO, выращенных с использованием ЭТПК.

1.3 Научная новизна работы. Впервые рассматривается возможность введения в практику получения вирусной массы на перевиваемых линиях клеток с использованием в качестве биологически активной добавки в питательные среды экстрактов из мышц, печени и почек плодов коров. Дается их характеристика по основным физико-биохимическим показателям,

необходимым для полноценной жизнедеятельности клеток в культуре. Показаны особенности влияния ЭТПК на рост и морфологию перевиваемых культур клеток, полученных из разных органов и от животных разных видов (SPEV – почки эмбриона свиньи, ВНК-21/13-02 – почки новорожденного сирийского хомячка, VERO – почки африканской зеленой мартышки, MDBK – почки эмбриона КРС, LEK – легкого эмбриона КРС). Впервые проведена оценка репродукции вирусов ИРТ и ПГ-3 КРС, а также реовируса тип 1, штамм “Lang”, на культурах клеток LEK и VERO, соответственно, при выращивании их с добавлением в ростовую среду экстрактов из мышц, печени и почек плодов коров в качестве замены СККРС.

1.4 Практическая значимость работы. Разработана технология получения экстрактов мышц, печени, почек плодов коров и показана возможность их применения в средах для культивирования перевиваемых линий клеток с целью репродукции на них вирусов. Результаты выполненных исследований используются в производственном процессе в лаборатории культур клеток и гибридной технологии Федерального государственного учреждения «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань) при культивировании перевиваемых линий животных клеток в процессе изготовления вакцин. Рекомендуется повышение коэффициента использования плодного материала, получение от него не только сыворотки крови, но и экстрактов тканей в качестве биологической добавки в питательные среды для культивирования животных клеток и репродукции на них вирусов.

1.5 Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены, на научных сессиях Ученого совета ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» по итогам НИР за 2006-2009 гг.; научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарии» (Казань, 2007); научно-практической конференции «Достижения молодых ученых – в производство», посвященной 100-летию со дня рождения профессора Х.Х. Абдуллина (Казань, 2008); пятом съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Москва, 2008),

международной научно-практической конференции «Достижения супрамолекулярной химии и биохимии в ветеринарии и зоотехнии» (Москва, 2008); всероссийской научно-практической конференции «Современные тенденции развития ветеринарной медицины и инновационные технологии в ветеринарии и животноводстве» (Казань, 2009).

1.6 Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 1 - в издании, рекомендованном ВАК РФ.

1.7 Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология получения тканевых экстрактов плодов коров на основе раствора Хэнкса, с использованием в качестве одного из этапов процесса замораживания-размораживания субстрата;

2. Ростовые свойства экстрактов плодов коров относительно перевиваемых линий клеток MDBK, ВНК-21/13-02, LEK, SPEV, VERO при добавлении в культуральную среду.

3. Репродукция вирусов на перевиваемых культурах клеток, выращенных на среде с использованием тканевых экстрактов плодов коров.

1.8 Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 107 страницах компьютерного текста, состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических предложений, библиографического списка литературы и приложений. Работа содержит 13 таблиц, проиллюстрирована 16 рисунками. Список использованной литературы включает 212 библиографических источников, в том числе 74 - на иностранном языке.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в лаборатории культур клеток и гибридной технологии отдела биобезопасности ФГУ «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» в течение 2006-

2009 г. согласно государственной программе НИР (№ гос. регистрации 01200202602).

Материалом для получения экстрактов служили мышцы задних конечностей, печень и почки 20-ти плодков массой 5 -10 кг от клинически здоровых коров, доставленных из мест, благополучных по инфекционным заболеваниям. Технологическая схема получения ЭТПК представлена на рис. 1.

Электрофорез белков ЭТПК проводили с помощью аппарата «Астра» (г. Уфа) на базе Республиканской клинической больницы Республики Татарстан. Определение аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинфосфокиназы (КФК), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), общего белка, мочевины, креатинина, прямого и общего билирубина, глюкозы, холестерина в ЭТПК и СККРС осуществлялось на биохимическом анализаторе «Architect C8000» (США).

Оценку прозрачности и ростовых свойств, а так же на возможное присутствие контаминантов в ЭТПК и контроле СККРС осуществляли согласно Методическим рекомендациям по контролю качества жидкой сыворотки крови крупного рогатого скота, применяемой в медицинских и биологических целях (1982). Общепринятыми методиками определяли содержание общего белка (Инструкция по определению общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции, 1972), свободного гемоглобина (Инструкция по применению набора реагентов для определения гемоглобина в крови гемиглобинцианидным методом, фирма «ЭКОлаб», г. Электрогорск, 1981), рН сыворотки (Методические указания по применению физико-химических методов контроля медицинских биологических препаратов, 1977) и общего холестерина (Инструкция по применению набора реагентов для определения содержания холестерина в сыворотке и плазме крови ферментативным методом, фирма «ЭКОлаб», г. Электрогорск, 1981).

