

**ЧУРИНА ЗОЯ ГЕННАДЬЕВНА**

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ И  
РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ АПИФИТОПРЕПАРАТА НА  
КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Казань – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

**Научный руководитель:** **Плотникова Эдие Миначетдиновна**  
доктор ветеринарных наук, доцент

**Официальные  
оппоненты:** **Маннапов Альфир Габдуллович** доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой аквакультуры и пчеловодства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет - МСХА им. К.А. Тимирязева»

**Мельник Николай Васильевич**  
доктор ветеринарных наук, профессор, президент Национальной ассоциации организаций ветеринарно-биологической промышленности «Ветбиопром»

**Ведущая организация:** Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП)  
г. Щелково

Защита диссертации состоится «21» июня 2018 г. в «14<sup>00</sup>» часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, Республика Татарстан, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <http://www.kgavm.senet.ru>

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2018 г. и размещен на сайтах <http://vak2.ed.gov.ru> и <http://www.kgavm.senet.ru>

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Г.Р. Юсупова

# 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**1.1 Актуальность проблемы.** В настоящее время развитие рынка новой биотехнологической продукции, получаемой с помощью перевиваемых клеточных линий, сопровождается наращиванием объемов выпуска и потребления питательных сред, среди которых особое внимание привлекают среды на основе продуктов животного (Вахонина Т.В., 1990; Ганиев И. М., 2007; Глаглева И.С. 2013) и растительного (Трошина Г.М., 2006) происхождения.

Однако существует реальная опасность инфицирования прионами препаратов, полученных с использованием продуктов животного происхождения. Поэтому государственными организациями, ведущими контроль за производством лечебно-профилактических препаратов было предъявлено требование ограничения применения в производстве вакцинных препаратов субстанций животного происхождения (Мельник Н.В., 2016).

Вместе с тем в настоящее время перспективным направлением в области биотехнологии, клеточной и генной инженерии является применение высокомолекулярных соединений (ВМС) – биополимеров, из которых наиболее высокой биологической активностью обладают природные биополимеры – хитин и хитозан, полученные из ракообразных и насекомых (пчел), содержащие в своем составе белки, углеводы, аминокислоты, микро- и макроэлементы и обладающие метаболитстимулирующей, ростстимулирующей и бактерицидной активностью (Плотникова Э.М., 2015 и др.). Исследованиями установлено, что внесение в ростовые (питательные) среды биополимеров значительно усиливало пролиферацию культивируемых клеток животных (лимфоцитов и спленоцитов) – в условиях *in vitro*.

Учитывая, что сочетание апипродуктов с фитопрепаратами приводит к усилению биологического действия отдельных компонентов (Закиров Р.Ф., 2009), сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» была разработана хитинсодержащая натуральная композиция «Вита-Форце» (Патент РФ №2324361 С1А23К), которая является уникальной как по составу (более 400 химических соединений), так и биологическому действию (метаболизм-, рост иммуностимулирующее, детоксицирующее, адаптогенное, антиоксидантное) в условиях *in vivo*, есть полное основание предположить, что указанный апифитопрепарат может быть использован в качестве активатора метаболизма при культивировании клеток животных в искусственных условиях (*in vitro*) для репродукции вирусов при изготовлении вакцинных препаратов.

Однако исследования по использованию апифитопрепаратов в качестве активаторов роста клеток *in vitro* единичны и не дают полного представления о роли апипродуктов в клеточной биотехнологии. В связи с тем, что активация клеточного метаболизма представляет одну из актуальных задач биотехнологии и в связи с малоизученностью вопроса о влиянии апифитопродуктов на рост и развитие клеток животных в искусственных условиях культивирования для вирусологических исследований, а также в

связи с актуальностью проблемы, нами проведены настоящие исследования.

## **1.2 Степень разработанности проблемы**

Сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» установлено, что хитинсодержащие продукты пчеловодства обладают метаболизм-, иммуно-, гемопоэз- и ростстимулирующим действием в условиях *in vivo*. Что касается влияния биополимеров, в частности, продуктов пчеловодства, на культивируемые клетки в условиях *in vitro*, то такие исследования единичны, и они выполнены, в основном, на миоцитах и спленоцитах (Madin S., 1958) с использованием одного из компонентов композиционного препарата на основе продуктов пчеловодства (Маннапова Р.Т., 2002; Гулюкин М.И., и др. 2011). Но вопрос о влиянии хитинсодержащего апифитопрепарата на перевиваемые клетки животных для репродукции вирусов остается неизученным.

## **1.3 Цель и задачи исследований**

Целью исследований являлось изучение возможности применения апифитоэкстракта из биологически активных продуктов пчеловодства (БАПП) в качестве биологической добавки в питательные среды для выращивания культур клеток с последующей репродукцией на них вирусов. Исходя, из этого были выдвинуты следующие задачи:

- получить апифитоэкстракт из биологически активной композиции «Вита-Форце»;
- определить оптимальные параметры экстрагирования субстрата для получения биологически активной добавки;
- изучить биохимический состав полученного апифитоэкстракта;
- изучить антимикробную активность апифитопрепарата по отношению к контаминантам питательных сред;
- определить оптимальные количества апифитоэкстракта, обеспечивающие высокую ростовую активность культур клеток в питательной среде;
- оценить репродукцию вирусов инфекционного (ИРТ) и парагриппа-3 (ПГ-3) КРС на перевиваемых линиях клеток MDBK, LEK, VERO, выращенных на апифитоэкстракт содержащей питательной среде.

## **1.4 Научная новизна работы**

На основании анализа биохимического состава и механизма действия природных биополимеров, в частности хитина, хитозана и хитинсодержащих биологически активных продуктов пчеловодства, впервые обоснована возможность применения этих соединений в качестве активаторов метаболизма культивируемых клеток животных. Впервые экспериментально подтверждена возможность получения апифитоэкстракта из БАПП, с целью использования его в качестве ростстимулирующего фактора – биодобавки в питательные среды для культивирования клеток *in vitro*. Впервые методом этанолового экстрагирования БАПП получен апифитоэкстракт (АФЭ), содержащий 160 мг % сухих экстрактивных веществ; впервые оптимизированы условия монослойного выращивания перевиваемых линий клеток MDBK в питательной среде Игла MEM, содержащей 0,9 – 1,1 г/л АФЭ,

обеспечивающая через 48 ч культивирования накопление клеток со степенью размножения  $\mu t=3,32$  и индексом пролиферации  $ИП=5,3$ ; впервые установлена возможность профилактики бактериальной контаминации различных линий клеток при культивировании их в АФЭ – содержащей питательной среде, исключая тем самым, из технологического цикла применение антибиотиков в качестве антибактериальных субстанций; впервые проведена оценка репродукции вирусов ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота на перевиваемых культурах клеток линий MDBK, LEK и VERO, с добавлением в ростовую среду апифитоэкстракта из БАПП.

