

ХІМІЯ. ХІМІЧНА, БІОЛОГІЧНА ТА ХАРЧОВА ТЕХНОЛОГІЇ

УДК. 57.086.83

К.Білоткач¹, А.Салюк¹, канд. техн. наук;

О.Трохименко², канд. біол. наук; І.Дзюблик², докт. мед. наук

¹ Національний університет харчових технологій

² Київська медична академія післядипломної освіти

КУЛЬТИВУВАННЯ ПОВЕРХНЕВОЗАЛЕЖНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ТВАРИН НА НЕТРАДИЦІЙНИХ МАТЕРІАЛАХ. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ОКИСНЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ПОЛІЕТИЛЕНОВОЇ ПЛІВКИ НА ВИХІД БІОМАСИ КЛІТИН

Поверхневозалежні культури клітин (ПКК) – важливі біологічні агенти, культивування яких ускладнено необхідністю забезпечення у системі культивування розвиненої поверхні росту, у якості якої найчастіше використовують полімери та їх композиції. Правильно підібраний режим окиснювальної модифікації поверхні росту полімеру є запорукою максимізації виходу клітинної біомаси. В даній роботі проведено оптимізацію режиму окисної модифікації (хромовою сумішшю) поверхні поліетиленової плівки. Показано, що окиснення у хромовій суміші поверхні поліетилену дає позитивний результат на вихід клітин за умови обробки полімеру не довше, ніж 5 хвилин, окрім того культивування ПКК можна проводити і на не обробленому матеріалі. Із використанням оптимізованого режиму окиснення поверхні росту хромовою сумішшю була підготовлена насадка з поліетиленової плівки для культивування ПКК СНЕВ, вихід клітин з якої був на 20% більший ніж при культивування в аналогічній системі на носії із поверхнею росту, модифікованою за стандартною методикою.

Умовні позначення

БАР – біологічно активна речовина;

ВРХ – велика рогата худоба;

КК- культура клітин

ПКК – поверхневозалежна культура клітин;

КЕ – КК курячого ембріону;

ПТП, ST – КК тестикул поросят;

СНЕВ – культура клітин свинячої нирки ембріональної версинізованої;

ВНК-21 – КК нирка золотистого сирійського хом'ячка;

CRFK – КК нирки домашнього kota;

СНО - КК яйників китайського хом'яка;

С127 – КК молочної залози миші;

FL72 – КК лімфоматозної нирки kota.

FRhl – КК легенів плоду макаки резус;

HEP- 2 – КК аденокарциноми гортані людини;

L – 929 – КК фібробластів ембріону миші;

MRC-5 – КК легенів плоду людини;

MDBK - КК нирки собаки;

PK – КК нирки свині;

Vero – КК нирки зеленої африканської мавпи;

WI-38 – КК легенів ембріону людини;

СКЕК – сироватки крові ембріонів корів;

PS – полістирол,

К+ - PS з покращеною адсорбційною здатністю;

μ - питома швидкість росту, год⁻¹.

Xk - кількість клітин на початку культивування, тис клітин/мл;

Xn - кількість клітин наприкінці культивування, тис клітин/мл;

На сьогодні багато біологічно активних та імуномодулюючих речовин для медицини та ветеринарії є продуктом культивування перещеплюваних культур клітин тварин та людини *in vitro* (Таб.) [1]. Перевага використання культур клітин тварин і людини при отриманні терапевтичних препаратів полягає у тому, що такі клітини, на відміну від генноінженерних прокаріотичних біологічних агентів, здатні здійснювати посттрансляційну модифікацію білків і таким чином синтезувати білки людини, практично ідентичні до природніх [4]. З іншого боку, при виробництві інактивованих чи атенуєваних вірусних вакцин, культура клітин є практично єдиним джерелом одержання вірусів.