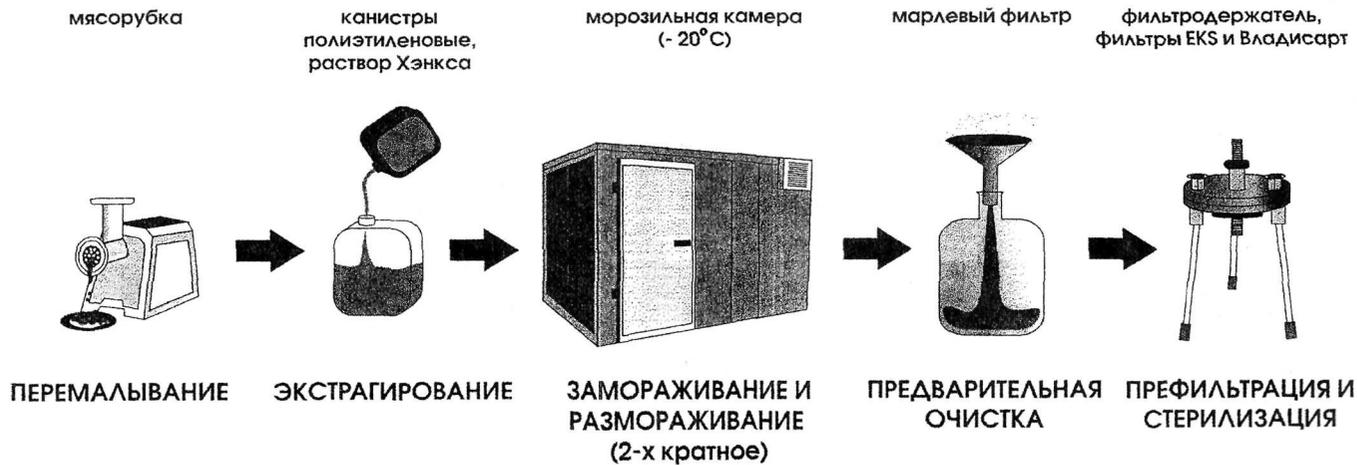


Рис. 1. Технологическая схема получения тканевых экстрактов плодов коров.

Пролиферативная активность культур клеток MDBK, ВНК 21/13-02, LEK, SPEV, VERO исследовалась после 72-х часовой инкубации в средах с экстрактами тканей плодов коров и контроле - СККРС. Культивировали перевиваемые линии клеток по общепринятой методике (Адамс Р., 1983). С каждым экстрактом плодов коров было проведено по 9 серий опытов. Экстракты мышц, печени и почек добавляли в 10%-ной концентрации в ростовые среды (в соответствии с Каталогом специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных, 2006). Индекс пролиферации клеток, как показатель ростстимулирующей активности сыворотки крови и ЭТПК, оценивали по Б.И. Антонову (1986).

Вирусологические исследования проводили в лаборатории вирусологии (зав. - лаб., док. вет. наук, профессор, Х.З. Гаффаров) совместно с кандидатами вет. наук, ст. науч. сотрудниками В.Г. Гумеровым и М.А. Ефимовой. Использовались вакцинный штамм «ТК-А(ВИЭВ)-В2» вируса ИРТ и референтный штамм «ПТК-45/86» вируса ПГ-3 КРС (ВИЭВ, г. Москва), а также реовирус тип I референтный штамм "Lang" (Великобритания).

Репродукцию вирусов ИРТ, ПГ-3 и реовируса изучали на перевиваемых линиях клеток LEK и VERO, соответственно, культивируемых на ростовой среде с добавлением 10% ЭТПК (контроль - СККРС). Серологические исследования основывались на выявлении антител к вирусам ПГ-3, ИРТ и реовируса КРС.

Цифровой материал подвергался статистической обработке на персональном компьютере методами вариационной статистики (Плохинский Н.А., 1978) с вычислением средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$), среднеквадратического отклонения (σ) и коэффициента корреляции (r) с использованием программы Microsoft Excel.

Выражаю глубокую благодарность канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Гурьянову Н.И. за оказание научно-методической помощи при выполнении и оформлении данной работы.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Физико-химический и биохимический состав экстрактов из мышц, печени и почек плодов коров

Физико- и биохимические показатели фетальных экстрактов определены в 3 сериях. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Физические и биохимические показатели тканевых экстрактов тканей плодов коров