Получено положительное решение ФИПС о выдаче патента на изобретение по заявке № 2016150760/20 9081424 от 01.02.18г. «Способ получения природного биополимера – аписана для активации культур клеток и способ активации культур клеток *in vitro* при репродукции вирусов» Чурина З.Г. и др.

### **1.5 Практическая значимость работы**

В результате проведенных исследований разработана технология получения апифитопрепарата из биологически активных продуктов пчеловодства (БАПП), а также сконструированы питательные среды на его основе, пригодные для культивирования клеток MDBK, LEK и VERO, обеспечивающие высокую ростовую активность клеток *in vitro* и репродукцию на них вирусов.

### **1.6 Методология и методы исследований**

Методологические подходы в решении задач диссертационного исследования основаны на литературном поиске, посвященном обоснованию актуальности, цели и задач исследований, анализе данных отечественных и зарубежных публикаций по тематике исследования; получению и изучению ростстимулирующего действия апифитопрепарата на основе биологически активных продуктов пчеловодства на перевиваемые клетки животных в условиях *in vitro*.

Для достижения основной цели диссертационной работы, теоретического обоснования возможности и необходимости применения апифитопрепарата для стимуляции метаболизма перевиваемых линий клеток и репродукции на них вирусов, использована совокупность адекватных методологических приемов, доступные и сертифицированные методы, включающие микробиологические, морфологические, биохимические, цитогенетические, вирусологические и статистические методы исследований.

### **1.7 Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Технология получения АФЭ из БАПП.
2. Культуральные, цитоморфологические, кариологические и вируспродуцирующие характеристики стационарной перевиваемой линии клеток, выращенных на средах, содержащих апифитоэкстракт из БАПП.
3. Стабильность биологических свойств перевиваемых линий клеток MDBK, LEK и VERO, выращенных на средах, содержащих апифитоэкстракт из БАПП, в процессе монослойного стационарного культивирования.
4. Возможность исключения из технологического процесса применения

антибиотиков и замены их биополимерами на основе хитин- хитозан содержащих субстанций.

5. Усиление репродукции вирусов на культуре клеток с использованием апифитоэкстракта.

**1.8 Апробация работы** Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях: – ученого совета ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» по итогам НИР за 2013–2017; – третьем Международном ветеринарном конгрессе «Ветеринария на пути инновационного развития агропромышленного комплекса» (Алматы, 2015); – Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны (Санкт-Петербург», 2015).

### **1.9 Публикации результатов исследований**

Основные результаты исследований опубликованы в 5 научных работах, в том числе - 3 в рецензируемом журнале из перечня ВАК Минобрнауки РФ.

### **1.10 Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 136 страницах компьютерного текста и включает разделы: общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключение, практические предложения и приложения.

Работа иллюстрирована 10 таблицами, 7 рисунками. Список литературы включает 263 литературных источников, в том числе – 38 зарубежных авторов.

## **2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы и методы исследований**

Работа выполнена в лаборатории культуры клеток и питательных средах отдела биологической безопасности ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» в течение 2013–2017 гг. согласно государственной программе НИР (№ гос. регистрации 01200202602).

Для проведения исследований в работе в качестве тест - культур клеток использовали перевиваемые клеточные линии MDBK, LEK, ВНК – 21-13/02 и VERO из коллекции ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань). В качестве ростовых и поддерживающих питательных сред для культур клеток использовали 0,5% раствор гидролизата лактальбумина (ГЛА) на растворе Хэнкса (НПО «Вектор», Россия); среду Игла MEM (pH 7,5-7,6) с глутамином (НПО «Вектор», Россия), синтетическую среду 199 (НПО «Вектор», Россия); раствор трипсина, раствор трипсина и Версена; нормальную сыворотку КРС, сыворотку плодов коров. Все растворы готовили на деионизированной воде сопротивлением 10-18Мом.

В качестве потенциальных стимуляторов роста культивируемых клеток *in vitro* использовали водные и этаноловые экстракты подмора пчел, прополиса, личинок трутней, восковой моли, обножки, воска, натуральной биологически активной композиции «Вита-Форце», биополимеры

коммерческого и собственного изготовления (хитозан и апизан). Для деконтаминации питательных сред использовали антибиотики: энроксил 5%, ципрофлоксацин, цефтриаксон, стрептомицина сульфат, бензилпенициллина натриевую соль, канамицин. В качестве химических реактивов использовали колхицин, ледяную уксусную кислоту, эфир, краситель азур-эозин, метанол, раствор хлорида натрия рН 7,2-7,4.

В качестве тест-микробов контаминантов питательных сред использовали аспорогенные (*E.coli*, *St.aureus*) и спорогенные (*B.subtilis*) микроорганизмы, а также мезофильные аэробные и факультативные анаэробные микроорганизмы (КМАФАиМ), выделенные из экстракта мышечной ткани коров, используемых в биотехнологии.

Для оценки вирусрепродуцирующей способности сред с испытуемыми апифитопродуктами использовали вакцинные штаммы «ТК-А (ВИЭВ) – В 2», вируса ИРТ и «ПТК- 45/86», вируса ПГ-3 КРС, которые получены из Всероссийского научно- исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Коваленко Я.Р. (г. Москва), а также реовирус, тип 1 референтный штамм «Lang» (Великобритания).

Для получения экстрактов апипрепаратов отбирали пробы пчелиного подмора, трутневого расплода, личинок восковой моли, перги, обножки, пыльцы, которые подвергали очистке, сушке, гомогенизации и водно-этаноловой экстракции, согласно предложенной методике (Албулов А.И., 2004; Маннапова Р.Т., 2002). Полученные этаноловые экстракты подвергали деалькоголизации (освобождению от экстрагента) путем упаривания на вакуумном ротационном испарителе до исходного объема и нейтрализовали 0,1н КОН до рН 7,2-7,4, затем разводили стерильным физиологическим раствором до исходной концентрации и использовали в качестве добавки в ростовые питательные среды. Испытуемые экстракты добавляли в питательные среды в 10%-ной концентрации с добавлением антибиотиков (цефтриаксона, ципрофлоксацина, канамицина сульфата, стрептомицина сульфата, бензилпенициллина натриевой соли) по 100 Ед/мл и без добавления их.

