

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,  
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

На правах рукописи

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:  
доктор ветеринарных наук  
Плотникова Э.М.

Казань-2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	4
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1 Основные компоненты питательных сред для роста и пролиферации культур клеток животных	10
2.2 Использование биологически активных веществ в качестве альтернативных стимуляторов роста клеток в культуральной среде	15
2.3 Высокомолекулярные соединения – потенциальные активаторы клеточного метаболизма <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	22
3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
3.1 Материалы и методы исследований	41
3.2 Результаты исследований	50
3.2.1 Возможности применения хитинсодержащих биодобавок в качестве активаторов в клеточной биотехнологии	50
3.2.2 Подготовка потенциальных активаторов метаболизма клеток для использования их в составе питательных сред	64
3.2.3 Оценка ростстимулирующей активности хитин, хитозансодержащих препаратов на пролиферативную активность перевиваемых культур клеток	68
3.2.4 Изучение токсичности, максимально переносимой (МПД), минимально цитотоксической (МЦД) концентрации (антимикробной активности апифитоэкстракта) хитин - хитозансодержащих препаратов в культуре клеток	77
3.2.5 Кариологическая стабильность клеток МДВК, выращенных в АФЭ - содержащей ростовой среде, при стационарном (длительном) культивировании	86

3.2.6	Изучение влияния криоконсервирования на биологические свойства культур клеток, выращенных на АФЭ - содержащей питательной среде	90
3.2.7	Влияние апифитопрепарата в составе питательных сред на репродукцию вирусов	96
4	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
5	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	102
6	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	103
7	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	105

## 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 и растительного происхождения [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 20,21].

Однако существует реальная опасность инфицирования сред прионами препаратов, полученных с использованием продуктов животного происхождения, поэтому государственным организациям, ведущим контроль за производством лечебно – профилактических препаратов, было предъявлено требование ограничения применения в производстве вакцинных препаратов и субстанций животного происхождения [23].

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, обладающие метаболитстимулирующей, ростстимулирующей и бактерицидной активностью [1, 24]. Исследованиями установлено, что внесение в ростовые (питательные) среды биополимеров (восковой моли) значительно усиливало пролиферацию культивируемых клеток животных (лимфоцитов и спленоцитов) в условиях *in vitro* [3,13].

Учитывая, что сочетание апипродуктов с фитопрепаратами приводит к усилению биологического действия отдельных компонентов [12]. Сотрудниками ФГБНУ «ФЦТР–БВНИВИ» была разработана хитинсодержащая натуральная биологическая активная композиции «Вита–Форце» [15], которая является уникальной, как по составу (более 400

химических соединений), так и по биологическому действию (метаболизм – рост – иммуностимулирующее, детоксицирующее, адаптогенное, антиоксидантное) в условиях *in vitro*. Есть полное основание предположить, что указанный апифитопрепарат может быть использован в качестве активатора метаболизма при культивировании клеток животных в искусственных условиях (*in vivo*) для репродукции вирусов при изготовлении вакцинных препаратов [155].

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, а также с малоизученностью вопроса о влиянии апифитопродуктов на рост и развитие клеток животных в искусственных условиях культивирования для вирусологических исследований, проведенные настоящие исследования являются актуальными.

## **1.2 Степень разработанности проблемы**

Сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ–ВНИВИ» установлено, что хитинсодержащие продукты пчеловодства обладают метаболизм – , иммуно – , гемопоз – и ростостимулирующим действиями 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 с использованием восковой моли [13], одного из компонентов композиционного препарата на основе продуктов пчеловодства [15, 96, 115]. Но вопрос о влиянии хитинсодержащего апифитопрепарата на перевиваемые клетки животных для репродукции вирусов остается неизученным.

## **1.3 Цель и задачи исследований**

Целью исследования 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 БАПП, впервые обоснована возможность применения этих соединений в качестве активаторов метаболизма культивируемых клеток животных. Впервые экспериментально подтверждена возможность получения апифитоэкстракта из хитинсодержащих 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; в первые оптимизированы условия монослойного выращивания перевиваемых линий клеток MDBK в питательной среде Игла MEM, содержащей 0,9 – 1,1 г/л апифитоэкстракта, обеспечивающая через 48ч 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 21.02.17г. «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 хитинсодержащего препарата из 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 более эффективную 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 целесообразного применения апифитопрепарата для стимуляции метаболизма перевиваемых линий клеток и репродукции на них вирусов, использована совокупность адекватных методологических приемов, доступные и сертифицированные методы,

включающие: морфологические, цитогенетические, вирусологические и статистические методы исследований.

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

1. Технология получения апифитоэкстракта 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 2013–2017г.;
- третьем Международном ветеринарном конгрессе «Ветеринария на пути инновационного развития агропромышленного комплекса» – (Алматы, 2015г.);
- Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны (Санкт–Петербург», 2015г.).

### **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 133 страницах компьютерного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, заключение, практические предложения и приложения.

Работа иллюстрирована 10 таблицами, 4 рисунками. Список литературы включает 263 литературных источников, в том числе 38 зарубежных авторов.

## 2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Основные компоненты питательных сред для роста и пролиферации культур клеток животных

Одним из важнейших компонентов питательных сред для культивирования клеток животных и репродукции вирусов в биотехнологии является сыворотка крови, которая обладает полифункциональными свойствами: стимуляция усвоения молекул, воздействие на клеточную мембрану, участие в регуляции плотности культуры и контактной ингибиции, стимуляция внутриклеточного содержания необходимых для роста клеток питательных компонентов, регуляция уровня внутриклеточных циклических нуклеотидов, стимуляция синтеза ядерных белков, активация ассоциированных с мембраной системы протеаз, перенос через мембрану низкомолекулярных компонентов [1,4,35,50,57, 68, 90, 98, 132,167,175, 179,].

Для получения более экономичных питательных сред при культивировании клеток *in vitro* используют более дешевые сыворотки, получаемые от телят, лошадей, свиней и оленей, которые оказались наиболее эффективными ростстимулирующими составляющими питательных сред [31,36,41, 116, 158,].

Различные клетки нуждаются в разнообразных компонентах сыворотки – глобулинах, стероидных гормонах, инсулине, фетуине и др. Сыворотка крови плодов коров (СКПК) богата фетуином и добавление ее к питательным средам кардинально изменяет их свойства, обеспечивает длительное культивирование клеток животных и человека, содержит повышенное количество эстрадиола, эстриола и прогестерона. Добавление 5–15% СКПК, сыворотки новорожденных телят и лошадей, т.е., оказавшихся оптимальными при выращивании различных клеток и вирусов, остается неизбежной необходимостью [66].

Ряд линий перевиваемых клеток при использовании в составе питательных сред сывороток крови лошадей, крупного рогатого скота и эмбрионального экстракта морфологически трансформировались, а для решения определенных задач научного и производственного характера оказалось необходимым получение постоянных линий клеток, не подвергающихся морфологической трансформации и сохраняющих нормальный (диплоидный) набор хромосом. Поставленной цели достигли одновременно несколько исследователей, исключивших из питательной среды эмбриональный экстракт и включивших в ее состав СКПК. Клетки в таких средах сохраняли диплоидный набор хромосом и хорошо размножались. [254, 259]. Значение СКПК не сводится только к высокому содержанию в ней фетуина – она бедна жирами и  $\gamma$ -глобулинами, оказывающими вредное действие на клетки.

Для культивирования клеток часто используют синтетические питательные среды с добавлением сывороток крови различных видов животных [47,54, 62, 73, 208,]. При этом следует иметь в виду, что сыворотки крови крупного рогатого скота могут быть контаминированы бычьими вирусами, микоплазмами, содержат антитела или неспецифические ингибиторы [245, 248].

СКПК широко используется при культивировании клеток и тканей как универсальная добавка к питательным смесям низкомолекулярных веществ, но ее применение имеет ряд недостатков: высокая стоимость, непостоянство состава и свойств и прочее. Для уменьшения расхода СКПК прибегают к замене ее сывороткой крови других видов животных, как фетальной, так и взрослых особей; сывороткой крови КРС с добавлением к ней других компонентов, либо удалением из нее отдельных составных частей; также добавляют очищенные факторы роста и гормоны к средам определенного состава с полным исключением нативной сыворотки.

Кроме сывороток крови КРС, в качестве заменителей СКПК, в составе питательных сред используют сыворотку крови лошадей. На культуральных

питательных средах, не содержащих сыворотку крови, может расти ограниченное число специально адаптированных клеток; такие среды считаются пригодными, если темп деления на них не более чем в два раза меньше темпа деления клеток в среде с 10% сыворотки крови коров [58].

Сыворотка крови животных, являясь важнейшим компонентом ростовой среды для большинства клеточных культур и играя роль физиологического буфера, является источником питательных веществ, способствует процессам адгезии, распластывания и миграции клеток, связывания и детоксикации токсических веществ и пирогенов питательных сред и продуктов метаболизма клеток. Полифункциональность сыворотки, по мнению ряда авторов, связана с ее многокомпонентностью [1, 57, 68, 90, 179].

В составе сыворотки – содержится 90 – 96% воды, 4 – 10% плотных веществ, минерального (1%) и органического (9%) происхождения. Минеральный состав сыворотки крови представлен NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, а также незначительным количеством соединений железа, меди, йода, цинка, кобальта, марганца и некоторых других элементов, находящихся в ионно – и молекулярно – дисперсном состоянии, а также в составе сложных органических соединений. Было показано, что концентрация ионов в сыворотке крови составляет в пределах Na<sup>+</sup> 268 – 460 мг, Cl<sup>-</sup> 98.9 – 140 экв/л, Ca<sup>2+</sup> 3.1 – 8.8 экв/л (Esber H. G. et al., 1973).

Органические вещества сыворотки крови представлены белками, углеводами и жирами, ферментами, гормонами, витаминами, иммунными телами и пигментами [56].

В настоящее время установлено, что плазма крови содержит около 100 различных белковых компонентов и других веществ. Согласно исследованиям [186], в сыворотке крови сельскохозяйственных животных содержатся следующие белки: 1) альбумины: 1, 2 и 3; 2) α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, α<sub>3</sub>, α<sub>4</sub> – глобулины, β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>, β<sub>3</sub> – глобулины и γ<sub>1</sub>, γ<sub>2</sub> – глобулины; 3) нуклеопротеиды; 4)

гликопротеиды; 5) белки – ферменты; 6) белки – гормоны; 7) белки – антитела.

Содержание общего количества белков в сыворотке крови животных различно: у птиц оно равно в среднем 5,0, у млекопитающих – 8%. Биологически активные вещества, содержащиеся в сыворотке, выполняют функции стимулятора пролиферации и адгезии клеток, а высокомолекулярные фракции сыворотки (альбумины,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулины) обладают протективными свойствами, что обуславливает ее присутствие в питательных средах, используемых для выращивания клеточных культур [89].

Для замены сывороток крови в питательных средах для культур клеток человека и животных могут быть использованы ростстимулирующие белки, выделяемые путем осаждения полиэтиленгликолем (молекулярная масса 4000–6000Д) из сывороток крови крупного рогатого скота, свиней, северных оленей и суягных овец [177].

Согласно данным Р.Я.Подчерняевой и др. [157], в сыворотке крови содержатся аминокислоты, полипептиды, аммиак, углеводы, глюкоза, фруктоза, гликоген, липиды и продукты их распада [191].

Количество глюкозы в крови животных колеблется в пределах от 40 до 260 мг %. Глюкоза в крови находится как в свободном, так и в связанном состоянии в виде комплексов с белками. В сыворотке содержится в небольших количествах гликоген (от 15 до 50 мг %) и всегда присутствуют, как продукты промежуточного обмена углеводы, молочная, пировиноградная, уксусная другие кислоты. В сыворотке присутствуют нейтральные жиры и продукты их распада – глицерин и жирные кислоты

При выведении и культивировании штаммов перевиваемых клеток, сыворотка крови начала применяться очень широко. При получении перевиваемых клеток, R. Chang [230] использовал 20% сыворотку крови человека, – 5% куриный эмбриональный экстракт, 60% – раствор Хэнкса.

Автор считает нежелательным смешивание сывороток крови разных доноров. Этому условия придерживался и W. Jordan [242] при получении штаммов перевиваемых клеток, используя среду, содержащую 35% сыворотки человека, 5% куриного эмбрионального экстракта и 60% раствора Хэнкса.

Для культивирования клеток Hela многие авторы предпочитали культуральные среды более простого состава, например, среду, впервые предложенную W. Dunham, F. Ening [232] включающую 40% нормальной сыворотки человека и 60% раствора Хэнкса или среду еще более простого состава: 20% сыворотки человека и 80% раствора Эрла [238]. Результаты испытания 15 различных сред с использованием сывороток крови человека, лошади и крупного рогатого скота показали, что лучшие результаты по ростостимулирующей активности получены при 10% концентрации сыворотки крови. При применении сред, содержащих нормальную лошадиную сыворотку и бычий, коровий эмбриональный экстракт, наблюдали более активное и длительное размножение фибробласт подобных клеток [62.]

В работе по получению перевиваемых клеточных штаммов из тканей кролика и куриного эмбриона была использована среда F 17, состоящая из 10% куриного эмбрионального экстракта, 20% нормальной лошадиной сыворотки и 70% солевого раствора Фишера. Отношение числа положительных результатов к числу отрицательных составило 3:20 [71]. Для получения линии перевиваемых клеток из тканей новорожденных швейцарских мышей использовали среду 199 с 10% лошадиной сывороткой [255].

Кроме того, включение в состав культуральной среды сыворотки плода коровы способствовало увеличению положительных результатов при попытках получения линий перевиваемых клеток [48,154, 156, 235, 236]. Тем самым, был предложен белковый компонент питательных сред, обеспечивающий оптимальные условия культивирования как первичных, так

и перевиваемых культур клеток человека и животных, что подтверждено и последующими многочисленными исследованиями.

## **2.2 Использование биологически активных веществ в качестве альтернативных стимуляторов роста клеток в культуральных средах**

Как было показано выше, сыворотка крови является необходимым компонентом большинства питательных сред для культивирования клеточных и органных культур. Сыворотка крови играет роль предохранительного физиологического буфера, участвует в процессе адгезии, распластывания и миграции клеток, является источником питательных веществ [60].

Сыворотка крови крупного рогатого скота (СККРС), лошадей и овец в составе питательных сред поддерживает рост и жизнеспособность первичных и перевиваемых клеток, но не оказывает заметного влияния на урожай вирусов при добавлении ее в поддерживающую среду для зараженных вирусом клеток [43]. Добавление сыворотки крови крупного рогатого скота в питательную среду при культивировании перевиваемых клеток, хронически инфицированных вирусом лейкоза КРС, не обеспечивает репродукцию и накопление этого вируса в культуре клеток.

Более качественными являются сыворотка крови эмбриона коровы, а также сыворотка крови ягнят и молодых телят, почек новорожденных крольчат, КРС и плодов коров (Патент РФ № 2520868) [107,148]. Они пригодны для получения перевиваемых линий клеток и для работы в биотехнологии (Патент РФ № 2460786 2012, [147]; Патент № 2455015 2011) [146, 253].

Недостатком сыворотки крови является то, что она дефицитна, имеет высокую стоимость, поэтому редко используется при производстве биопрепаратов для животноводства [59, 260].

В связи с тем, что при культивировании клеток требуется питательная среда со стабильными характеристиками, а сыворотка крови, к сожалению, весьма вариабельна по своим свойствам и, поэтому не отвечает современным требованиям промышленной биотехнологии [67]. С учетом этого в настоящее время в биотехнологии разработаны и предложены около 30 бессывороточных сред адаптированных доз, поддержания коммерчески важных клеточных линий (Hela, Vero, CHO, MDCK), а также стволовых клеток, гибридом и культур общего применения [59, 69, 171]. При этом производители предлагают, как заменители сыворотки крови животных-добавки, так и готовые к применению свободные от сыворотки питательные среды [44, 161, 194, 220,]. Следовательно, одним из основных требований к питательной среде, используемой при культивировании животных клеток, является уменьшение или исключение содержания в ней сыворотки крови [47]. Путем тщательного подбора и оптимального сбалансирования компонентов питательных сред, ряду исследователей удалось получить хорошие результаты культивирования клеток животных при использовании низких концентраций сывороток крови [5, 6, 45, 138,188, 263]. При этом установлено, что технологические показатели культур клеток, выращенных на малосывороточной среде, не уступают культурам, полученным на среде, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота [161].

Постоянное использование клеточных культур в качестве субстрата при изготовлении биопрепаратов и биологически активных веществ диктует необходимость разработки экономичных и доступных питательных сред, основу которых составляют аминокислоты и пептиды, получаемые протеолитической обработкой белковых веществ (гидролизаты). Благодаря простоте и универсальности технологии создания сред на основе белковых гидролизатов, в настоящее время налажено производство значительного количества белковых гидролизатов животного происхождения (казеина, молока, цельной крови, сыворотки крови, эмбрионов, внутренних органов, мышечной ткани), а также пептон Витте, бактопептон [46]. Наиболее



эффективными из перечисленных компонентов оказались бактопептон, пептический гидролизат легкого коровы и пептон Витте, растворимые протеины. Получены гидролизаты растительного происхождения (сои, гороха и других) [130,199].

Наибольшее распространение в практике культур клеток получила среда с гидролизатом лактальбумина – ГЛА [88]. Однако он малодоступный импортный препарат, поэтому его дефицитность вызывает необходимость создания отечественного заменителя. Простота изготовления, невысокая стоимость и высокие питательные свойства гидролизатных сред представляют интерес для биотехнологов [195]. Поиск для них дешевого белоксодержащего, неприщевого, полноценного по азотистым компонентам, экономичного и доступного в больших количествах сырья остается актуальным для производства бессывороточных питательных сред [165].

В качестве питательного субстрата и источника сырья для получения питательных основ используют периферическую кровь, используя ее кислотные и ферментативные гидролизаты разработана, технология приготовления ряда питательных сред на основе сухих эритроцитных гидролизатов используемых в качестве белковой основы питательных сред [169]. Н.Г.Шептун [222] предложил использовать гидролизаты отходов переработки сыворотки крови животных (фибрина, отходов изготовления препаратов иммуноглобулинов и их смеси), а также гемогидролизат – продукт ферментативного гидролизата сгустков крови КРС или человека (отходов производства  $\gamma$ - глобулина). Для культивирования первичных клеток в среду, состоящую из солевого раствора Хэнкса, добавляют гидролизат сгустков крови [18, 75, 152, 178].

С целью выращивания однослойных первичных культур и субкультур клеток разработаны среды из гидролизатов белков казеина и обраты молока. При культивировании почечного эпителия кроликов на гидролизате обраты молока с добавлением 2% сыворотки, Дмитриева Э.А. [9,65] наблюдала образование монослоя через 3 дня после посева [92, 203].

Установлено, что бактопептон, мясной бульон и бактотриптоза в концентрации 0,5% заменяют сыворотку в минимальной среде Игла МЕМ. По данным Круман И.И. и др., (1981) [98,103], для культивирования клеток ВНК–21 лучшей оказалась среда F–12 с содержанием 0,55% бактопептона и 300 мг/мл детергента Дарван.

Keay L., Schlesinger S. [244] с успехом применяли для культивирования клеток 3Т3, Hela, не утративших чувствительности к вирусам, бессывороточные среды на основе среды Иглы МЕМ с добавлением бактопептона и инсулина. Разработана полусинтетическая среда с основой из ферментативного гидролизата яичного белка [27].

Учитывая, что белки мышечной ткани являются источником всех незаменимых аминокислот (АК), установили пригодность гидролизата мышечной ткани КРС (перевар Хоттингера) в качестве источника азотистого питания для культур клеток животного происхождения и возможность выращивания на ней однослойных культур клеток некоторых видов животных [180,221]. Позднее Swim Н. [144, 180, 258] была разработана технология изготовления сухого ферментативного гидролизата мышечных белков (ФГМ) для выращивания культур клеток, которая благодаря хорошей растворимости и содержанию 18 свободных АК, в том числе незаменимых, а также низкомолекулярных пептидов, ФГМ вполне отвечает требованиям биотехнологии для размножения клеток млекопитающих вне организма. Поэтому питательную среду на основе ФГМ [99], рекомендуют использовать при культивировании клеток. При добавлении к среде гидролизатов ГЛА, ФГМ установлен хороший рост клеток ВНК–21 в суспензии. На этой основе разработана среда, в которой 80% АК среды RPMI-1640 заменено гидролизатами ГЛА и ФГМ, которая при оптимальных условиях обеспечивает получения устойчивых урожаев клеток ВНК–21 [71]. Являясь хорошим источником азотистого питания клеток, ФГМ и его варианты (ФГМ–1, ФГМ–2, ФГМ–3 и ФГМ–4) в сывороточной среде обеспечивают хорошее накопление клеток при различных методах выращивания по

питательной ценности не уступая среде Игла MEM и поэтому успешно может быть использована для серийного выращивания различных линий клеток, а для культивирования лимфобластоидных и миеломных клеток рекомендована среда ФГМ-4 [34, 180,211].

Учитывая существование реальной опасности инфицирования прионами препаратов, полученных с использованием продуктов животного происхождения, в настоящее время были проведены исследования, связанные с возможностью применения для вирусологических целей белковых гидролизатов растений [199], что позволяет существенно уменьшить как риск контаминации препаратов животными патогенами, так и стоимость среды.

Культивирование однослойных первичных культур клеток на питательных средах из гидролизатов белков гороха и сои показало, что в них хорошо репродуцировали различные и типы вируса ящура с сохранением исходных биологических свойств [28,46]. При этом гидролизат рисовой муки обладал более высокой ростстимулирующей активностью по сравнению с гидролизатом соевой муки [138, 228].

Проводя исследования по усовершенствованию способа выращивания клеток тканей животных и человека, А. Карелл (1913) впервые применил экстракт эмбрионов, плазму крови, обогащенную экстрактом эмбриона для ускорения их роста (<http://www.biotehnolog.ru>).

I.L. Bell и В.Н. Rolingon (1929) сообщили о том, что они культивировали фрагменты органов на поверхности сгустка, образованного куриной плазмой и эмбриональным экстрактом на ч стекле со сменой питательной среды каждые 2–3 дня. Продолжая аналогичные исследования, [262] выращивали мезонефрос куриного эмбриона на поверхности плотного субстрата, образованного 1–2% агаром, эмбриональным экстрактом, сывороткой и солевым раствором, которые стимулировали рост клеток, как позвоночных, так и беспозвоночных животных, что свидетельствует от универсальности характера их митогенной активности.

При замене сыворотки специфичными для данного клеточного типа набором гормонов, гормоноподобных ростовых факторов, транспортных белков и факторов, способствующих прикреплению и распластыванию клеток, G.Sato (1980) и его последователи добились роста различных клеток в стандартных средах. При этом многие клетки сохраняли способность к синтезу характерных для дифференцированного состояния веществ.

Одним из перспективных источников получения смесей АК являются белки дрожжей [124,125].

В 1986 г И.И.Фриндлянская (1986) [207] использовала стандартную среду для бессывороточного культивирования нормальных клеток кератиноцитов мыши в бескальциевой среде Игла с добавлением экстракта из гипофиза. С.Н.Гаврилов[34], А.А.Нариманов [123] на культурах миеломных клеток мышей и фибробластов сирийского хомячка показали, что экстракт плацентарной ткани человека обладает биологической активностью, которая способствует прикреплению клеток к субстрату и влиянию на их распластывание и морфологию. С.Д. Иржанов [81] для обогащения предложили в синтетические питательные среды добавлять 0,1 – 0,5% альбумина бычьей плазмы, 5 – 10% куриного эмбрионального экстракта, глюкозу, витамин С, глутамин, ГЛА и т.д. Изучая адаптацию вируса Ауески, выращивали клетки на покровных стеклах в минимальной среде Игла в модификации Дюльбеко (ДМЕМ), содержащей 10% СКПК и 5% куриного эмбрионального экстракта. Х.З.Гаффаров соавт. [43, 49], выращивая клетки почки поросенка в среде с 0,5% ГЛА на растворе Хэнкса, добавляли 10% сыворотки КРС, 15% сыворотки крови теленка и 3% эмбрионального экстракта. Н.И.Гурьяновым [63, 237,] выявлена хорошая ростстимулирующая активность экстракта из остаточных сгустков крови плодов коров в сочетании с амниотической жидкостью КРС. На основании полученных данных автор рекомендовал их к использованию в составе сред для культивирования клеток. Хазиев Л.Р. (2014)[210, 234, 247] считает, что одним из хорошо изученных ростовых факторов является эпидермальный

фактор роста – ЭФР. Н.А.Одинцовой и соавт. [135] выявлено содержание ЭФР – подобных веществ в водно–солевых и кислотно–этанольных экстрактах из тканей морских беспозвоночных (морской еж, морская звезда, голотурия, двустворчатый моллюск, мечехвост). Установлено, что наибольшей активностью обладает кислотно – этанольный экстракт из тканей мидии, некоторые фракции которого обладают выраженным митогенным эффектом [124,125].

Состав ферментативных белковых гидролизатов казеина, крови, молочной сыворотки, мяса, дрожжей и других, представляет собой главным образом смесь АК и пептидов, выполняют важную роль в стимуляции роста клеточных культур разработана комбинированная питательная среда, состоящая из 0,25 % ФГБК–с и 0,1% ФГП–с для выращивания перевиваемых клеточных культур ВНК–21–2/17, РК–13, RS–13, RS–88 и вируса ящура, СС – 76, болезни Гамборо и энтерита норок. Рядом исследователей установлено, что белковую питательную основу можно получить из придатков и семенников, субпродуктов животных, мясокостной и рыбной кормовой муки, органов и мышечных тканей ластоногих, селезенки, кишечной массы домашних птиц, поджелудочной железы, а также из сыворотки крови животных, в том числе северных оленей [52, 94, 120, 157,164,181, 209].

Установлена возможность использования устаревших концентратов тромбоцитов, заготавливаемых для переливания крови, а также вещество, стимулирующее рост культуры тканей и клеток, получаемое измельчением сгустка бычьей крови в присутствии водно–солевого раствора. Исследователями Великобритании предложен простой метод получения синтетических липопротеинов низкой плотности (сЛПНП). Добавка сЛПНП в культуральную среду обеспечивала более высокие концентрации холестерина (важного компонента питательных сред для клеточных культур), чем добавка 10%–ной сыворотки и применяемых в практике клеточных культур липидных добавок. Установлено, что сЛПНП стимулировали клеточную пролиферацию линий NSO и U937 в бессывороточной среде.

Таким образом, синтетические липопротеины низкой плотности представляют собой новую и перспективную искусственную альтернативу природным липопротеинам низкой плотности множественного назначения.

### **2.3 Высокомолекулярные соединения – потенциальные активаторы клеточного метаболизма *in vivo* и *in vitro***

Одним из важнейших достижений мирового научно – технического прогресса в области изыскания новых биологически активных веществ (БАВ), за последние тридцать лет стало изучение, создание и внедрение биотехнологию, клеточную и генную инженерию высокомолекулярных соединений (ВМС) – биополимеров (белков и нуклеиновых кислот) [140].