Більшість культур клітин, що використовуються у біотехнології медичних чи ветеринарних препаратів, є поверхневозалежними (Таб.), тобто такими, проліферація яких можлива лише за умови прикріплення до біоафінної поверхні росту. Забезпечення рентабельності виробництва БАР із застосуванням ПКК тварин вимагає використання високоефективних систем культивування, продуктивність яких зростає зі збільшенням співвідношення: поверхні росту до об'єму культивування [5].

Можливість культивування ПКК на полімерних плівках була продемонстрована у роботах [6, 7, 8]. Проте в них не було запропоновано зручного способу заповнення плівкою посудини для культивування, тому раніше, при розробці високоефективних систем культивування, плівки з полімерів не розглядали як перспективний матеріал для створення високорозвиненої поверхні росту. У попередніх дослідженнях нами було доведено, що полімерні плівки з поліетилену, поліпропілену та полістиролу вітчизняного виробництва придатні для використання у якості поверхні росту при культивуванні ПКК, а саме СНЕВ, НЕР- 2, L – 929, ПТП [9]. Окрім того, зважаючи на сучасні тенденції у розробці нових систем культивування КК, а саме насадкових систем [10], нами було запропоновано спосіб культивування ПКК на насадці, виготовленій з плівки поліетилену, що є ущільненою масою хаотично орієнтованих стрічок, розміром до 1,5X10 мм [Пріоритетна довідка № 20031211040 від 05.12.2003].

Відомо, що при культивуванні ПКК на полімерних матеріалах поверхні росту повинні проходити попередню обробку, що пов'язана із зміною характеристик поверхні носія [11], як, наприклад, збільшення ступеня гідрофілізації [12]. Поверхні полімерів є, як правило, гідрофобними, проте ступінь гідрофобності полімерів варіює. З іншого боку, показано, що для кожної культури клітин є свій оптимальний рівень гідрофілізації поверхні росту [13]. Тому при розробці методів культивування поверхневозалежних культур клітин на нетрадиційних матеріалах, таких, яким є поліетиленова плівка, доцільно визначити оптимальний режим модифікації поверхні росту, що забезпечував би максимальний вихід клітин на одиницю поверхні матеріалу.

Враховуючи те, що оптимальний ступінь гідрофілізації поверхні носія є важливим показником покращення біоафінності поверхні росту, при розробці методів культивування ПКК на нетрадиційних полімерних носіях актуальним є визначення оптимального режиму окиснювальної модифікації поверхні поліетиленової плівки, що забезпечить максимальний вихід біомаси клітин при культивуванні.

Мета роботи полягає в оптимізації режиму окиснювальної модифікації поверхні поліетиленової плівки та використання модифікованої за обраним режимом плівки при створенні системи культивування ПКК.

Таблиця

Основні біологічно активні та імуномодулюючі речовин, що виробляються із застосуванням технології культивування перещеплюваних культур клітин тварин та людини

Діюча речовина / застосування	Культура клітин (КК)
Терапевтичні препарати, отримані за технологією рекомбінантних ДНК [2]	
Тканинний активатор плазміногену / Серцевий напад, емболія	СНО*
Еритропоетин / Анемія	
Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор / Нейтропенія	
Антигемофільний фактор VIII / Гемофілія А	
Коагуляційний фактор IX / Гемофілія В	
Дезоксирибонуклеаза I / Муковісцидоз	
Інтерферон бета / Розсіяний склероз	
Моноклональні антитіла до тромбоцитів / Тромбози	
Моноклональні антитіла до трансмембранного антигену CD20 В-лімфоцитів /	
Не-ходжкінські лімфоми	
Моноклональні антитіла до епідермального ростового фактору/ Рак молочної залози	
Моноклональні антитіла до фактору некрозу пухлин / Ревматоїдні захворювання	
Соматотропін – гіпофізарний гормон росту людини / Затримка росту	C127*
Медичні противірусні вакцини [3]	
Інактивована проти поліомієліту	Vero*
Інактивована вакцина проти гепатиту А	MRC5*
Адсорбована вакцина проти сказу	FRhI/MRC 5/KE/Vero*
Атенуйована вакцина проти кору	KE*
Атенуйована вакцина проти краснухи	WI-38*
Ветеринарні противірусні вакцини [2]	
Вірусна діарея великої рогатої худоби (BRX)	MDBK*
Парагрип 3 BRX	
Ринотрахеїт BRX	
Ящур	BHK-21*
Сказ	
Аденовірусна інфекція собак 2-го типу	Vero*
Чума собак	
Венесуельський енцефаломієліт коней	
Японський енцефаліт коней	
Парвовірусна інфекція свиней	ST*, PK*
Парвовірусна інфекція собак	CRFK*
Панлейкемія котятчих	
Лейкемія котятчих	FL72**