Коммерческие хитозан, апизан и препараты собственного изготовления использовали в качестве добавок к питательным средам согласно инструкциям по применению препаратов.

Перевиваемые линии клеток культивировали и общепринятой методике (Адамс Р., 1983) в стандартных условиях.

Пролиферативную активность культур (индекс пролиферации – ИП) оценивали с помощью показателя  $C2$  (долевое выражение отношения количества клеток на  $V$ -сроке инкубации ( $U1$ ) к посевной дозе клеток ( $Uн$ ) по формуле  $C2 = U1/Uн$  (Лобунцова Д.В., 1985 и др.).

Приготовление препаратов хромосом для цитогенетического анализа проводили по методу Р. Moorhead (1960), который предусматривает накопление в культуре клеток с помощью колхицина метафазных пластинок, обработку клеток гипотоническим раствором, фиксацию препаратов и их окрашивание. Окраску хромосомных препаратов проводили с

использованием готового красителя азур-эозина по Романовскому. К 100 мл свежеприготовленной дистиллированной воды прибавляли 5 мл готовой краски и 2-3 мл 0,1% раствора двууглекислого натрия для создания нейтральной среды (рН=6,8-7,2).

Контроль клеточных культур на стерильность проводили путем посева на бактериологические среды: МПА, МПБ, триптический перевар сердца, Сабуро, Китт - Тароцци. Чувствительность культур клеток, выращенных на различных средах с использованием испытуемых потенциальных активаторов - апифитопрепаратов определяли вирусологическими методами к парвовирусу крупного рогатого скота типа I (штамм «Parvo 32459»), герпесвирусу типа I (ИРТ) (вакцинный штамм «ТК-А (ВИЭВ) – В 2») вирусу парагриппа-3 (штамм «SF-4»). Титры вирусов рассчитывали по методу (Reed L., Muench H., 1983) и выражали в Ig КОЕ/мл, Ig ЛД<sub>50</sub>/мл и Ig ТЦД<sub>50</sub>/мл соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере, используя программу Microsoft Office Excel 2007. Достоверность изменений величин показателей определяли по непараметрическому критерию Вилькоксона.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1 Подготовка потенциальных активаторов метаболизма клеток для использования их в составе питательных сред**

В качестве стандартного полимера в опытах использовали коммерческий хитозан-фармакор отечественного производства ООО «Фармакор Продакшн» (Санкт-Петербург). Препарат представляет собой лиофилизированный аморфно-кристаллический инкапсулированный биополимер, содержащий в одной капсуле 220 мг хитозана. БАД «Хитозан-фармакор» содержит биологически активное вещество хитозан из хитиновых оболочек красноногих камчатских крабов, полученный путем деацелирования.

Для испытания препарата в качестве активатора клеточного метаболизма из исходного материала готовили навески по 25, 30, 75, 100, 125, 150, 175 и 200 мг, которые вносили в ростовые (питательные среды) из расчета 25–200 мг/л. Параллельно готовили водные растворы хитозана путем растворения содержимого 1 капсулы (220 мг) в 100 мл стерильной бидистиллированной воды. Полученный 0,25% -ный раствор хитозана вносили в питательные (ростовые) среды из расчета 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мг/л.

В качестве второго потенциального активатора клеточного метаболизма *in vitro* использовали препарат – аписан производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань) ,(Низамов Р.Н., и др. 2004).

Перед испытанием препарат, расфасованный в ампулы по 15 мг лиофильно высушенного порошка, вскрывали и вносили в питательные среды из расчета 12,5; 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 мг/л. Параллельно готовили растворы аписана. Содержимое ампул (от 25 до 200 мг) растворяли в 100 мл стерильной дистиллированной воды, т.е. изготавливая растворы от

0,09 до 0,25% -ной концентрации аписана и внося их соответственно в питательные среды из расчета от 10 до 100 мл/л питательной среды.

Для оценки сравнительной метаболизм - стимулирующей активности коммерческих хитозана и препарата собственного изготовления – аписана производства ФГБНУ ФЦТРБ-ВНИВИ (г. Казань), последний вносили в питательные среды в виде кристаллического порошка и растворов в вышеуказанных количествах и объемах с соблюдением идентичных условий эксперимента.

В качестве опытного испытуемого материала использовали лиофильно высушенный этаноловый экстракт апифитопрепарата «Вита-Форце», полученный по разработанной нами технологии. В состав композиции «Вита-Форце» входят апипродукты (мед, прополис, перга, пыльца (обножка), пчелиный яд, пчелиный расплод в различных стадиях развития, маточное молочко, воск) и фитопрепарат – травяная мука в определенных количественных соотношениях. Для использования апифитопрепарата в качестве активатора клеточного метаболизма, из исходного материала (порошка «Вита-Форце») получали этаноловый экстракт. Для этого порошок биодобавки «Вита-Форце» в количестве 100 г вносили в стеклянную колбу (500 мл) и заливали 70% -ным этанолом в соотношении 1:3, закрывали пробкой и содержимое выдерживали при комнатной температуре в течение 21 суток в темном месте. По истечении указанной экспозиции содержимое колбы (этаноловый экстракт) подвергли деалькоголизации путем удаления экстрагента в вакуумном испарителе, определяли содержание сухого экстрактивного вещества в этаноловом экстракте, которая составляло  $160 \pm 5$  мг%. Полученный осадок вносили в ампулы по 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 мг/мл.

Таким образом, для проведения экспериментов по оценке метаболизм - стимулирующей активности препаратов из класса биополимеров, содержащих хитин и хитозан, в опытах использовали коммерческие хитозан, аписан и препараты собственного изготовления – экспериментальные образцы пчелозана из подмора пчел и этаноловый экстракт натуральной биологически активной добавки «Вита-Форце».

В соответствии с 3-й задачей исследований, на следующем этапе работы полученный препарат – апифитоэкстракт (АФЭ) подвергали химическому анализу и использовали в качестве активатора метаболизма культур клеток.