Высокомолекулярные соединения – это полимеры и биополимеры, молекулы которых состоят из большого числа повторяющихся групп атомов или звеньев одинакового, или различного химического строения [183].

ВМС делят на природные (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды) и синтетические (полиэтилен, полибутадиен, фенолоальдегидные смолы и др.). Биологическое значение природных ВМС определяется тем, что они составляют структурную основу всех живых организмов и участвуют практически во всех процессах жизнедеятельности [104,186].

Физиологически активные полимеры (ФАП), с точки зрения фармакологии, представляют уникальную возможность создания нового почти идеального типа биопрепарата будущего. Очень важно, что при таком «полимерном» подходе к созданию биопрепаратов можно использовать богатейший опыт и знания по применению естественных биологически активных соединений, которые самой природой предназначены действовать на определенные стадии биохимических процессов в организме [215].

Механизмы проявления собственной физиологической активности могут включать в себя как важнейшую составляющую физические эффекты,

связанные с большой массой, осмотическим давлением, конформационными перестройками и др., а также могут быть связаны с межмолекулярными взаимодействиями с биополимерами организма [24,153]. По структуре эти полимеры могут быть разделены на пять больших групп:

1. Нейтральные полимеры с неспецифической активностью, физическая активность которых обусловлена их физико–химическими свойствами и почти не специфична в отношении конкретной структуры, которая может быть, поэтому весьма различной. Важным свойством таких полимеров является незначительное взаимодействие со структурными элементами организма.

2. Поликатионы, физиологическая активность которых зависит, в первую очередь, от плотности и распределения положительных зарядов.

3. Полианионы, активность которых определяется преимущественно отрицательным зарядом.

4. Синтетические аналоги нуклеиновых кислот; в них вместо углерод–фосфатного скелета биополимеров находится цепочка синтетического полимера, заряженного или электронейтрального.

5. Полимеры с различными другими функциональными группам. Важно отметить, что в отличие от полимеров прививочного типа, в них нельзя выделить какой – либо структурный элемент (фармакофор). [22,33,159,166, 182].

Наиболее широко применяемый в медицине полимер 1–й группы – декстран, метаболизируясь клетками макроорганизма, превращается в глюкозу и усиливает размножение клеток крови [168].

Способность поливинилпирролидона и других полимеров этой группы к комплекс образованию с биополимерами организма повышает физиологическую активность полимеров [182].

Физиологическая активность 2–й группы полимеров – поликатионов весьма многообразна и связана, главным образом, взаимодействием их

поликатионами организма (белки, нуклеиновые кислоты, ряд полисахаридов), усиливая действия последних [29].

Среди поликатионов, физиологическую активность которых изучали с целью выяснения возможности их применения как ФАП, можно выделить ионины. При проникновении внутри клетки ионины, взаимодействуя с рибосомами, стимулируют РНК – синтезирующие белки и ферменты, усиливая, тем самым, рост и развитие клеток *in vitro* [184].

Как известно, большинство биополимеров живых организмов является ионокатионами и, поэтому биологическая активность поликатионов разнообразна и подобна активности гликопротеинов и нуклеиновых кислот [251].

Весьма разнообразной биологической активностью обладает сополимер дивинолового эфира с ангидридом – пириновый сополимер, который в условиях *in vivo* обладает противоопухолевой, противовирусной, иммуномодулирующей, интерферогенной, лейкопоэзстимулирующей, противогрибковой, антибактериальной и иммуноадьювантной активностью [227].

Одно из наиболее важных преимуществ полимеров – это селективность по отношению к немногим типам – клеток или органов, и не менее важным является использование полимеров в качестве носителей биологически активных веществ – стимуляторов метаболизма клеток *in vivo* и *in vitro* [95].

В целом проблема целенаправленного транспорта ФАП в культивируемые клетки *in vivo* и *in vitro* еще не решена, хотя различные пути, ведущие к этой цели, обоснованы теоретически и подтверждены экспериментально.

Учитывая, что для длительного культивирования клеток крови и стволовых клеток костного мозга необходим ряд клеточных факторов, включающих цитокины (SCF, IL-3, IL-6.GM-CSF) [13], использование полимеров (поли – (И), поли – (С) и ДЭАЭ – декстрана), являющихся



индукторами цитокинов и интерферона [102], позволили бы достичь значительных успехов в биотехнологии, клеточной и генной инженерии.

Ранние работы в области макромолекулярной химии и клеточной инженерии были посвящены изучению влияния полимеров на синтез интерферона в культивируемых клетках. В результате этих исследований было установлено, что такие полианионы как полинуклеотиды и пираны способны активировать клетки на синтез интерферона [256]. Хорошими активаторами макрофагов в культуре клеток являются полимерные соединения – пиран и мурамилпептид [190].

В клеточной и генной инженерии все более широкое применения находят липосомы, представляющие собой липопротеины низкой плотности, которые поступив в организм, достаточно быстро улавливаются клетками печени, легких, мозга и другими органами ретикулоэндотелиальной системы (моноцитами, макрофагами), стимулируя метаболические функциональные свойства клеток [239].

Таким образом, синтетические липопротеиды низкой плотности представляют собой новую и перспективную искусственную альтернативу природным липопротеинам низкой плотности множественного назначения (<http://www.cbo.ru>).

Биополимерами являются многие природные высокомолекулярные соединения, из которых построены клетки живых организмов и межклеточное вещество, связывающее их между собой. К биополимерам относятся белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды (сложные углеводы) и так называемые биополимеры, например, липопротеины (комплексысодержащие белки и липиды) и т.д. Природный биополимер хитин – это азотосодержащий полисахарид (аминополисахарид). Мономерами полисахаридов являются моносахариды: глюкоза, фруктоза, галактоза др. [176, 189].

Большинство резервных полисахаридов (крахмал, гликоген, инулин) являются важнейшими компонентами пищевых продуктов, выполняя в

организме человека функцию источника углерода и энергии. Самый распространенный в мире биополимер – это структурный полисахарид растений – целлюлоза. Хитин является вторым после целлюлозы по распространенности структурным полисахаридом. По химическому строению, физико-химическим свойствам и выполняемым функциям хитин близок к целлюлозе. Хитин – это аналог целлюлозы в животном мире [136].

Элементарной частицей (мономером) хитина является N–ацетил – В–Д – глюкозамин. Термин глюкозамин означает, что мономер хитина является производным глюкозы, а точнее, В – Д – глюкозы [37, 213].

Кардинальной задачей современной фармакологии является повышение эффективности терапии. Успехи последних лет в области медицины привели к активации собственных средств защиты организма. Поиск новых биологически активных и создание более совершенных форм уже известных активных препаратов и задачей доставки активных препаратов непосредственно в орган – мишень является актуальной задачей физиологии и фармакологии. Макромолекулярный подход к усовершенствованным уже применяющимся в практике биологически активных веществ (БАВ) может привести к созданию препаратов, обладающих повышенной эффективностью – физиологически активных полимерных соединений (ФАП), которые самой природой предназначены действовать на строго определенных стадий биохимических процессов в клетке организма.

ФАП условно можно разделить на две группы, определяющие проявление физиологической активности. В ФАП первой группы входят физиологически активные полимеры, механизм действия которых обусловлен кооперативными реакциями ФАП с биополимерами организма вторая группа – это специально сконструированные полимеры, состоящие из комбинации полимера – носителя и низкомолекулярного или высокомолекулярного ФАП. В полимерах второй группы используется физиологически активная часть присоединенного вещества и лишь иногда

полимера – носителя, наличие которого позволяет значительно улучшать свойства ФАП в результате его включения в полимерную систему, которая обладает физиологической активностью присоединенных веществ и некоторыми биологическими характеристиками [29, 184].

Создание ФАП отнюдь не заменяет применение уже известных и поиска новых эффективных низкомолекулярных биологически активных веществ. При использовании собственной физиологической активности полимеров можно получить также биологически активные вещества, которые вообще не существуют среди низкомолекулярных соединений [243].

Поскольку литература по ФАП к настоящему времени и рассчитывает более 1500 оригинальных статей, обзоров и монографий и, полимеры рассматриваются лишь поскольку, насколько они служат носителями ФАВ, ограниченный объем раздела и предмет тематики не позволяет нам охватить всю литературу, поскольку в данном разделе нас интересует вопросы, касающиеся биополимеров.

Живой организм представляет собой открытую, саморегулируемую и самовоспроизводящуюся гетерогенную систему, важнейшими функциональными веществами которой являются биополимеры – белки и нуклеиновые кислоты [32].

Не только форма живых существ, но и сама возможность их существования определяется наличием в организме различных биополимеров. Состав биополимеров по существу аналогичен у всех живых существ – от бактерий до человека. Внутри клетки, ограниченной от внешнего мира мембранной оболочкой, находятся водные растворы нуклеиновых кислот (так называемых информационных молекул), различные белки и углеводы. Кроме того, в растворах присутствуют в виде ионов низкомолекулярные неорганические соли, необходимые для осуществления и регулирования специфических биологических функций биополимеров [102].

В некоторых случаях можно рассматривать строение биополимеров, не принимая в расчет их реакций в растворе с низкомолекулярными ионами,

однако при изучении физиологии живых организмов нельзя пренебрегать взаимодействием биополимеров с ионами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , поскольку строение и осуществление функций нуклеиновых кислот и биополимеров во многом определяются присутствием именно этих ионов.

Каждый организм самостоятельно синтезирует присущие ему биополимеры, причем в качестве мономерных структурных единиц используется всего несколько типов молекул, общих для всех живых существ.

Если начать классифицировать все известные биополимеры в зависимости от той роли, которую они играют в организме, то можно разделить их на три условные группы. Первую составят структурные биополимеры, к которым относятся полисахариды и некоторые белки, например, белки шерсти. Во вторую группу войдут биополимеры, необходимые для осуществления биологических функций, таких, например, как ферментативный катализ или транспорт кислорода. К таким полимерам принадлежат, главным образом, белки. К третьей группе относятся нуклеиновые кислоты, в которых закодирована информация о всех белках, синтезируемых в организме [76, 137].

Можно сказать, что главнейшими биополимерами, необходимыми для поддержания жизни на Земле, являются биополимеры второй и третьей групп, т.е. белки, синтезируемые на основе информации, закодированной в нуклеиновых кислотах, а также сами нуклеиновые кислоты. Именно эти биополимеры являются объектом наибольшего числа исследований, проводимых сейчас во всем мире. Изучают их первичное строение, стереоструктуру, функции, а также зависимость между биологическими функциями и строением [200, 202, 226].

Как известно, нуклеиновые кислоты построены из моонуклеотидов, структурными единицами белков служат аминокислоты. Количество биополимеров, построенных из этих мономеров, может быть чрезвычайно велико. Так, для нуклеиновых кислот, построенных всего из 4 видов

нуклеотидов, при степени полимеризации 1000 возможно 10 600 вариантов молекул. При синтезе белков используется около 20 различных аминокислот [241].

Информация о белках закодирована в нуклеиновых кислотах с помощью, так называемых кодонов. Все известные кодоны суммированы в таблице кодонов [242].

Первый биополимер, изготовленный на Земле – это пчелиный воск-продукт выделения восковой железы пчелы, который образуется при потреблении пчелами меда и пыльцы [105].

В организме насекомых, ракообразных, грибов и диатомовых водорослей природный биополимер хитин в комплексе с минеральными веществами, белками и меланинами образует внешний скелет и внутренние опорные структуры [20, 250].

Уникальные свойства биополимеров – хитина и его производных (высокая сорбционная способность, биосовместимость, усвояемость, нетоксичность, бактерицидность, метаболизм стимуляция и т. д.), неисчерпаемые запасы сырья (панцири морских и пресноводных ракообразных, грибов, покрова насекомых) обуславливают все возрастающий интерес к их производству и практическому применению биомассы мицеллярных и высушенных грибов [2, 205].

Одомашненные и поддающиеся разведению насекомые (тутовый шелкопряд, медоносные пчелы и комнатные мухи) являются богатыми сырьевыми источниками хитина [128, 224].

Молекула хитина состоит из  $N$ -ацетил- $\beta$ - $D$ -глюкозаминовых звеньев. В живых организмах может образовываться хитин, а хитозан является производным хитина (Hood M.A., 1977). Молекула хитозана состоит из  $N$ - $D$ -глюкозаминовых звеньев. Хитозан получают из хитина деацетилированием с помощью щелочей. Деацетилирование – это реакция обратная ацетилированию, т.е. замещение атомом водорода ацетильной группы ( $CH_3CO$ ). Поэтому, в отличие от хитина, хитозан может иметь

структурную неоднородность, обусловленную неполной завершенностью реакции деацетилирования. Таким образом, при неполном ацетилировании молекула хитозана состоит из случайно– связанных N– ацетил –  $\beta$ -D– глюкозаминовых звеньев (основные звенья) и  $\beta$ -D– глюкозаминовых звеньев (остаточные звенья) [39].

Наличие реакционноспособных функциональных групп в структуре молекул хитина и хитозана обеспечивает возможность получения разнообразных химических модификаций пригодных для использования в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве, медицине и т. д. [11].

Меланины – высокомолекулярные водонерастворимые пигменты, широко распространены в растительных и животных организмах; определяют окраску покровов, и их производных (волос, перьев, чешуи) у позвоночных, кутикулы у насекомых, кожуры некоторых плодов и т.д. [38].

Потенциальные источники хитина многообразны и широко распространены в природе. Общая репродукция хитина в мировом океане оценивается в 2.3 млрд. т в год, что может обеспечить мировой потенциал производства 150 – 200 тыс. т хитина в год. Наиболее доступным для промышленного освоения и масштабным источником получения хитина являются панцири промысловых ракообразных. Возможно также использование гладиуса (скелетной пластинки) кальмаров, скорпионы, каракатицы, биомассы мицелиальных и высших грибов. В России массовым источником хитинсодержащего сырья является камчатский краб и краб – стригун, годовой вылов которых на Дальнем Востоке составляет до 80 тыс. т., а также углохвостая креветка в Баренцевом море [118].

Хитин, входящий в состав панциря ракообразных, образует волокнистую структуру ракообразных сразу после линьки панцирь мягкий, эластичный, состоящий только из хитинбелкового комплекса, но с течением времени происходит его упрочнение за счет минерализации структуры в основном карбонатом кальция. Таким образом, панцирь ракообразных

построен из трех основных элементов – хитина, играющего роль каркаса, минеральной части, придающей панцирю необходимую прочность и белков, делающих его живой тканью [8, 21,70,133, 185].

Массовые источники панцирь – содержащего сырья (ПСС) имеются во многих странах, но промышленное производство хитина и хитозана освоено преимущественно в Японии, где суммарно по данным на 1998г выпускается до 2500 т хитина и хитозана в год. В США выпускается около 1000 т хитозана и других модификаций хитина в год. Отечественная промышленность начала осваивать производство хитина и хитозана в 1970–1980 гг. и к настоящему времени общий объем их выпуска достигает 80 т в год [212].

Хитин и его деацелированное производное – хитозан привлекли широкого круга исследователей и практиков благодаря комплексу химических, физико–химических и биологических свойств и неограниченной воспроизводимой сырьевой базой [74].

Полисахаридная природа этих полимеров обуславливает их сродство к живым организмам, а наличие реакционноспособных функциональных групп (гидроксильные группы, аминогруппа) обеспечивает возможность разнообразных химических модификаций, позволяющих усиливать присущие им свойства или придавать новые в соответствии с предъявляемыми требованиями [30, 55,187].

Интерес к хитину и хитозану связан с их уникальными физиологическими и экологическими свойствами, такими как биосовместимость, биодеструкция, физиологическая активность при отсутствии токсичности, способность к селективному связыванию тяжелых металлов и органических соединений, способность к волокну– и пленкообразованию и др. [3,19, 79, 206].

Процесс получения хитина заключается в удалении из сырья последнего минеральных солей, белков, липидов, пигментов, поэтому качество хитина и хитозана зависит во многом от способа и степени удаления

этих веществ, а также от условий проведения реакции деацетилирования. Требования к свойствам хитина определяются областям их практического использования, которые весьма разнообразны. В России, как и в других странах, нет единого стандарта, но существует деление на хитин и хитозан технический, промышленный, пищевой и медицинский [23,40, 87,100, 134].

Согласно данным, приведенным в монографии [213], известно следующие направления их применения: атомная промышленность, для локализации радиоактивности и концентрации радиоактивных отходов. Медицина, в качестве шовных материалов, рано – и ожогозаживляющих повязок; в составе мазей, различных лечебных препаратов, как энтеросорбент. В сельском хозяйстве для производства удобрений, защиты семенного материала и сельскохозяйственных культур, а так же при очистке воды служит как сорбент и флокулянт и др.

Хитозан обладает многими свойствами, которые делают его привлекательным для широкого применения: в качестве корма для животных питания, продуктов биомедицины, сельского хозяйства и окружающей среды. Антибактериальные, противогрибковые и противовирусные свойства делают хитозан особенно полезным для биомедицинского применения.

Фактически многие люди принимают диетические добавки, полученные из хитозана, для улучшения здоровья, и рядом преимуществ, включая способность к стимулированию роста *Bifidobacteria*– полезной с кишечной бактерии [15, 252].

В результате многочисленных исследований к настоящему времени обнаружены ряд биологических эффектов хитозана: антиоксидантный, антибактериальный и противовирусный, регенирующий, иммуностимулирующий, антитоксичный и другие [38].

Хитозан показал себя как эффективный радиопротектор, сорбент токсинов и тяжелых металлов в организме, иммуномодулятор в ветеринарии, а также других областях. На сегодняшний день известно более 70 направлений применения хитозана [204].



Известно, что панцири ракообразных достаточно дорогостоящее сырье и, несмотря на то, что разработано более 15 методов получения из них хитина, одомашненные и поддающиеся разведению насекомые, в силу своего воспроизводства, могут обеспечить большую биомассу, содержащую хитин. К таковым относятся тутовый шелкопряд, медоносная пчела и комнатная муха [126,127].

Потенциальным источником пчелиного хитозана служит кутикула, содержащая хитин. Сырьем для получения хитина и хитозана из пчелиных – может, служит подмор пчел, погибших, главным образом, в период зимовки и осыпавшихся на дно улья. Летом их гибель гораздо значительнее, чем зимой, но менее заметна, поскольку пчелы погибают вне улья. Пчелы осеннего вывода, не выполняющие интенсивную работу, хорошо переносят зимовку и живут 8–9 месяцев [106].

За счет широкого распространения пчеловодства в нашей стране существует возможность получать хитиновое сырье в значительных масштабах. Ежегодная сырьевая база подмора пчел является новым перспективным источником хитозана насекомых наряду с традиционными видами сырья.

Существуют различные виды химической модификации хитозана насекомых для его перевода в водорстворимую форму, но наиболее перспективным является создание низкомолекулярного хитозана. Хитин, полученный из пчел, представляет собой комплексную субстанцию с меланином, обладающую рядом биологических свойств [145,148,150,151].

Исследования хитозана из подмора пчел в России привели к созданию нового продукта с уникальными свойствами, названного апизаном (пчелозаном) [117, 212].

Пчелиная семья – это уникальная биофабрика, производящая мед и воск, прополис и обножку, маточное молочко и пчелиный яд. Подмор – это природное сырье, имеющее в своем составе белок, хитин, меланин, воск, витамины и другие вещества. Объемы подмора, пригодного для

промышленной переработки, оцениваются в десятки тонн в год из расчета содержания в России 3 млн. семей пчел.

Рядом исследователей были проведены работы их изучению химического состава экстракта пчел. Объектом исследований служил CO<sub>2</sub>-экстракт, полученный из подмора пчел, представленного компанией «Тенториум». Для выделения из подмора пчел биологически активных веществ, была использована «сверхкритическая» экстракция, которая применяется обычно для извлечения компонентов из различных видов растений и зерен. Состав экстрагируемых компонентов обычно является весьма гетерогенным и сильно зависит от условий проведения процесса экстракции. Обычно эфирное число для пчелиного воска составляет 66–86.

Число флавоноидных и других фенольных (14–16%) соединений – величина, полученная спектрофотометрическим методом. Обращает на себя аномально высокое значение содержания витамина С–0,5– 0,7 мг на 1 г экстракта. Для сравнения – у цитрусовых оно составляет 0,4– 0,6 мг на 1 г. Аскорбиновая кислота, присутствующая в исследуемом экстракте, имеет большое значение для его использования в лечебно- профилактической практике [3].

Апизан полностью растворим в 1%-ной уксусной кислоте, способен связывать большое количество органических водорастворимых веществ, в том числе бактериальные токсины, образующиеся в толстом кишечнике.

Апизан является уникальным сорбентом, он обладает исключительной способностью эффективно удерживать влагу. Молекула апизана имеет положительный заряд, в то время как липиды кожи – отрицательный. Апизан абсолютно не токсичен, не накапливается в верхних слоях кожи, безвреден для особо чувствительных областей [212].

Обогащенные продукты питания апизаном могут использоваться с целью снижения высоких уровней холестерина в крови, фактора риска при заболеваниях сердца [74].

Пленки хитозана были использованы для предотвращения влияния сырости, уменьшения бактерий и увеличения срока годности при хранении скоропортящихся продуктов, таких, как свежие фрукты и овощи. Доказано, что при покрытии свежей клубники хитозановой пленкой срок хранения ягод увеличивается от одного до пяти дней и более. Огурцы, помидоры, дыни и фрукты, восприимчивые плесни, также могут быть сохранены при помощи такой пленки [30, 37].

Таким образом, пчелиной подмор является перспективным источником получения высококачественного аписана медицинского, косметического и пищевого назначения, а также ряда побочных продуктов, таких, как кормовой белок и меланин, природный краситель [263].

Учитывая, что сочетание препаратов хитозана с веществами зоогенной и фитогенной природы приводит к существенному усилению биологических свойств природного биополимера, в закрытом акционерном обществе «Биопрогресс» было организовано производство биологически активных веществ (БАВ) из нетрадиционных видов сырья, таких как: гидробиоты (крабы, кальмары, криль мидии, водоросли), насекомые (пчелы, мухи), растительное сырье (травы и хвойные, элеутерококки), пищевые и пекарные дрожжи.

На основе хитозана и фитопрепаратов (бурых водорослей, кальмары, фикуса, экстракта сбора лекарственных трав, мяты перечной, подорожника, ромашки лекарственной, зверобоя, тысячелистника, а также водного экстракта сибирской пихты) в указанном предприятии налажено производства «Абисорб», «Фитохитодез», «Ламихит», «Фукохит», обладающие бактерицидным, регенерирующим, детоксицирующим, противовоспалительным, иммуностимулирующим, антиоксидантным, метаболизм – и гемопозстимулирующим свойствами.

С учетом последних достижений в области производства биологически активных веществ из нетрадиционного сырья – апипрепаратов и фитопрепаратов, в отделе радиобиологии ФГБНУ «ФЦТРБ–ВНИВИ» (г.

Казань) была сконструирована биологически активная композиция «Вита–Форце» (Патент № 2324361 РФ, МПС С1 /А.В.Иванов, Р.Н.Низамов и др.) [149], содержащая мед, прополис, пергу, обножку, пчелиной расплод, восковую моль, пчелиный подмор и травяную муку, обладающая иммуностимулирующим, детоксицирующим, радиозащитным, адаптогенным, антокидательным и метаболитстимулирующим эффектами.

Поскольку предметом исследований настоящей работы является изучение возможности применения биополимеров в биотехнологии, представляли интерес вопросы, касающиеся стимуляции клеточного метаболизма в условиях *in vivo* и *in vitro*, т.е. влияния указанных высокомолекулярных соединений на клеточный метаболизм (рост, развитие, пролиферацию, репродукцию) как в условиях организма (*in vivo*), так и в условиях искусственного выращивания (*in vitro*).

Одной из наиболее серьезных задач, связанных с получением разного рода биологических тканей из исходных клеток в сочетании с полимерами и макромолекулярными агрегатами, является активация клеток [12]. Высказывание большинства исследователей сводится к тому, что конструирование искусственных систем, обладающих способностью активировать клетки и их развитие, может оказать самую существенную помощь при массовом культивировании клеток *in vitro* [61,67].

В отличие от синтетических и природных полимеров, биополимеры представляют собой высокомолекулярные соединения, являющихся структурной основой всех живых организмов, которые обеспечивают их нормальную жизнедеятельность, выполняя разнообразные биологические функции. К биополимерам относятся белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды [174]. Известны также смешанные биополимеры, например, липопротеины (комплексы, содержащие белки и липиды), гликопротеины (соединения, в молекулах которых от олиго – или полисахаридные цепи ковалентно связаны с пептидными цепями) липополисахариды (соединения, молекулы которых построены из липидов, олиго – и полисахаридов) [14, 77].

Важнейшим механизмом действия природных биополимеров на организм, в частности, хитозана, является его способность ускорять начало и интенсивность процессов репродукции стволовых клеток костного мозга [78]. Поскольку ряд продуктов пчеловодства (прополис, пчелиный подмор, пчелиный расплод, воск, восковая моль и т.д.), в своем составе содержат хитин и хитозан, (составные компоненты апифитопрепарата «Вита – Форце»), представляет интерес изучение влияния их на клеточной метаболизм в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Результаты иммуноморфологических исследований органов и телят, стимулированных путем 5 – дневной дачи им 0,25% – ного прополисного молока показали увеличение массы тела в 1,3 раза, количества тимоцитов – в 1,16 раза, Т– и В – лимфоцитов – в 1,05 раза по сравнению с контролем [143]. Аналогичные данные были получены в опытах на утках [64].

Применение смеси апипрепарата (прополиса) с фитопрепаратом («Эракондом») в условиях *in vivo* приводило в 1,25 – и 1,44 – кратному увеличению Т – хелперов и В – лимфоцитов в органах иммуно – и гемопоеза овец, вызывало активацию размножения в кишечнике бифидо – и лактобактерий в 1,66 и 2,12 раза при торможении роста эшерихий, стафилококков и клостридий [82, 108, 109, 111, 216, 218].

Введение в организм плотоядных «Апистимулина–А» (препарат на основе пчелиной перги) в дозе 20–25 мг на голову приводило к 1,9 – 2,2–кратному повышению количества иммунокомпетентных клеток–плазмобластов в селезенке и лимфатических узлах животных [97]. Результаты изучения действия биологически активных продуктов пчеловодства (экстрактов и растворов прополиса, пчелинового яда и маточного молочка) *in vitro* на инфузории, дафнии, личинок комаров и плодовую мушку показали стимулирующее действие на клетки гидробионтов, ускоряя развитие на различных этапах онтогенеза [16, 163]. Применение прополиса и цветочной пыльцы на фоне иммунизации телят против стрептококкоза вызывало иммуноморфологические изменения в

органах иммунопоза, сопровождавшихся усилением размножения Т – и В – лимфоцитов, тимоцитов, спленоцитов с одновременным увеличением тимусного и селезеночного индексов [110].