Умовні позначення: * - поверхневозалежна КК, ** - суспензійна КК.

Матеріали і методи дослідження

В роботі використовували поверхневозалежну перещеплювальну культуру клітин (КК) свинячої нирки ембріональної версинізованої (СНЕВ), що була отримана з Інституту ветеринарної медицини, м. Київ. КК СНЕВ культивували впродовж 20

пасажів на кафедрі вірусології КМАПО. У якості середовища культивування використовували середовище 199 (“Біотестлабораторія”, м. Київ) з додаванням 5% сироватки крові ембріонів корів (СКЕК, “Біотестлабораторія”, м. Київ) та антибіотиків: 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (“Київмедпрепарат”, м. Київ).

У якості поверхні росту для культивування ПКК СНЕВ використовували поліетиленову плівку по ГОСТ 10354-82.

Як окислювач використовували хромову суміш складу: 20% водний розчин сірчаної кислоти (х.ч. „Хімліборреактив”) з додаванням 2% калію двохромовоокислого (х.ч. „Хімлаборреактив”).

Поліетиленову плівку нарізали на кружечки площею, рівною площі дна лунок полістиролового 48-лункового планшету (1,1 см²) для культивування ПКК (Sarstadt, США).

Зразки поліетиленової плівки промивали у проточній водопровідній воді та обробляли окиснювачем впродовж 10, 30, 60, 120, 300, 600, 1200, 1800 секунд. Також використовували необроблену поліетиленову плівку. Після окиснення зразки промивали проточною, а потім дистильованою водою, після чого стерилізували автоклавуванням при тиску 0,5 над. атмосфери впродовж 30 хвилин.

Стерильні зразки вміщували у стерильні стандартні одноразові полістиролові планшети для культивування ПКК (Sarstadt, США) та у планшети з покращеною адсорбційною здатністю “Cell+” (Sarstadt, США). Частину зразків у кожному планшеті обробляли впродовж 2 годин середовищем інкубації 1 (середовище кондиціонування). У якості середовища кондиціонування використовували середовище культивування 199, стерильно відібране після культивування клітинної культури СНЕВ впродовж 48 годин. Іншу частину зразків обробляли впродовж 2 годин середовищем інкубації 2 (середовище культивування 199 з додаванням 5% СКЕК). Необроблені зразки залишали у планшетах до інокуляції. У контрольні лунки (для порівняння ростових характеристик КК на поверхні полістиролу культурального планшету та на поліетиленовій плівці) паралельно вносили середовища інкубації 1 та 2 на 2 години, частину контрольних лунок залишали не обробленими (для контролю впливу попередньої інкубації поверхні росту із середовищами інкубації 1 та 2).

Суспензію клітин СНЕВ у посівній концентрації $250 \cdot 10^3$ кл/мл в середовищі культивування 199 із додаванням 5% СКЕК та антибіотиків вносили по 1 мл у всі лунки планшетів. Клітини культивували при 37 °С в атмосфері 5 % CO₂ впродовж 72 годин.