Результаты анализа химического состава апифитоэкстракта, проведенного в химико-аналитической лаборатории Всероссийского государственного научно-исследовательского института животноводства (ВГНИИЖ РАСХН, протокол испытаний № 704 от 05 января 2014 г.), показали, что апифитоэкстракт содержит углеводы, заменимые и незаменимые аминокислоты, жирные кислоты, макро- и микроэлементы. Апифитоэкстракт, содержащий важнейшие компоненты для роста и развития клеток *in vitro*, в дальнейшем использовали в качестве ростстимулирующего фактора при культивировании животных клеток, используемых при

репродукции вирусов для получения вакцинных препаратов.

### **3.2 Изучение токсичности, максимально переносимой концентрации (МПД), минимально цитогенетической концентрации (МЦД) и антибактериальной активности апифитоэкстракта**

Учитывая широкий спектр биологического действия природных биополимеров, в частности хитин- и хитозансодержащих препаратов, которые разнонаправленно действуют на микро- и макроорганизмы, подавляя рост и развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры, с одновременной стимуляцией полезной микрофлоры (бифидобактерии). Мы сочли необходимым провести исследования по оценке возможности деконтаминации культур клеток с использованием хитозана и хитинсодержащего препарата - апифитоэкстракта из «Вита-Форце».

Перед проведением основных опытов по оценке ростстимулирующей активности апифитоэкстракта, предварительно изучали токсичность и максимально переносимую дозу препарата для культур клеток *in vitro*. Для этого различные концентрации препарата (0,01; 0,1; 1,0; 10,0%) вносили в ростовую среду с засеянными культурами клеток MDBK, LEK и VERO. Через 24-часовой инкубации проводили оценку токсичности по количеству мертвых и выживших клеток. Учитывая, что биологически активные вещества оказывают стимулирующее действие на клетки макроорганизма в оптимальных количествах и превышение их концентрации может оказать одновременно и отрицательное влияние на метаболизм клеток, на следующем этапе работы проводили исследования по определению минимально цитотоксической и максимально переносимой концентрации испытуемых агентов на культурах клеток различных линий.

В качестве тестируемых клеток использовали перевиваемые культуры клеток линий MDBK, ВНК 21-13/02 и VERO. Для изучения токсичности в ростовые среды вносили возрастающие концентрации испытуемых препаратов от 0,5 до 1500 мг/мл. Токсическое действие исследуемых препаратов на биологические характеристики культур клеток учитывали ежедневно в течение 3 суток. Результаты определения максимально переносимой и минимальной цитотоксической концентрации хитин- и хитинсодержащих препаратов для перевиваемых линий клеток представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Максимальная переносимая (МПД) и минимальная цитотоксическая (МЦД) концентрация хитин- и хитозансодержащих препаратов для перевиваемых линий клеток (n=5)

Перевиваемые линии клеток	Испытуемые препараты			
	хитозан		апифитоэкстракт	
	МПД (мг/мл)	МЦД (мг/мл)	МПД (мг/мл)	МЦД (мг/мл)
MDBK	>400	400 – 800	>900	>1000
ВНК 21-13/02	>400	400 – 700	>850	>950
VERO	>400	400 – 690	>900	>1200

Из представленных в таблице данных видно, что апифитоэкстракт из натуральной биологически активной композиции «Вита-Форце» менее токсичен, поскольку максимальная переносимая доза (МПД) и минимальная цитотоксическая доза (МЦД) для использованных линий клеток составляет выше 1000 мг/мл. В отличие от хитинсодержащего апифитопрепарата (АФЭ), природный биополимер – хитозан для изучаемых линий клеток был более токсичным: максимальная переносимая и минимальная токсичная доза препарата составляла 400–800 мг/мл.

На следующем этапе проводили опыты по определению антибактериальной активности АФЭ из «Вита-Форце».

При этом в качестве тест-микробов контаминантов питательных сред использовали аспорогенные (*E.coli*, *St.aureus*) и спорогенные (*B.subtilis*) микроорганизмы, а также мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАиМ), выделенных из экстракта мышечной ткани коров, используемых в биотехнологии.

Для изучения антимикробного действия апифитоэкстракта готовили 0,1-1,0%-ные растворы препарата, которые вносили в пробирки с вышеуказанными тест-микробами в концентрации  $2,5 \times 10^5$  м.к. и выдерживали 24-72 ч при температуре  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . При изучении влияния препарата на мезофильно - аэробные и факультативно-анаэробные микробы (КМАФА иМ), указанные концентрации АФЭ – вносили в пробирки с мышечными экстрактами и культивировали в вышеуказанных условиях. По истечении ускоренной экспозиции производили посевы на МПБ и МПА для подсчета количества выживших микробов.

Результаты проведения исследований показали, что апифитоэкстракт из «Вита-Форце» обладает достаточно высоким антибактериальным свойством по отношению к аспорогенным и спорогенным микроорганизмам, вызывая гибель *E.coli* в 0,3% -ной концентрации, *St.aureus* в 0,5 % -ной и *B.subtilis*-0,7%-ной концентрации за 24 ч. Бактериостатическая концентрация для *E.coli* составляла 0,9 мг/мл, для *St.aureus* - 1.0 мг/мл и для *B. subtilis* -1,2 мг/мл при 72 – часовой экспозиции.

С учетом полученных данных первого этапа микробиологических исследований, на следующем этапе работы изучали влияние хитозана и АФЭ на мезофильные аэробные и факультативно - анаэробные микроорганизмы (КМАФАиМ), выделенные из экстракта мышечной ткани коров, используемых в биотехнологии в качестве добавки в питательные среды.

Для изучения антимикробного действия препаратов готовили 0,1-1%-ные растворы хитозана и апифитоэкстракта соответственно, которые вносили в пробирки с обсеменными КМАФА и М мышечными экстрактами и оставляли их различные экспозиции при комнатной температуре ( $22^\circ\text{C}$ ). По истечении соответствующей экспозиции производили посевы из проб на МПБ и МПА для подсчета количества выживших микроорганизмов.

Результаты изучения АФЭ на мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (КМАФАиМ), выделенные из экстракта мышечной ткани коров, используемых в биотехнологии в качестве биодобавки в ростовые среды, представлена на рисунке 1.

