

волн морфологические изменения в дерме кожи всех участков локализации сходны с описанными в предыдущие сроки. На 5-е сутки после воздействия СВЧ-волн в дерме кожи всех участков выявляется усиление явлений периваскулярного отека, а также набухания, снижения фибриллярности и осмиефильности коллагеновых волокон, выявляемое при электронной микроскопии. На 10-е сутки после воздействия микроволн изменения со стороны волокнистых структур, сходны с описанными на 5-е сутки, но имеют меньшую степень выраженности. На 25-е сутки после воздействия в отдельных участках дермы выявляется отчетливое усиление интенсивности окраски. На 60-е сутки после воздействия микроволн морфология волокнистого компонента сетчатого и сосочкового слоев дермы кожи от исходной практически не отличается, а коллагеновые волокна умеренно окрашиваются эозином и кислым фуксином.

**ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ГИДРОЛИЗАТА СОИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА
БРОМЕЛАЙНА И ОЦЕНКА РОСТОВЫХ
СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
НА ЕГО ОСНОВЕ ДЛЯ ПЕРЕВИВАЕМЫХ
КУЛЬТУР КЛЕТОК**

Трошкова Г.П. *, Мазуркова Н.А. **,
Сумкина Т.П. **, Мартынец Л.Д. **,
Шишкина Л.Н. **, Карабинцева Н.О. *

* *Новосибирский государственный
медицинский университет*

** *ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора*

В настоящее время ферментативные белковые гидролизаты, характеризующиеся высокими питательными свойствами, доступностью и относительно невысокой стоимостью все чаще применяют в качестве аминокислотно-пептидной основы вирусологических питательных сред. Заметный экономический эффект при использовании питательных сред на основе ферментативных гидролизатов белоксодержащего сырья в биотехнологическом производстве с использованием культур клеток, обусловил необходимость расширения разработки, изучения и внедрения гидролизатных сред в практику. Критерием при отборе белков для получения гидролизатов, используемых в составе питательных сред, является полноценность. Из растительных белков наибольший потенциал имеют белки соевых семян. В связи с этим создание белковых гидро-

лизатов соевой муки и их применение для конструирования вирусологических питательных сред является перспективным способом решения проблемы дефицита и высокой стоимости сред на основе индивидуальных аминокислот.

Целью настоящей работы явилось совершенствование технологии получения гидролизата соевой муки с использованием протеолитического растительного фермента бромелайна, конструирование питательной среды на основе полученного гидролизата и оценка возможности ее применения для культивирования клеток млекопитающих.

Условия эксперимента

В качестве субстрата для гидролиза была использована соевая мука высшего сорта. В качестве протеолитического растительного фермента применяли бромелайн («Sigma», США). Физико-химические свойства гидролизатов оценивали по следующим показателям: внешний вид, цвет, запах – органолептически; концентрацию ионов водорода 1%-ного раствора – потенциметрически; массовую долю влаги – весовым методом в соответствии с ФС 42-3874-99; растворимость – путем учета времени полного растворения 5 г гидролизата в 100 мл очищенной воды. Аминный азот определяли методом формольного титрования по ФС 42-3874-99, белковый общий азот и остаточный азот в безбелковом фильтрате – колориметрическим методом с реактивом Несслера по ФС 42-3874-99. Коэффициент аминный рассчитывали по отношению массовой доли аминного азота к массовой доле общего, коэффициент протеолиза – по отношению массовой доли остаточного азота к массовой доле общего. Аминокислотный состав гидролизатов определен на аминокислотном анализаторе «Мультихром» в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ Баратовой Л.И.

В работе использовали культуры клеток MDCK (клетки почки взрослой самки кокерспаниеля), Vero (клетки почки зеленой марьшишки), ВНК-21 (клетки почки новорожденно-го сирийского хомячка), полученные из музея клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Ростстимулирующую активность питательных сред оценивали путем культивирования клеточных линий в течение 5 последовательных пассажей в культуральных флаконах площадью 25 см². Посевная доза составляла 1,0×10⁵ клеток в 1 мл для клеточных линий MDCK и Vero и 0,5×10⁵ клеток в 1 мл для ВНК-21. Пересев осуществляли через 3-4 суток после формирования монослоя. Для снятия клеток использовали 0,25 % раствор трипсина и 0,02% раствор Версена в соотношении 1:1. Учитыва-

ли сроки образования монослоя, морфологию клеток и индексы пролиферации. Величина индекса пролиферации рассчитывалась как отношение количества выросших клеток к исходному в пяти повторах для каждого эксперимента. В качестве контрольных использовали питательные среды ДМЕМ и Игла МЕМ, производства ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» с добавлением 2, 3 и 5% сыворотки крови плодов коровы (СКПК) («Gibco», США) или 10% сыворотки крови крупного рогатого скота (ООО «Биолот», Санкт-Петербург).