Кожні 24 години підраховували кількість клітин, що вирости у лунках планшетів із досліджуваними зразками поліетиленової плівки та в контрольних лунках. Для цього після закінчення культивування середовище росту видаляли, зразки поліетиленової плівки з клітинами двічі промивали розчином Хенкса, після чого в лунки планшетів додавали по 1 мл суміші 0,02% розчину Версену і 0,25% розчину трипсину у рівних співвідношеннях. Носій з клітинами витримували у вказаному розчині до тих пір, поки всі клітини не відділялися від поверхні росту. Кількість знятих з носія клітин у суспензії підраховували у гематиметрі за стандартною методикою після фарбування мортальним барвником.

Питому швидкість росту ПКК СНЕВ (μ) визначали кожні 24 години як питому швидкість утворення продукту - біомаси клітин. За визначенням, питома швидкість утворення продукту - це відношення приросту концентрації продукту до його початкової концентрації за одиницю часу [14]. Обчислювали за формулою:

$$\mu = \frac{(X_k - X_n) / X_n}{t_k}.$$

Якість клітинних моношарів досліджували шляхом світлової мікроскопії. Для цього зразки полімерної плівки разом з клітинами, що вирости, двічі промивали фізіологічним розчином і фарбували впродовж 15 хвилин 0,2 % водно-спиртовим розчином кристалічного фіолетового, після чого досліджували під мікроскопом при збільшенні X300.

Результати та обговорення

Для культивування поверхнево-незалежної культури клітин, якою є КК СНЕВ, поверхня для прикріплення клітин повинна бути біоафінною. Найбільш важливою складовою біоафінності поверхні росту для ПКК є ступінь її гідрофілізації, зокрема, присутності гідрофільних залишків, наприклад, карбонільних груп, що утворилися на ній за рахунок окиснення матеріалу носія. Покращення біоафінності носіїв поводять шляхом їх обробки у кислотах (концентрована сірчана кислота, хромово суміш), спирті (етиловому, метиловому), при обробці УФ опроміненням, коронним розрядом, інкубуючи із розчинами факторів адгезії (полілізину, колагену, фібронектину) тощо [15]. Найбільш доступним методом окиснення поверхонь матеріалів в умовах лабораторії є їх хімічне окиснення, тому у якості окиснювача обрали хромову суміш зазначеного вище складу. Традиційно поверхні полімерів для культивування ПКК обробляють впродовж 20 – 30 хвилин хромовою сумішшю [16], тому у якості стандартної методики покращення біоафінності поверхні поліетиленової плівки ми обробляли її окиснювачем впродовж 20 хвилин.

Оскільки відомо, що гідрофілізований полістирол серед поліолефінів характеризується найбільшою біоафінністю по щодо ПКК [17], у якості контролю для порівняння із поверхнею поліетиленової плівки нами було обрано два типи поверхонь: контроль 1 - гідрофілізований полістирол високої щільності (стандартний культуральний планшет, Sarstadt, США) та контроль 2 - гідрофілізований полістирол високої щільності з покращеною адсорбційною здатністю ("Cell + ", Sarstadt, США).

Результати досліджень показали, що полістирол з підвищеною адсорбційною здатністю (контроль 2) мав найвищі показники за кількістю клітин, що вирости на 48 та 72 години, отже, кількість клітин, що зросла на 72 години культивування на планшеті з покращеною адсорбцією, було прийнято за 100%.

При підрахунку кількості клітин через 24 години на всіх досліджених зразках з поліетиленової плівки та у контролях 1 та 2 достовірних відмінностей виявлено не було. При цьому кількість клітин зменшилась до $144 \pm 4 \cdot 10^3$ кл/см², що свідчило про їх загибель, рівень якої для всіх зразків та контролів був достовірно однаковим (питома швидкість росту, $\mu = -0,0176 \pm 0,0007$ год⁻¹, відсоток клітин, що загинули, склав 57,6%).