Изучение миелограммы костного мозга цыплят, получавших в рационе прополисное молочко и бифидумбактерин показало повышение количества клеток зернистого и эритроцитарного ростка, моноцитов и плазмоцитов, превышая контрольный уровень в 1,2–1,62 раза [223].

В опытах, проведенных на организменном уровне (*in vivo*) по изучению влияния различных композиционных форм продуктов пчеловодства (мед+прополис, мед+цветочная пыльца, мед+пшеничные отруби) на рост и развитие установлено, что самые высокие показатели роста развития и сохранности поголовья наблюдали в группе животных, получавшей композицию мед+прополис+пшеничные отруби, в которой указанные показатели превышали контрольный уровень в 1,35–1,42 раза [112]. При этом установлено также, что указанная композиция из продуктов пчеловодства вызывала выраженное повышение активности Т– и В–лимфоцитов при одновременном увеличении содержания их в периферической крови, усиливала размножение клеток и увеличение массы мышечной ткани.

Результаты сравнительных опытов по изучению влияния различных композиционных форм апифитопродуктов (мед, перга, прополис, цветочная пыльца в сочетании с пшеничными отрубями и кумысом) на соматические, кроветворные, стволовые клетки костного мозга и бифидобактерий показали, что композиция мед+пшеничные отруби стимулировала развитие бифидобактерий в 2,09, лактобактерий – в 2,08 раза с одновременным угнетением развития стафилаккоков, клостридий кандиды. При этом наиболее выраженными метаболит – стимулирующими свойствами по отношению к соматическим (мышечным) и иммунокомпетентным (Т – и В – лимфоциты) клеткам обладала композиция: мед+прополис+цветочные пыльца+мумие+кумыс, которая способствовала повышенной прироста живой

массы в 1,3 раза, количества Т– лимфоцитов – в 1,45 раза, В – лимфоцитов – в 1,62 раза, Т–хелперов – в 1,81 раза.

Ф.Г.Юмагужин и др. [225], изучая влияние апипрепарата «Апирой» на развитие клеток восковой железы пчел установил, что использованный препарат оказывал ростстимулирующее действие на железистые клетки пчел. Пероральное поступление в организм мышей апипрепарата (прополиса) в течение 7 дней в дозе 2 мл/мышь вызывало усиление пролиферации клеток костного мозга, превышая контрольные значения в 1,97 раза ( $p < 0,01$ ), увеличивало число спленоцитов в селезенке – в 2,04 раза, повышало среднесуточный прирост живой массы птиц [80, 219].

Наряду со способностью апипрепаратов стимулировать клеточный метаболизм и пролиферацию клеток органов и тканей животных *in vivo* и *in vitro*, они обладают одновременно важнейшим свойством – ингибировать рост и размножение патогенных и условно патогенных микроорганизмов (стафилококков, стрептококков, диплококков, вирусов, грибов, эшерихий, сальмонелл, микобактерий туберкулеза и т.д.) [42, 82, 113, 114, 162, 196, 217].

Первые сообщения бактерицидных, бактериостатических свойств прополиса появились в печати в 1948г [86]. Последующие исследования отечественных и зарубежных исследователей подтвердили высокую антимикробную активность препаратов из продуктов пчеловодства (прополиса, воска, цветочной пыльцы, меда, цветочной пыльцы и маточного молока, меда+прополиса, меда+цветочной пыльцы, прополисного молочка) [10, 197].

Таким образом, из анализа приведенных в обзоре литературы материалов видно, что важнейшим компонентом питательных сред для культивирования клеток в искусственных условиях (*in vitro*) является сыворотка крови животных, которая содержит все необходимые компоненты для роста и развития клеток. Однако при культивировании клеток требуются питательные среды со стабильными характеристиками, а сыворотка крови, к

сожалению, весьма вариабельна по своим свойствам, дефицитна и, в большинстве случаев, контаминирована микроорганизмами микробной, грибковой, вирусной природы и прионами, поэтому не отвечает современным требованиям промышленной биотехнологии. Разработаны и предложены около 30 бессывороточных сред, заменителей сывороток крови-добавки, гидролизаты животного происхождения. Учитывая существование реальной опасности инфицирования препаратов, полученных с использованием продуктов животного происхождения, в настоящее время были проведены исследования, связанные с возможностью использования для вирусологических целей белковых гидролизатов растений, что позволяет существенно уменьшить как риск контаминации препаратов животными патогенами, так и стоимость среды. Однако по химическому составу и питательным свойствам гидролизаты сои и муки далеки от оптимальных.

Вместе с тем, в последнее время наиболее перспективным направлениям в биотехнологии, клеточной и генной инженерии является применение высокомолекулярных соединений (ВМС), представленных полимерами и биополимерами.

Наиболее высокой биологической активностью обладают природные биополимеры – хитин и хитозан, полученные от ракообразных (хитозан) и насекомых (апизан), которые, проникая в клетки макроорганизма и взаимодействуя с рибосомами, стимулируют РНК – синтезирующие белки и ферменты, усиливая, тем самым, рост и развитие клеток.

Ценнейший биополимер – хитозан, обладающей уникальными свойствами (биосовместимость, легкоусвояемость, нетоксичность, метаболитстимуляция, бактерицидность, содержание в составе белков, углеводов, аминокислот, макро – и микроэлементов и т.д.) обуславливает возрастающий интерес к нему не только фармакологов, терапевтов, геронтологов, физиологов, но и биотехнологов.

Учитывая высокую биологическую активность природных биополимеров, в последнее время специалистов по биотехнологии клеточной



и генной инженерии привлекают хитинсодержащие апипрепараты, полученные на основе продуктов пчеловодства. Особый интерес для биотехнологов представляет работы, выполняющие [25, 101, 122], которые установили возможность стимуляции миоцитов, спленоцитов при применении в качестве добавок к питательным средам апипрепаратов (препараты восковой моли – первого естественного биополимера, полученного на Земле), маточного молочка и перги.

Как видно из анализа приведенной литературы, биологическое действие апипродуктов значительно усиливается при сочетанном применении их с веществами растительного («Эраконд», пшеничные отруби, мумие) и животного (кумыс) происхождения.

Однако эти исследования единичны и поэтому 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 мало изученностью влияния хитин и хитозансодержащих апипродуктов на рост и развитие клеток животных в искусственных условиях культивирования (*in vitro*) для вирусологических исследований, нами были проведены настоящие исследования.

### **3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **3.1 Материалы и методы исследований**

Работа выполнена в отделе культур клеток и питательных сред ФГБНУ «Федеральный Центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» в течение 2013–2017 гг. согласно государственной программе НИР (№ гос. регистрации 01200202602).

В ходе работы были использованы следующие материалы:

Культуры клеток: Для оценки ростовых свойств разных сывороток крови и экстрактов *in vitro* использовали перевиваемые клеточные линии MDBK, LEK, и VERO из коллекции ФГБНУ «ФЦТРБ – ВНИВИ» (г. Казань).

Перевиваемые культуры клеток хранили в жидком азоте при  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  
 Линии диплоидных клеток: MDBK – перевиваемая линия клеток почки эмбриона крупного рогатого скота, полученная Madin S., Darby N. [246]; VERO – перевиваемая линия клеток почки африканской зеленой мартышки, полученная Yasumura Y., Kawakita Y. в 1992 г. [85]; ВНК–21/13–02 – перевиваемая линия клеток почки новорожденного сирийского хомячка, полученная на Щелковском биокомбинате, 2004 г. LEK – перевиваемая культура клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота.

Ростовые и поддерживающие питательные среды для культур клеток и растворы: 0,5% раствор гидролизат лактальбумина (ГЛА) на растворе Хэнкса (НПО «Вектор», Россия); среда Игла MEM (pH 7,5–7,6) с глютамином (НПО «Вектор», Россия), синтетическая среда 199 (НПО «Вектор», Россия); сбалансированный раствор Хэнкса по стандартной прописи pH 7,2–7,4; раствор трипсина, раствор трипсина и Версена; стерильная нормальная сыворотка крупного рогатого скота, сыворотка плодов коров.

Все растворы готовили на деионизированной воде сопротивлением 10-18Мом.

Антибиотики: энроксил 5%, ципрофлоксацин, цефтриаксон, стрептомицина сульфат, бензилпенициллина натриевая соль, канамицин.

Приборы и оборудование: Biologicalthermostat BT 120; CO<sub>2</sub> – инкубатор BINDER, шейкер INFORSAGCH – 4103 BIOTTMINGEN (Ecotron), сухожаровой стерилизационный шкаф ШСС 1000 ПР, стерилизатор паровой ГК – 100 – 3, установка для получения деионизированной воды Milli-Q, морозильник – ларь «POSIС – СВЯЯГА», мембранные фильтры фирмы «Millipore», центрифуга K70–D, магнитные мешалки: VEBMLWPRUFGRATE-WERKMEDINGENSITZFREITALTypRH – 3, MM–5, MM3M, микроскоп NikonTS100 – FMFA33400, сосуды Дьюара,

биоохранилище ХБ – 05, аквадистиллятор, автоматические микропипетки (одноканальные), камера Горяева, предметные и покровные стекла. Кроме того, использовали пипетки автоматические на 200мкл, 1000мкл, 10мл, колбы на 0,25л с резиновыми пробками.



Рисунок 1 - Прибор Stat Fax 3300, биохимический анализатор USA.

Химические реактивы: колхицин, ледяная уксусная кислота, эфир, краситель азур – эозин по Романовскому – Гимзе, метиловый спирт, раствор хлорида натрия рН 7,2 – 7,4;

Потенциальные стимуляторы роста культивируемых клеток in vitro: водные и этаноловые экстракты подмора пчел, прополиса, личинок восковой моли, перги, обножки, воска, травяной муки и натуральной биологически активной композиции «Вита–Форце», биополимеры коммерческого и собственного изготовления – хитозан и апизан.

Вирусы и штаммы. 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), выделенные из мышечной ткани коров, используемых в биотехнологии. Для оценки вирусрепродуцирующих 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 (Патент РФ № 2556121 С 1) [150,170].

На первом этапе получения апиэкстрактов проводили подготовку вышеперечисленного технологического сырья.

Для этой цели собирали свежих погибших пчел, трутневого расплода, личинок восковой моли без признаков плесени и разложения. Сырье просеивали через сито с крупными ячейками, затем материал подсушивали в сухожаровом шкафу при температуре +40–45<sup>0</sup>С. Сухой материал подвергали гомогенизации на шаровой мельнице или электрокофемолке. Степень дисперсности контролировали микроскопически, которая должна составить в пределах 60–90мкм. Полученный порошок упаковывали в бумажные пакеты по 25–50 г., подвергали стерилизации путем автоклавирования при 100<sup>0</sup>С и давлении 1,0–1,5 атм. Простерилизованные пакеты с гомогентами указанных апипрепаратов, а также травяную муку и порошок препарата «Вита–Форце» заливали 70% этанолом в соотношении 1:3, закрывали пробками и выдерживали смеси порошки + этанол в течение 21 суток при комнатной температуре. 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. Полученные растворы экстрактов разводили стерильным физиологическим раствором до исходной концентрации и использовали в качестве добавки в ростовые питательные среды.

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



Рисунок 2 - **а** (с лева) – коммерческий препарат хитозана, **б** (в центре)– 75%–раствор апизана, **в** (с права)– раствор апифитоэкстракта.

Клетки выращивали в условиях стационара в стеклянных флаконах емкостью 250мл, флаконах Карреля (диаметром 55мм), на 24– и 6–луночных пластиковых панелях для культивирования клеток, пенициллиновых флакончиках. Маточные культуры выращивали в стеклянных матрасах емкостью 200 мл. Испытуемые экстракты добавляли в питательные среды в 10%–ной концентрации в соответствии с Каталогом специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных (2011) [84], с добавлением антибиотиков (цефтриаксона, ципрофлоксацина, канамицина сульфата, стрептомицина сульфата, бензилпенициллина натриевой соли) по 100 Ед/мл и без добавления их.

Эффективность посева оценивали по доле прикрепления к субстрату клеток через 6 ч после начала инкубирования. Дальнейший учет результатов

культивирования проводили через каждые 24 ч в течение 7 суток с помощью гемоцитомера.

Пассирование культур клеток и линий диплоидных клеток проводили с коэффициентом рассева 1:2 – 1:3. Клетки отделяли от стекла смесью (1:1) 0,25%-го раствора трипсина и 0,02%-го раствора Версена при комнатной температуре.

Пролиферативную активность культур (индекс пролиферации – ИП) оценивали с помощью показателя  $C_2$  (долевое выражение отношения количества клеток на  $V$ -сроке инкубации ( $U_1$ ) к посевной дозе клеток ( $U_n$ ) по формуле  $C_2 = U_1/U_n$  [66].

Подсчет производили при увеличении микроскопа: окуляр 7, объектив 20, по всей площади камеры, четырехкратно, каждый раз, заряжая камеру вновь, для подсчета брали только те клетки, которые расположены в камере, в границах, очерченных сеткой (225 больших квадратах). Подсчитывали только клетки с хорошо выраженным ядром и неповрежденной цитоплазмой, конгломераты клеток, количество которых четко не выражено, принимали за одну клетку. Когда концентрация клеток в суспензии была большая, и подсчет был затруднен, суспензию предварительно разводили питательной средой до удобной концентрации.

Число клеток в 1 мл среды определяли по формуле:

$$X = (a \times 1000 \times 2) \div 0,9, \text{ где:}$$

$X$  – число клеток в 1 мл;

$a$  – среднее число клеток в 4х пробах;

1000 - число кубических миллиметров в см;

2 – коэффициент разведения суспензии раствором красителя;

0,9 – объем камеры Горяева в кубических миллиметрах.

Для упрощения подсчета среднее количество клеток в одной сетке умножали на 2200. Если суспензию предварительно разводили в 2, 3 или 5 раз, число клеток в камере умножали на разведение, а затем на 2200.

Жизнеспособность клеток в суспензии определяли с помощью 0,5% водного раствора трипановой сини (в 100 мл бидистиллированной воды растворяли 500 мг краски, после этого раствор фильтровался через бумажный фильтр). При этом методе живые клетки не окрашивались, а мертвые окрашивались в синий цвет.

Процент жизнеспособности клеток в суспензии определяли по формуле: 
$$\frac{\text{общее число клеток} - \text{число мертвых клеток}}{\text{общее число клеток}} \times 100$$

Митотический индекс определяли по формуле:

$$\text{МИ} = \frac{M \times 1000}{KL\%}, \text{ где}$$

МИ – митотический индекс

M – сумма митозов

KL – сумма клеток

Криоконсервирование как первично–трипсинизированных, так и перевиваемых клеток проводили по стандартной схеме: охлаждение со скоростью 1°С /мин до (–70)°С, затем ампулы погружали в жидкий азот.

Для консервирования линий клеток применяли защитную среду, состоящую из питательной среды (50%), сыворотки крови крупного рогатого скота (40%) и диметилсульфоксида (10%). Глицерин и ДМСО стерилизовали автоклавированием при 1,5 атм. в течение 1 ч.

Рекриоконсервацию клеток проводили на водяной бане при 37°С.

Долю жизнеспособных клеток определяли, как отношение числа клеток, невосприимчивых к красителю (1%-ный раствор трипанового синего), к общему числу клеток в анализируемом образце.

Препараты для рутинного цитогенетического обследования первичных линий клеток готовили по общепринятой методике (Moorhead P. et.al., 1960).

Для определения модального класса и интервала изменчивости по числу хромосом в первичных и перевиваемых линиях клеток анализировали по 100 метафазных пластинок на разных уровнях пассажей культур.

Приготовление препаратов хромосом для цитогенетического анализа проводили по методу Р. Moorhead [249], который предусматривает накопление в культуре клеток с помощью колхицина метафазных пластинок, обработку клеток гипотоническим раствором, фиксацию препаратов и их окрашивание.

За 4–6 ч до окончания выращивания клеток в культуральный флакон вводили колхицин в дозе от 0,4 мкг/мл. Через указанное время питательную среду сливали, а на монослой клеток наслаивали теплый раствор (38°C), состоящий из 0,25%-ного трипсина и 0,2%-ного Версена в соотношении 9:1. Через 5–10 минут, когда клетки начинали отслаиваться от стекла, раствор Версена с трипсином удаляли, а клетки суспендировали в 6–8 мл гипотонического раствора.

В качестве гипотонического раствора использовали смесь питательной среды Игла с деионизированной водой (1:5) [67]. Гипотонизация длилась от 10 до 25 минут. Суспензию клеток в гипотоническом растворе переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость сливали, а на осадок осторожно по стенке пробирки, чтобы не разбить осадок, добавляли фиксатор, состоящий из одной части ледяной уксусной кислоты и трех частей метилового спирта. Первая фиксация длилась 20–30 минут при 4°C, после чего клетки ресуспендировали пипетированием и центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин. Повторная фиксация длилась 15–20 минут. Количество фиксирующей жидкости зависло от количества осадка, и колебалась от 2 до 5 мл. По окончании фиксации клетки ресуспендировали в небольшом количестве фиксатора; одну–две капли суспензии клеток наносили на охлажденное предметное стекло и подсушивали над пламенем.



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, Кит–Тароцци.

Чувствительность культур клеток, выращенных на различных средах с использованием испытуемых потенциальных активаров - апифитопрепаратов определяли вирусологическими методами к парвовирусу крупного рогатого скота типа I (штамм «Parvo 32459»), герпесвирусу типа I (ИРТ) (вакцинный штамм «ТК–А (ВИЭВ) – В2») вирусу парагриппа–3 (штамм «SF–4»). Исследования проводили совместно с сотрудниками лабораторий вирусологии с.н.с., к.в.н. Каримуллиной И.Г.

Титры вирусов рассчитывали по методу Reed L., Muench H., [257] и выражали в  $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$  соответственно.

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

## 3.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.2.1 Возможности применения хитинсодержащих биодобавок в качестве активаторов в клеточной биотехнологии

Известно, что для нормального роста и развития клеток в макроорганизме (*in vivo*) имеются оптимальные условия (наличие 8 незаменимых аминокислот: изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, фенилаланин, триптофан, валин), обеспеченность углеводами, витаминами, микроэлементами, гормонами, ферментами и соответствующие значения рН (7,0-7,4).

Изолированные от внутренней среды организма клетки животных сохраняют основные требования к создаваемой искусственной среде (*in vitro*). При этом установлено, что для роста и развития клеток вне организма требуется, кроме вышеперечисленных, еще пять аминокислот: аргинин, глютамин, гистамин, тирозин, цистин [244]. Установлено, что синтез белка и размножение клеток в культуре происходит при концентрации незаменимых аминокислот в клетках не менее 0,01- 0,04мМ. При концентрации аминокислот ниже указанного уровня, несмотря на наличие резервов в питательной среде, образование белков, размножение и рост клеток (*in vitro*) прекращается.

Для нормального роста клеток *in vitro* важным компонентом питательной среды являются витамины, принадлежащие, в основном, группе В: никотинамид, тиамин, пантотенат, пиридоксаль, рибофлавин, фолиевая кислота, никотиновая кислота, холин, инозитол, биотин, а также витамины А, Д, К, Е.

В качестве источника энергии в питательных средах используют углеводы и, чаще всего, Д-глюкозу. Клетки используют углеводы для синтеза некоторых заменимых аминокислот (аланина, серина, аспаргиновой и глютаминовой кислот), а также для синтеза жирных и нуклеиновых кислот.

Кроме глюкозы в список активных сахаров, в состав питательных сред вводят еще и галактозу, маннозу, фруктозу, Д-глюкозу, глюкозо - L-фосфат, глюкоза- 6 фосфат. На рост клеток *in vitro* оказывают положительные влияния сложные сахара - крахмал и гликоген.

Известно, что гормоны оказывают выраженное действие на клеточную пролиферацию и, что для поддержания роста клеток *in vitro* необходимы гормоны, связанные с белками сыворотки, а также неорганические соли, низкомолярные синтетические вещества, сывороточные или серозные компоненты.

Несмотря на общие закономерности, установленные в развитии и размножении клеток вне организма (*in vitro*), каждая отдельная клеточная культура проявляет свои специфические особенности метаболизма, что сопряжено значительными трудностями при подборе сред питательных сред с оптимальным составом и диктует необходимость поиска универсального типа биопрепаратов, удовлетворяющих требованиям современной биотехнологии.

Одним из важнейших достижений мирового научно-технического прогресса в области изыскания биологически активных веществ (БАВ) за последние 30 лет стало изучение, создание и внедрение в биотехнологию, клеточную и генную инженерию высокомолекулярных соединений (ВМС)-биополимеров или физиологически активных полимеров (ФАП), представляющих уникальную возможность создания почти идеального типа биопрепарата будущего [139]. Обладая весьма разнообразной биологической активностью, биополимеры при проникновении внутрь клеток и взаимодействуя с рибосомами, стимулируют РНК - синтезирующие белки и ферменты, усиливая, тем самым, рост и развитие клеток [184], обладая одновременно, лейкопоэзстимулирующей, иммуноадывантной, иммуномодулирующей, интерферогенной, цитокинстимулирующей, противоопухолевой, противовирусной, антибактериальной и противогрибковой активностью [227].

Исследования состава и биологических свойств апипрепаратов, содержащих биополимеры – хитин и хитозан, показали, что в апипродуктах содержатся десятки и сотни соединений, микроэлементов, витаминов, аминокислот, углеводов, вещества флавоноидной и терпеноидной природы, фитонциды, ненасыщенные ароматические кислоты, микроэлементы: медь, кобальт, калий, натрий марганец, цинк, кальций, барий, титан, никель, хром, ванадий, олово, витамины: А, В, С, Д, Е, глюкоза, фруктоза, коричный спирт и др.

Именно такой состав апипрепаратов обеспечивает благоприятное комплексное действие на клетки организма: метаболизм стимулирующее, трофическое, мембранотропное, бактерицидное, бактериостатическое, фунгицидное, ростстимулирующее, пластические (регенерация тканей - клеточной кооперации макроорганизма) [7]. К числу апипродуктов, оказывающих преимущественно метаболическое действие, следует отнести мед, обножку, пергу, маточное молочко, прополис. Химический состав, которых представляет собой композицию биологически ценных соединений, включающих присутствие богатого спектра веществ, названных «нутриентами» и полностью усвояемых клетками *in vivo* и *in vitro*: моно- и олигосахара, аминокислоты, органические и жирные кислоты, макро- и микроэлементы, витамины и другие эссенциальные продукты.

Установлено, что биологическое действие апипродуктов значительно усиливается при сочетанном применении их с веществами растительного («Эраконд», пшеничные отруби, мумие) и животного (кумыс) происхождения.

С учетом вышеуказанного, сотрудниками ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» разработана натуральная хитинсодержащая биологически активная кормовая добавка «Вита-Форце», содержащая комплекс апипродуктов: мед, прополис, пергу, обножку, пчелиный яд, пчелиный расплод, маточное молочко, восковую моль и их личинки, воск, пчелиный подмор и травяную муку, являясь уникальной как по составу (более 400 химических соединений), так и

по биологическому действию (метаболизм-, - ростстимулирующее, иммуностимулирующее, детоксицирующее, антиоксидантное, адаптогенное, противорадиационное) в условиях *in vivo* и *in vitro*. Поэтому есть полное основание предположить, что данный препарат может быть использован в качестве ростстимулирующего фактора при культивировании клеток животных в искусственных условиях (*in vitro*) для репродукции вирусов при изготовлении вакцинных препаратов.

В связи с тем, что в состав препарата «Вита-Форце» входят компоненты, представляющие собой апипродукты, используемые в медицине и животноводстве как в отдельности, так и в сочетании друг с другом, а также с фитопрепаратами в качестве пищевых и кормовых добавок, считаем необходимым более детально освещать их химический состав и биологические свойства, поскольку алгоритм предпринятых исследований предполагает изучение влияния на метаболизм клеток в культуре как в сочетании их друг с другом, так и отдельности компонентов, входящих в состав композиции апифитопрепарата.

Один из важнейших компонентов, входящих в состав апифитопрепарата - это пчелиный яд, представляющий собой комплекс высокомолекулярных (энзимы) и низкомолекулярных (пептиды) белковых веществ. В состав пчелиного яда входят 18 из 20 обязательных аминокислот (аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, лизин, аргинин, глютаминовая и аспарагиновая кислота, триптофан, пролин, тирозин, цистеин, метионин, фенилаланин, гистидин). Пептиды, входящие в состав пчелиного яда, играют большую роль в организме, стимулируя различные биохимические процессы, участвуя в белковом, жировом, гормональном, минеральном, водном и других обменах.

Ведущим пептидом в яде является мелитин, состоящий из 26 аминокислот. Кроме участия во многих метаболических процессах, мелитин обладает противовоспалительным, антибактериальным, радиозащитным действием, стимулирует рост и развитие

иммунокомпетентных клеток костного мозга, тимуса и селезенки, стимулирует плодовитость самок, подавляет рост грамположительных и грамотрицательных микробов, увеличивает поверхностную активность мембран. Б.Н.Орловым и др. [141] описано 19 сторон механизма действия пчелиного яда, важнейшим из которых для биотехнологии являются влияние на синтез белка, углеводов, ферментов, рост и размножение клеток и тканей.

Другой важнейшей компонент, входящий в состав апифитопродукта «Вита-Форце» - это мед-нектар цветов, переработанный в зобике пчелы. Мед содержит все микроэлементы (кальций, натрий, фосфор, железо, сера, хлор, йод, марганец, кремний, алюминий, теллур, кобальт), ферменты (инвертаза, диастаза, каталаза, глюкооксидаза, фосфатаза), белки (0,3- 0,5%), витамины (В1, В2, В6, С, никотиновая, пантотеновая кислоты), органические кислоты (яблочная, молочная, уксусная, лимонная, винная и др.), углеводы (глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, гликоген, декстрин, крахмал), протеин (0,313%), аминокислоты (0,5%), антибиотики (фитонциды), флавоноиды (Вахонина Т.В.,1991).

С.Младенов [121] писал: «Мед-категория нравственная, но в ряду вечных ценностей вместе с золотом, серебром, алмазами, янтарем, розовым маслом, мед тоже есть эталон вечной и незыблемой ценности, более того, он исключителен и уникален на земле, как исключительна и уникальна сама пчела».

Согласно Э. А. Лудянскому [105] известно 23 стороны биологического действия меда на организм (физиологическое, оздоровительное, противовоспалительное, дезинтоксикационное, миотропное и неврологическое, ферментативное, диетическое, эндокринотропное, гепатотропное, метаболизм регулирующее, иммунотропное, антиаллергическое, бифидогенное, биотрансформационное, протиррадиационное, антибиотическое, (противомикробное, противовирусное, противогрибковое), ранозаживляющее, консервирующее, антиаллергическое, секреторное, болеутоляющее и т.д.Из всех

перечисленных механизмов биологического действия меда, самым ценным для биотехнологии представляет питательное значение, обусловленное наличием в составе легко и хорошо усваиваемых углеводов (фруктозы, Д-глюкозы, галактозы), минеральных веществ, ферментов, аминокислот и важнейшее значение при культивировании клеток *in vitro* - антимикробное действие, что открывает перспективу использования апипродуктов в биотехнологии в качестве деконтаминирующего агента и исключения из биотехнологического процесса антибиотиков.