Данные представленные для обсуждения представляют собой статистически обработанные результаты экспериментов с использованием общепринятых методов вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Методика получения ферментативных гидролизатов из муки растительных злаков с использованием протеолитического фермента трипсина нами подробно описана ранее [1, 2]. Разработанные нами питательные среды на основе ферментативных (с использованием трипсина) гидролизатов рисовой и соевой муки обладали высокими ростстимулирующими свойствами для перевиваемых культур клеток MDCK и Vero, при этом вируспродукция на обеих клеточных культурах, выращенных в питательных средах на основе гидролизатов, была высокой как для холодоадаптированных вакцинных штаммов вирусов гриппа А и В, используемых в живых гриппозных вакцинах, так и для штаммов, рекомендованных ВОЗ в 2007-2008 г. в качестве вакцинных в составе инактивированных гриппозных вакцин. В целях исключения из технологии получения противогриппозных вакцин компонентов животного происхождения, как источника возможной контаминации чужеродными агентами, нами проведена оценка возможности использования для получения ферментативного гидролизата соевой муки вместо фермента животного происхождения – трипсина, растительной протеазы – бромелайна. Бромелайн выделяется из зрелых стеблей ананаса (*Ananas*) семейства бромелиевых, является тиоловой протеазой, имеющей в составе активного центра сульфгидрильную группу цистеина.

Полученные ферментативные гидролизаты соевого белка с помощью фермента бромелайна по описанной ранее методике [1, 2] были изучены по физико-химическим свойствам и испытаны в составе питательных сред для культивирования клеточных линий млекопитающих. Сухие ферментативные гидролизаты соевой муки представляют собой тонкодисперсные порошки белого или светло-кремового

цвета с характерным запахом. Растворы гидролизатов 1%-ой концентрации имеют значения pH 5,5-6,8, время растворения 5 г гидролизата в 100 мл воды очищенной не превышало 2 мин, остаточная влажность - не более 3%. Массовая доля азота общего в гидролизатах составляет $8,83 \pm 0,37$ %, массовая доля азота аминного - $4,50 \pm 0,14$ %, аминный коэффициент равен 0,51, а коэффициент протеолиза - 0,90. При этом исследуемый соевый гидролизат содержит все незаменимые аминокислоты в оптимальных соотношениях.

На основе полученного гидролизата была сконструирована питательная среда для культур клеток млекопитающих. Для приготовления среды 7 г гидролизата растворяли в 1 л сбалансированного раствора Хенкса, в который дополнительно вводили 1 г глюкозы и комплекс витаминов в количестве 22,5 г/л.

Оценку пригодности гидролизатов для культуральных питательных сред проводили путем определения способности гидролизатной среды обеспечивать образование монослоя и пролиферацию перевиваемых культур клеток. Для этой цели применяли наиболее широко используемые для производства вакцин клеточные культуры MDCK, Vero и ВНК-21. Полученные результаты подтверждают, что при культивировании клеток Vero пролиферативная активность среды на основе ферментативного гидролизата соевой муки с добавлением 5% сыворотки крови плодов коровы (СКПК) была сравнима с контролем и составила $4,9 \pm 0,3$. При снижении концентрации СКПК до 3% пролиферативная активность экспериментальной среды оставалась высокой и сопоставимой с величиной индексов пролиферации (ИП) контрольной среды, содержащей 5% СКПК. Экспериментальная среда с пониженной концентрацией сыворотки крови обеспечивала формирование монослоя клеток с типичной морфологией на 3-4 сутки. Снижение концентрации СКПК в контрольной среде до 3% приводило к заметному снижению индексов пролиферации культуры, отсутствию формирования монослоя.

Для культуры клеток MDCK ростстимулирующая активность ПС на основе гидролизата сои, полученной с бромелайном, даже в малосывороточном варианте (2% СКПК) остается высокой (ИП= $5,1 \pm 0,1$) и сравнимой с активностью синтетической среды ДМЕМ, содержащей 5% СКПК (ИП= $5,0 \pm 0,1$). При этом клетки сохраняли типичные морфологические черты линии без дегенеративных изменений и образования симпластов, имели полигональную форму и четкие границы, характерные для культур эпителиоидного типа.