Через 48 годин культивування кількість клітин на зразках, оброблених окиснювачем впродовж 600 – 1800 секунд, виявилась достовірно більшою, ніж кількість клітин на зразках, що були оброблені впродовж 0-300 секунд: $228,33 \pm 13,07 \cdot 10^3$ та $170,83 \pm 6,9 \cdot 10^3$ кл/см² відповідно. Кількість клітин, що вирости на полістиролі стандартного культурального планшету (контроль 1) $190,83 \pm 16,8 \cdot 10^3$ кл/см², була меншою, ніж та, що вирости на зразках полістиролу з покращеною адсорбцією (контроль 2) $271,21 \pm 17,22 \cdot 10^3$ кл/см², але достовірно не відрізнялась від кількості клітин, отриманих на зразках поліетилену, що були оброблені у хромовій суміші до 300 секунд (рис. 1).

Через 72 години культивування було виявлено значний приріст клітин на зразках, оброблених у хромовій суміші впродовж 0 – 300 секунд, $\mu = 0,044 \pm 0,003$, год⁻¹ (рис. 2), як і для клітин у лунках стандартного полістиролового планшету (контроль 1), $\mu = 0,046$ год⁻¹, у той час як на зразках, що були оброблені впродовж 600 – 1800 секунд питома швидкість росту клітин зменшувалась, $\mu = 0,01 \pm 0,001$ год⁻¹, як і в лунках планшету із покращеною адсорбційною здатністю (контроль 2), $\mu = 0,019$ год⁻¹.

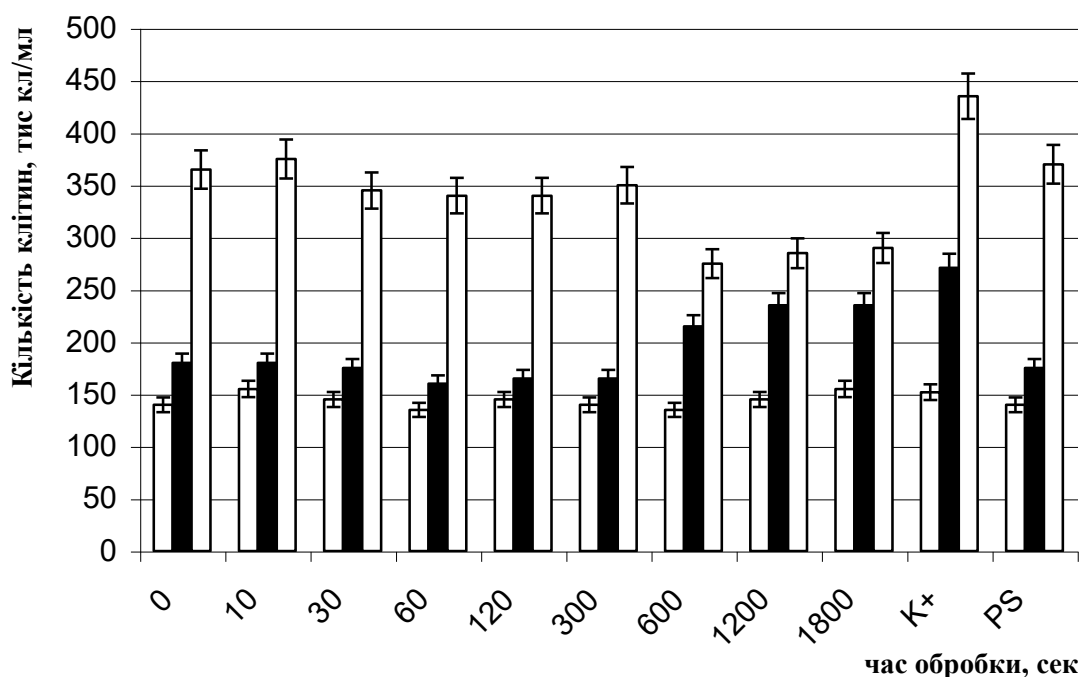


Рис. 1 Кількість клітин КК СНЕВ, що виросла на зразках з поліетиленової плівки, обробленої 40%-ю хромової сумішшю впродовж проміжків часу різної тривалості. Тривалість обробки у хромовій суміші позначено арабськими літерами по осі “час обробки”. Кількість клітин, що виросли на поверхні росту за 24, 48 та 72 години культивування, позначено за порядком: □, ■, ▤ відповідно.