Следующий важный компонент апифитопрепарата «Вита-Форце» - прополис, вырабатываемый пчелами продукт, содержащий 22 химических соединения, основное из которых представлены смолой и бальзамом (30-55%), эфирными маслами (10-15%), воском (30%), цветочной пылью (5%) и дубильными веществами (4,1-5,1%).

Из прополиса выделены две фенольные фракции: гидрофильная, состоящая из кофейной, кумаровой, феруловой кислот, скополетина, эскулетина, умбелифина и гидрофобная, состоящая из флавонов и флавонолов: лютеолина, апигинина, кварцетина, кампферона, рабидона [198].

Основное в прополисе - защитные вещества самих растений. Пчелы выбирают те растения, которые дают вещества прополиса. Обладающие бактерицидным действием - флавоны: хитизин, тектохризин, апитенин, анацетин и флавоноиды: галаптин, ОСНЗ галантин, изальникин, хамферол, камферил, рампоцитрин, римнетин, игорамнетин, кварцетин-3,3-деметил-эфир, флавононы: никоцембрин, гипобанцезин, 3-ацетилгипобакцизин, 5-ОСНЗ-3,7ОН флавоноид А.С. Поправко [160] считает, что генетически микробы не в состоянии победить десятки веществ (полифенолы, сесквитерпены, ароматические спирты и кислоты), которые заняли «круговую оборону» за 50 млн. лет развития флоры.

В прополисе содержатся микроэлементы: титан (70 мг%), никель (28мг%), ванадий (11мг%), барий (117мг%), медь (36 мг %), марганец (840мг%), цинк (4060мг%), хром (7,5), олово (6,2), кобальт (0,48 мг %),

калий, фосфор, натрий, железо, магний, молибден, аммоний, кремний, цирконий, фтор и другие [83].

Витаминов в прополисе сравнительно меньше, чем в меде и пыльце, но все же он содержит небольшое количество В-1, В-2, В-6, С, Е, РР, пантотеновую кислоту.

Одним из важнейших и ведущих основных механизмов действия прополиса - антимикробное (бактерицидное, противовирусное, фунгицидное, антифлогическое, фунгистатическое и т.д.). Другим важным для клеточной биотехнологии свойством прополиса является трофическая и репаративная функция, обеспечивающая стимуляцию роста и размножения фибробластов Т и В-лимфоцитов, тимоцитов, спленоцитов, гепатоцитов, остеоцитов, миоцитов, увеличению противовоспалительного, иммуностимулирующего, иммуномодулирующего действия, увеличивает комплементарную, фагоцитарную активность, антитоксическим, регенерирующим, анестезирующим, консервирующим, эссенциальным, противоопухолевым, противорадиационным, антиоксидантным, холинолитическим, гепатопротекторным, антитоксическим, эндокринорегулирующим и белоксинтезирующим действием.

Четвертый важнейший компонент апифитопрепарата «Вита-Форце» - это пыльца (обножка), служащая для пчел не только незаменимым личиночным кормом, но и обязательной пищей кормилиц, питающих матку, представляет собой содержимое мужских половых органов растений-гаметофитов. Обножка - 4 млн. пыльцевых зерен, смоченных нектаром или медом из зобика, содержит белки, аминокислоты, углеводы, водорастворимые витамины, липиды, фенольные соединения (флавоноиды), эфирные масла, спирты, углеводы, органические кислоты (муравьиная, уксусная, молочная), гормоноподобные вещества, нуклеиновые кислоты, минеральные вещества [193]. Пыльца, содержащая все вещества, необходимые для жизни (белки, углеводы, липиды, витамины, минеральные



вещества ферменты, гормоны и т.д.), может заменить белки в питании человека и животных.

Ферменты в пыльце представлены амилазой, инвертазой, фосфатазой, каталазой, пероксидазой, фосфорилазой, трегалозой и т.д. В пыльце содержатся минеральные вещества. Это осфор, калий, кальций, магний, натрий, медь, железо, марганец, цинк, кобальт, барий, серебро, золото, ванадий, иридий, молибден, хром, кадмий, стронций, палладий, платина, титан [233]. Биологически активные вещества представлены нуклеиновыми кислотами (РНК, ДНК), содержание которых в пыльце составляет 0,37%, а также содержатся вещества, стимулирующие рост человека, животных и растений -ауксины; общее количество каротиноидов достигает 57 мг%, каротина провитамина А-14мг%; фенолы (очень активная биологическая группа, действующая на неоплазму) астрагамин, кварциметрин, кварцетин, 3,7-0-диглюкозу.

Гармоничным сочетанием белков, жиров, углеводов, ферментов, микроэлементов, аминокислот и т.д. в наиболее усвояемых формах в пыльце обуславливает высокую биологическую активность апипродукта: улучшение роста (анаболический эффект) за счет фитостеринов, увеличивает количество эритроцитов и лейкоцитов стимуляция эритро и лейкопозза, метаболизм регуляция (восстановление обмена ферментов и аминокислот), антибиотическая активность (стимулируют полезных и подавляет рост вредных микробов), нормализация липидного обмена, восстановление обменных процессов при старении (пыльца растений-это эликсир молодости), нормализация деятельности желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы, стимуляция иммуногемопозза (увеличение гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, Т - и В - лимфоцитов), увеличивает темпы роста клеток костной ткани (остеоцитов), печени (гепатоцитов), сердца (миоцитов), регенерация клеток, сердца, печени, нормализация трофики тканей и кишечного микробиоценоза, защиты клеток от свободных (токсических) радикалов при радиационном поражении (радиопротекторный

эффект), увеличение плодовитости и усиление репродукции клеток мышечной, соединительной и костной ткани, лимфатических органов [51].

Согласно данным, полученным А.А.Никулиным [113], пыльца-мембраностабилизатор, антиоксидант, нормализует все виды обмена (белковый, жировой, углеводный, минеральный, окислительный), ускоряет процессы биотрансформации и детоксикации, стимулирует развитие гепатоцитов, снижает содержание фермента аланинтрансферазы, увеличивает репродуктивность животных, обезвреживает токсины, является адаптогеном.

Пыльцы, подвергаясь в сложенных в соты пчелами молочнокислому брожению, пыльцевые зерна прорастают и сырье превращаются в высокопитательный белково-липидно-витаминный пчелиный корм-пергу (пчелиный хлеб) [160].

Химический состав перги почти не отличается от таковой пыльцы (обножки), однако в ней больше углеводов и молочной кислоты и меньше белков и жиров. В перге имеется множество аминокислот (16) и жирных кислот (13). Аминокислоты: глутаминовая (24,38%/кг.), аспарагиновая (29,92), лейцин (18,70), аланин (12,69), серин (13,31), глицин (11,13), треонин (11,49), валин (13,49), изолейцин (10,59), пролин (9,04), фенилаланин (11,41), тирозин (12,98), лизин (3,89), гистидин (12,21), регинин (6,61), метионин (2,02г/кг).

Перга обладает полифункциональными биологическими свойствами: улучшает плодовитость и рост расплода, увеличивает длительность жизни, усиливает синтез протеинов, нормализует деятельность желудочно-кишечного тракта, печени, щитовидной железы, усиливает действие питательных веществ и их усвояемость (трофическое действие), улучшает гемодинамику, уменьшает интоксикацию продуктами метаболизма и экотоксикантами, замедляет рост опухолей, увеличивает рост, массу тела, эндокринных желез и мышц, подавляет рост патогенной микрофлоры [26].

Маточное молоко (М.М.) содержащиеся в апифитопрепарате «Вита-Форце» - это продукт пчеловодства, выделяемый пчелами из глоточных и верхнечелюстных желез и используется для вскармливания матки и личинок.

В химическом составе М.М. содержатся белки (18-30%), жиры (5,5%), сахара (17%), аминокислоты, минеральные вещества (1%), витамины в хорошем сбалансированном составе.

Белки представлены альбуминами и глобулинами, имеется 22 аминокислоты, (аргинин, гликогол, гистидин, лизин, валин, лейцин, изолейцин, треонин, серин, метионин, глютаминовая кислота, триптофан, прозолин, а также гамма-глобулин, желатин). М.м. содержит много витаминов: В1, В2, В3, В4, В5, В6, В7, В-8, В9, В12, С, Д, Е, А микроэлементы: железо, марганец, цинк, кобальт, столь необходимые для кроветворения, фосфор, калий, натрий, кальций, магний, никель, серебро, ртуть, золото, висмут, алюминий, хром, кремний, мышьяк.

В М.М. содержатся ферменты: амилаза, инвертаза, (глюкооксидаза аскорбинооксидаза, каталаза, кислая фосфатаза, клинэстераза, протеаза, липиды, органические кислоты:10-гидроокси-2-деценовая, кальция глюконовая, нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), фолиевая и пантотеновая кислоты), ювенильные гормоны. В м.м. обнаружено 15 жирных кислот (янтарная, адипиновая, пимепиновая, пробковая, лауриновая,10-оксидеценовая, транс-10-окси-2-деценовая и др.).

По данным Т.В.Вахониной [26], в м.м. содержание общего азота составляет 7,1-7,3%, протеина-44,4-46,9%, свободных сульфгидрильных групп-0,03-1,03 мкг/г%, свободных жирных кислот - 8,2-10,0%, холестерина-0,23-0,4%, липидных компонентов-3,3-4,1, глюкозы-11,8-14,4%, фруктозы - 5,6-8,25, сахарозы-10,5%, пирувата-0,1-0,6%, лактата-0,8-1,07%, минеральных веществ-2,5-3%.

Белки М.М. аналогичны белкам крови человека. Аминокислотный состав идентичен мясу, молоку, яйцам, но значительно больше глютаминовой и аспарагиновой кислот, лизина и прополиса.

Биологические свойства М.М. сводятся к: улучшению трофики, активизации ферментного обмена, улучшению тканевого и клеточного дыхания, окисления и фосфорлирования, вегетативно-сосудистой, центральной и вегетативной нервной системы, нормализации состава крови, стимуляции роста и размножения мышечных и стволовых клеток костного мозга, увеличение синтеза белка, иммунорегуляция, усиление антиинфекционной защиты, утилизации продуктов обмена (метаболитов), оказывает радиозащитное и антимуtagenное действие.

Пчелиный воск, входящий в состав апифитопрепарата «Вита-Форце» - это первый полимер, изготовленный на Земле. Пчелинный воск выделяется восковыми железами пчел, образуемый при потреблении пчелами меда и пыльцы с участием перги.

В состав воска входит 300 различных веществ: сложные эфиры (70-75%) жирные кислоты, углеводы (11-17%), минеральные и красящие вещества.

Биологическое действие воска сводится к тому, что он является заменителем животного и растительного масла, хранителем ферментов в организме адсорбирует вредные вещества, обладает высокими бактерицидным и консервирующим свойствами [214].

Восковая моль или мотылица – бабочка из семейства Pyralidae, входящая в состав апифитопрепарата «Вита-Форце», откладывает яйца в пчелиных сотах, ее гусеницы питаются воском, ткуют в сотах длинные паутинные оды.

Экстракт, полученный из восковой моли, содержит нуклеотиды, свободные аминокислоты, сахара и жирные кислоты, важные микро- и макроэлементы, в том числе – цинк и магний, ферменты, уразу, щелочную протеазу и высокомолекулярные соединения ароматических компонентов с аминокислотами и сахарами.

Фармакотерапевтической ареал экстракта из восковой моли довольно обширен: гемостимулятор, ранозаживляющий эффект, метаболизм – стимуляция, стимуляция роста и развития клеток в культуре.

Трутневый расплод, входящий в качестве одного из компонентов апифитопрепарата «Вита–Форце», имеет много общего с маточным молочком. Личинка пчелы питается, растет, накапливая в своем теле сбалансированный запас питательных веществ, который необходим для роста животного организма имаго до стадии, за очень короткий период онтогенеза– 5–6 дней.

Установлено, что в теле личинок подобран весь комплекс биологически активных соединений: общего белка (12,13%), жира (22,2%), гликогена (24,5%, азота (6,2%), деценовых кислот (2,1 /г, сульфгидрильные группы (190,8-292), минеральные вещества (натрий , калий, кальций, магний, марганец, медь, цинк), витамины (мг/ 100 мл:  $\beta$  –токоферол –3500,  $\beta$ +in-токоферол–600;  $\alpha$ –токоферол–370; витамины группы В (В)1, В2, В3, В5, В6);  $\beta$ –каротин и др.), натуральные половые гормоны (н/моль/100г: экстрадиол– 677,6); желчные кислоты (холестерин 0,13 мкг/мл, линолевая –1,3 мкг/мл, дезоксихолерова (1,35) и другие биологически активные вещества [163].

Благодаря уникальному сочетанию химических веществ, гомогенат трутнева расплода (ГТР), обладают высокой биологической активностью: иммуностимуляция, гепатопротектор, синтез гормонов, ферментов, антител, метаболизм – стимуляция, усвоение питательных веществ, улучшение пищеварения, тиреопротектор, антимикробный эффект (включая возбудителя туберкулеза), биостимуляция клеток органов и тканей (щитовидной железы, печени, костного мозга, тимуса, селезенки, мышц) [17, 142].

Один из важнейших компонентов апифитопрепарата «Вита–Форце» – пчелиный подмор, определяющий ведущий механизм биологического действия на клеточном, органном, тканевом и организменном уровне – это погибающие пчелы. Главная ценность пчелиного подмора – хитозановой комплекс, в состав которого входят глюкозамин, меланин, гепарин,

пчелиный яд, уксусная кислота, эти вещества восстанавливают биологическое равновесие организма благодаря очищению, регуляции обменных процессов, стимуляции иммунной системы.

Он угнетает активность многих болезнетворных микроорганизмов, защищают человека, животных и растений от вирусных инфекций. Антиоксидантные свойства подмора позволяют применить его для нейтрализации ядовитых соединений, профилактически развития злокачественных клеток, замедления процессов старения. Действующим веществом пчелиного подмора является хитин (хитозан - меланиновый комплекс), который, активизируя работу щитовидной железы, способствует заживлению кожи и слизистых оболочек при язвенных, ожогах, очищает кишечник, нормализует его функцию, уменьшает всасывание токсинов, связывает и выводит из организма токсины, тяжелые металлы, радиоактивные вещества, обладает радиопротекторными свойствами, нормализует микрофлору кишечника, подавляя рост и развитие патогенных, стимулируя рост и развитие полезной микрофлоры (бифидобактерий, лактобацилл), усиливает внутрикишечный синтез витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, РР, фолиевой кислоты нейтрализует токсические радикалы (антиоксидантное действие).

В организме пчел выявлено наличие, как минимум, 27 элементов: Al, Ag, As, B, Ba, Be, Ca, Cr, Cu, Fe, Ga, Ge, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Si, Sn, Sr, Ti, U, V, Zn, Zr (кстати, все они входят в состав пыльцы [74]).

Таким образом, в организме пчелы присутствуют, в различных количествах, мед, пчелиный яд, хитин, хитозан, белки, углеводы, органические и неорганические кислоты, набор заменимых и незаменимых аминокислот, витамины, гормоны, микро- и макроэлементы, которые, в совокупности, представляют собой ценный биологический питательный комплекс, способный обеспечивать жизнедеятельность животных и растительных клеток простейших и ряда полезных микроорганизмов в условиях организма (*in vivo*) и вне организма (*invitro*) [13,187].

В качестве веществ растительного происхождения в апифитопрепарате «Вита – Форце» используют травяную муку по ГОСТ 18691– 83, которая является ценным кормом для всех с. – животных и может заменить в рационах концентраты, богат каротином, витаминами, микроэлементами и т. д. Наиболее ценным сырьем при приготовлении используют люцерну, клевер и их смеси со злаковыми травами.

Люцерновая мука содержит: 22% протеина, 18% клетчатки; из минеральных веществ 1%: кальция – 1,2 – 1,5, фосфора – 0,2 – 0,3, натрия – 0,07– 0,11, калия – 0,3–2, хлора – 0,4–0,5, магния – 0,4– 0,5, а также микроэлементы, мг/кг корма: железа –300–450, марганца – 30 – 40, цинка –16 – 20, меди – 10 –11, селена – 0,5 – 0,6, кобальта – 0,18 – 0,30, йода 0,11 – 0,20, бетакаротина – 102 –103, витамин В –100 – 150, витамин К– 3,5 – 9,5, рибофлавина –10 – 17, ниацина – 41– 58, пантотеновой кислоты – 20 – 30, холина –1500 – 1800, фолиевой кислоты –1–3, тиамина –3–4, пиридоксина – 6,6–7,6, бетаина – 4,6– 5,4. Содержание незаменимых аминокислот %: лизина –0,6–1, триптофана –0,4–0,6, метионина – 0,2–0,4, треонина –0,6–1, валина–0,7– 1,2, гистидина–0,2–0,5, фенилаланина – 0,8 – 1,2, лейцина – 1,1 –1,7, изолейцина–0,6 – 0,9, аргинина – 0,6–1, глицинина –0,7 –1,1, тирозина – 0,4– 0,8, аланина – 0,8, глютаминовой кислоты –1,5– 2,3, пролина –0,8 –1,1, серина – 0,7 – 0,8 [93].

Травяная мука используется для повышения полноценности и усвоения комбикормов и кормовых рационов животных, источника витаминов и минеральных веществ.

Сочетание апипродуктов в кормовой добавке «Вита–Форце» с фитопрепаратом растительных происхождения – травяной мукой ведет к повышению биологической активности препарата, оказывая взаимодействия веществ аписогенного и фитогенного происхождения.

Таким образом, в результате сопоставительного анализа действия компонентов натуральной биологически активной композиции «Вита–Форце» на организм установлено, что как отдельные компоненты препарата–

апипродукты (мед, пчелиной яд, перга, обножка, маточное молочко, воск, восковая моль, пчелиный подмор) и фитопрепарат-травянная мука, так и сочетание их в установленных соотношениях, благодаря оптимальной сбалансированности питательных веществ (белка, углеводов, жиров, витаминов, ферментов, гормонов, микроэлементов, антибактериальных веществ и т.д.), оказывают стимулирующее действие на организм как на клеточном, органном, так и организменном уровнях, стимулируя клеточный метаболизм, ускоряя и усиливая рост и развитие молодняка животных, повышая иммунитет, сопротивляемость к инфекциям микробной, грибковой и вирусной природы, регулирует синтез белка, аминокислот, ферментов, витаминов, гормонов в макроорганизме.

Отдельные компоненты препарата «Вита–Форце», (перга, маточное молочко, обножка) по химическому составу и биологическому действию идентичны таковым сыворотки крови животных и тканевых гидролизатов, применяемых в клеточной биотехнологии и генной инженерии, что обосновывает возможность и необходимость испытания вышеупомянутого препарата в качестве активатора клеток при культивировании их в условиях *in vitro* для выращивания на них вирусов с целью изготовления вирусных вакцинных препаратов.

### **3.2.2 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 220мг хитозана. БАД «Хитозан–фармакор» содержит биологически



активное вещество-хитозан, получаемые из хитиновых оболочек красноногих камчатских крабов путем деацелирования.

По внешнему виду хитозан представляет собой порошок от белого до кремового цвета. Для придания биополимеру водорастворимости, высокомолекулярный полимер был подвергнут гидролизу комплексом ферментов микробного происхождения, в результате получен низкомолекулярный водорастворимый хитозан (г. Санкт–Петербург, ООО «Фармакор Продакшн»), обладающий более высокой биологической активностью.

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 мг/л, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мг/л.

В качестве второго потенциального активатора клеточного метаболизма *in vitro* использовали коммерческий препарат – аписан производства (г. Щелково Московский обл. и биокомбината ВНИТИБП РАСХН).

Выделенный из хитинового покрова пчел хитозан для придания ему водорастворимости также подвергнут гидролизу комплексом ферментов микробного происхождения. В результате получен продукт, названный аписаном (пчелозаном).

После лиофильной сушки пчелиной хитозан представляет собой тонкий светло–коричного цвета, порошок растворимый в кислой среде при pH 5,5, имеет влажность 8 – 10%, содержание золы 1–2%, вязкость 5–10 с Пэ, степень деацелирования – 80 – 85 %. Полученный продукт аписан представляет собой аморфно–кристаллический полимер, для которого также

характерно явление полиморфизма. Аписан растворяется в разбавленных органических кислотах – уксусной, лимонной, щавелевой, янтарной. Хитозан обладает более выраженными сорбционными свойствами в растворенном виде, чем в нерастворенном.

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 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 клеточной 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», разработанного ФГБНУ – «ФЦТРБ–ВНИВИ» (г. Казань) (Патент РФ № 2324361 С1 А23К, опубликовано 20.05.2008. – Бюлл. №14) [149].

Натуральная биологически активная композиции «Вита-Форце» представляет собой темно-коричневый порошок с запахом меда, воска, цветов и меда, расфасованный в двухслойные влагонепроницаемые полиэтиленовые мешки. Производитель – ООО «Зооинженерия» (п. Новый, Тукаевского района РТ).

В состав композиции входят апипродукты (мед, прополис, перга, пыльца (обножка), пчелиный яд, пчелиный расплод в различных стадиях развития, маточное молочко, восковая моль и их личинка, воск) и

фитопрепарат–травяная мука в определенных количественных соотношениях.

Согласно данным, проведенным химико–аналитической лабораторией Аккредитованного испытательного центра № РОСС RU 0001/21 GN 84 Всероссийского государственного научно–исследовательского института животноводства РАСХН (Зав., проф. Ю.П. Фомичев), порошок «Вита – Форце» содержит следующие компоненты: 6,62% влаги, 8,12% клетчатки, 8,14% жира, 3,55% общего азота, 22,18% сырого протеина, 4,35 г/кг кальция, 4,71 г/кг фосфора, 0,224 мг/кг цинка, 0,186 мг/кг магния, 17,12 % сахаров, 1,62 мг/кг меди, 26,05 г/кг аспарагиновой кислоты, 9,92 г/кг аланина, 9,73 г/кг валина, 2,34 г/кг цистина, 3,61 г/кг метионина – 5,43 г/кг изолейцина 12,84 г/кг лейцина – 5,34 г/кг тирозина – 7,38 г/мл фенилаланина, 12,35 г/кг лизина, 2,92 г/кг гистидина и 3,58 г/кг аргинина.

Содержание жирных кислот в препарате в % составляет: C<sub>5</sub>–0,15, C<sub>6</sub>–0,14, C<sub>7</sub>–0,15, C<sub>8</sub>–0,30, C<sub>10</sub>–0,67, C<sub>11</sub>–0,45, C<sub>12</sub>–0,45, C<sub>14</sub>–4,02, C<sub>15</sub>–0,30, C<sub>16</sub>–30,18, C<sub>16</sub>–7,45, C<sub>17</sub>–0,22, C<sub>18</sub>–1,79, C<sub>19</sub>–0,19, C<sub>20</sub>–0,15. Общие липиды – 20,65%, индекс насыщенности липидов–0,638.

Результаты анализа химического состава апифитоэкстракта, проведенного в выше названной лаборатории, показали, что апифитоэкстракт содержит углеводы, заменимые и незаменимые аминокислоты, жирные кислоты, микро – и микроэлементы.

Фитоэкстракт, содержащий важнейшие компоненты для роста и развития клеток *in vitro*, в дальнейшем использовали в качестве ростстимулирующего фактора при культивировании животных клеток, используемых при репродукции на них вирусов для получения вакцинных препаратов.

Для использования апифитопрепарата в качестве активатора клеточного метаболизма, из исходного материала (порошка «Вита – Форце») получали этаноловый экстракт. Для этого порошок указанной композиции

«Вита – Форце» в количестве 100г вносили в стеклянную колбу (500 мл) и заливали 70% – ним 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 экстракта 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, апизан и препараты собственного изготовления–экспериментальные образцы пчелозана из подмора пчел и этаноловый экстракт натуральной биологически активной добавки «Вита – Форце».

### **3.2.3 Оценка ростстимулирующей активности хитин, хитозансодержащих препаратов на пролиферативную активность перевиваемых культур клеток**

В исследованиях использовали питательные среды: Игла MEM, раствор Версена, трипсина, Хэнкса, сыворотки крови крупного рогатого скота (СККРС), сыворотки крови плодов коровы (СКПК). В качестве паспортизированных клеточных культур использовали линий перевиваемых клеток: MDBK, ВНК–21/13, LEK и VERO, полученные из коллекции культур клеток ФГБНУ– «ФЦТРБ – ВНИВИ».

Ростстимулирующую активность питательных сред, содержащих испытуемые потенциальные активаторы метаболизма из класса биополимеров (хитозансодержащих препаратов) оценивали путем

культивирования клеточных культур в течение 5 последовательных пассажей с учетом значений индекса пролиферации и морфологии клеток.

Перед проведением основных опытов по оценке испытуемого хитозансодержащих биополимеров – экстракта апифитопрепарата «Вита–Форце», вначале проводили предварительные опыты по изучению влияния контрольных коммерческих биополимеров: хитозана и ализана. Для этой цели на первом этапе проводили титрацию препарата путем внесения в питательные среды различных количеств хитозана и устанавливали зависимость роста и развития клеточных культур от концентрации препарата.

Результаты титрации оптимальных количеств хитозана при культивировании клеточной линии MDBK на питательной среде Игла MEM представлены в таблице 1.

Таблица 1 – 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 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
27,4	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

Из данных таблицы видно, что питательная среда, содержащая хитозан в концентрации 27,5 и 55,00 мг/л обеспечивала максимальный рост и развитие культуры клеток линии MDBK, при индексе пролиферации 3,2 и 3,3 соответственно.

Увеличение концентрации хитозана в питательной среде выше 53,0 мг/л нецелесообразно, поскольку двукратное увеличение количества препарата (110 мг/л) не приводило к увеличению концентрации клеток в культуральной среде и пролиферативной активности клеток линии MDBK.

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 –ч 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 ( $P \leq 0,001$ ) по сравнению с таковыми 24 ч экспозиции культивировании клеток.

Дальнейшее удлинение срока культивирования (72 ч) клеток приводило к торможению их роста и развития к этому сроку как концентрация клеток, так и пролиферативная активность их уступали таковым 48– ч культивирования в 2,6–2,9 раза ( $P \leq 0,001$ ).

Параллельно нами были проведены опыты по оценке ростстимулирующей активности второго контрольного препарата из класса природных биополимеров – хитозана из пчел – аписана. Для этого испытуемый препарат, после приготовления соответствующих навесок из исходного материала по 6, 12 15, 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 190, 200, 250 мг, вносили в питательные среды (ПС) и производили посев клеток линии MDBK из расчета 4 кл/мл и культивировали их по вышеописанной методике.