Показатели	Контроль - СККРС	Тканевые экстракты			
		мышц	печени	почек	
Прозрачность оптическая плотность, ед. опт. пл.	0,230±0,01	0,097±0,002***	0,127±0,006**	0,034±0,002***	
pH	7,67±0,02	7,25±0,01*	7,80±0,02*	7,18±0,01*	
Общий белок, г/л	57,7±3,9	6,52±0,07***	7,55±0,24***	9,81±0,25***	
Свободный гемоглобин, г/л	0,51±0,04	0,12±0,03***	0,21±0,02***	0,21±0,02***	
Общий холестерин, ммоль/л	0,74±0,03	0,02±0,005***	0,37±0,04***	0,02±0,003***	
Общие липиды, г/л	1,58±0,13	0,33±0,05***	0,75±0,09**	0,52±0,09***	
Глюкоза, ммоль/л	11,9±0,34	20,9±0,49***	13,5±0,21*	11,0±0,27*	
Мочевина, моль/л	3,2±0,23	1,6±0,03***	4,2±0,22**	1,8±0,04***	
Креатинин, мкмоль/л	82±2,3	100±6,8**	56±1,78**	45±2,93**	
Билирубин, мкмоль/л	общий	5,6±0,39	5,0±0,32*	11,8±0,82**	10,2±0,35**
	прямой	1,5±0,04	1,5±0,08	4,8±0,35**	1,5±0,04
Ферменты, Ед/л	АЛТ	12±0,56	145±7,86***	37±1,9***	40±3,5***
	АСТ	36±1,34	615±34,8***	913±54,3***	244±13,2***
	ЛДГ	528±23,7	581±29,5*	1851±78,8***	236±17,8***
	КФК	355,6±14,8	561,3±36,3**	245,9±13,8**	66,6±2,7***

Примечание: *, **, *** – уровни достоверности различия с контролем (p) - соответственно $\leq 0,05$; $\leq 0,01$; $\leq 0,001$

Содержание общего белка в плодных экстрактах в несколько раз ниже в сравнении с СККРС. Минимальная концентрация общего белка выявлена в экстракте мышц, а максимальная – в экстракте почек. Проведенные исследования показали, что ЭТПК имеют меньшую оптическую плотность по сравнению с СККРС, что связано, вероятно, с более низким содержанием в экстрактах нерастворимых в воде веществ. На скорость роста клеток в культуре оказывает влияние концентрация ионов водорода (рН). рН у ЭТПК имеет незначительные отклонения как в кислую, так и в щелочную стороны, относительно СККРС, но они соответствуют физиологической норме. Так, при культивировании клеток млекопитающих концентрацию водородных ионов в ростовой среде поддерживают в пределах 7,2 - 7,4 (Цыренов В.Ж., 2005). Клетки перевиваемых линий предпочитают менее щелочную среду, однако рН – ниже 7,0 нежелательна (Сергеев В.А., Собко Ю.А., 1990). Закисление и защелачивание ростовой среды вызывает сначала остановку размножения клеток, а затем и их гибель. По данным таблицы 1 уровень рН экстрактов мышц и почек плодов коров несколько ниже, а рН экстрактов печени незначительно выше контроля – СККРС.

Концентрация общего белка в ЭТПК меньше, чем в СККРС. Но при этом около 50% белка в ЭТПК приходится на альбуминовую фракцию (таблица 2), тогда как в СККРС на долю этой фракции приходится всего 29%. В литературе именно с ней обычно связывают ростстимулирующую активность сывороток крови животных (Колбасова О.Л. и др., 2000). Нами также выявлено низкое содержание γ - глобулинов в ЭТПК, по сравнению с СККРС. Эта фракция глобулинов является носителем антител, которые, в свою очередь, оказывают вредное воздействие на рост клеток (Игудин Л.И. и др., 1983; Монастырев А.М. и др., 2008). Сравнивая 3 вида экстрактов плодов коров по суммарному проценту альбуминов, α -, β -глобулинов показано, что их больше в экстракте печени - 83,9 %, в экстрактах мышц, почек их количество ниже и сопоставимо - 77,9 и 77,6% соответственно. Наибольшее количество γ -глобулина в ЭТПК - по

23% присутствует в экстрактах мышц и почек, минимальное – в экстракте печени (16%). В СККРС на долю этой фракции приходится 42%.

Таблица 2 – Фракционный состав белков (%) тканевых экстрактов плодов коров и сыворотки крови крупного рогатого скота

Экстракты	Альбумины	Глобулины		
		α	β	γ
мышц	51,14±0,9	15,06±0,8**	11,78±1,1*	22,05±1,8***
печени	55,25±5,1***	9,62±0,6	19,10±1,3*	16,03±1,1**
почек	35,98±2,2**	11,78±0,7	29,81±1,5***	22,43±2,2***
Контроль - СККРС	28,99±2,4	13,68±0,7	15,46±1,2	41,84±3,7

Примечание: *, **, *** – уровни достоверности различия с контролем (p) - соответственно $\leq 0,05$; $\leq 0,01$; $\leq 0,001$

Содержание общих липидов и холестерина в экстрактах мышц, печени и почек плодов коров ниже, чем в СККРС. Меньше всего холестерина содержится в экстрактах мышц и почек плодов коров, этот показатель почти в 40 раз ниже по сравнению с СККРС. Низкое содержание липидов в ЭТПК объясняется методическими особенностями экстрагирования питательных веществ из тканей. Возможно, пониженная концентрация липидов в ЭТПК оказывает положительное воздействие на рост клеток в культуре, несмотря на малое содержание в них белка, т.к. известно отрицательное воздействие липидов на пролиферативную активность клеток.