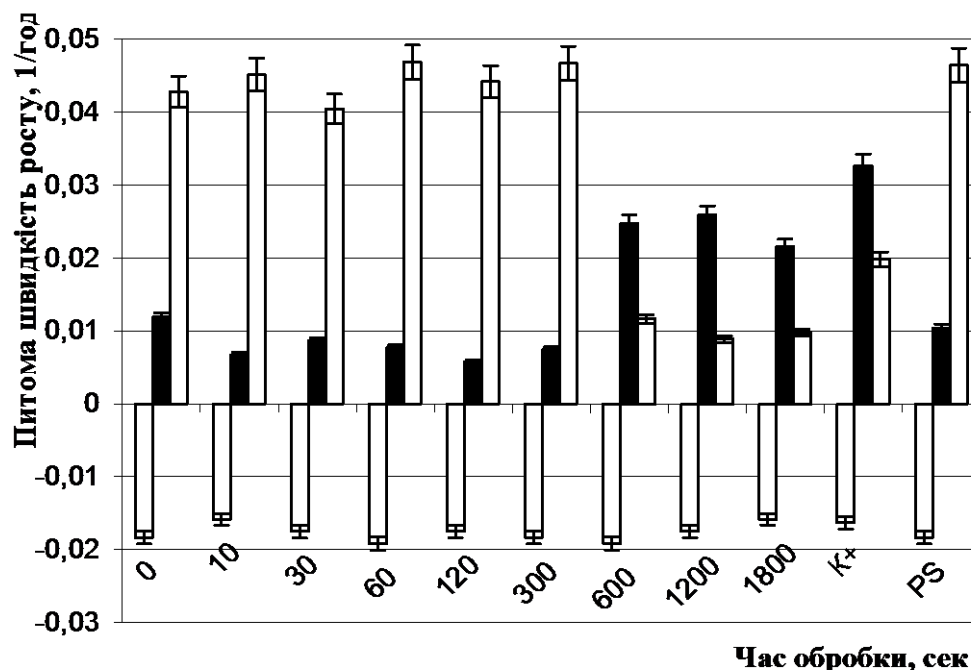


Рис. 2 Залежність питомої швидкості росту культури СНЕВ на зразках з поліетиленової плівки від часу обробки зразка у 40%-й хромовій суміші. Тривалість обробки у хромовій суміші позначено арабськими літерами по осі “час обробки”. Кількість клітин, що виросли на поверхні росту за 24, 48 та 72 години культивування, позначено за порядком: □, ■, ▤ відповідно.

Проте, на жодному з досліджуваних зразків кількість клітин не сягнула тієї кількості, що виросли на полістиролі із покращеною адсорбційною здатністю $435 \pm 23 \cdot 10^3$ кл/ cm^2 (100%). Кількість клітин, що виросла на зразках, оброблених впродовж 0 – 300 секунд, сягнула $352 \pm 11 \cdot 10^3$ кл/ cm^2 та достовірно не відрізнялась від кількості клітин, що виросли у полістиролових лунках стандартного культурального

планшету $370 \pm 24 \cdot 10^3$ кл/см² (контроль 1), що склало 83% від кількості клітин, що вирости у полістироловому планшеті з покращеною адсорбційною здатністю (контроль 2). Кількість же клітин, що вирости на зразках поліетиленової плівки, обробленої у хромовій суміші довше 300 секунд, склала $283 \pm 8 \cdot 10^3$ кл/см², тобто 65% від кількості клітин, що вирости на полістиролі з покращеною адсорбційною здатністю.