Результаты исследования по изучению влияния на метаболизм клеток МДВК природного биополимера хитозана из пчел – аписана в зависимости от его содержания в питательной среде, приведены в таблице 5.

Таблица 2 – Влияние апизана на рост и развитие клеток линии MDBK в зависимости от его содержания в ростовой среде

Концентрация апизана в ПС, мг/л	Концентрация клеток ( $\times 10^5$ ) и индекс пролиферации в зависимости от времени культивирования, ч					
	24		48		72	
	КК	ИП	КК	ИП	КК	ИП
6,25	1,8 $\pm$ 0,21	0,8	3,5 $\pm$ 0,43	1,9	2,5 $\pm$ 0,29	1,7
12,50	2,9 $\pm$ 0,19	1,0	5,0 $\pm$ 0,29	2,1	2,7 $\pm$ 0,33	1,8
25,00	3,5 $\pm$ 0,73	1,3	8,8 $\pm$ 0,55	2,9	2,9 $\pm$ 0,35	1,9
50,00	3,6 $\pm$ 0,35	1,4	9,0 $\pm$ 0,017	3,1	2,9 $\pm$ 0,19	1,9
70,0	3,6 $\pm$ 0,29	1,5	9,0 $\pm$ 0,35	3,2	2,8 $\pm$ 0,41	1,8
90,00	3,6 $\pm$ 0,25	1,5	9,0 $\pm$ 0,41	3,2	2,7 $\pm$ 0,23	1,7
100,00	3,6 $\pm$ 0,33	1,5	9,0 $\pm$ 0,39	3,2	2,7 $\pm$ 0,17	1,6
120,0	3,6 $\pm$ 0,35	1,5	9,0 $\pm$ 0,70	3,2	2,7 $\pm$ 0,45	1,6
130	3,6 $\pm$ 0,41	1,5	9,0 $\pm$ 0,77	3,2	2,6 $\pm$ 0,25	1,5

Примечание: ПС – питательная среда

Из материалов таблицы видно, что питательная среда, содержащая апизан в диапазоне концентраций 25,0–70,0 мг/мл, 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.

Дальнейшее увеличение концентрации биополимера (90,100,120,150 мг/мл) не приводило к увеличению концентрации клеток в культуральной жидкости и индекса пролиферации.

Следовательно, оптимальное содержание апизана в ростовой среде составляет 50– 60,0 мг/мл, что обеспечивает достаточно высокий урожай клеток линии MDBK.

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/мл) 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.

Перед началом испытаний готовили рабочие растворы лиофилизированного экстракта – порошка «Вита–Форце». Для этого содержимое 10 ампул растворяли в 100 см<sup>3</sup> очищенной воды, получая растворы 1%-ной концентрации. Полученные растворы имели значение рН, равное 6,2–6,7, время растворения 1 г экстракта порошка в 100 см<sup>3</sup> очищенной воды не превышало 3 мин.

Полученный раствор апифитоэкстракта добавляли в питательную среду на основе Игла MEM из расчета 10, 30, 60, 90, 110, 150, 200, 250 мл/л, создавая концентрацию экстракта в культуральной среде 100, 300, 600, 900, 1100, 1300, 2000, 2500 мг/л.

В приготовленную вышеуказанным способом питательную среду засеивали культуру клеток MDBK и LEK из расчета  $(3-4) \times 10^5$  кл/мл.

Оценивали ростстимулирующую активность полученных апифитоэкстрактсодержащих питательных сред при культивировании клеточной MDBK и LEK в течение 72 ч с учетом морфологии клеток и индекса пролиферации.



В качестве контроля для сравнительного анализа ростовых свойств использовали синтетическую среду Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крови КРС.

Результаты исследований представлены в таблице 3, рис. 3 и 4.

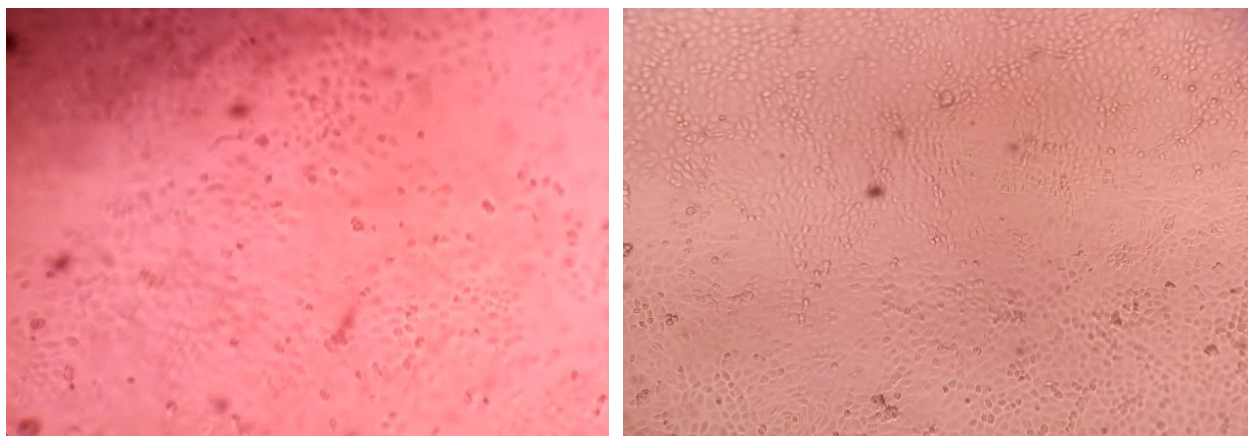


Рисунок 3 – Контроль – МДВК    Рисунок 4 – МДВК+АФЭ через 24 ч

Таблица 3 – Значение 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 содержащий АФЭ на различные сроки культивирования, ч ( $M \pm m$ )		
	24	48	72
0,1	$3,3 \pm 0,35$	$3,7 \pm 0,87$	$3,1 \pm 0,47$
0,3	$3,5 \pm 0,73$	$4,3 \pm 0,35$	$3,9 \pm 0,93$
0,6	$3,9 \pm 0,33$	$4,3 \pm 0,67$	$4,1 \pm 0,77$
0,9	$4,1 \pm 0,27^x$	$4,9 \pm 0,67$	$4,7 \pm 0,25^x$
1,1	$4,3 \pm 0,73^x$	$5,3 \pm 0,71^x$	$4,9 \pm 0,31^x$
1,5	$4,3 \pm 0,19^x$	$5,5 \pm 0,59^{xx}$	$4,9 \pm 0,27^x$
2,0	$4,2 \pm 0,71^x$	$5,5 \pm 0,25^{xx}$	$4,7 \pm 0,73^x$
2,5	$4,1 \pm 0,29^x$	$5,3 \pm 0,55^x$	$4,5 \pm 0,67$
Контроль–Игла MEM±СККРС (10%)	$2,9 \pm 0,23$	$3,8 \pm 0,47$	$3,2 \pm 0,29$

Примечание: ИП – индекс пролиферации, АФЭ – пифитоэкстракт, СККРС – сыворотки крови КРС,  $x - P \leq 0,05$ ,  $xx - P \leq 0,01$ .

Из данных таблицы видно, что введение в состав среды апифитоэкстракта в количестве 0,9 – 1,1 мг/мл 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 MEM 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 необходимого 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.

Результаты проведенных исследований по изучению ростстимулирующей активности АФЭ на культуре клеток линии MDBK послужили основанием для испытания ростстимулирующей активности препарата на других линиях клеток, используемых в биотехнологии по производству вирусных вакцин: ВНК – 21/13 – 02, LEK, VERO

Указанные линии клеток животных засеивали из расчета  $(3-4) \times 10^5$  кл/мл в питательную среду Игла MEM, содержащую оптимальные концентрации (1,1 мг/л) АФЭ (испытуемая питательная среда) и контрольную среду Игла MEM с 10% сыворотки КРС (СККРС).

Испытуемые культуры клеток выращивали в стандартных условиях в течение 72 ч после посева исходных культур.

Результаты изучения влияния испытуемого субстрата потенциального активатора метаболизма клеток – апифитоэкстракта из композиции «Вита – Форце» на различные линии клеток животных представлены в таблице 7.

Таблица 4 – Значения индекса пролиферации различных клеточных линии культур животных в питательной среде на основе АФЭ после 72 – ч инкубации.

Питательные среды	Значения ИП линий клеток ( $M \pm m$ )			
	МДБК	ВНК–21/1–02	ЛЕК	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: Обозначения согласно табл. 6.

Из данных таблицы видно, что испытуемая 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 1г/л оказывало наиболее высокую пролиферативную активность для клеток линии МДБК, значение ИП которой составляло 5,1±0,27 против 3,1±0,23 в контроле, что в 1,64 раза больше, чем в контроле ( $P < 0,05$ ).

Клеточная линия ЛЕК в убывающем ряду пролиферативной активности занимала третью позицию, имея значение ИП 4,6±0,25, что превышает таковое контроля в 1,31 раза ( $P < 0,05$ ).

Из взятых для опытов культур клеток наиболее требовательной к биологически активным добавкам ростовой среде оказалась линия клеток ВНК –21/13–02, которая по значению этого показателя (4,2±0,35) уступает

таковому MDBK в 1,21 раза ( $P>0,05$ ), LEK–в 1, 09 ( $P>0, 05$ ), VERO – в 1, 32 раза ( $P<0,05$ ). Однако, как видно из данных таблицы 4, значения ИП для всех культур клеток, выращенных в ростовой среде с включением изучаемого субстрата (апифитоэкстракта «Вита–Форце») в 1,65 раза (для MDBK, в 1,13 раза –VERO) превышали контрольные значения.

На следующем этапе работы проводили исследования по изучению скорости образования монослоя у перевиваемых культур клеток MDBK в ростовой среде, содержащей апифитоэкстракт из натуральной композиции «Вита-Форце». Результаты динамических исследований показали, что скорость образования монослоя клеток была аналогична таковой контрольной среды (Игла MEM с СККРС) и составляла 24 ч после посева исходной культуры.

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

Монослой перевиваемых культур клеток, выращенных в экспериментальной и контрольной среде, представлял собой плотное, однородное образование, тяжи и «окна» отсутствовали. Клетки, выращенные в экспериментальной ростовой среде, имели эпителиоподобную форму, характерную для изучаемого вида клеток животных. В монослое границы клеток четко выражены, округление контуров, уменьшение клеточных размеров по сравнению с контролем не выявлены.

Ни в экспериментальных, ни в контрольных образцах клеточного монослоя, окрещённого акридиновым оранжевым, мертвых клеток не выявлено. Ядра в клетках, выращенных в средах с добавлением АФЭ из композиции «Вита-Форце», имеют ровные контуры, клетки с кариорексисом и кариопикнозом отсутствуют. Клетки с 2 и более ядрами в экспериментальном монослое не выявлены, что свидетельствует о нормальном митозе клеток.

Как в экспериментальных, так и в контрольных препаратах дегенеративные изменения в цитоплазме (вакуоли, зернистость, потоцитоз), свидетельствующие о недостатке питательных веществ, отсутствовали.

Таким образом, клетки, выращенные в питательных средах с добавлением апифитоэкстракта композиции «Вита–Форце», морфологически не отличались от таковых, выращенных в контрольной среде – Игла МЕМ с СККРС.

### **3.2.4 Изучение токсичности, максимально переносимой (МПД), минимально цитотоксической (МЦД) концентрации 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 хитинсодержащего композиционного препарата «Вита–Форце».

Функциональным требованием ко всем линиям клеток является исключение контаминации их микроорганизмами. Контаминанты, ухудшая качество культур клеток, создают трудности в вирусологических исследованиях и при изготовлении противовирусных вакцин [72]. Из тканей и сывороток клинически здоровых животных выделены десятки вирусов, разных видов бактерии (*St. aureus*, *St. citreus*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Sp.*, *Pr. vulgaris*, *Pr. mirabilis*, *St. rosum*, *B. subtilis*, *B. flavidum*, *Candida Sp*, *Aspergillasp*), дрожжи и др. [129].

При ненадлежащем соблюдении асептики, при работе в боксе в культурах клеток могут появляться условно–патогенные микроорганизмы, присутствующие в воздухе, а также бактерии, выделяемые персоналом. Согласно данным О.Ю. Зуева и др. [74], микробная ассоциация боксовых помещений включает непатогенные бактерии кокковой группы, пигментные бактерии, дрожжи и плесни, а сама культура нередко изначально оказывается контаминированной микоплазмами, вирусами [119]. При крупномасштабном культивировании требования асептики являются трудновыполнимыми и, поэтому, поиск эффективных средств профилактики контаминации культур клеток является одной из актуальных проблем современной биотехнологии.

Для деконтаминации культур клеток используется комплекс антибиотиков пеницилин–канамицин–стрептомицин, а также современные препараты, обладающие широким спектром действия – фторхинолоны и цефаноспорины [53].

Однако длительное использование антибиотиков сопровождается индукцией антибиотикорезистентности у микроорганизмов. Кроме того, известно, что антибиотики, независимо от класса, оказывают цитотоксическое действие на клетки в культуре [207]. Поэтому в настоящее время ведутся исследования по изысканию нетрадиционных деконтаминантов, обладающих более широким спектром действия и меньшим цитотоксическим эффектом.

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.

Установлено, что использованные концентрации препарата не оказывали токсического действия на культуре 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 5.

Таблица 5 - Максимальная переносимая (МПД) и минимальная цитотоксическая (МЦД) концентрация хитин - и хитозансодержащих препаратов для перевиваемых линий клеток n=3

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.

Перед началом основных микробиологических исследований по оценке антибактериальной активности апифитоэкстракта, вначале проводили минимальной бактериостатической (МБСК) и минимальная бактерицидной концентрации (МБЦК) хитозан и апифитоэкстракта.

Антимикробную активность природного биополимера-хитозана из крабов апифитоэкстракта из натуральной биологически активной композиции «Вита–Форце» изучали по отношению к аспорогенным бактериям (*St. aureus*, *E. coli*) и спорогенному микробу *B. subtilis*, выделенных из контаминированных культур клеток. В качестве критериев антимикробной активности использовали минимальную бактериостатическую (МБСК) и минимальную бактерицидную концентрацию которые определяли через 24 (МБСК) и через 72 ч (МБСК) инкубации при  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в отношении испытуемых тест–микробов.

Результаты проведенных микробиологических исследований по определению МБСК и МБЦК представлены в таблице 6



Таблица 6 – Антимикробное действие хитозана и апифитоэкстракта в культуре клеток,(n=3)

Микроорганизмы	Антибактериальные препараты и действующие концентрации (мг/мл)			
	хитозан		апифитоэкстракт	
	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК
<i>St.aureus</i>	0,19	0,25	0,5	1,0
<i>E.coli</i>	0,15	0,21	0,3	0,9
<i>B.subtilis</i>	0,21	0,39	0,7	1,2

Примечание: МБсК – минимальная бактериостатическая, МБцК – минимальная бактерицидная концентрация.

Из материалов таблицы видно, что минимальная бактериостатическая концентрация хитозана по отношению к испытуемым тест-микробам колебалась в пределах от 0,15 до 0,21 мг/мл, а минимальная бактерицидная – от 0,21 до 0,39 мг/мл. В отличие от хитозана, изучаемые тест-микробы проявляли более высокую устойчивость по отношению к АФЭ, для задержки роста которых потребовались концентрации хитозана от 0,3 до 0,7 мг/мл, а гибель их (бактерицидная концентрация) наступала при внесении в микробные суспензии от 0,9 до 1,2 мг/мл апифитоэкстракта из хитинсодержащего препарата «Вита-Форце».

Из использованных в качестве тест-микробов аспорогенных и спорогенных микроорганизмов наиболее высокую резистентность проявляли спорогенные бактерии *B.subtilis*, для инактивации которых необходимо было использование более высоких концентраций препаратов: 0,39 мг/мл хитозана и 1,2 мг/мл апифитоэкстракта.

Вторую позицию по устойчивости к использованным препаратам проявляли стафилококки (*St. aureus*), инактивация которых наступала при внесении в инкубационную среду 0,25 мг/мл хитозана и 1,0 мг/мл апифитоэкстракта.

Наименьшую резистентность по отношению к испытуемым препаратам проявляли бактерии *E. coli*, которые погибали при концентрации 0,21 мг/мл хитозана и 0,9 мг/мл апифитоэкстракта в инкубационной среде.

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 внесения препарата на мезофильно аэробные и факультативно – анаэробные микробы (КМАФАиМ), указанные концентрации АФЭ – вносили в пробирки с мышечными экстрактами и культивировали в вышеуказанных условиях. По истечении ускоренной экспозиции приносили посева на МПБ и МПА для подсчета количеств выживших микробов

Из данных таблицы видно, 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 апифитоэкстракта (АФЭ) на мезофильные аэробные и факультативно - анаэробные микроорганизмы (КМАФА и М), выделенные из экстракта мышечной ткани коров, используемой в биотехнологии в качестве добавки в питательные среды.

Указанные микроорганизмы выделяли из мышечной ткани согласно ГОСТ Р 50396.1-2010 «Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативных аэробных микроорганизмов». Результаты

определения количества микроорганизмов в экстракте показали, что микробная обсеменённость его составляла  $1,5 \times 10^3$  КОЕ/мл.

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 посеvy из проб на МПБ и МПА для подсчета количества выживших микроорганизмов.

Результаты бактериологических исследований по изучению влияния растворов хитозана и апифитоэкстракта АФЭ на мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, выделенные из экстракта мышц коров, представлены в таблице 7

Таблица 7 - Антибактериальная активность хитозана и апифитоэкстракта в отношении мезофильных и аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов

Экспозиция, ч	Объект исследования	Обсеменённость раствора КМАФА и М $\times 10^3$ КОЕ/мл
1	0,44%-ный р-р хитозана	$1,01 \pm 0,05$
	1,0%-ный р-р АФЭ	$1,13 \pm 0,09$
2	0,44%-ный р-р хитозана	$1,91 \pm 0,02^x$
	1,0%-ный р-р АФЭ	$1,93 \pm 0,03^x$
12	0,44%-ный р-р хитозана	$1,39 \pm 0,005^{xx}$
	1,0%-ный р-р АФЭ	$1,41 \pm 0,008^{xx}$
17	0,44%-ной р-р хитозана	$0,05 \pm 0,0003^{xxx}$
	1,0%-ный р-р АФЭ	$0,06 \pm 0,0003^{xxx}$
24	0,44%-ный р-р хитозана	$0,001 \pm 0,0003^{xxx}$
	1,0%-ный р-р АФЭ	$0,002 \pm 0,005^{xxx}$
48	0,44%-ный р-р хитозана	0
	1,0%-ный р-р АФЭ	0

Примечание: х-Р <0,05, хх-Р <0,001;xxx- исходная концентрация микробов- $1,51 \times 10^3$  КОЕ/мл.

Из данных таблицы видно, что внесение в раствор, содержащий  $1,5 \times 10^3$  КОЕ/мл (колоний образующие единицы) мезофильных аэробных и факультативно- анаэробных микроорганизмов (КМАФА и М) растворов хитозана и апифитозэкстракта оказывало бактерицидное действие на микроорганизмы в зависимости от времени контакта испытуемых агентов. При этом наиболее интенсивная гибель микроорганизмов наблюдалась при 3-17 - ч контакте их с испытуемыми агентами.

Как видно из данных таблицы 7, снижение степени обсемененности контаминированного (КМАФАи М) раствора при 3 - ч экспозиции составляла в 2,59 (хитозан) и 2,75 раза (АФЭ), ( $P < 0,01$ ) соответственно.

Наиболее интенсивная гибель микробных клеток КМАФАиМ под воздействием испытуемых агентов наступала при 12 и 24 ч. экспозиции, когда в контаминированных указанными микроорганизмами растворах обнаруживалось  $0,05 - 0,06 \times 10^3$  микробных клеток, что составляет 50 - 60 микробных клеток на 1 мл раствора. 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  $1 \text{ см}^3$  - Бактерицидная активность 1%-ного раствора АФЭ по отношению к КМАФА и М.

Учитывая, что бактерицидное действие антибактериальных агентов в значительной степени зависит от температуры среды, и, во-вторых, в биотехнологии культивирование животных клеток осуществляют при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ , представлял интерес изучение влияния указанной температуры на степень обсеменённости растворов при контакте изучаемых микроорганизмов с испытуемыми агентами.

Результаты изучения влияния температуры на степень обсеменённости экстракта мышц коров после внесения растворов хитозана и апифитоэкстракта из «Вита-Форце», показали, что ингибирование обсеменности экстракта мышц коров, содержащих мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФАиМ) в присутствии 0,44%-ного раствора хитозана и 1% -ного раствора апифитоэкстракта при температуре 37<sup>0</sup>С приводило к ускорению гибели тест - микробов, которая наступала при 1000-минутной экспозиции (16,6 ч) (рис.5)

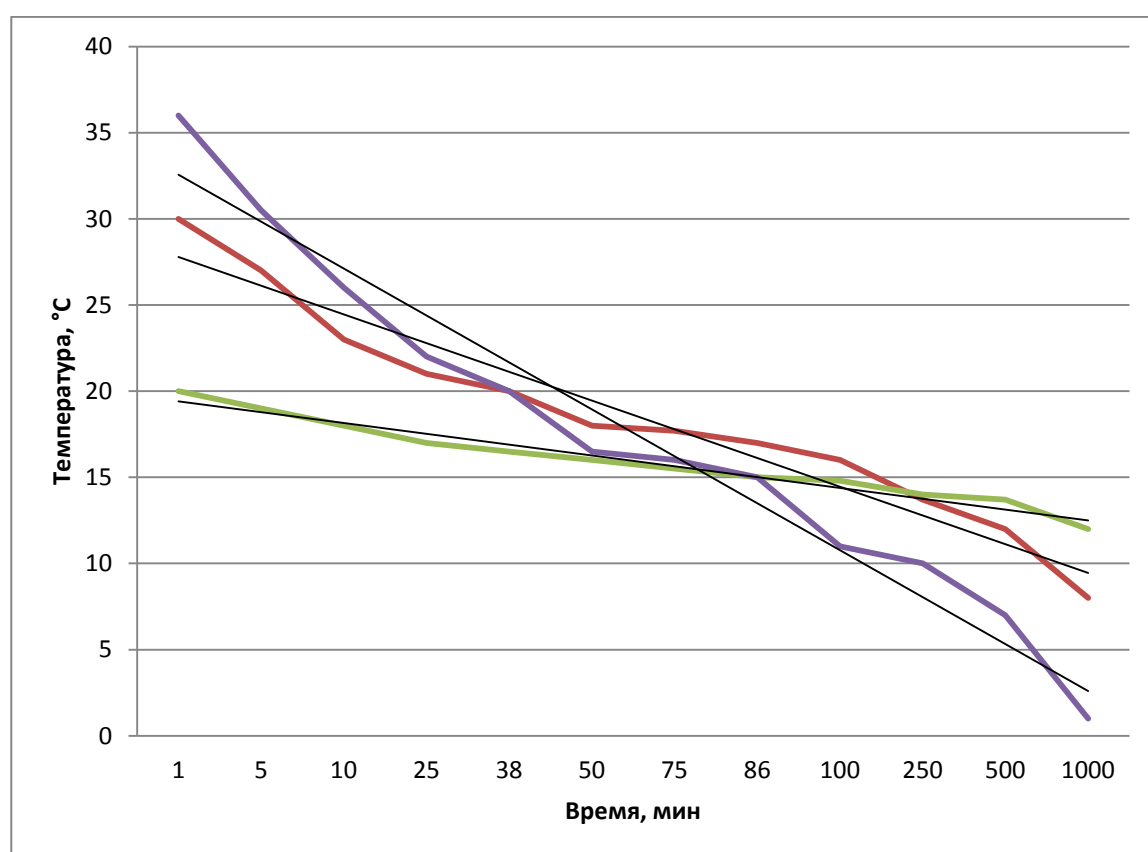


Рисунок 5 - Время гибели МАФА и М, подвергаемых действию 0,44%-ного раствора хитозана (1) и 1%-ного раствора апифитоэкстракта (АФЭ) при различных температурных культивирования. Исходная концентрация микробов в растворе  $1,5 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Из сопоставительных данных таблицы 7 и рисунка 5 видно, что 99,9%-ная гибель тест - микробов при температуре 22<sup>0</sup>С наступала при 24 - ч

экспозиции контакта микробов с испытуемыми агентами в водном растворе, содержащем МАФАиМ. Повышение температуры инкубирования микроорганизмов в присутствии испытуемых агентов ускорило их гибель в 1,5 раза, несмотря на то, что изучаемые тест - микробы в этом варианте опыта пребывали в условиях белковой защиты (в экстракте мышц коров).

Результаты динамических исследований показали, что апифитопрепарат (АФЭ) в эффективной (оптимальной) концентрации не обладает токсичностью и не оказывает отрицательного влияния на морфологические и ростовые свойства всех испытанных линий культур клеток.

Таким образом, установлено, что апифитопрепарат из БАПП в концентрации 1 мг/мл обладает высокой антибактериальной активностью по отношению к грамотрицательным и грамположительным микроорганизмам, оказывая, одновременно ростстимулирующее действие на культуру клеток животных в условиях *in vitro*.

### **3.2.5 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, содержащий апифитоэкстракт из «Вита–Форце» при стационарном (длительном) культивировании.

Изучение пролиферативной стабильности полученных в процессе выращивания клеток в экспериментальной среде с изучаемой добавкой проводили на протяжении 10 последовательных пассажей при

оптимизированных условиях культивирования. Во всех циклах суспензионного культивирования клеток использовали ростовую среду Игла MEM, содержащую 1г/л апафитоэкстракта натуральной композиции «Вита-Форце». В качестве контрольной среды использовали среду Игла MEM с 1% СККРС. При этом смену среды производили через каждые 3–4 дня культивирования тестируемых клеток.

В качестве критериев оценки использовали динамические показатели плотности клеточной популяции, жизнеспособности (по тесту витального окрашивания трипановым синим) и морфологии клеток.

Динамические наблюдения в процессе культивирования клеток MDBK показали увеличение клеточной массы, при этом культура была представлена клетками удлинённой формы с неповреждённой оболочкой, гомогенной или мелкозернистой цитоплазмой.

Результаты исследований по изучению изменения клеточной массы в процессе культивирования и жизнеспособности клеток на различных стадиях пассирования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Динамика изменения 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. $10^5$	Кратность увеличения биомассы	Жизнеспособность клеток (%)
1-5	$3,0 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,5^{xx}$	2,1	$90,0 \pm 3,0$
6-10	$3,0 \pm 0,3$	$6,25 \pm 0,1$	2,05	$89,7 \pm 5,0$

Примечание : x-p<005, xx-p <0,01

Из данных таблицы видно, что в течение первых 5 пассажей последовало увеличение степени размножения клеток, когда биомасса претерпевает 2,1 удвоений или генераций, что подчиняется закону

экспоненциального или логарифмического роста и удовлетворительно описывается формулой:

$$x = x^0 \cdot e^{\mu t}, \text{ где}$$

$x$  - количество биомассы,  $x^1$  - исходная концентрация, клеток,

$\mu t$  - степень размножения.