Максимальное количество глюкозы содержится в экстракте мышц плодов коров, оно превышает содержание в СККРС почти в 2 раза. Минимум глюкозы отмечается в экстракте почек плодов коров, это значение соответствует таковому в СККРС.

Мочевина, конечный продукт метаболизма белков, в большом количестве присутствует в экстракте печени, а наименьшая ее концентрация выявлена в экстракте мышц плодов коров. В экстракте мышц плодов коров показано значительное превышение содержания креатинина по сравнению с СККРС,

тогда как в других тканевых экстрактах этот показатель ниже относительно контроля.

Общий билирубин в экстрактах печени и почек плодов коров превышает его значение в СККРС (почти в 2 раза), а прямой лишь в экстракте печени.

Особо следует отметить более высокие значения ферментов АЛТ и АСТ в тканевых экстрактах, по сравнению с СККРС. В экстракте печени плодов коров ЛДГ содержится в 3 раза больше, чем в СККРС. В экстракте мышц его количество незначительно превышает контроль, а в экстракте почек оно ниже в 2 раза. Концентрация КФК в ЭТПК и СККРС также отличается. В экстракте мышц его содержится в 1,6 раза больше, в экстракте печени в 1,6 раза меньше, а в экстракте почек его количество снижено более, чем в 5 раз по сравнению с СККРС. Высокое содержание ферментов в ЭТПК объясняется усиленными обменными процессами, происходящими в тканях плода, и скорее всего они не оказывают значительного влияния на пролиферацию клеток.

3.2 Влияние экстрактов на пролиферативную активность клеток

Результаты таблицы 3 свидетельствуют об относительно высокой пролиферативной активности изученных линий культур клеток после 72-х часовой инкубации при использовании экстрактов.

Таблица 3 – Индекс пролиферации 5 линий культур клеток в среде с тканевыми экстрактами плодов коров

Экстракты	MDBK	ВНК-21/13-02	LEK	SPEV	VERO
мышц	5,0±0,19*	4,3±0,22**	4,5±0,07*	4,5±0,07**	4,2±0,09*
печени	3,6±0,22***	3,2±0,06***	2,5±0,11***	2,2±0,25***	2,5±0,07***
почек	3,9±0,26***	3,6±0,14***	3,4±0,07***	3,6±0,18***	3,4±0,06***
Контроль-СККРС	6,2±0,3	6,2±0,4	5,6±0,19	6,1±0,1	5,2±0,22

Примечание: *, **, *** – уровни достоверности различия с контролем (p) - соответственно $\leq 0,05$; $\leq 0,01$; $\leq 0,001$

Из трех тканевых препаратов экстракт мышц обеспечивает наибольшую пролиферацию перевиваемых культур клеток, хотя ИП несколько ниже уровня, полученного с использованием СККРС. Наименьшей ростстимулирующей активностью обладает экстракт печени плодов коров. Из взятых для опытов культур клеток в ходе экспериментов к исследованным заменителям СККРС максимально адаптировалась перевиваемая культура клеток MDBK.

Эти клетки показали достаточно высокий ИП при использовании всех ЭТПК. Наиболее требовательной к виду биологически активных добавок в ростовой среде оказалась перевиваемая линия клеток ВНК-21/13-02.

Полученные данные позволяют заключить, что из всех исследованных нами экстрактов тканей плодов коров наиболее перспективным заменителем СККРС в культуральной среде при выращивании перевиваемых линий клеток является экстракт мышц.

Скорость образования монослоя в ростовой среде при использовании в качестве заменителя СККРС и ЭТПК была различной. При добавлении в среду экстракта мышц плодов коров монослой образовывался за 24 ч. Медленнее всего клеточный рост происходил при добавлении в питательную среду экстракта печени плодов коров, но во всех случаях монослой образовывался через 72 ч, как и в контроле.

Морфологические изменения в клеточном монослое, выращенном с добавлением экстрактов плодов коров по сравнению с контролем, были незначительны (рис. 2). Клетки, выращенные в экспериментальной среде, имели характерную для данного вида клеток форму - эпителиоподобную, с четко выраженными границами, без признаков дегенерации и морфологически не отличались от клеток, выращенных в контрольной среде.