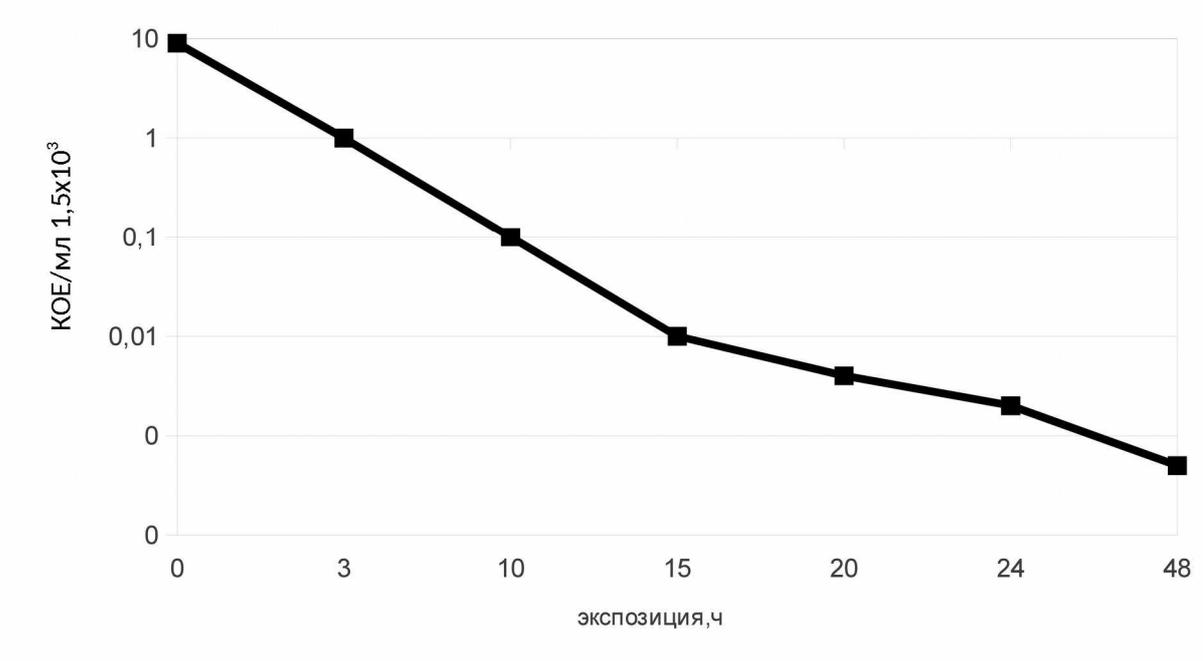


Рисунок 1 – Бактерицидная активность 1%-ного раствора АФЭ по отношению к КМАФА и М

Из данных рисунка видно, что внесение в раствор, содержащий  $1,5 \times 10^3$  КОЕ/мл мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАиМ) растворов хитозана и апифитоэкстракта оказывало бактерицидное действие на микроорганизмы в зависимости от времени контакта испытуемых агентов. При этом наиболее интенсивная гибель микроорганизмов наблюдалась при 3-17 – часовом контакте их с испытуемыми агентами и наступала при 12- и 24– часовой экспозиции, когда в контаминированных указанными микроорганизмами в суспензиях обнаруживалось  $0,05-0,06 \times 10^3$  микробных клеток, что составляет 50-60 микробных клеток на 1 мл суспензии. Увеличение срока экспозиции (контакта микроорганизмов с действующими агентами) до 24 ч вызывало существенное влияние на жизнеспособность испытуемых микробов – к этому сроку в растворах обнаруживались не более 1-2 микробных клеток на  $1 \text{ см}^3$ .

Таким образом, установлено, что апифитопрепарат из натуральной биологически активной композиции «Вита-Форце» в концентрации 1 мг/мл обладает высокой антибактериальной активностью по отношению к грамотрицательным и грамположительным микроорганизмам, оказывая, одновременно ростстимулирующее действие на животные клетки в условиях *in vitro*. На следующем этапе проводили исследования по определению оптимальных количеств апифитоэкстракта, вносимых в ростовые среды для активации метаболизма культур клеток.

### 3.3 Оценка ростстимулирующей активности хитин-, хитозансодержащих препаратов на пролиферативную активность перевиваемых культур клеток

Перед основными опытами по оценке испытуемого экстракта апифитопрепарата «Вита-Форце», проводили предварительные исследования по изучению влияния контрольных коммерческих биополимеров хитозана и апизана. Для этой цели проводили подбор оптимальных количеств препарата для внесения в питательные среды различных доз хитозана, устанавливая зависимость роста и развития клеточных культур от концентрации препарата.

Результаты определения оптимальных количеств хитозана при культивировании клеточной линии MDBK на питательной среде Игла MEM представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние хитозана на рост и развитие клеток линии MDBK в зависимости от содержания препарата в ростовой среде Игла MEM

Концентрация хитозана в ПС, мг/л	Концентрация клеток ( $\times 10^5$ ) и индекс пролиферации (ИП) в зависимости от времени культивирования, ч					
	24		48		72	
	КК	ИП	КК	ИП	КК	ИП
6,85	1,8 $\pm$ 0,03	0,9	3,9 $\pm$ 0,51	2,1	2,7 $\pm$ 0,33	1,9
13,75	2,9 $\pm$ 0,07	1,1	5,3 $\pm$ 0,45	2,3	2,9 $\pm$ 0,27	1,9
27,50	3,5 $\pm$ 0,05	1,4	9,0 $\pm$ 0,05	3,2	2,9 $\pm$ 0,27	1,8
55,00	3,6 $\pm$ 0,03	1,5	9,1 $\pm$ 0,011	3,3	2,9 $\pm$ 0,33	1,7
110,02	3,6 $\pm$ 0,15	1,5	9,0 $\pm$ 0,27	3,2	2,8 $\pm$ 0,02	1,6
220,00	3,6 $\pm$ 0,19	1,5	9,0 $\pm$ 0,53	3,2	2,7 $\pm$ 0,07	1,5

Примечание: КК-концентрация клеток ( $\times 10^5$ /мл), ИП-индекс пролиферации, ПС-питательная среда

Как видно из данных таблицы, наиболее интенсивный рост культуры клеток линии MDBK на питательной среде, содержащей природный биополимер – хитозан в концентрации 27,5-55,0 мг/л, наблюдался при 48 – часовом культивировании клеток, когда их концентрация достигла максимального уровня – 9,0 $\pm$ 0,05 и 9,1 $\pm$ 0,11 $\times 10^5$  клеток/мл, что в 2,52 и 2,57 раза выше ( $p < 0,001$ ) по сравнению с таковыми 24 часовой экспозиции культивирования клеток.