Степень размножения определяется отношением  $x/x_0$ , которое равно  $e^{\mu t}$ . В нашем случае, когда биомасса претерпевает и удвоений или генераций, мы можем записать  $x/x_0 = 2^n$ . Интегрирование этого уравнения дает значение

$$n = 3,32 \log (x/x_0).$$

Поскольку исходная концентрация ( $x_0$ ) при засеве культуры составляла  $3 \cdot 10^5$  кл/мл, степень размножения (генераций) культуры составит 3.32.

Начиная, с 6 пассажа происходило незначительное ослабление метаболического коэффициента культуры – кратность увеличения биомассы при пассажах 6–10 составляла 2,05 против 2,1 при 1–5 пассажах культур. Следовательно, биомасса культуры, достигнув максимума к 5 генерации, в силу увеличения концентрации метаболитов в культуральной среде и снижения концентрации лимитирующих факторов, в частности, кислорода, не удастся поддерживать постоянный экспоненциальный рост. Это неизбежно происходит в периодической культуре – раньше или позже. В нашем случае прекращение экспоненциального роста наступило на 6–м пассаже.

Однако эти различия степени размножения клеток используемой культуры не имели существенных различий, поскольку концентрация клеток в культуральной жидкости на различных стадиях развития (1–5 и 6–10 пассажи) не имела достоверных различий.

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 композиции «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 проведенного по стандартной методике путем подсчета хромосом в 160 метафазных пластинках кариологического анализа представлены в таблице 9.

Таблица 9 – 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 МЕМ с СККРС	8	7	6	5	4	7	4	6
Игла МЕМ с АФЭ	7	9	15	6	5	9	7	5

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

Из данных таблицы видно, что число хромосом в клетках, выращенных в апифитопрепаратсодержащей 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 6 видно, что использование биодобавки из апифитопрепарата при культивировании клеток MDBK приводит к увеличению числа хромосом и модальных классов 51 – 55%, 56 – 60, 61– 65 и 66 – 70% в 1,02 раза, 1,07, 1,28 и 1,75 раза соответственно.

Таким образом, использование биодобавки– апифитопрепарата АФЭ из композиции «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 клеток.

### **3.2.6 Изучение влияния криоконсервирования на биологические свойства культур клеток, выращенных на АФЭ – содержащей питательной среде**

При интенсивных биотехнологических производствах в процессе крупномасштабного культивирования клеток возникает необходимость сохранения активной популяции. Однако для сохранения стабильности кариологических свойств линий клеток и высокой чувствительности их к вирусам, а также генетической однородности требуется подбор оптимальных условий для длительного хранения. Поскольку обычные условия хранения (4–8<sup>0</sup>С) не обеспечивают стабильности их биологических свойств, особое значение приобретает проблема длительного хранения клеточных культур, разрешение которой позволяет иметь запас клеток с заданной биологической характеристикой. Установлено, что оптимальные условия для сохранения жизнедеятельности клеток достигаются при криоконсервации их в жидком азоте (–196<sup>0</sup>С).

Несмотря на то, что криоконсервирование является наиболее эффективным методом длительного хранения клеток, однако в процессе криоконсервирования различные стрессы за счет формирования внутриклеточного льда, осмотического шока или токсичности криопротектора, вызывают необратимые повреждения клеток и их функцию. На сегодняшний день актуальной проблемой криобиологии остается восстановление клеток животных и человека после рекриоконсервации с максимальным процентом жизнеспособности.

Успех низкотемпературного консервирования зависит от ряда факторов: вида и типа клеток, состава среды консервирования, вида и концентрации криопротектора, режима охлаждения и отогрева, способа реабилитации клеток после отогрева. Жизнедеятельность клеток при длительном хранении в жидком азоте различна и зависит от типа клеток культур, а также состава питательных сред, в которых были выращены культуры клеток.

Данная работа направлена на исследование жизнеспособности и скорости восстановления после криоконсервации клеток первично-трипсинизированной культуры MDBK, выращенной на апифитоэкстрактсодержащей питательной среде Игла MEM.

На первом этапе исследований первично-трипсинизированную культуру клеток MDBK, полученную по стандартной методике с использованием апифитопрепаратсодержащей среды Игла MEM, замораживали в концентрации  $1,9 \pm 0,1 \times 10^6$  кл/мл.

Клетки замораживали в концентрации  $3,9 \times 10^6$ . Для замораживания использовали среду согласно каталогу: среда Игла MEM – 45 %, сыворотка бычьей 45 %, 5 % ДМСО, 5 % глицерина. Культивирование клеток проводили по общепринятой методике в стандартных условиях монослойно при температуре 37°C. Матричные культуры клеток выращивали в стеклянных матрасиках емкостью 200 мл, в опытах по изучению выживаемости культуры – в 24-луночных планшетах. Для размораживания использовали среду Игла

MEM и 10% эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота с добавлением антибиотиков (канамицина сульфата, стрептомицина сульфата и бензилпенициллина натриевой соли) по 100 ед /мл. Смену среды проводили через 24 ч после размораживания. Для снятия со стекла и диспергирования клеток использовали 0,25% раствор трипсина. Через 2, 4, 6, 24, 48, 72 ч и на 5–е сутки инкубации в термостате из лунок сливали питательную среду и ополаскивали теплым раствором Хэнкса. Подсчет адгезированных клеток проводили в камере Горяева, используя 0,2% раствор трипанового синего для окрашивания клеток, с помощью микроскопа МББ–1А. Качество монослоя оценивали в инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS 100.

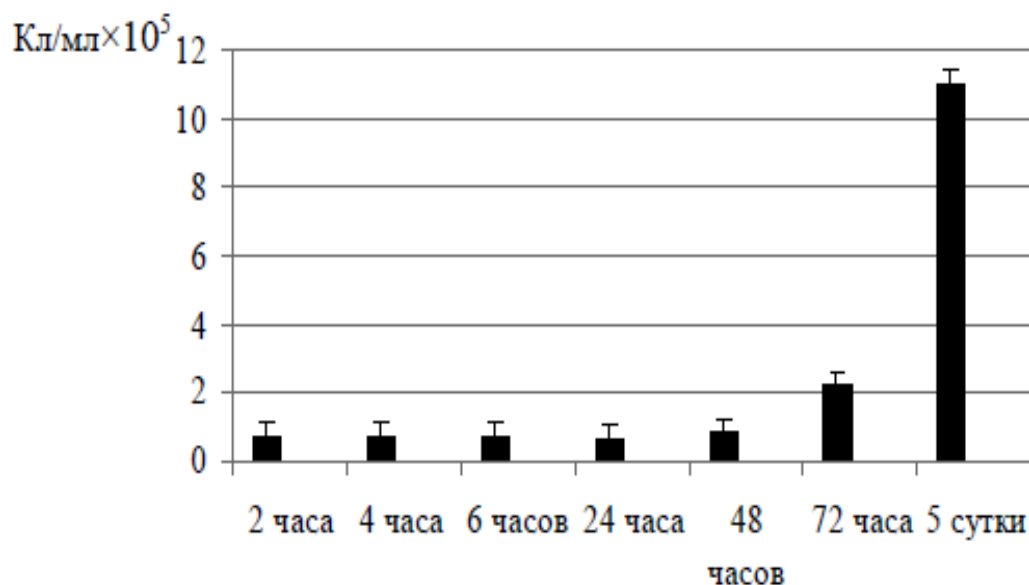
На первом этапе исследований определяли жизнеспособность и начальную адгезию клеток перевиваемой линии MDBK, скорость и качество формирования монослоя, индекс пролиферации после оттаивания.

Установлено, что после размораживания концентрация клеток составляла  $2,76 \times 10^6$ , что соответствовало 70% от числа замороженных клеток. Однако при окрашивании трипановым синим установлено, что только 70% из числа размороженных клеток живые. Таким образом, очевидно, что реальное число выживших клеток составляло 48,7% от общего числа замороженных. Поскольку экспресс–метод суправитального окрашивания трипановым синим не дает точной оценки жизнеспособности клеток и ее репродуктивной способности, а говорит лишь о мембранных разрушениях клетки, применяли комплекс методов цитологических исследований, предусматривающих изучение не только структурной целостности клеток, но и исследование способности к пролиферации, митотической активности и т.д. Наиболее достоверную оценку жизнеспособности культивируемых клеток и восстановленных после криоконсервации дает учет интенсивности роста при высеве в культуральные сосуды, в связи с чем клетки высевали в 24 – луночные планшеты. Концентрацию клеток путем разведения доводили до  $2,76 \times 10^5$  кл/мл. Через 2, 4, 6, 24 ч считали количество адгезированных клеток. В ходе эксперимента

установлено, что через 2, 4 и 6 часов число прикрепившихся клеток находилось примерно на одном уровне и составляло  $0,73 \times 10^5$  кл/мл, что соответствовало 26,4% выживаемости. Кроме того, уже на 2 ч инкубации клетки образовывали первые адгезионные фокальные контакты, участвующие в прикреплении клеток к субстрату. Часть клеток вакуолизирована, клетки лежали изолированно друг от друга. Через 24 часа инкубации число прикрепившихся клеток незначительно ниже –  $0,66 \times 10^5$  кл/мл и составляло 24%, что, вероятно, связано с отслоением и гибелью части слабо прикрепившихся нежизнеспособных клеток. Поскольку течение 24 ч инкубации количество адгезированных клеток находилось примерно на одном уровне, следует предположить, что седиментация и адгезия клеток происходит уже спустя 2 часа, а полное прикрепление клеток завершается к 24 часам. Через 48 часов количество клеток составляло  $0,86 \times 10^5$ , и соответствовало 31,1 % от общего числа размороженных клеток.

Следовательно, что в это время начинается процесс удвоения клеток. На 3–е сутки число клеток увеличивалось до  $2,22 \times 10^5$  кл/мл. Конфлюэнтный монослой формировался на 5–е сутки, число клеток равнялось  $1,1 \times 10^6$  кл/мл. При подсчете индекса пролиферации (ИП) установлено, что ИП на втором пассаже составил  $1,5 \pm 0,01$ .

Рисунок 6 – Динамика восстановления клеток перевиваемой линии MDBK после криоконсервации  $P \leq 0,05$



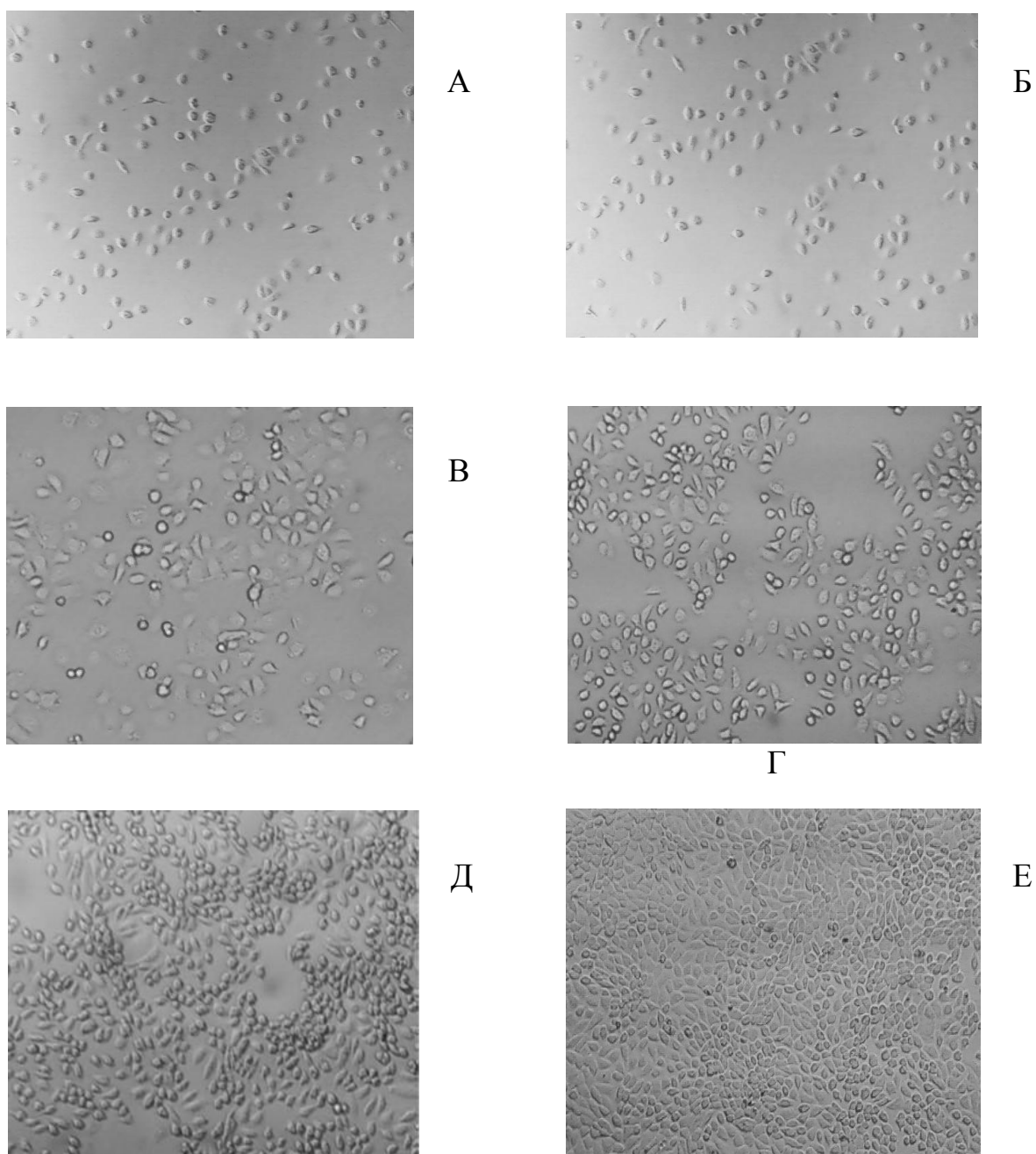


Рисунок 7 – Клетки перевиваемой линий MDBK через: А–2 часа, Б–4 часа, В–24 часа, Г–48 ч, Д–72 часа, Е–5 сутки после размораживания

На основании полученных данных можно заключить, что истинный процент жизнеспособных восстановленных после криоконсервации клеток возможно определить только путем учета интенсивности роста при высевае в культуральные сосуды. Полная адгезия размороженных клеток происходит в

первые часы инкубации после размораживания, процесс клеточного деления начинается через 48 часов инкубации после размораживания.

Работа предполагает дальнейшие исследования, основанные на подсчете изменения индекса пролиферации и митотического индекса клеток в процессе дальнейшего пассирования, а также использование биологически активных веществ, которые могут способствовать повышению процента жизнеспособных клеток в цикле замораживания – оттаивания.

На следующем этапе работы были проведены цитогенетические исследования рекреоконсервированных клеток по выявлению возможных изменений числа хромосом и модального класса хромосом методом цитологического анализа препаратов метафазных пластинок.

Результаты кариологических исследований показали, что перевиваемая культура клеток MDBK, полученная на питательной среде, содержащей АФЭ из натуральной биологически активной композиции «Вита–Форце», после криоконсервации и рекреоконсервации не изменили своей видовой принадлежности и соответствует первоначальным паспортным данным исходной культуры: модальной класс MDBK составил 48 хромосом.

Таким образом, проведенные исследования морфологических, кариологических свойств криоконсервированных и рекреоконсервированных препаратов клеток MDBK, полученных на питательной среде Игла MEM с АФЭ, после криоконсервирования, изученная линия клеток не изменила свою видовую принадлежность и модального класса хромосом. Это свидетельствует о том, что после замораживания, перевиваемые культуры клеток (КК) в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) сохраняют высокую выживаемость и хромосомный набор клеток остаются стабильными.

С целью изучения чувствительности культуры клеток MDBK, выращенных на апифитоэкстрактсодержащей питательной среде после замораживания в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) и размораживания, проводили следующую серию опытов, используя для вирусологических исследований

вакцинные штаммы вируса парагриппа-3 (ПГ-3) и ТК-А (ВИЭВ) – В-2 вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) крупного рогатого скота. С использованием указанных штаммов вирусов были проведены 3 последовательных пассажа.

Инфекционную активность вирусов ПГ-3 и ИРТ определяли титрованием их на культуре клеток MDBK, полученной на апифитопрепаратсодержащей питательной среде Игла MEM.

Результаты вирусологических исследований показали, что степень чувствительности культуры к вирусам после длительного хранения в жидком азоте практически не изменилась: к вирусам ПГ-3 она составлена  $5,5 \log$  ТЦД  $50/\text{см}^3$ .

Таким образом, криоконсервированная перевиваемая линия клеток MDBK при длительном хранении в жидком азоте  $-196^{\circ}\text{C}$  сохраняют свои биологические свойства после рекриоконсервации. При культивировании в стандартных условиях могут быть использованы для наращивания вирусной массы с целью получения вакцинных препаратов для профилактики вирусных заболеваний животных.

### **3.2.7 Влияние апифитопрепарата в составе питательных сред на репродукцию вирусов**

Известно, что метаболизм, интенсивность размножения, скорость роста и пролиферации зависят не только от линии перевиваемых клеток, но и в большей степени от особенностей биологических добавок в ростовые среды. Как было показано выше, применение биополимеров и апифитопрепаратов оказывает ростстимулирующее действие на различные линии клеток, что дает основание считать, что экстракт аписогенного и растительного происхождения в ростовой среде может повышать репродуктивную активность вирусов в культуре клеток за счет отсутствия в



них антител против возбудителей заболеваний сельскохозяйственных животных и, во-вторых, в нем содержится комплекс питательных веществ апиосогенного и фитогенного происхождения, оказывающих метаболизмстимулирующее действие на культивируемые клетки животного, растительного и микробного происхождения.

Обнаружено, что в развитии респираторных заболеваний КРС основная роль принадлежит вирусам ПГ–3 и ИРТ, инфицированность которыми регистрируется во многих регионах нашей страны [155, 172, 173].

Вышеназванные возбудители обладают цитопатическим действием, вызывая гибель культивируемых клеток в результате взаимодействия их с патогенными агентами. Вирус ПГ–3 обладает тропизмом к эпителию органов дыхания и хорошо продуцируется в клетках респираторного тракта животных, а вирус ИРТ развивается более интенсивно в клетках почек эмбрионов КРС (МДВК). Наиболее чувствительными к вирусу ПГ–3 являются клетки легкого эмбриона коровы (ЛЕК). Реовирусы культивируются на куриных эмбрионах, в клетках приматов, собак, кошек [209].

Согласно данным Х.З. Гаффарова [43], вирус ИРТ легко культивируется в монослое перевиваемой линии клеток и его цитопатическое действие (ЦПД) проявляется через 48–96 ч после заражения. Первичные признаки ЦПД характеризуются появлением зернистости, округлением клеток, которые располагаются группами в виде скоплений с утонченными перемычками и гроздьями по концам. ЦПД начинается с краев и распространяется на весь монослой с последующим образованием сферических синцитий, содержащих по 1–20 ядер.

При заражении клеток вирусом ПГ–3 в монослое появляются гранулированные и вокуоализированные округлые клетки или многоядерные симпласты, которые возникают в результате влияния нескольких клеток. Клетки, находящиеся в симпласте, утрачивают способность к митозу,

погибают и отпадают от стекла с последующим появлением в многослойной культуре отверстий – «окон» [73].

Изучение влияния апифитопрепаратсодержащей 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.

В ходе эксперимента было проведено 5 последовательных пассажей каждого вируса. Уровень накопления вируса в культуре клеток определяли методом титрования по общепринятой в вирусологии методике.

Результаты проведенных исследований по репродукции вирусов ИРТ и ПГ–3 клетками линий MDBK, LEK и VERO в фитоэкстракстсодержащей и сывороточной (контроль) ростовой средах представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Репродукция вирусов ИРТ и ПГ–3 на перевиваемых линиях культур клеток MDBK, LEK, VERO, культивируемых в апифитопрепаратсодержащей ростовой среде Игла MEM

Линии культур клеток	Ростовая среда	Титры вирусов, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	
		ИРТ	ПГ–3
MDBK	Игла MEM+АФЭ	6,9 ± 0,3 <sub>xx</sub>	6,6±0,5
	Контроль (СККРС)	6,1±0,1	6,01±0,7
LEK	Игла MEM+АФЭ	6,8±0,3	6,5±0,1
	Контроль (СККРС)	6,1±0,1	6,1±0,3
VERO	Игла MEM+АФЭ	6,6±0,7	6,3±0,9
	Контроль (СККРС)	6,1±0,1	6,1±0,5

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, титр ПГ-3 в 1,10 раза ( $P>0,05$ ).

При использовании линии клеток LEK в этих условиях также прослеживалась тенденция усиления репродукции вирусов ИРТ. Как видно из данных таблицы, титры вируса ИРТ в данном варианте опыта превышали контрольные значения в 1,01 раза ( $P>0,05$ ). Что касается вируса ПГ-3, то значение его титров были сопоставимы с таковыми контроля, имея одинаковые величины количества вируса.

При использовании линий клеток VERO наблюдалось незначительное ослабление вируспродуцирующей способности клеток, которая уступала контролю в 1,08 раза, однако разница титров контроля и опыта при этом была недостоверной ( $P>0,05$ ). Аналогичная же тенденция снижения вируспродуцирующей способности клеток VERO наблюдалась при использовании в качестве тест – вируса ПГ-3, которая уступала в 1,13 раза ( $P>0,05$ ) контрольным значениям

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.

## 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные исследования по оценке ростстимулирующей активности веществ аписогенного и фитогенного происхождения, изучения влияния их на морфологические, кариологические и вирусологические 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 сут и температуре  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , получен апифитоэкстракт (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 в(%): аспарагеновой (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 (900–1200 мг/мл) не обладает токсичностью и не оказывает отрицательного влияния на морфологические и ростовые свойства использованных линий клеток.

4. Установлено, что внесения в питательные (ростовые) среды апифитоэкстракта из расчета  $1 \times 10^{-3}$  мг/л повышала плотность клеток в 2,1

раза и индекс пролиферации в 1,64 раза по сравнению с контролем. Добавление в ростовые среды апифитоэкстракта в концентрации 1000 мг/мл обеспечивало деконтаминацию сред от аспорогенных и спорогенных контаминантов, что позволяет исключить из технологического процесса традиционных антибактериальных субстанций - антибиотики.

5. Установлено, что апифитоэкстракт обладает бактерицидной и бактериостатической активностью по отношению к контаминантам антигельминтных сред *E.coli*, *St.aureus*, *B.subtilis* к мезофильным аэробным и факультативно аэробным микроорганизмам; при этом минимальная бактериостатическая и минимальная бактерицидная (МБЦК) 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.

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. Культивирование вирусов ИРТ и ПГ–3 на питательных средах, содержащих апифитоэкстракт в количестве 1000 мг/л, обеспечивало повышение репродукции вирусов, увеличивая титр возбудителей: ИРТ в 1,13 раза (на 13%) и ПГ–3 в 1,10 раза (на 10%) по сравнению с контролем.

## 5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

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

2. Применение апифитоэкстракта путем внесения его в ростовые (питательные) среды из расчета 1 г/л, обеспечивает высокой уровень пролиферации клеток линий MDBK, LEK и VERO, повышает конечную плотность клеток в 2,1 раза и индекс пролиферации в 1,6 раза по сравнению с контролем.

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

4. Полученный апифитоэкстракт из хитинсодержащей композиции используется в лабораториях ФГБНУ "ФЦТРБ–ВНИВИ" для наращивания вирусной биомассы с целью получения вакцинных препаратов для профилактики вирусных болезней животных.

## 6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК	– аминокислота
АФЭ	– апифитоэкстракт
БАПП	– биологически активные продукты пчеловодства
ВЕРО (VERO)	– перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки
ВМС-	– высокомолекулярные соединения
ГЛА	– гидролизат лактоальбумина
ДМЕМ	– среда Игла в модификации Дюльбекко
ДМСО(DMSO)	– диметилсульфоксид
ДЭАЭ	– декстран
Игла MEM	– минимальная среда Игла
ИП	– индекс пролиферации
ИРТ КРС	– инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота
ИП	– индекс пролиферации
КК	– культура клеток
КРС	– крупный рогатый скот
КМАФАиМ	– количество мезофильных аэробных и факультативно-аэробных 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
МДСК (MDCK)	– перевиваемая культура клеток почки собаки

МЕМ	– минимальная среда Игла
мМ	– молекулярная масса
МПД	– минимальная цитотоксическая доза
МПА	– мясо – пептонный агар
МПБ	– мясо – пептонный бульон
ПГ-3	– парагрипп– 3
ПСС	– панцирьсодержащее сырье
ПС	питательная среда
СНО	– перевиваемая культура клеток яичника китайского хомячка
СПК	– сыворотка плодов коров
СКПК	– сыворотка крови плодов коров
СККРС	– сыворотка крови крупного рогатого скота
сЛПНО	– синтетический липопротеин низкой плотности
ЦПД	– цитопатическое действие
ЭМБР	– сыворотка эмбрионов коров
ВНК-21/13-02	– перевиваемая монослойная, суспензионная сублиния почки новорожденного сирийского хомячка
ФГМ	– ферментативный гидролизат мышечных белков
ФАП	– физиологически активные полимеры
HeLa (Хела)	– клеточная линия аденокарциномы шейки матки человека
ММ	– маточное молочко
МК	– микробные клетки
КОЕ	– колоний образующие единицы



## 7 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М., 1983. – 264 с.
2. Албулов, А.И. Промышленная технология получения биополимеров / А.И. Албулов, В.М. Белоусов // Матер. 7-й Междун. конф. – М.: Изд-во ВНИРО, 2003. – С.215 – 217.
3. Албулов, А.И. Различные виды хитозана для ветеринарии и животноводства / А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, С.М. Шинкарев [и др.] // Аграрная Россия. - 2004. – № 5. – С. 8 – 11.
4. Андреева, М.А. Изучение возможности использования сывороток, обработанных полиэтиленгликолем, в производстве вирусных препаратов / М.А. Андреева, Г.А. Костина, И.Ф. Радаева, С.Б. Шмелева // Цитология. - 1996.– Т.38. – № 2. — С. 175 – 176.
5. Анисимова, Л.И. Получение перевиваемых культур клеток, адаптированных к росту в питательных средах с пониженным содержанием сыворотки крови крупного рогатого скота / Л.И. Анисимова // Автореф. дис... канд. биол. наук. – Покров, 2003. – 25 с.
6. Анисимова, Л.И. Рост и вирусрепродуцирующая характеристика клональной линии клеток почки сайги, культивируемой в малосывороточной питательной среде с использованием препарата «Веторон – Е» / Л.И. Анисимова, Е.П. Прилепская, В.В. Недосеков [и др.] // Матер. Междунар. науч. – практ. конф. «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными экзот. и зооантропоноз. болезнями животных». – Покров, 2000. – С. 211 – 213.
7. Асафова, Н.Н. Метаболические регуляторные физические эффекты пчелиных продуктов, взаимосвязь с лечебными свойствами / Н.Н. Асафова // Матер. Междн. научн. – практ. конф. по апитерапии. – Уфа, 2002. – С. 194 – 196.