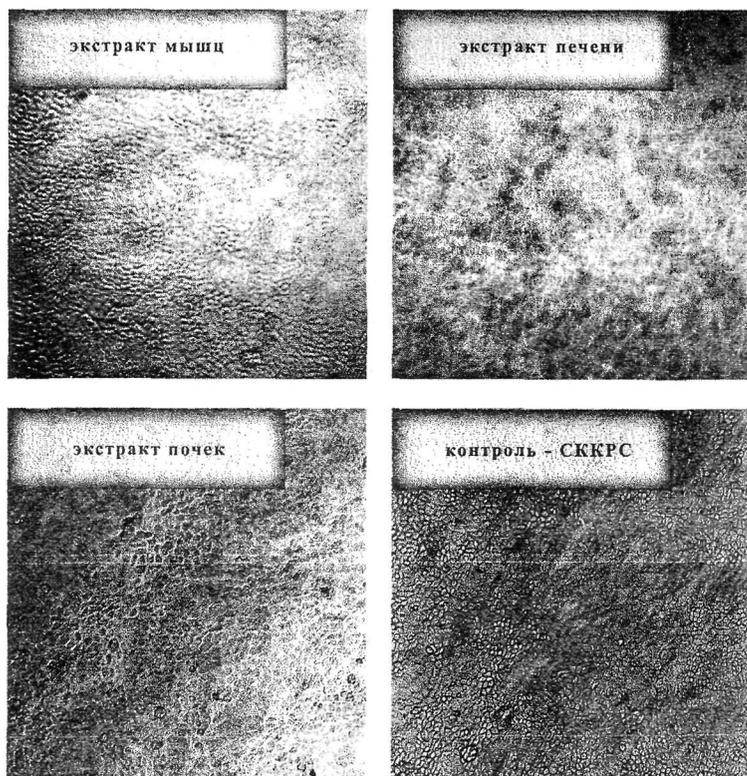


Рис. 2. Монослой перевиваемой культуры клеток MDBK на ЭТПК после 72 ч инкубации.

3.3 Влияние экстрактов в составе питательных сред на репродукцию вирусов

Все использованные в эксперименте вирусы, оказывали цитопатическое действие (ЦПД), т.е. клетки погибали в результате взаимодействия с вирусом. Проведено пассирование вирусов ИРТ, ПГ-3 на перевиваемой культуре клеток ЛЕК, выращенных на средах, содержащих ЭТПК. В опыт брали культуру после образования полного монослоя, осуществлено 5 последовательных пассажей каждого вируса.

Вирус ИРТ легко культивируется в монослое, его цитопатогенное действие отмечается через 48-96 ч после заражения. Первичные признаки ЦПД выражаются появлением зернистости, округлением клеток, которые располагаются группами в виде скоплений с утонченными перемычками и гроздьями по концам. Начинается ЦПД с краев и распространяется на весь монослой. В последствие происходит формирование сферических синцитий, содержащих по 10-20 ядер. Данный тип синцития чаще формируется при заражении культур небольшой дозой вируса (Гаффаров Х.З. и др., 2002). Вирус ПГ-3 вызывает появление в зараженном монослое гранулированных и вакуолизированных округлых клеток или многоядерных симпластов, которые возникают в результате слияния нескольких клеток. Находящиеся в симпласте клетки утрачивают способность к митозу, погибают и отпадают от стекла. В монослойной культуре возникают отверстия – «окна».

Согласно данным таблицы 4, видно, что наибольший урожай вирусной массы ИРТ и ПГ-3 был получен при использовании в качестве ростстимулирующей добавки в ростовую среду СКПК и СККРС.

Таблица 4 – Репродукция вирусов ИРТ и ПГ-3 на перевиваемой линии культуре клеток LEK

Экстракты и сыворотки крови	Титр вирусов, lg ТЦД ₅₀ /мл	
	ИРТ	ПГ-3
Экстракт мышц	6,2±0,1*	4,7±0,2**
Экстракт печени	4,7±0,2**	4,0±0,2***
Экстракт почек	4,7±0,3**	4,2±0,1***
СКПК	7,0±0,2	7,0±0,2
Контроль - СККРС	6,7±0,1	6,5±0,3

Примечание: ТЦД₅₀/мл - тканевая цитопатическая доза вируса;

*, **, *** – уровни достоверности различия с контролем (p) -

соответственно ≤ 0,05; ≤ 0,01; ≤ 0,001

Из исследованных ЭТПК наилучшим оказался экстракт мышц. При этом вирус ИРТ размножался значительно лучше по сравнению с вирусом ПГ-3 и его титр был незначительно ниже контроля. Но при пассивировании вируса ИРТ на экстрактах печени и почек плодов коров репродукция была ниже, чем в контроле на 30%, а у вируса ПГ-3 на - 39 и 35% соответственно.

Вирус ПГ-3, по-видимому, оказался более чувствительным и менее адаптогенным к используемым добавкам, поэтому его титр был ниже контроля при применении всех ЭТПК.

Таким образом, применение ЭТПК в культуральных средах вызывает некоторое снижение репродуктивной активности вирусов ИРТ и ПГ-3.

Нами также проведено пассирование реовируса тип 1 штамм "Lang" на перевиваемой линии VERO. Эта культура клеток наиболее чувствительна к данному вирусу, на которой он размножается с проявлением ЦПД. В опыт брали культуру с полным монослоем, осуществлено 5 последовательных пассажей вируса.

Реовирус имеет относительно длинный период репродукции, поэтому в зараженной культуре ранние проявления ЦПД обнаружить трудно. Цитопатический эффект характеризуется появлением округленных зернистых клеток и напоминает картину неспецифической дегенерации, что вызывает определенные трудности при идентификации. Пораженные реовирусом клетки не слущиваются со стекла, а сохраняют связь с монослоем, прикрепляясь к нему отростками, становятся гранулярными (рис. 3).