При мікроскопічному дослідженні клітинних моношарів, що утворились на зразках, як оброблених хромовою сумішшю, так і не оброблених, а також моношарів у контрольних лунках, порушень їх цілісності та вогнищ дегенерації клітин виявлено не було. Це свідчило про нетоксичність плівки поліетилену для поверхневозалежної клітинної культури СНЕВ.

Отже, за результатами досліджень з оптимізації режиму окиснювальної модифікації поліетиленової плівки, що використовується у якості поверхні росту при культивуванні ПКК СНЕВ, можна зробити висновок, що окиснення поверхні поліетиленової плівки хромовою сумішшю доцільно проводити не довше ніж 5 хвилин (300 с.), а більш тривале окиснення поверхні носія негативно впливає на вихід біомаси клітин. Окрім того, при культивуванні ПКК СНЕВ можна використовувати і необроблену поліетиленову плівку.

Гідрофілізація поверхні кристалічних полімерів, якими є полістирол та поліетилен та на якій планується культивувати поверхневозалежні клітини, необхідна для адсорбції факторів адгезії клітини, якими є білки, що мають здатність адсорбуватися на гідрофільних поверхнях [18]. Прикріплення клітини до поверхні росту опосередковане утворенням зв'язків типу "ліганд-рецептор" між білками прикріплення клітини – інтегринами, та адсорбованими з середовища культивування факторами адгезії, наприклад, фібронектином [19]. У середовищі, що містить сироватку крові тварин, завжди присутні фактори адгезії (альбуміни, глобуліни); окрім того, клітини під час своєї життєдіяльності утворюють компоненти зовнішньоклітинного матриксу (фібронектин, колаген) [20], що також опосередковують прикріплення клітини до поверхні росту. З цієї точки зору, нами було досліджено вплив інкубації зразків поліетиленової плівки у середовищі з сироваткою (середовище інкубації 1) та середовищі кондиціонування (середовище інкубації 2). Проте в досліді не було виявлено впливу інкубації у вказаних середовищах на кількість клітин, що прикріпилась до поверхні росту та на питому швидкість росту клітин. Це явище можна пояснити тим, що фактори адгезії здатні адсорбуватися на поверхні за кілька хвилин, у той час як прикріплення клітин до поверхні росту займає близько 2-х годин; [21] тобто, при інокуляції зразка поверхні росту суспензією клітин у середовищі з сироваткою першими адсорбуються білки адгезії, присутні у сироватці, а ефект інкубації зразка було нівельовано.

Зменшення вартості цільового продукту (біологічно активної речовини) можна досягти за рахунок підвищення продуктивності системи культивування ПКК тварин і людини. У свою чергу збільшення продуктивності системи культивування досягається за рахунок зменшення об'єму культивування при одночасному збільшенні поверхні росту – поверхні для розмноження клітин. Нашими дослідженнями показана можливість застосування у якості поверхні росту поширеного, дешевого і безпечного матеріалу, яким є поліетиленова плівка вітчизняного виробництва. При умові надання поліетиленовій плівці компактного об'єму, можна виготовити насадку з високорозвиненою поверхнею росту із дешевого та доступного на ринку України матеріалу. Розглядаючи можливі методи створення розвиненої поверхні з плівок полімерів, ми дійшли до висновку, що найбільш зручним та ефективним методом буде формування насадки з ущільнених полімерних стрічок розміром: шириною від 1,5 до 2 мм та довжиною від 10 до 70 мм. Процеси подрібнення полімерної плівки можна автоматизувати, а ступінь подрібнення збільшити.