8. Бабак, В.Г. Коллоидные свойства хитина и хитозана / В.Г. Бабак // Хитин и хитозан. – М.: Наука, 2002. – С. 201 – 210.
9. Бадрутдинов, Н.В. Применение сыворотки крови кроликов при культивировании перевиваемых клеток и репродукции на них вирусов / Н.В. Бадрутдинов // Автореф. дис...канд. биол. наук. – Казань, 2010. – 22с.
10. Баззаев, Т.В. Восковая мазь в лечении гнойных ран ротовой полости и остеомиелита нижней челюсти / Т.В. Баззаев // Матер. Междн. научн. – практ. конф. по апитерапии. – Уфа, 2002. – С. 167 – 168.
11. Баэт, М.Р. Образование амидных связей в карбоксиметиловом эфире хитозана / М.Р. Баэт, Г.А. Вихорева, С.Л. Гальбрайт // Химические волокна. – 1990. – № 5. – С. 5 – 6.
12. Бейли, Дж. Основы биохимической инженерии / Дж. Бейли, Д. Оллис – М.: Мир, 1989. – 590 с.
13. Билько, Н.М. Культивирование гемопоэтических клеток *in vitro* и *in vivo* / Н.М. Билько // Животная клетки в культуре / Под ред. Л.П. Дьяконова. – М., 2009. – С. 455 – 470.
14. Биополимеры // Химическая энциклопедия. – М.: Изд-во «Советская энциклопедия» –1988. – Т. 1. – 554 с.
15. Большаков, И.Н. Использование хитозана и его продуктов при воспалительных заболеваниях животных / И.Н. Большаков, С.М. Насибов, Е.Ю. Куклин [и др.] // Хитин и хитозан. – М.: Наука, 2002. – С.280.
16. Борисов, И.В. Действие биологически активных продуктов пчеловодства на простые биологически тест-объекты // Матер II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 186 – 191.
17. Будникова, Н.В. Биологические активные соединения в трутневом расплоде / Н.В. Будникова // Пчеловодство. – 2009. – № 6. – С. 45 – 47.
18. Бутко, М.П. Чувствительность перевиваемой культуры клеток СПЭВ, выращенных на среде гемогидролизатккорона – и энтеровирусам свиней /

- М.П. Бутко, А.Г. Батиашвили, В.Ф. Нестеренко // Вопросы зоогигиены, дератизации и санитарной микробиологии в промышленном животноводстве. – М., 1983. – С. 102 – 104.
19. Быков, В.П. Некоторые аспекты использования хитина и хитозана в качестве флокулянтов / В.П. Быков, Е.А. Ежова, С.В. Немцев // Аграрная Россия. – 2004. – № 5. – С. 30 – 31.
20. Быкова, В.М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана / В.М. Быкова, С.В. Немцев // Хитин и хитозан. – М.: Наука, 2002. – С. 7 – 23.
21. Быкова, В.П. Производство и применение хитина и хитозана / В.П. Быкова // Тез. докл. Всеросс. конф. – М., 1995. – С. 3 – 5.
22. Васильева, А.Е. Химия высокомолекулярных соединений / Под ред. Н.А. Платэ. – М.: ВНИТИ, 1981. – 695 с.
23. Васнев, В.А. Синтез гребнеобразных производных хитина и хитозана / В.А. Васнев [и др.] // Пластические массы. – 2002. – № 10. – С. 29 – 30.
24. Ватанабэ, Х. Электромагнитные свойства биополимеров / Х. Ватанабэ // Биополимеры. Пер с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 105 – 109.
25. Вахонина, Т.В. Биологически активные продукты пчеловодства / Т.В. Вахонина // Апитерапия и пчеловодство. – Гадяч, 1991. – С. 20 – 23.
26. Вахонина, Т.В. Пчелиная аптека – Лениздат, 1993. – 239 с.
27. Велева, Е. Новые питательные среды для выращивания культур клеток / Е. Велева, П. Текерлеков // Ветеринарный сборник. – 1984. – Т. 82. – № 3. – С. 13 – 15.
28. Велямов, М.Т. Чувствительность культур клеток, выращенных в питательных средах из гидролизатов белков гороха и сои, к вирусам парагриппа – 3, инфекционного ринотрахеита и диареи крупного рогатого скота / М.Т. Велямов // Автореф. дис... канд. вет. наук. – М., 1986. – 19 с.
29. Вирник, А.Д. Полимеры в медицине / А.Д. Вирник, А.В. Снежко, К.П. Хомяков // – М., 1977. – Т. 7. – № 1. – С. 27 – 55.

30. Вихорева, Г.А. Строение и кислотн – основные свойства карбоксиметилового эфира хитозана / Г.А. Вихорева [и др.] // Высокомолекулярные соединения. – 1989. – Т. 31. – № 5. – С. 1003 – 1007.
31. Волкова, О.Н. Сыворотка тюленя – компонент ростовой среды для клеточных культур млекопитающих. Исследование цитотоксичности и ростстимулирующей активности сыворотки / О.Н. Волкова, С.И. Поликарпова, А.М. Седов [и др.] // Биотехнология.. – 1991.– № 2. – С. 38 – 40.
32. Волькенштейн, М.В. Молекулярная биофизика. – М.: Наука, 1975. – 616 с.
33. Высокомолекулярные соединения // Большая медицинская энциклопедия. – М.: Изд-во «Советская энциклопедия» – 1976. – Т 4. – С. 1495 – 1501.
34. Гаврилов, С.Н., Опарин В.Н., Курносое А.Н. // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии, эпизоотологии. – Покров. 1981. – С. 36 – 38.
35. Гаенко, Т.П. Бессывороточное культивирование генно-инженерных клеток-продуцентов ГМ – КСФ. Условия культивирования и синтез ГМ – КСФ / Т.П. Гаенко, Р.А. Алибаева // Биотехнология. – 1993. – № 11–12. – С. 39 – 41.
36. Галахарь, Н.Л. Культивирование гибридом в среде, содержащий сыворотку эмбрионов овец / Н.Л. Галахарь, С.Н. Дьяченко // Цитология. – 1987. – Т. 29. – № 9. – 1078 с.
37. Гальбрайт, Л.С. Модифицированные волокнистые и пленочные материалы / Л.С. Гальбрайт // Химические волокна. – 2005. – № 5. – С. 21 – 27.
38. Гальбрайт, Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Л.С. Гальбрайт // Соревский образовательный журнал. – 2001. –Т. 7. – № 1. – С. 51– 56.

39. Гамзадае, А.И. Некоторые особенности получения хитозана / А.И. Гамзадае, А.И. Скляр, С.В. Рогожин // Высокомолекулярные соединения. – 1985. – Т. 27А. – № 6. – С. 1179 – 1184.
40. Гамзадае, А.И. Структурная неоднородность как фактор изменчивость свойств хитина и хитозана / А.И. Гамзадае // Хитин и хитозан. – М.: Наука, 2002. – С. 112 – 119.
41. Ганиев, И.М. Применение комбинаций сывороток крови различных видов животных для культивирования клеток и репродукции вирусов / И.М. Ганиев // Автореф. дис...канд. биол. наук. – Казань, 2007. – 19 с.
42. Ганиткевич, М.И. Питательная основа для культивирования патогенных микроорганизмов / М.И. Ганиткевич, Б.И. Черняк // Открытия. – 1985. – № 15.
43. Гаффаров, Х.З. Моно – и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Е.А. Непоклонов [и др.] // – Казань: Изд-во «Фэн». – 2002. – С. 351 – 362.
44. Гендон, Ю.З. Разработка культуральной живой холодоадаптированной реассортантной гриппозной вакцины / Ю.З. Гендон, С.Г. Маркушин, И.И. Аكوпова [и др.] // Вопр. вирусол. – 2003. – № 2. – С. 12 – 17.
45. Герасимов, В.Н. Получение постоянных линий клеток из органов козы, свиньи и кролика / В.Н. Герасимов // Ветеринария. – 1998. – № 3 – С. 27 – 29.
46. Гизитдинов, Н.Н. Разработка поточного способа изготовления сухих белковых гидролизатов гороха и сои / Н.Н. Гизитдинов, Ю.Х. Бахтаунов, М.Т. Велямов // Вестник с. – х. науки Казахстана. – 1984. – № 1. – С. 62 – 64.
47. Гильмутдинов, Р.Я. Сравнительное изучение сывороток крови разных видов животных и тканевых экстрактов плодов коров при культивировании клеток / Р.Я. Гильмутдинов, Н.И. Гурьянов, Р.Р. Закиров // Матер. Междун. научн. – практ. конф. посв. 65 – летию Ульяновской ГСХА. – 2008. – Т. 4. – С. 31 – 35.

48. Гильмутдинов, Р.Я. Репродукция в культуре клеток Vero при замене в ростовой среде бычьей сыворотки крови на кроличью или плодов коров / Р.Я. Гильмутдинов, Н.И. Гурьянов, Р.Р. Закиров, Н.В. Бадрутдинов // Ученые зап. КГAVM. – 2009. – Т. 197. – С. 17 –21.
49. Гильмутдинов, Р.Я. Новые питательные среды для культивирования клеток животного происхождения и вирусов. Биотехнология: состояние и перспективы развития / Р.Я. Гильмутдинов, Н.И. Гурьянов, Э.М. Плотникова, Е.Ю. Хамзина // Материалы конгресса. М. – 2011. – Ч. 1. – С. 206 – 207.
50. Гильмутдинов, Р.Я., Курбанов Р.З. Физиология крови. – Казань: ТГТИ, 1999. – 184 с.
51. Гиниятуллин, М.Г. Технологические аспекты получения пыльцы / М.Г. Гиниятуллин, Р.Р. Батталова, Г.Ю. Нуриева // Пчеловодство. – 2002. – № 6. – С. 54 – 55.
52. Гиршович, Е.С. Способ получения основы питательных сред для культивирования микроорганизмов / Е.С. Гиршович // Открытия. – 1988. – № 22. – С. 122 – 123.
53. Глаголева, И.С. Возможность применения первичных культур клеток почек новорожденных крольчат в производстве вакцинных препаратов / И.С. Глаголева, Э.М. Плотникова // Гены Клетки. – 2014. – Том IX. – № 3. – С. 151 – 155. [www.genescells.ru](http://www.genescells.ru) (Scopus) ISSN2313-1829-
54. Глаголева, И.С. Репродукция производственных штаммов вирусов на культуре клеток новорожденных крольчат / И.С. Глаголева // Автореф. дис...канд. биол. наук. – Казань, 2013. – 23 с.
55. Гладышев, Д.Ю. Строение и фракционный состав карбоксиметилового эфира хитозана / Д.Ю. Гладышев [и др.] // Высокомолекулярные соединения. – 1990. – Т. 32Б. – С. 503 – 505.
56. Гоа, М. Образование спиральной структуры в белках / М. Гоа // Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 133 – 136.

57. Голубев, Д.Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / Д.Б. Голубев, А.А. Соминина, М.Н. Медведева // – Л.: Медицина, 1976. – 222 с.
58. Гудкова, Д.А. Зависимость пролиферации клеток линии 3Т 6 в полностью бессывороточной среде от эпидермального фактора роста / Д.А. Гудкова, А.Б. Сорокин // Цитология. – 1987. – Т. 29 – № 2. – С. 1309 – 1313.
59. Гуненков, В.В. Свойства сыворотки крови северных оленей и результаты применения ее в вирусологии и биотехнологии / В.В. Гуненков, О.И. Сухарев, В.Ф. Сирота // Вопр. вирусол. – 2003. – № 6. – С. 38 – 39.
60. Гурьянов, Н.И. Преимущество использования сыворотки крови из сердца бычков для культивирования клеток / Н.И. Гурьянов // Ветеринария. – 2008. – № 7. – С. 37 – 38.
61. Гурьянов, Н.И. Усовершенствование технологий получения сывороток крови кур, бычков, эмбрионов коров и изучение их свойств при культивировании клеток и вирусов / Н.И. Гурьянов / Автореф. дис...канд. биол. наук. – Казань, 1992. – 19 с.
62. Гурьянов, Н.И. Качество сыворотки крови коров и бычков / Н.И. Гурьянов // Ветеринария. – 2002. – № 4. – С. 24 – 25.
63. Гурьянов, Н.И. Ростстимулирующее вещество для культур клеток / Н.И. Гурьянов // Ветеринария. – 1995. – № 12. – С. 26 – 29.
64. Гушин, П.Я. Влияние прополиса на параметры суточных ритмов хронаксии нервной системы у уток / П.Я. Гушин, А.Ф. Хабиров // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 100 – 101.
65. Дмитриева, Э.А. Изучение динамики распределения сульфгидрильных соединений в культурах клеток, тканях и органах животных при репродукции вируса ящура и вируса осповакцины / Э.А. Дмитриева // Автореф. дис...канд. биол. наук. – Казань, 1968. – 20 с.

66. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Под ред. проф. Л.П. Дьяконова, проф. В.И. Ситькова // – М.: Компания Спутник+, 2000. – 400 с.
67. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре / Под ред. проф. Л.П. Дьяконова – М.: Изд. Спутник+, 2009. – 656 с.
68. Дьяконов, Л.П. Методические рекомендации по культивированию первичных культур и субкультур из ткани легкого плодов крупного рогатого скота / Л.П. Дьяконов, Д.В. Лобунцова, Б.П. Аспинадзе // – М., 1985. – 8 с.
69. Дяченко, А.С. Бессывороточная питательная среда для культивирования / А.С. Дяченко, В.С. Попова, И.Н. Матвеева и др. // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Материалы Международной научно–практической конф., посв. 45–летию института 27–28 ноября 2014. – Щелково, 2014. – С. 239 – 242.
70. Евдокимов, Ю.М. Нуклеиновые кислоты и хитозан / Ю.М. Евдокимов // Хитин и хитозан. – М.: Наука, 2002. – С. 178 – 201.
71. Елисеев, Т.А. Питательная среда для суспензионного культивирования клеток ВНК–21 / Т.А. Елисеев, К.Г. Шмаленко // Ветеринарная биотехнология. Матер. Междунар. науч. – практ. конф., посвящ. 80 – летию ФГУП. – Щелково, 2004. – С. 136 – 138.
72. Еремец, В.И. Совершенствование и стандартизация технологических процессов, методов контроля и управления качеством противовирусных вакцин / В.И. Еремец, А.Я. Самуйленко, Н.К. Еремец и др. // Ветеринарный врач. – 2011. – № 3. – С. 4 – 7.
73. Закиров, Р.Р. Применение тканевых экстрактов плодов коров при репродукции вирусов на перевиваемых линиях клеток / Р.Р. Закиров // Автореф. дис...канд. биол. наук. – Казань, 2009. – 24 с.



74. Зуева, О.Ю. Разработка биотехнологических процессов получения биологически активных соединений из медоносных пчел и исследование их свойств / О.Ю. Зуева // Авт. дисс... канд. техн. наук. – М., 2004. – 22 с.
75. Иванюшенкова, И.В. Культивирование вакцинных штаммов вируса африканской чумы лошадей в суспензии клеток с использованием гидролизата белков крови / И.В. Иванюшенкова, Г.Н. Дороненкова, В.Г. Костюченко [и др.] // Вирусные и микробные болезни животных. Сб. науч. тр. – Владимир, 1995. – С. 179 – 181.
76. Идзумии, К. Нуклеиновые кислоты / К. Идзумии // Биополимеры. Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 275 – 301.
77. Икэхара, М. Химический синтез нуклеиновых кислот / М. Икэхара, Т. Танака // Биополимеры. Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной – М.: Мир. 1988. – С. 332 – 349.
78. Ильин, Л.А. Влияние хитозана на систему крови облученных животных / Л.А. Ильин, И.Е. Андрианова, В.А. Глушков // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2004. – Т. 44. – № 2. – С. 176 – 178.
79. Ильин, Л.А. Лечебно – профилактические свойства низкомолекулярного хитозана при лучевом поражении / Л.А. Ильин, И.Е. Андрианова, В.А. Глушков // Радиобиология. Радиационная экология. – 2004. – Т. 44. – № 5. – С. 547 – 549.
80. Ильясова, З.З. Влияние прополиса и препарата «Ферран» на антителогенез / З.З. Ильясова, Р.Т. Маннапова // Матер II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 442 – 443.
81. Иржанов, С.Д. Органные культуры в вирусологических исследованиях / С.Д. Иржанов, Я.Е. Хесин // – М.: Медицина, 1977. – 159 с.
82. Исмагилов, А.М. Естественный микробиоценоз кишечника при мелофагозе овец, лечении медиатрином и иммуностимуляции оксиметилурацилом, эракондом и прополисом / А.М. Исмагилов, Р.Т.

- Маннапова // Матер II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 145 – 152.
83. Кардаков, В.П. Микроэлементы прополиса / В.П. Кардаков, Д.Е. Потехина, А.В. Белоусова, П.Т. Савин // Пчеловодство. – 1980. – № 2. – С. 29 – 30.
84. Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных / Код коллекции международному каталогу 3 – е изд. – MWIEV, Kuzminki, 109472, Moscow, Russia, Москва, 2011. – 155 с.
85. Каталог специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных. – Москва, 2006. – 2-изд. – 113 с.
86. Кивалкина, В.П. Изучение бактерицидных свойств прополиса / В.П. Кивалкина // Пчеловодство. – 1948. - № 10. - С. 50 – 51.
87. Кильдеева, Н.Р. Получение материалов медицинского назначения из растворов биосовместимых полимеров / Н.Р. Кильдеева, Л.С. Вихорева // Химические волокна. – 2005. – № 6. – С. 21 – 24.
88. Клеточная культура без использования сыворотки крови [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <http://www.humanorg.ru> (дата обращения 17.03.20014 г.).
89. Колбасова, О.Л. Изучение влияния сыворотки крови различной видовой принадлежности на культурные и вирусрепродуцирующие показатели клона клеток РК – 15/B5 [Использование полученных трофовариантов клеток в качестве резервных при культивировании и титровании вируса классической чумы свиней] / О.Л. Колбасов, С.Г. Юрков, В.В. Куриннов // Матер. Междунар. науч. – практ. конф. «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзот. зооантропоноз. болезнями животных» – Покров, 2000. – С. 188 – 190.
90. Конки, Д. Культуры животных клеток. Методы / Д. Конки, Э. Эрба, Р. Фрелини и др. // Пер. с англ. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
91. Коресек, J. Polymersin Medicine, 1977. V. –7. N 3 – P. 191 – 220.

92. Коренева, А.И. Разработка питательных сред для культур клеток млекопитающих на основе ферментативного гидролизата казеина / А.И. Коренева // Автореф. дис... канд. техн. наук. – М., 1995. – 28 с.
93. Кормление сельскохозяйственных животных: Справочник / Под ред. академика А.П. Калашникова, – М.: Росагропромиздат, 1988. – С. 47 – 48.
94. Коротич, А.С. и др. Питательная среда для выращивания микроорганизмов. А.с. 1237707 СССР // Открытия. – 1986. – № 22.
95. Коршак, В.В., Штильман М.И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М. – Наука, 1984.
96. Котова, Г.А. Маточное молочко: проблемы производства и использования / Г.А. Готова // Пчеловодство. – 1991. – № 8. – С. 44 – 45.
97. Красочко, П.А. Иммуноморфологические изменения у серебристо-черных лисиц при стимуляции поствакцинального иммунитета продуктами пчеловодства / П.А. Красочко, В.С. Прудников, А.В. Михайлова // Матер II Междун. научн.-практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 138 – 160.
98. Круман, И.И. Остановка роста клеток ВНК-21 и их стабилизация в состоянии покоя под действием сывороточных фракций / И.И. Круман, Н.Ф. Остапенко, Б.К. Гаврилюк и др. // Цитология. – 1981. – Т. 23. – № 8. – С. 934 – 943.
99. Культура животных клеток [Электронный ресурс]: Основы биотехнологии. – Режим доступа: <http://www.biotechnolog.ru> (дата обращения 06.10.2016).
100. Куприна, Е.Э. Опытная – промышленная установка для получения хитин – минерального комплекса «Хизитэл» электрохимическим способом / Е.Э. Куприна и др. // Материалы Восьмой Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Казань 12 – 15 июня 2006 г. – М.: ВНИРО, 2006. – С. 34 – 37.

101. Кусима, С. О Терапевтическом эффекте маточного молочка / С.О. Кусима // XXX Международный конгресс по пчеловодству в Нагойе (Япония). Бухарест: – Апимондия, 1985. – С. 389 – 394.
102. Леви, А. Структура и функции клетки. – М.: Мир, 1971. – 579 с.
103. Лозовой, Д.А. Исследование некоторых биохимических параметров культуры клеток ВНК–21/2–17 после криоконсервирования и кратковременного хранения при температуре 4-8°С. / Д.А. Лозовой, М.Н. Гусева, Б.Л. Манин [и др.] // Труды федерального центра охраны здоровья животных. – 2015. – Т. XIII – С. 145 – 161.
104. Лосев И.П / И.П Лосев, Е.Б. Тростянская //Химия полимеров. – М., 1971. – 371 с.
105. Лудянский, Э.А. Руководство по апитерапии – М.: Полиграфист, 1994. – 461 с.
106. Лудянский, Э.А. Советы народной медицины. – Ярославль: Верхне-Волжская кн. Изд-во, 1992. – 162 с.
107. Манин, Б.Л. Получение постоянной клеточной линии RBT из почек теленка / Б.Л. Манан, Н.В. Коропова, Е.А. Трофимова // Труды федерального центра охраны здоровья животных. – 2015. – Т. XIII – С. 165 – 179.
108. Маннапова, Р.Т. Биологическая аптека пчел и ее возможности / Р.Т. Маннапова // Матер. II-Междн. научн. – практ. конф. по апитерапии. – Уфа, 2002. – С. 70 – 72.
109. Маннапова, Р.Т. Показатели Т– и В– систем организма животных при стимуляции композиционными формами с продуктами пчеловодства / Р.Т. Маннапова, А.А. Бакиров // Матер II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 252 – 266.
110. Маннапова, Р.Т. Влияние различных композиционных форм с продуктами пчеловодства на динамику бактерицидной, лизоцимной активности сыворотки крови и фагоцитарной активности лейкоцитов /

- Р.Т. Маннапова, А.А. Бакиров // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 251 – 261.
111. Маннапова, Р.Т. Влияние прополиса и нового препарата из группы пиримидинов на естественную резистентность / Р.Т. Маннапова, Н.В. Гребенькова, В.П. Кривоногов // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 304 – 307.
112. Маннапова, Р.Т. Динамика Т – Е – РОК – лимфоцитов, Т– хелперов, Т – супрессоров и В – ВАС – лимфоцитов в крови и иммуностимуляции организма биологически активными препаратами / Р.Т. Маннапова, А.М. Исмагилов // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 138 – 144.
113. Маннапова, Р.Т. Влияние прополиса и препарата «Ферран» на миелограмму костного мозга / Р.Т. Маннапова, В.С. Лисица, Ю.Ф. Надысев, З.З. Ильясова // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 442 – 443.
114. Маннапова, Р.Т. Композиционные формы с продуктами пчеловодства, их влияние на продуктивные свойства и показатели резистентности организма животных / Р.Т. Маннапова, А.Н. Панин, А.А. Бакиров // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 268 – 277.
115. Маннапова, Р.Т. Естественный микробиоценоз кишечника и методы их коррекции при стрептококкозе телят биологически активными продуктами пчеловодства / Р.Т. Маннапова, А.Н. Панин, Р.Б. Шагимухаметов // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 206 – 209.
116. Манцыгин, Ю.А. О преимуществах использования свиной сыворотки при культивировании некоторых линий клеток животных и человека / Ю.А. Манцыгин, Н.В. Святухина, С.А. Павулсоне // Цитология. – 1983. – Т. 25. – № 10. – С. 1197 – 1201.

117. Маслова, Г.В. Влияние вида хитинсодержащего сырья на физико-химические свойства хитиновых биополимеров, полученных с помощью электрохимического активирования / Г.В. Маслова и др. // Материалы шестой Междунарн. Конф. «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва – Щелково, – 2001. – С. 35 – 38.
118. Маслова, Г.В. Теория и практика получения хитина / Г.В. Маслова // Хитин и хитозан. – 2002. – С. 24 – 44.
119. Матвеева, Л.И. Сравнительное изучение микроскопических методов диагностики контаминации культур клеток микроорганизмами / Л.И. Матвеева, А.С. Гизатуллина, Р.Я. Гильмутдинов // Ветеринарная патология. – 2003. – № 1. – С. 40 – 41.
120. Милютин, В.Н. Способ получения питательной основы микробиологических сред. А. с. 1222676 СССР / В.Н. Милютин // Открытия. – 1986. – № 13.
121. Младенов, С. Мед и медицина – София, 1971. – 87 с.
122. Мухин, С.А. Сердечно – сосудистой и гериатрический препарат из восковой моли / С.А. Мухин, И.А. Спиридонов, А.К. Рачков и др. // Биол. акт. продукты пчеловодства и их использование. – 1990. – С. 55 – 57.
123. Нариманов, А.А. Сравнительное исследование действия экстракта плацентарной ткани и фибропектина на клетки млекопитающих *in vitro* / А.А. Нариманов, Б.К. Гаврилюк // Биотехнология. – 1990. – № 5. – С. 38 – 40.
124. Неклюдов, А.Д. Дрожжи как источник получения аминокислотных препаратов / А.Д. Неклюдов, Х.А. Купов // Антибиотики и химиотерапия. – 1988. – № 9. – С. 708 – 713.
125. Неклюдов, А.Д. Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами / А.Д. Неклюдов, С.М. Навашин // Прикл. биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21. – Вып. 1. – С. 3 – 17.