Параллельно проводили опыты по оценке ростстимулирующей активности второго контрольного препарата из класса природных биополимеров – хитозана из пчел – апизана. Результаты исследования показали, что питательная среда, содержащая апизан в диапазоне концентраций 25,0-70,0 мг/л, обеспечивала максимальный рост и развитие клеток тест-культуры (MDBK), при котором концентрация клеток в культуральной среде через 48 ч (логарифмическая фаза) составляла 8,8 $\pm$ 0,35 и 9,1 $\pm$  0,35 кл/мл соответственно при индексе пролиферации 2,7-2,9 соответственно.

Таким образом, природные биополимеры – хитозан и апизан обладают высоким ростстимулирующим потенциалом, обеспечивая удвоение биомассы через 48 ч при минимальной концентрации биополимеров (6,25-6,85 мг/л) и достижения максимального роста культуры клеток при содержании их в питательной среде 25-70,0 мг/л.

Полученные данные послужили основанием для испытания хитинсодержащего апифитопрепарата «Вита-Форце» в качестве ростстимулирующего фактора при культивировании животных клеток, используемых при выращивании вирусов для получения вакцинных препаратов. Для оценки ростстимулирующей активности апифитоэкстракты готовили 1%-ные растворы, которые вносили в питательные среды в количестве от 10 до 250 мг/л, засеивали их культурами клеток MDBK, LEK и VERO из расчета 3-4.105кл/мл, культивировали клетки в течение 72 ч с учетом морфологии клеток и индекса пролиферации. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Значения индекса пролиферации клеточной культуры MDBK в питательной среде Игла MEM с различными концентрациями апифитоэкстракта «Вита-Форце»

Концентрация АФЭ в культуральной среде, г/л	Динамика значений ИП клеточной культуры в культуральной среде, содержащей АФЭ на различные сроки культивирования, ч (M± m)		
	24	48	72
0,1	3,3± 0,35	3,7± 0,87	3,1± 0,47
0,3	3,5± 0,73	4,3± 0,35	3,9± 0,93
0,6	3,9± 0,33	4,3± 0,67	4,1± 0,77
0,9	4,1± 0,27 <sup>x</sup>	4,9±0,67	4,7± 0,25 <sup>x</sup>
1,1	4,3± 0,73 <sup>x</sup>	5,3 ± 0,71 <sup>x</sup>	4,9± 0,31 <sup>x</sup>
1,5	4,3± 0,19 <sup>x</sup>	5,5± 0,59 <sup>xx</sup>	4,9± 0,27 <sup>x</sup>
2,0	4,2± 0,71 <sup>x</sup>	5,5± 0,25 <sup>xx</sup>	4,7± 0,73 <sup>x</sup>
2,5	4,1 ± 0,29 <sup>x</sup>	5,3± 0,55 <sup>x</sup>	4,5± 0,67
Контроль–среда Игла MEM±СРКРС (10%)	2,9±0,23	3,8±0,47	3,2±0,29

Примечание: ИП–индекс пролиферации, АФЭ–апифитоэкстракт, СККРС-сыворотки крови КРС, <sup>x</sup>- p < 0,05, <sup>xx</sup>- p < 0,01

Из данных таблицы видно, что введение в состав среды апифитоэкстракта в количестве 0,9-1,1 мг/л оказывало по отношению к

клеточной культуре выраженное стимулирующее действие, увеличивая ИП в 1,6-1,67 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. При концентрации апифитоэкстракта в среде 0,1 мг/мл значения ИП клеточной культуры MDBK сопоставимы с таковыми в среде Игла МЕМ с 10% СККРС ( $p > 0,05$ ).

Клетки, выращенные в экспериментальной среде с апифитоэкстрактом, имели форму, характерную для данного вида клеток, с четко выраженными границами, без признаков дегенерации и морфологически не отличались от клеток, выращенных в контрольной среде.

Следует отметить, что введение в состав среды препарата на основе апифитоэкстракта позволяет избежать необходимости добавления индивидуальных аминокислот, а также антибиотиков, что имеет существенное отличие и преимущество по сравнению с известным способом культивирования клеток животных *in vitro* с использованием питательных сред на основе СККРС.

В следующей серии опытов изучали ростстимулирующую активность препарата на других линиях клеток: MDBK, ВНК-21/13-02, LEK и VERO.

Результаты изучения влияния апифитоэкстракта из биологически активной композиции «Вита-Форце» на различные линии клеток животных представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Индекс пролиферации различных клеточных линий культур клеток животных в питательной среде на основе АФЭ после 72 – часовой инкубации

Питательные среды	Значения ИП линий клеток ( $M \pm m$ )			
	MDBK	ВНК-21/1-02	LEK	VERO
Игла МЕМ + 1000 мг/л АФЭ	5,1±0,27 <sup>xx</sup>	4,2 ±0,35	4,6±0,25 <sup>x</sup>	4,5±0,33 <sup>x</sup>
Игла МЕМ+10% СККРС	3,1±0,23	3,7±0,45	3,5±0,51	3,4±0,21

Примечание: ИП – индекс пролиферации, АФЭ – апифитоэкстракт, СККРС – сыворотки крови КРС, <sup>x</sup> –  $p < 0,05$ , <sup>xx</sup> –  $p < 0,01$

Из данных таблицы видно, что испытываемая среда, содержащая изучаемый субстрат – экстракт апифитопрепарата «Вита-Форце», обладала достаточно высокой ростстимулирующей активностью, усиливая пролиферацию всех использованных линий клеток животного происхождения. При этом установлено, что внесение в ростовую среду испытуемого экстракта в количестве 1 г/л оказывало наиболее высокую пролиферативную активность для клеток линии MDBK и значение ИП которой составляло 5,1±0,27 против 3,1±0,23 в контроле, что в 1,64 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

На следующем этапе работы проводили исследования по изучению скорости образования монослоя у перевиваемых культур клеток MDBK в ростовой среде, содержащей апифитоэкстракт из натуральной биологически активной композиции «Вита-Форце». Результаты динамических

исследований показали, что скорость образования монослоя клеток была аналогична таковой в контрольной среде (Игла MEM с СККРС) и составляла 24 ч после посева исходной культуры.

В клеточном монослое, выращенном с добавлением в ростовую среду АФЭ из «Вита-Форце», морфологические изменения клеток по сравнению контролем не выявлены.

### 3.4 Кариологическая стабильность клеток MDBK, выращенных в АФЭ – содержащей ростовой среде при стационарном культивировании

Учитывая, что длительное культивирование клеток может индуцировать как фенотипические, так и генотипические изменения с последующей утратой их специфических культурально-морфологических и метаболических свойств, на следующем этапе работы проводили опыты по изучению пролиферативной стабильности MDBK, выращенных в ростовой среде, содержащей апифитоэкстракт из «Вита-Форце» при стационарном (длительном) культивировании.