Следует отметить, что в культуре клеток VERO, выращенной с добавлением экстракта печени плодов коров, ЦПД несколько отличался от такового в контроле и в опытах с другими экстрактами. Там происходило формирование больших округлых бляшек, соединенных друг с другом перемычками.

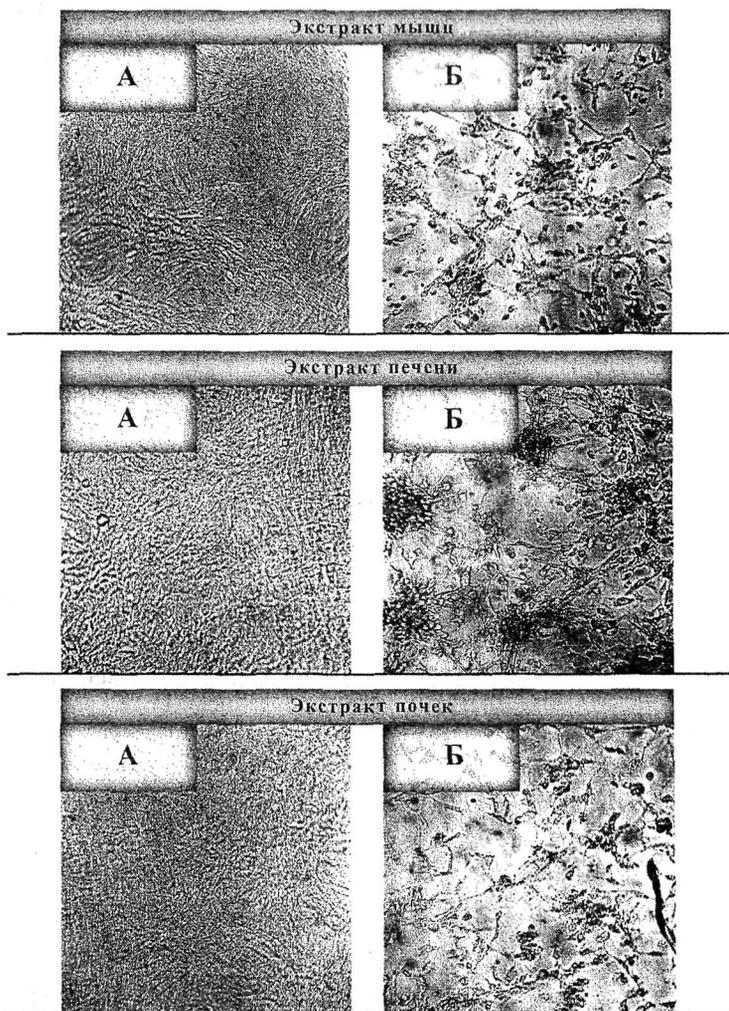


Рис. 3. Цитопатическое действие реовируса крупного рогатого скота в культуре клеток VERO с добавлением экстрактов
А – незараженная культура, Б – культура на 5-е сутки после заражения реовирусом.

Данные о репродукции реовируса на культуре клеток VERO, выращенной с применением различных ЭТПК отражены в таблице 5.

Таблица 5 – Репродукция реовируса тип 1 штамм “Lang” на перевиваемой линии культуре клеток VERO

Экстракты и сыворотки крови	Титр вируса в РГА, $1/n$
Экстракт мышц	64
Экстракт печени	32
Экстракт почек	32
СКПК	64
Контроль - СККРС	32

Репродукция реовируса на перевиваемой культуре клеток VERO с добавлением в ростовую среду экстракта мышц была выше (титр в РГА 1:64), чем при добавлении экстрактов почек (титр в РГА 1:32) и печени (титр в РГА 1:32). При пассивировании реовируса на культуре клеток, выращенной с добавлением в питательную среду экстракта мышц плодов коров титр был выше, чем в контроле в 2 раза. Такая же величина титра реовируса была получена при использовании в качестве биологически активной добавки СКПК.

Представленные данные свидетельствуют, что экстракт мышц плодов коров является перспективным заменителем СККРС в ростовых средах при наращивании массы реовируса тип 1 штамм “Lang” на перевиваемой культуре клеток VERO, т.к. позволяет получать вирусную массу с высокой инфекционной активностью и в большем количестве при изготовлении диагностических и профилактических препаратов.

3.4 Корреляционные отношения различных признаков при изучении экстрактов плодов коров

Корреляционный анализ имеет в исследовательской работе широкое применение. Между тем, корреляция не является точной зависимостью одного

признака от другого, и степень ее варьирует от полной независимости до очень сильной связи. Кроме того, характер связи между отдельными признаками может быть разнообразен.