Кроме того, показана пригодность экспериментальной гидролизатной среды для культивирования клеток ВНК-21 (С.13), используемых для производства ветеринарных вакцин. Индексы пролиферации культуры ВНК-21 (С.13) после 5-го пассажа в экспериментальной и контрольной средах, содержащих 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, были сопоставимы и равны $9,6 \pm 0,3$ и $9,4 \pm 0,4$, соответственно. Морфологическая характеристика клеток выросших в экспериментальной среде оставалась типичной для данного типа клеток и не отличалась от такой в контрольной среде.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана технология приготовления питательной среды на основе ферментативного гидролизата соевой муки, полученного с использованием растительного протеолитического фермента бромелайна. Приготовленная питательная среда может успешно применяться для культивирования перевиваемых клеточных культур МДСК, Vero и ВНК, используемых, в частности, в качестве субстрата для культуральных медицинских и

ветеринарных вакцин. Использование среды на основе соевого гидролизата для клеточных культур МДСК и Vero позволяет снизить содержание сыворотки крови в питательной среде до 2-3%, соответственно, при этом среда с пониженной концентрацией сыворотки обладает такими же ростовыми характеристиками, как и традиционные питательные среды, содержащие 5-10% сыворотки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трошкова Г.П., Мартынец Л.Д., Кирова Е.В., Сумкина Т.П., Юдин А.В. Совершенствование технологии приготовления питательных сред на основе ферментативных гидролизатов рисовой и соевой муки // Биотехнология. – 2006. - № 4. - С. 74-78.
2. Сумкина Т.П., Мартынец Л.Д., Трошкова Г.П. Оптимизация питательных сред на основе ферментативных гидролизатов рисовой и соевой муки для культивирования клеток млекопитающих // Сб. научных трудов. Под ред. И.Г. Дроздова. Достижения современной биотехнологии. - Новосибирск. - 2008. - С. 312-317.

Медицинские науки

АГРЕГАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ КРОВЯНЫХ ПЛАСТИНОК У МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ НА ФОНЕ УМЕРЕННЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

Медведев И.Н., Савченко А.П.,
Завалишина С.Ю.

*Курский институт социального образования
(филиал) РГСУ
Курск, Россия*

У здоровых молодых людей регулярно тренирующихся в рамках общей физической подготовки (ОФП), не до конца выяснено состояние агрегационной активности тромбоцитов (АТ) под влиянием различных индукторов и их сочетаний, имеющихся в условиях кровотока. Цель исследования: выяснить АТ у здоровых молодых людей, не имеющих вредных привычек и регулярно тренирующихся в рамках ОФП.

В группу исследования включены 147 здоровых молодых студентов, тренирующийся в рамках ОФП вначале на занятиях по физической культуре, а по завершению программы предмета в спортивной секции по ОФП (28 человек 18 лет, 31 человек 19 лет, 29 человек 20 лет, 27 человек 21 года и 32 человек в возрасте 22 лет). Подсчитывалось количество тромбоцитов в капиллярной крови в камере Горяева. Длительность агрегации тромбоцитов (АТ) определялась визуальным микрометодом

по Шитикова А.С. (1999) [7] с использованием в качестве индукторов АДФ ($0,5 \times 10^{-4}$ М.), коллагена (разведение 1:2 основной суспензии), тромбина (0,125 ед/мл.), ристомицина (0,8 мг/мл.), адреналина (5×10^{-6} М., завод Гедон Рихтер), а также сочетания АДФ и адреналина, АДФ и коллагена, адреналина и коллагена для моделирования реальных условий кровотока. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием t-критерия Стьюдента.

У обследованных молодых людей в 18-летнем возрасте время развития АТ под влиянием коллагена составляло $34,2 \pm 0,15$ с., находясь на таком же уровне и в последующие годы. Аналогичная активность АТ у здоровых 18 летних тренированных молодых людей отмечена под влиянием АДФ ($45,2 \pm 0,11$ с.) и ристомицина ($49,4 \pm 0,22$ с.). В более поздние сроки развивалась тромбиновая и адреналиновая АТ, составляя в 18 лет $57,9 \pm 0,16$ с. и $104,2 \pm 0,17$ с., соответственно, достоверно не меняясь у более старших обследованных. В 18 лет при сочетанном применении индукторов у тренирующихся физически молодых людей АТ составляла для АДФ+адреналин – $37,5 \pm 0,19$ с., для АДФ+коллаген – $27,2 \pm 0,22$ с., для адреналин+коллаген – $29,4 \pm 0,12$ с., оставаясь стабильной до 22 летнего возраста.