Результаты исследований по изучению изменения клеточной массы в процессе культивирования и жизнеспособности клеток на различных стадиях пассирования представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Изменение биомассы и жизнеспособность клеток MDBK в процессе непрерывного монослойного культивирования

Число пассажей	Посевная концентрация, $\times 10^5$ (кл/мл)	Концентрация клеток в монослое через 72 ч, кл/мл. $\times 10^5$	Кратность увеличения биомассы	Жизнеспособность клеток (%)
1-5	3,0 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,5 <sup>xx</sup>	2,1	90,0 $\pm$ 3,0
6-10	3,0 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,1	2,05	89,7 $\pm$ 5,0

Примечание: <sup>x</sup>-p < 0,05, <sup>xx</sup>-p < 0,01

Из данных таблицы видно, что в течение первых 3 пассажей последовало увеличение степени размножения клеток, когда биомасса претерпевает 2,1 удвоений.

Начиная, с 6 пассажа происходило незначительное ослабление метаболического коэффициента культуры - кратность увеличения биомассы при пассажах 6 – 10 составляла 2,1 против 2,05 при 1-5 пассажах культур.

Таким образом, при длительном монослойном культивировании клеток MDBK на протяжении 10 непрерывных циклов установлена стабильность ростовых и морфологических свойств используемой линии клеток, выращенных в питательной среде, содержащей 1г/л апифитоэкстракта из «Вита-Форце».

Параллельно нами был проведен кариологический анализ перевиваемой линии клеток MDBK, культивируемых в апифитоэкстракт – содержащей ростовой среде после стабилизации ее биотехнологических характеристик на уровне 75 пассажа непрерывного монослойного

культивирования в оптимизированном технологическом режиме.

Результаты кариологического анализа, проведенного по стандартной методике путем подсчета хромосом в 160 метафазных пластинках, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Распределение хромосом в метафазных пластинках культуры клеток MDBK

Ростовая среда	Количество метафазных пластинок (%) и хромосом							
	36–40	41–45	46–50	51–55	56–60	61–65	66–70	71–75
Игла MEM с СККРС	8	7	6	5	4	7	4	6
Игла MEM с АФЭ	7	9	15	6	5	9	7	5

Примечание: СККРС-сыворотка крови крупного рогатого скота, АФЭ-апифитоэкстракт из экстракта «Вита-Форце».

Из данных таблицы видно, что число хромосом в клетках, выращенных в апифитопрепарат содержащей среде, колеблется от 36 до 75, а модальный класс метафазных пластинок – 51-56 хромосом при количестве метафазных пластинок с этим классом – 36%.

Модальный класс метафазных пластинок клеток линии MDBK, выращенных в присутствии СККРС, составил также 51-55 хромосом при количестве метафазных пластинок с этим классом 35%.

Из сопоставительного анализа данных таблицы 5 видно, что использование биодобавки из апифитопрепарата при культивировании клеток MDBK приводит к увеличению числа хромосом в модальных классах 51-55%, 56-60, 61-65 и 66-70% на 2%, 7%; 28% и на 75% соответственно.

Таким образом, использование биодобавки – АФЭ из «Вита-Форце» не оказывает существенного влияния, как на морфологию, так и на рост и кариотип клеток линии MDBK, что свидетельствует о сохранении стабильности ростовых, морфологических свойств и кариологической характеристики культуры.

Изучение влияния апифитопрепарат содержащей ростовой среды Игла MEM на вируспродуцирующую активность линии клеток MDBK, LEK, VERO проводили в отношении вирусов ИРТ и ПГ-3. В опыт брали культуры после образования полного монослоя. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 7.

Из представленных в таблице материалов видно, что наибольшее количество вирусной массы ИРТ и ПГ-3 было получено при использовании в качестве ростстимулирующей добавки в ростовую среду Игла MEM апифитоэкстракта из натуральной композиции «Вита-Форце» на линии клеток MDBK. При этом вирус ИРТ размножается значительно лучше по сравнению с вирусом ПГ-3 и его титр превышал контрольные значения в 1,13 раза (на 13%), титр ПГ-3 в 1,10 раза (на 10%) ( $p > 0,05$ ).

Таблица 7 – Репродукция вирусов ИРТ и ПГ-3 на перевиваемых линиях культур клеток MDBK, LEK, VERO, культивируемых в апифитопрепарат содержащей ростовой среде Игла MEM

Линии культур клеток	Ростовая среда	Титры вирусов, lg ТЦД 50/МЛ	
		ИРТ	ПГ-3
MDBK	Игла MEM+АФЭ	6,9 ± 0,3 <sup>xx</sup>	6,6±0,5
	Контроль (СККРС)	6,7±0,1	6,5±0,7
LEK	Игла MEM+АФЭ	6,8±0,3	6,5±0,1
	Контроль (СККРС)	6,7±0,1	6,5±0,3
VERO	Игла MEM+АФЭ	6,5±0,7	6,3±0,9
	Контроль (СККРС)	6,7±0,1	6,5±0,5

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизирована технология получения апифитоэкстракта из биологически активной композиции «Вита-Форце», а также сконструирована питательная среда на его основе, пригодная для культивирования клеток MDBK, LEK, VERO и обладающая биологическими свойствами, сравнимыми со свойствами питательной среды Игла MEM.

## 5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные исследования по оценке ростстимулирующей активности веществ аписогенного и фитогенного происхождения, изучения влияния их на антибактериальные, морфологические, кариологические и вируспродуцирующие свойства перевиваемых линий клеток *in vitro*, обобщение и анализ полученных данных, обосновывают следующие выводы:

1. Методом этанолового экстрагирования биологически активной добавки «Вита-Форце» при соотношении компонентов 1:3, длительности экстрагирования 21 суток и температуре  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , получен – АФЭ, который использован в качестве биологически активной добавки (биоактиватора) в культуральную питательную среду для выращивания клеток и репродукции на них вирусов.

2. Химический состав апифитоэкстракта представлен белками, углеводами, органическими кислотами, витаминами и аминокислотами (%): аспарагиновой (16,7), глутаминовой (13,1) кислотами, треонином (6,4), серином (1,3), пролином (6,4), валином (6,2), цистином (1,5), метионином (2,3), изолейцином (3,5), лейцином (8,2), тирозином (3,4), фенилаланин (4,7), лизином (3,4), гистидином (1,9), аргинин (2,3).