126. Немцев, С.В. Содержание хитина в организме медоносных пчел / С.В. Немцев, О.Ю. Зуева, Р.Г. Хисматуллин // Пчеловодство. – 2001. – № 5. – С. 50 – 51.
127. Немцев, С.В. Получение хитина и хитозана из медоносных пчел / С.В. Немцев, О.Ю. Зуева, Р.Г. Хисматуллин [и др.] // Приклад. Биохим. и микробиол. – 2004. – Т. 40. – № 1. С. 42 – 46.
128. Немцев, С.В. Получение низкомолекулярного водорастворимого хитозана / С.В. Немцев, С.М. Ильина, С.М. Шинкарев // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 37 – 42.
129. Никитина, В.А. Изучение источников контаминатов культур клеток / В.А. Никитина, К.М. Хакимова, С.Х. Хаертынов // Учен. зап. КВИ им. Н.Э. Баумана. – 1975. – Т. 119. – С. 163 – 167.
130. Николаев, А.К. Разработка и использование питательной среды на основе ферментативного гидролизата белков кормовых дрожжей (паприн) для выращивания клеток и вирусов / А.К. Николаев, В.Н. Герасимов, В.И. Смирнов [и др.] // Вирусные и микробные болезни животных. Сборник науч. трудов – Владимир, – 1995. – С. 174 – 178.
131. Никулин, А.А. Цветочная пыльца как фармакотерапевтическое средство при лечении экспериментально вызванных патологических состояний / А.А. Никулин, П.А. Чумаченко, С.А. Вархалева [и др.] // – Вологда, 1987. – С. 38 – 39.
132. Новохатский, А.С. Тканевые и клеточные культуры в вирусологии и молекулярной биологии / А.С. Новохатский // Итоги науки и техники. Сер. Вирусология ВИНТИ – 1979. – Т. 8. – 156 с.
133. Нудьга, Л.А. Производные хитина и хитозана и их свойства / Л.А. Нудьга // Хитин и хитозан. – 2002. – С. 141 – 147.
134. Общая химическая технология / Под ред. И.П. Мухленова. – М: Высшая школа, 1984. – Т. 1. – 255 с.

135. Одинцова, Н.А. Ростовый фактор из тканей морского моллюска *Mytilusedulis* / Н.А. Одинцова, А.М. Нестеров, Д.А. Корчагина // Цитология. – 1992. – Т. 34. – № 10. – С. 90 – 95.
136. Озерецковская, Л.А. Получение, свойства и применение / Л.А. Озерецковская, Н.И. Васюкова, С.В. Зиновьева // Хитин и хитозан. – 2002. – С. 339 – 345.
137. Онари, С. Свойства полипептидов и белков / С. Онари // Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – 1988. – С. 41 – 50.
137. Онищенко, Г.Г. Оптимизация технологии производства живой культуральной противогриппозной вакцины с использованием питательной среды на основе гидролизатов белков растительного происхождения / Г.Г. Онищенко, Н.А. Мазуркова, Г.П. Трошкова и др. // Биотехнология. – 2007. – № 3. – С. 31 – 37.
138. Ооари С. Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 353 – 383.
139. Оои М., Сакияма Ф. Подход к ферментативной реакциям Биополимеры / Пер с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 181 – 229.
140. Орлов, Б.Н. Пчелиный яд, его биологическое значение / Б.Н. Орлов // Буклет ВДНХ СССР, 1978.
141. Осинцева, Л.А. Микробиологическая характеристика трутневого гомогената / Л.А. Осинцева, В.И. Коркина, В.В. Кабышева // Пчеловодство. – 2010. – № 7. – С. 45 – 47.
142. Панин, А.Н. Динамика массы, структурных компонентов тимуса, Т-лимфоцитов телят, полученных от стимулированных прополисом коров / А.Н. Панин, Р.Т. Маннапова, Р.К. Далинов, Н.Г. Кутлин // Матер. II Междун. Научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 90 – 93.



143. Панкова, Г.Е. Гидролизаты мышечных белков при культивировании тканей животных *in vitro* / Г.Е. Панкова, Д.А. Цуверкалов // Ветеринария. – 1963. – № 5. – С. 62 – 63.
144. Пат. РФ. № 2488632. Постоянная линия клеток плавников сибирского осетра (*acipenserbaeri*), используемая для вирусологических исследований рыб.
145. Патент РФ. № 2455015. Способ получения сыворотки крови плодов коров для культивирования клеток животных и человека / Э.М. Плотникова, Н.И. Гурьянов, А.В. Иванов – Оpub. 10.07.2012.
146. Патент РФ № 2460786. Способ получения сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота для культивирования клеток животных и человека / А.В. Иванов, Э.М. Плотникова, Н.И. Гурьянов, А.А. Иванов, Н.В. Бадрутдинов, Р.Х. Хусаенов – Оpub. 10.09.2012.
147. Патент РФ № 25200868 28 апреля 2014г / Способ получения первичной культуры клеток почек новорожденных крольчат для репродукции вирусов / А.В. Иванов, Э.М. Плотникова, И.С. Глаголева, Р.Г. Фазлиахметов, Л.Р. Хазиев, Р.Н. Низамов.
148. Патент РФ № 2324361 С1А23К 1/00 биологической активной кормовая добавка «Вита-Форце» / А.В. Иванов, Р.Н. Низамов, Г.В. Конюхов и др. – Оpub. 20.05.2008 Бюл. № 14.
149. Патент РФ № 3556121С, 10.07.2015 / Способ получения настоя чайного гриба Иванов А.В., Низамов Р.Н., Конюхов Г.В. и др.
150. Патент РФ. 2455015. Способ получения сыворотки крови плодов коров для культивирования клеток животных и человека / Э.М. Плотникова, Н.И. Гурьянов, А.В. Иванов – Оpub. 10.07.2012.
151. Пиотрович, В.А. Разработка питательных сред для культивирования культур клеток / В.А. Пиотрович // Автореф. дис...канд. вет. наук. – Киев. 2002. – 18 с.
152. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры – М.: Химия. 1986. – 296 с.

153. Плотникова, Э.М. Некоторые аспекты увеличения биомассы перевиваемых клеточных линий *in vitro* / Э.М. Плотникова, Е.Ю. Хамзина, Ю.М. Кириллова // Междунар. Научно – практич. конф. «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». – М.: ЗАО «Экспо-биохим – технологии». – РХТУ им. Менделеева. – 2012. – 319 с.
154. Плотникова, Э.М. Новые питательные среды для культивирования клеток животного происхождения вирусов / Э.М. Плотникова, Н.И. Гурьянов, И.М. Ганиев // Материалы конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития. – 2011. – Ч. 1. – С. 206 – 207.
155. Плотникова, Э.М. Способ повышения выживаемости облученных клеток МДВК, используемых при получении противовирусных вакцин / Э.М. Плотникова, Р.Н. Низамов, З.Г. Чурина [и др.] // Матер. III-Межд. ветеринарного конгресса «Ветеринария на пути инновационного развития агропромышленного комплекса». Алмата. – 2015. – С. 221 – 226.
156. Подчерняева, Р.Я. Методические рекомендации по контролю качества жидкой сыворотки крови крупного рогатого скота, применяемой в медицинских и биологических целях / Р.Я. Подчерняева, Г.Р. Михайлова, Е.И. Исаева // Миллиметровые волны в биологии и медицине – 2004. – (33). – № 1. – С. 12 – 17.
157. Поликарпова, С.И. Рост клеток в культуре в средах, содержащих сыворотки отечественного производства / С.И. Поликарпова // Цитология. – 1987. – Т. 29. – № 9. – С. 1099 – 1100.
158. Полимеры в медицине / Пер. с англ. Изд. Ред. Н.А. Плата. – М., 1969. – 275.
159. Поправко, С.А. Растительные источники прополиса / С.А. Поправко // Пчеловодство. – 1980. – № 2 – С. 28 – 29.
160. Пригода, А.С. Конструирование бессывороточных питательных сред для культивирования клеток млекопитающих / А.С. Пригода, А.В. Корнеева // Биотехнология. – 1991. – № 4. – С. 5 – 6.

161. Присакарь, В.И. Антимикробная активность продуктов пчеловодства / В.И. Присакарь, Н.Г. Еремия, Т.С. Чайя, Т.Г. Плот // Матер. IV Научн. – конф. по апитерапии – Рыбное, 1995 – 38 с.
162. Прогода, И.А. Получение апидобавок из личинок пчел / И.А. Прогода // Пчеловодство. – 2009. – № 8. – С. 48 – 50.
163. Прозоровский, С.В. Питательная среда для культивирования *Legionellarpneumophila* / С.В. Прозоровский // Открытия. – 1987. – 46 с.
164. Простяков, А.П. Гидролизат белков сыворотки молока для питательных сред клеточных культур / А.П. Простяков, С.П. Сергеева, Л.П. Дьяконов, Г.М. Строкина // Ветеринария. – 1990. – № 7. – С. 67 – 69.
165. Рабинович, И.М. Применение полимеров в медицине. – Л., 1972. – 198 с.
166. Радаева, И.Ф. Исследование свойств сывороток крови различных видов животных / И.Ф. Радаева, Г.А. Костина, С.Б. Шмелева, М.А. Андреева // Цитология. – 1996. – Т. 38. – № 2. – 244 с.
167. Разводовский Е.Ф. Химия и технология высокомолекуляр. сред. – 1976. – Т. 10. – С. 61 – 95.
168. Раскин, Б.М. Всесоюзный съезд микробиологов и эпидемиологов / Б.М. Раскин // Тезисы докладов, – 1999. Ч. 1. – С. 310 – 311.
169. Рачков, А.К. Перспективы и успехи в применении лечебно-профилактических препаратов на основе экстракта личинок восковой моли / А.К. Рачков, М.А. Рачкова, Т.Ф. Дыминич, [и др.] // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 443 – 444.
170. Самуйленко, А.Я. Использование хитозана в защитных средах высушивания / А.Я. Самуйленко, А.И. Албулов, А.А. Нежута // Матер. Международной научно – практической конф., посв. 45– летию института «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК», 27–28 ноября 2014 – Щелково, 2014. – С. 218 – 222.

171. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных / А.Я. Самуйленко // Диагностика вирусных инфекций. – 2011. – С. 114 – 185.
172. Самуйленко, А.Я. Использование культуры клеток в диагностике вирусных болезней / А.Я. Самуйленко // Инфекционная патология животных, диагностика вирусных инфекций. – 2011. – Т. 7. – С. 17 – 119.
173. Самуйленко, А.Я. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК / А.Я. Самуйленко, В.М. Попова, И.Н. Матвеева, [и др.] // Матер. Международной научно-практической конференции. «Современные методы фильтрации в биотехнологии», 5 – 7 декабря 2014г. e – mail: <mailto:vnitib@mail.ru>  
HYPERLINK
174. Сафонов [и др.] // Вопр. вирусол. – 1989. – Т. 34. – № 5 – С. 623 – 627.
175. Сафронова, Т.М. Биохимическая свойства хитин содержащего сырья / Т.М. Сафронова, Г.П. Рыговская, Г.Д. Щиголева // ЦНИИТЭ и РХ. – 1974. – В. 11. – С. 3 – 7.
176. Светлоу Р. Молекулярная биофизика. – М.: Мир, 1984. – 573 с.
177. Сергеев, В.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии / В.А. Сергеев, Ю.А. Собко// – К.: Урожай, 1990. – 152 с.
178. Сергеев, В.А. Размножение вирусов животных в культуре ткани / В.А. Сергеев – М.: Колос, 1966. – 311 с.
179. Сергеев, В.А. Суспензионное культивирование вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней / В.А. Сергеев, С.М. Гурбанов, Е.А. Непоклонов, [и др.] // Вопр. вирусол. – 1989. – № 1 . – С. 103 – 106.
180. Сергеев, В.А. Ферментативный гидролизат мышечных белков как основа питательных сред для клеточных культур / В.А. Сергеев, В.И. Жестеров
181. Сидельковская, Ф.П. Химия N-винилпирролидона и его полимеров. – М., Наука. – 1970. – 150 с.

182. Сисидо, М. Спектры поглощения и эффект / М. Сисидо // Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 51 – 71.
183. Сорокин, А.Я./ А.Я Сорокин, В.А Кузнецова, Н.А Домничева, [и др.] // Иод – высокополимеры и биологические возможности организма. Л. – «Наука», 1979. – 259 с.
184. Софронов, А.П. Термохимия водных растворов солей хитозана-природного биополимера / А.П. Софронов // Хитин и хитозан. – М.: Наука, 2002. – С. 130 – 141.
185. Спир, Р.Е. Биотехнология клеток животных / Р.Е. Спир, Дж.Б. Гриффитс // Агропромиздат. – 1989. – 76 с.
186. Степанова, Е.А. Биологически активные амфифильные производные хитозана / Е.А.Степанова и др. // Химические волокна. – 2005. – № 6. – С. 57 – 58.
187. Стромская, Т.П. Клон Rat – 2/ 38 – ТР с пониженной зависимостью роста от сыворотки – модель для изучения роли факторов роста в экспрессии признаков трансформации / Т.П. Стромская, М.В. Суздалева, А.А. Ставровская // Цитология. – 1987. – Т. 29. – № 9 . – 1106 с.
188. Стряпиков, А.А. Основы химии высокомолекулярных соединений /А.А Стряпиков , В.А. Деревицкая ,Г.Л. Слонимский // – М., 1966. – 379 с.
189. Сунамото, Д., Иваното, К. Активация клеток // Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 446 – 466.
190. Суоко, Н. Структура полипептидов и белков // Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 105 – 117.
191. Сюрин, В.Н., Белоусова, Р.В. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных. – М.: Колос, 1986. – 126 с.
192. Талпай, Б.М. Цветочная пыльца // Апиакта. – 1986. – № 3. – С. 103 – 118.

193. Тарунина, М.В. Ростстимулирующая активность сред, кондиционированных клетками бессывороточных вариантов / М.В. Тарунина, Е.В. Березкина, В.А. Плескач // Цитология. – 1987. – Т. 29. – № 9. – 1106 с.
194. Телишевская, Л.Я. Разработка методов изготовления гидролизатов для питательных сред / Л.Я. Телишевская, С.П. Сергеева // Аграр. наука. – 2000. – № 10. – С. 22 – 23.
195. Тихонов, А.И. Разработка технологии и исследования лекарственных форм с фенольными соединениями прополиса // Автореф. дисс... докт. фармацевт. наук. – Харьков, 1983. – 150 с.
196. Тихонов, А.М. Сравнительное изучение антимикробной активности препарата прополиса / А.М. Тихонов, Т.Н. Будникова, А.М. Кобзарь // Апиакта (Бухарест) – XXIII. – 1988. – № 4 – С. 108 – 111.
197. Тихонов, А.М. Изучение антимикробной активности суппозиторий с препаратами прополиса / А.М. Тихонов, Т.Г. Ядрых, Л.Ф. Силаева // Матер. II Междун. научн. –практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 280 – 281.
198. Трошкова, Г.П. Совершенствование технологии приготовления питательных сред на основе ферментативных гидролизатов рисовой и соевой муки / Г.П. Трошкова, Л.Д. Мартынец, Е.В. Кирова и др. // Биотехнология. – 2006. – № 4. – С. 74 – 78.
199. Тэрамото, А. Влияние структурного переходов на свойства белков // Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е.И. Пичужкиной. – М.: Мир, 1988. – С. 144 – 176.
200. Урьяш, В.Ф. Термодинамика хитина и хитозана / В.Ф. Урьяш // Хитин и хитозан. – 2002. – С. 119 – 130.
201. Ушаков, В.Г. Синтетические полимеры лекарственного назначения. – Л., 1962. – 298 с.
202. Федотова, А.В. Выращивание клеток щитовидной железы при пониженных концентрациях сыворотки крови / А.В. Федотова А.В., А.Г.

- Снежко, Н.С. Белавкина // Цитология. – 1994. – Т. 36. – № 6. – С. 538 – 539.
203. Феофилова, Е.П. Биологические функции и практическое использование хитина / Е.П. Феофилова // Прикл.биохим. и микробиол. – 1984. – Т. 20. – №2. – С. 147 – 160.
204. Феофилова, Е.П. Фундаментальные науки – народному хозяйству / Е.П. Феофилова, А.П. Марьин, Ю.А. Шляпиков // – М.: Наука, 1990. – С. 270 – 271.
205. Фомичев, Ю.П. Сорбционно – детоксикационные технологии в животноводстве и ветеринарной медицине / Ю.П. Фомичев // Аграрная Россия. – 2004. – № 5. – С. 3 – 7.
206. Фридлянская, И.И. Новые методы культуры животных тканей. – М.: Мир, 1986. – 126 с.
207. Хаертынов, С.Х. Взятие крови с целью получения сыворотки для культивирования клеток / С.Х. Хаертынов, Н.К. Мамлеева // Цитология. – 1982. – № 11. – С. 66 – 67.
208. Хазиев, Л.Р. Влияние фито – зооэкстрактов на вируспродуцирующие свойства культивируемых клеток / Л.Р. Хазиев // Автореф. дис...канд. биол. наук. – Казань, 2013. – 16 с.
209. Хазиев, Л.Р. Новая биодобавка в питательные среды для выращивания культур клеток и репродукции на них вирусов / Л.Р. Хазиев, Э.В. Плотникова, Н.И. Гурьянов // Молодежная научно-практ. конф. «Биомедицина, биотехнология и экологическая безопасность: достижения молодых ученых и специалистов Евразии». – М., – 2014. - С. 90 – 91.
210. Хазипов, Н.З. Избранные труды / Н.З. Хазипов // Центр информационных технологий КГАВМ. – 2007. – 338 с.
211. Хисматуллина, Н.З. Апитерапия. – Пермь.: Мобиле. – 2005. – 296 с.
212. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова // – М.: Наука. 2002. – 368 с.

213. Христова, В.М. Лечение воском воспалительных заболеваний суставно-мышечной системы / В.М. Христова // Матер. XXX Междунарн. конгр. по пчеловодству. – Бухарест: Апимондия, –1985. – 75 с.
214. Чазов, Е.И. Физиологически активные полимеры / Н.А. Платэ, А.Е. Васильев // – 1986. –С. 5 – 6.
215. Шагивалеев, А.Д. Микробиоценоз кишечника лошадей под влиянием прополиса, цеолитов и биотрина / А.Д. Шагивалеев, Р.Т. Маннапова // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 230 – 232.
216. Шагимухаметов, Р.Б. Иммунный статус, естественный икробиоценоз кишечника и методы коррекции при стрептококкового-криптоспоридиозном заболевании телят / Р.Б. Шагимухаметов // Матер II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 209 – 223.
217. Шагимухаметов, Р.Б. Стимуляция Т– и В– систем иммунитета при стрептококкозе телят биологически активными продуктами пчеловодства / Р.Б. Шагимухаметов, Р.Т. Маннапова, А.Н. Панин // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 201 – 206.
218. Шайхуллов, Р.Р. Иммунный статус птиц – бройлеров и его коррекция прополисом и цеонитами / Р.Р. Шайхуллов, Р.Т. Маннапова // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 443 – 444.
219. Шафеева, Р.С. Культивирование клеток в бессывороточной среде с ростовыми белками из сыворотки крови крупного рогатого скота / Р.С. Шафеева, А.Г. Лютов, Д.В. Крутулина и др. // Актуал. вопр. прикл. биохимии и биотехнологии. – 1998. – С. 261 – 263.
220. Шелудько, Н.С. Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. – Л.: Наука, 1978. – 262с.
221. Шептун, Н.Г. Биохимическое обоснование к получению и использованию гидролизатов фибрина и отходов производства препаратов иммуноглобулинов / Н.Г. Шептун // Автореф. дис... канд. биол. наук. – Воронеж, 1989. – 22 с.



222. Шилов, С.О. Иммунологические перестройки в костном мозге цыплят при стимулировании прополисом и бифидумбактерином / С.О. Шилов // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 229 – 230.
223. Эрнст, Л.К. Использование комнатных мух в качестве хитин – содержащего сырья / Л.К. Эрнст, Ф.И. Злочеваный, В.А. Ерохин // Аграрная Россия. – 2000. – № 5. – С. 51 – 57.
224. Юмагужин, Ф.Г. Влияние синтетического феромона «АПИРОЙ» на развитие клеток восковой железы пчел / Ф.Г. Юмагужин, Р.Г. Нугуманов, А.Г. Маннапова // Матер. II Междун. научн. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 462 – 464.
225. Ясуоко, Н. Структура полипептидов и белков // Биополимеры / Пер. с японского М.К. Овечкиной и Е. И. Пичужкиной. – М.: Мир. – 1988. – С. 105 – 117.
226. Butler, G.B. Anionic Polymers Drugs/ L.G. Donaruma, R.M. Ottenbritte, O. Vogl. Eds, Wiley – Intersci. Publ., N.Y., 1978. – P. 49 – 141.
227. Cantor F., Schimmel S. Biophysical Chemistry. – Washington: Acad. Press, 1977. – 275 p.
228. Carraeber Ch.E. Biomedical and obental Applications of Polymere. – N.Y.: Plennen Press. – 1960. – 226 p.
229. Chang, R. Macromolecular growth requirements of human cells in continuous culture / R. Chang, R. Pennell, W. Keller, L. Wheaton // Proc. Soc. exp. Biol. – 1959. – V. 102. – № 1. – P. 213 – 217.
230. Chitin: A Natural Product for the 21 st Century, international Comission on Natural Health Product, 1995.
231. Dunham, W. Propagation of polivirus in chick embryo cell cultures. I. Cultivation of 3 virus types / W. Dunham, F. Ening // Proc. Soc. exp. Biol. – 1957. – V. 95. – № 4. – P. 637 – 639.
232. Echigo N., Takenaha T., Iatsunami K., Comparative studies on Chemical composition of Honey / Royal Ielli and Pollen Loades // Bull. Fuc.Agr. Tamagawa Univ. – 1986. – № 26. – P. 1 – 8.

233. Fell, I.L. The in vitro cultivation of tissue and cell of Pacific salmon and steelhead trout / I.L. Fell., B.H. Robinson // *Ann.N.V. Acad. Sei.* – 1929. – V. 126. – № 1. – P. 566 – 571.
234. Ferguson, J. Isolation and long-term culture of diploid mammalian cell lines / J. Ferguson, A. Wansbrough // *Cancer Res.* – 1962. – V. 22. – № 5. – Part 1. – P. 556 – 562.
235. Foley, G. Isolation and serial propagation of malignant and normal cells in semi-defined media. Origins of CCRF cell lines / G. Foley, B. Drolet, R. McCarthy // *Cancer Res.* – 1960. – V. 20. – № 6. – P. 930 – 938.
236. Frazatti – Galina, N. Vero – cell rabies vaccine produced using serum – free medium / N. Frazatti – Galina, R. Mourao – Fuches, R. Paoli [et al] // *Vaccine.* – 2004. – № 4. – P. 511 – 517.
237. Girardi, A. Growth and CF antigenicity of measles virus in cells deriving from human heart / A. Girardi, J. Warren, C. Goldman, B. Jeffries // *Proc. Soc. exp. Biol.* – 1958. – V. 98. – № 1. – P. 18 – 22.
238. Hassis H., *Cell Fusion.* – Oxford.: Clarendon Press. 1970. – 275 p.
239. Hood, M.A. Chitin / chitosan // *Abst. Firstintern. Cong.* – Boston, 1977. – P. 44 – 45.
240. Ingram, D.O. *The Biosynthesis of Macromolecules.* – N.Y.: W.A. Benjamin Inc, – 1985 – P. 395.
241. Jordan, D.O. *Chemistry of the Nucleic Acids.* – Washington: Butterworths, –1978. –P. 379.
242. Kalal J., Drobnik J., Korecek J., Exner J. – *Polymeric Drugs.* L., G. Domaruma, O. Vogl. eds. Academic Press, N.Y. – San. Francisco – L., –1978 – P. 131 – 159.
243. Keay, L. Production of sindbis, influenza, and vesicular stomatitis viruses in chicken embryo and rat embryo cell suspensions / L. Keay, Schlesinger // *Biotechnol Bioeng.* – 1974. – № 16 (8). – P. 1025 – 1044.
244. Kniazeff, A. // *J. Methods in Enzymology.* – 1979. – V. 43. – P. 233 – 257.

245. Madin, S. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions / S. Madin, N. Dazby // *Proc, Soc. Exp. Biol. Med.* – 1958. – V. 98. – P. 574 – 576.
246. Methods for preparation of media, supplements and substrate for serum-free animal cell culture // *Cell Cult. Mol and Cell Bio* – 1996. – V.1.
247. Monlander C., Kniazeff A., Boone C. et al. // *In vitro.* – 1972. – V. 7. – № 3. – P. 168 – 173.
248. Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains / P.S. Moorhead // *Exp. CellRes.* – 1961. – P. 585 – 621.
249. Muzzarelli R.F., F. Chitin. – Oxford: Pergamon Press, 1977. – 309.
250. Ottenbrite R.M., Enright N., Munson A., Kaplan A. – // *Amer. Chem. Soc. Polymer*, 1979, – V. 20, № 1, – P. 600 – 603.
251. Palache, A. Safety reactogenicity and immunogenicity of Mardin Darby canine kidney cell – derived inactivated influenza subunit vaccine. A meta – analysis of clinical studies / A.H. Scheepers, V. Regt [et al.] // *Dev. Biol. Stand.* – 1999. – № 98. – P. 115 – 125.
252. Patent 80263, MRI3 A61K 35/22. Proceden de preparare a seruluistimulat de cal, pentru culture celulate / E. Train, M. Melania, M. Marin, N. Stefan (CPP), 1982.
253. Puck, T. Genetic of somatic mammalian cells. Long – term cultivation of enploid cells from human and animal subjects / T. Puck, S. Ciecura, A. Robinson // *J. Exp. Med.* – 1958. – V. 108. – № 6. – P. 945 – 955.
254. Pumper, R. Multiplication of vaccinia virus in serum – free and serum-containing cell cultures / R. Pumper, L. Alfred, D. Sackett // *Nature.* – 1960. – V. 185. – № 4706. – P. 123 – 124.
255. Readings in mammalian cell culture/ Pollack R. Ed. – Cdd Spring Harbor Laboratory, 1981. – 395 p.
256. Reed, L., A simple use hod of estimating fifty percent endpoints / L. Reed, H. Muench // *Am. J. Hyg.* – 1938. – V. 27. – P. 493 – 496.

257. Swim, H. Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially / H. Swim, R. Parker // Am. J. Hyg. – 1957. – V. 66. – № 2. - P. 235 – 243.
258. Tjio, J. Genetics of somatic mammalian cells. Chromosomal constitution of cells in tissue culture / J. Tjio, T. Puck // J. Exp. Med. – 1958. – V. 108. – №2. – P. 259 – 268.
259. US Food and Drug Administration. Federal Register, 59 FR 44 591, August 29, 1994.
260. Welke G. Die Verwendung von Diploidsellinien als Vermehrungssubstrat für die Virusimpfstoffproduktion / G. Welke // Gbl. Gesamte Hyg. – 1980. – Bd. 26. – P. 365 – 372.
261. Wolf K., Haffen I.F. Poikilodnezen vertebrate cell line and viruses // I Tissue Culture Methods, – 1952. – VII. – P. 9 – 14.
262. Wosu, L. Optimal parameters for in vitro growth of parvoviruses / L. Wosu // Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis. – 1987. – V. 10. – № 1. – P. 25 – 32.
263. "<http://www.almidic.ru/>" **HYPERLINK** medoc.com (дата обращения 10.10.2016г (апизан) **HYPERLINK** "<http://www.cbio.ru/>" (полимеры).