Нами выявлена прямая корреляция между ИП MDBK и содержанием мочевины (0,87), прямого билирубина (0,84) в экстракте мышц плодов коров, а также содержанием общего (0,66) и прямого (0,81) билирубина, β -глобулина (0,65) в экстракте почек плодов коров. Отрицательная корреляция установлена между ИП MDBK содержанием АЛТ (-0,83), глюкозы (-0,70) в экстракте мышц плодов коров, а также γ -глобулина (-0,84), прямого билирубина (-0,89) в экстракте печени плодов коров и γ -глобулина (-0,75), мочевины (-0,60), кретинина (-0,65), АЛТ (-0,74), КФК (-0,92), в экстракте почек плодов коров. Прямая корреляция показана между ИП ВНК-21/13-02 и содержанием общего белка (0,67), прямого билирубина (0,96) в экстракте мышц плодов коров и общего билирубина (0,94) - в экстракте почек плодов коров. Выявлена отрицательная зависимость между содержанием альбумина (-0,66), прямым билирубином (-0,86) и γ -глобулином (-0,77) в экстракте печени плодов коров, а также общим белком (-0,85), γ -глобулином (-0,96), мочевиной (-0,89), АЛТ (-0,96) в экстракте почек плодов коров. Прямая корреляция установлена между ИП LEK и альбумином (1,0), α -глобулинами (0,72), креатинином (0,70) в экстракте мышц, а также мочевиной (0,69), ЛДГ (0,60) в экстракте печени. Отрицательная зависимость показана между ИП LEK и γ -глобулином (-0,98) в экстрактах мышц и γ -глобулином (-0,95) в печени плодов коров, а также альбуминами (-0,79) и глюкозой (-0,72) в экстрактах почек плодов коров. Положительная корреляция показана нами между ИП перевиваемой культуры SPEV и γ -глобулином (0,86), мочевиной (0,76), ЛДГ (0,63) экстракта мышц плодов коров, а так же общим белком (0,64), АСТ (0,75), ЛДГ (0,85) в экстракте печени плодов коров, общим белком (0,78), альбумином (0,76), α -глобулинами (0,76) в экстракте почек плодов коров. Отрицательная зависимость установлена между ИП SPEV и альбумином (-0,83), креатинином (-0,95), АСТ экстракта мышц плодов коров, АСТ (-0,63), ЛДГ (-0,80) в экстракте почек плодов коров.

Положительная корреляция прослеживается между ИП VERO и содержанием γ -глобулинов (0,60), глюкозой (0,81) в экстракте мышц плодов коров, β -глобулином (0,87), общим билирубином (0,97), АЛТ (0,99), АСТ (0,90), ЛДГ (0,84) в экстракте печени плодов коров, а также β -глобулином (0,76), общим (0,64) и прямым (0,73) билирубином в экстракте почек плодов коров. Отрицательная зависимость показана между ИП VERO и альбумином (-0,73), α -глобулином (-0,83) в экстракте мышц плодов коров, альбумином (-0,74), глюкозой (-0,84), КФК (-0,76) в экстрактах печени, а так же глюкозой (-0,94), креатинином в экстракте почек плодов коров.

Согласно полученным данным, положительная корреляция прослеживается между репродукцией вируса ИРТ на перевиваемой культуре ЛЕК и глюкозой (0,87) в экстракте мышц плодов коров, глюкозой (0,65), КФК (0,81) в экстракте печени плодов коров, мочевиной (0,61), креатинином (0,90), ЛДГ (0,71) и КФК (0,77) в экстракте почек плодов коров. Отрицательная зависимость показана между репродукцией вируса ИРТ и содержанием α -глобулина (-0,71) в экстракте мышц, прямым билирубином (1,0) в экстракте почек плодов коров. Положительная корреляция выявлена между репродукцией вируса ПГ-3 и глюкозой (0,67), креатинином (0,68) экстракта мышц, α -глобулином (0,64) экстракта печени, β -глобулином (0,81), АСТ (0,73) экстракта почек плодов коров. Отрицательная зависимость показана между репродукцией вируса ПГ-3 и мочевиной (-0,93) в экстракте мышц, γ -глобулином (-0,75) в экстракте печени, а также общим белком (-0,77), α -глобулином (-0,66), γ -глобулином (-0,65) в экстракте почек плодов коров.

4 ВЫВОДЫ

1. Разработана технология получения экстрактов тканей плодов коров на основе раствора Хэнкса, с включением в качестве дополнительного звена технологической цепочки этапа замораживания-размораживания субстрата.

2. Установлен биохимический состав экстрактов мышц, почек и печени плодов коров. Показано низкое содержание белковых фракций во всех

экстрактах тканей плодов коров по сравнению с сывороткой крови крупного рогатого скота.

3. Максимальная пролиферативная активность клеток MDBK ($5,0 \pm 0,19$), SPEV ($4,5 \pm 0,07$), ВНК 21/13-02 ($4,3 \pm 0,22$), VERO ($4,2 \pm 0,09$), LEK ($4,5 \pm 0,07$) после 72-х часовой инкубации проявляется при добавлении в ростовую среду экстракта мышц плодов коров; промежуточный уровень занимает экстракт почек плодов коров и минимальный – экстракт печени плодов коров на основе раствора Хэнкса.