3. Максимальная переносимая и минимальная цитотоксическая концентрация хитозана (препарат для сравнения) и апифитоэкстракта для культур клеток MDBK, VERO, ВНК – 21/13/02 составляли более 400 мг/мл и 400-800 мг/мл для хитозана и более 900 и 1200 мг/мл для апифитоэкстракта соответственно.

Апифитоэкстракт в оптимальной концентрации (900-1000 мг/мл) не обладает токсичностью и не оказывает отрицательного влияния на

морфологические и ростовые свойства использованных линий клеток.

4. Установлено, что апифитоэкстракт обладает бактерицидной и бактериостатической активностью по отношению к контаминантам питательных сред *E.coli*, *St.aureus*, *B.subtilis* и мезофильным аэробным и факультативно анаэробным (КМАФАиМ) микроорганизмам; при этом минимальная бактериостатическая и минимальная бактерицидная концентрация для хитозана (препарат для сравнения) составляет 0,3 и 0,7 мг/мл и для апифитоэкстракта – 0,9 и 1,2 мг/мл соответственно.

5. Установлено, что внесение в питательные (ростовые) среды апифитоэкстракта из расчета  $1 \times 10^3$  мг/л повышала плотность клеток в 2,1 раза и индекс пролиферации (ИП) в 1,64 раза по сравнению с контролем. Добавление в ростовые среды апифитоэкстракта в концентрации 1 г/л (1000мг/л) обеспечивало деконтаминацию сред от аспорогенных и спорогенных контаминантов, что позволяет исключить из технологического процесса традиционных антибактериальных субстанций - антибиотиков.

6. Длительное пассирование использованных линий клеток (MDBK, LEK, VERO) в АФЭ – содержащей среде на протяжении 10 пассажей не оказывало отрицательного влияния на стабильность ростовых, цитоморфологических, кариологических и генетических свойств клеток животных.

7. Культивированные вирусы ИРТ и ПГ- 3 на питательных средах, содержащих апифитоэкстракт в количестве 1 г/л (1000мг/л), обеспечивало повышение репродукции вирусов, увеличивая титр вируса ИРТ в 1,13 раза (на 13%) и вируса ПГ-3 в 1,10 раза (10%) по сравнению с контролем.

## **6 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Для стимуляции пролиферативной активности клеток и репродукции вирусов на них, в качестве активатора клеточного метаболизма рекомендуется использовать – АФЭ, полученный из биологически активной композиции «Вита-Форце».

2. Применение АФЭ путем внесения его в ростовые (питательные) среды из расчета 1 г/л (1000мг/л), обеспечивает высокий уровень пролиферации клеток линий MDBK, LEK и VERO, повышает конечную плотность клеток в 2,1 раза и индекс пролиферации в 1,64 раза по сравнению с контролем.

3. Получение и применение АФЭ регламентируется разработанными нами «Методическими рекомендациями по получению и применению апифитоэкстракта из биологически активной композиции «Вита-Форце» для культивирования клеток и репродукции на них вирусов», утв. директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» А.И. Никитиным, 2016 г.

4. Полученный апифитоэкстракт – используется в лабораториях ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» для наращивания вирусной биомассы с целью получения вакцинных препаратов для профилактики вирусных болезней животных.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

(\* - публикации в изданиях, рекомендованных ВАК)

1. Плотникова, Э.М. Влияние гамма – стерилизации питательных сред на рост и развитие культур клеток / Э.М. Плотникова, Р.Н. Низамов, Гурьянов, **З.Г. Чурина** [и др.] // Ветеринария. – 2015 . – № 5. – С. – 57– 58.\*

2. Плотникова, Э.М. Способ повышения выживаемости облученных клеток MDBK, используемых при получении противовирусных вакцин / Э.М. Плотникова, Р.Н. Низамов, Р.Г. Фазлиахметов, **З.Г. Чурина** // Матер. 3 международного ветеринарного конгресса «Ветеринария на пути инновационного развития агропромышленного комплекса» – Алматы. – 2015. – С. 221–226.

3. Плотникова, Э.М. Биодобавка на основе апипродуктов в питательные среды для выращивания культур клеток и репродукции вирусов / Э.М. Плотникова, **З.Г. Чурина**, Р.Н. Низамов // Матер. Межд. научн. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» – Санкт-Петербург. – 2015. – С. 165–166.

4. Медетханов, Ф.А. О перспективах использования экстрактов грибов в качестве стимуляторов роста и развития животных / Ф.А. Медетханов, **З.Г. Чурина**, А.С. Соловьева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана.– Казань. – 2016. Т. – 228 (IV) – С. 71–73.\*

5. **Чурина З.Г.** Влияние апифитопрепарата на микробные контаминанты культуральных сред. / З.Г. Чурина // Ветеринарный врач – 2017. – № 4 С. 25 – 29. \*

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК	– аминокислота
АФЭ	– апифитоэкстракт
БАПП	– биологически активные продукты пчеловодства
ВЕРО (VERO)	– перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки
ВНК–21/13–02	– перевиваемая монослойная, суспензионная сублиния почки новорожденного сирийского хомячка
ВМС	– высокомолекулярные соединения
ГЛА	– гидролизат лактоальбумина
Игла MEM	– минимальная среда Игла
ИП	– индекс пролиферации
ИРТ КРС	– инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота
ИП	– индекс пролиферации
КК	– культура клеток
КОЕ	– колонии образующие единицы
КРС	– крупный рогатый скот
КМАФАиМ	– количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов
ЛЭК (LEK)	– перевиваемая культура клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота
МБсК	– минимальная бактериостатическая концентрация
МБцК	– минимальная бактерицидная концентрация
МДВК (MDBK)	– перевиваемая культура клеток почки крупного рогатого скота
MEM	– минимальная среда Игла
МК	– микробные клетки
ММ	– маточное молочко
МПД	– минимальная переносимая доза
МПА	–мясо-пептонный агар
МЦД	– минимальная цитотоксическая доза
МПБ	– мясо-пептонный бульон
ПГ–3	– парагрипп- 3
ПС	– питательная среда
СПК	– сыворотка плодов коров
СКПК	– сыворотка крови плодов коров
СККРС	– сыворотка крови крупного рогатого скота
ЦПД	– цитопатическое действие
ЭМБР	– сыворотка эмбрионов коров