4. Репродукция реовируса в культуре клеток VERO, выращенной на питательной среде с экстрактом мышц плодов коров (титр в РГА = 1:64) на основе раствора Хэнкса, превышает таковую при общепринятом использовании сыворотки крупного рогатого скота (титр в РГА = 1:32).

5. Репродукция вируса инфекционного ринотрахеита, сопоставимая с таковой при использовании в ростовой среде сыворотки крупного рогатого скота ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл} = 6,7 \pm 0,1$), определена в культуре клеток LEK, выращенной на среде с использованием в качестве биологически активной добавки экстракта мышц плодов коров ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл} = 6,2 \pm 0,1$) на основе раствора Хэнкса.

6. Титр вируса парагриппа - 3, в культуре клеток LEK, выращенной на среде с использованием в качестве биологически активной добавки экстрактов плодов коров на основе раствора Хэнкса был ниже, по сравнению с использованием в ростовой среде сыворотки крупного рогатого скота.

7. Установлена обратная корреляция между индексом пролиферации перевиваемых культур клеток MDBK ($r = -0,84$), SPEV ($r = -0,39$), ВНК 21/13-02 ($r = -0,77$), VERO ($r = -0,52$), LEK ($r = -0,95$) и γ -глобулиновой фракцией белков экстрактов печени плодов коров.

8. Выявлена прямая корреляция между содержанием глюкозы в экстрактах мышц ($r = 0,87$) и печени ($r = 0,65$) плодов коров, используемых в качестве биологически активной добавки в культуральных средах, и титрами вирусов

инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 крупного рогатого скота на перевиваемой культуре клеток ЛЕК.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для стимуляции пролиферативной активности клеток и репродукции вирусов на них в качестве биологической добавки в питательные среды рекомендуется использовать экстракт мышц плодов коров на основе раствора Хэнкса.

2. Применение экстрактов плодов коров расширяет спектр биологически активных компонентов ростовой среды, обеспечивает в определенных сочетаниях высокий уровень пролиферации клеток и репродукции вирусов на них.

6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Закиров, Р.Р.** Стимуляция роста культур клеток экстрактами из мышц, печени и почек плодов коров / Р.Р. Закиров // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные проблемы ветеринарии» - Казань, 2007. – С. 108-109.

2. **Закиров, Р.Р.** Рост культуры клеток ВНК-21 при внесении в среду тканевых экстрактов плодов коров / Р.Р. Закиров, Е.Ю. Хамзина, Н.И. Гурьянов, Р.Я. Гильмутдинов // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». – Киров: ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», 2008. – Вып.1. – С.317-319.

3. Гурьянов, Н.И. Сравнительное изучение сывороток крови разных видов животных и тканевых экстрактов плодов коров при культивировании клеток / Н.И. Гурьянов, Р.Р. Закиров, Н.В. Бадрутдинов, Р.Я. Гильмутдинов // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования», посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА: Ульяновская ГСХА, 2008. – т.4. – С.31-34.

4. **Закиров, Р.Р.** Зависимость экстрагируемости веществ из фетальных тканей от соотношения их с раствором Хэнкса / Р.Р. Закиров // Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Достижения молодых ученых – в производство», посвященная 100-летию со дня рождения профессора Х.Х. Абдулина – Казань, 2008. – С.149-151.

5. **Закиров, Р.Р.** Биохимический состав и биологическая активность экстрактов из мышц, печени и почек плодов коров / Р.Р. Закиров, Н.И. Гурьянов, Р.Я. Гильмутдинов // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасным, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: Материалы Международной научно-практической конференции, 13-14 ноября 2008 года/ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ г. Покров, 2008. – С.153-155.

6. **Закиров, Р.Р.** Ростстимулирующее действие тканевых экстрактов плодов коров на культуре клеток MDBK / Р.Р. Закиров, Е.Ю. Хамзина, Н.В. Бадрутдинов, Р.Я. Гильмутдинов // Международная научно-практическая конференция «Достижения супрамолекулярной химии и биохимии в ветеринарии и зоотехнии», к юбилею кафедры органической и биологической химии – Москва, 2008. – С. 97.

7. Гильмутдинов, Р.Я. Биохимический состав и ростстимулирующий эффект на перевиваемые культуры клеток экстрактов из мышц, печени и почек плодов коров / Р.Я. Гильмутдинов, Р.Р. Закиров, Е.Ю. Хамзина, Н.И. Гурьянов // Ветеринарный врач, 2009. – №4. – С. 13–15.

*Отпечатано в ООО «Печатный двор».
г. Казань, ул. Журналистов, 1/16, оф.207
Тел: 272-74-59, 541-76-41, 541-76-51.
Лицензия ИД №7-0215 от 01.11.2001 г.
Выдана Поволжским межрегиональным
территориальным управлением МПТР РФ.
Подписано в печать 30.10.2009г. Усл. п.л 1,5
Заказ № К-6739. Тираж 100 экз. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печать - ризография.*