За результатами досліді з вивчення ростових характеристик КК СНЕВ на модифікованій окиснювачем поліетиленовій плівці нами було запропоновано

промивати масу стрічок носія хромовою сумішшю з метою знежирення поверхні росту, але не довше, ніж 5 хвилин. Отже, виготовлення насадки для культивування ПКК СНЕВ проводили таким чином. Полімерну плівку з поліетилену загальною площею 2000 см² промивали у проточній воді та нарізали на стрічки зазначеного розміру, після чого частину стрічок (загальною площею росту 1000 см²) знежирювали ополіскуванням хромовою сумішшю, іншу частину обробляли впродовж 20 хвилин окиснювачем (контроль). Ретельно відмивали залишки кислоти проточною та дистильованою водою. Формували насадку. Для цього масу стрічок з поліетиленової плівки спочатку розпрямляли шляхом обробки у киплячій воді впродовж декількох хвилин, після чого стрічки переносили в іншу посудину, де їх розпушували та перемішували. Вміщували хаотично орієнтовані стрічки поліетиленової плівки в посудину для культивування та ущільнювали, притискаючи перфорованим поліпропіленовим диском. Посудину заповнювали 0.9% розчином хлориду натрію так, щоб розчин покривав насадку. Стерилизували насадку разом із посудиною для культивування автоклавуванням при тиску 0,5 атмосфери. Після стерилізації розчин зливали, насадку промивали 2 рази стерильним сольовим розчином Хенкса та вносили суспензію ПКК СНЕВ у посівній концентрації $250 \cdot 10^3$ кл/мл у 100 мл середовища культивування зазначеного вище складу. Суспензію клітин обережно наливали на поверхню насадки так, щоб рідина повільно (2–3 мл/хвилину) просочувалась крізь шари стрічок поліетилену. Посудину герметично закривали. Клітини культивували при 37 °С впродовж 2 діб без заміни живильного середовища, а через 72 годин культивування кожної доби *S* середовища культивування замінювали на свіжоприготовлене.

При культивуванні ПКК СНЕВ на виготовлених насадках були отримані наступні результати: приріст клітин на насадці, поверхню росту якої було модифіковано за стандартною методикою, становив 2,8 рази, на насадці зі стрічок поліетиленової плівки, що була промита хромовою сумішшю, приріст клітин склав 3,4 рази. Кількість одержаних клітин в перерахунку на 1 см² поверхні росту для насадки виготовленої зі стрічок модифікованих за стандартною методикою, становила: $525 \pm 21 \cdot 10^3$ кл/см², кількість клітин, отриманих з насадки із оптимізованим способом модифікації поверхні росту, - до $680 \pm 24 \cdot 10^3$ кл/см². При перерахунку на 1 мл використаного середовища культивування кількість одержаних клітин складала $2625 \pm 6,9 \cdot 10^3$ та $3400 \pm 13 \cdot 10^3$ відповідно. Проте треба відзначити, що клітини не займали всю поверхню росту насадки, а також зростали на дні культуральної посудини, це, на нашу думку, пов'язано із стаціонарним режимом культивування та свідчить про необхідність створення постійного току живильного середовища у системі культивування із застосуванням нерухомої насадки.

Висновки

Дослідження часу окиснювальної модифікації поліетиленової плівки показали, що за своїми характеристиками відносно впливу на прикріплення, розпластування і проліферацію поверхневозалежної клітинної культури СНЕВ, поверхня необробленої поліетиленової стрічки чи обробленої впродовж не більш ніж 300 секунд у хромовій суміші не відрізняється від поверхні з полістиролу у стандартному культуральному планшеті (гідрофілізований полістирол), якщо кількість клітин оцінювати не раніше, ніж на 72 годину культивування. Отже, при культивуванні поверхневозалежних культур клітин на насадках, виготовлених з плівки поліетилену, можна замінити стадію окиснювальної модифікації поверхні росту на промивання носія у хромовій суміші чи взагалі виключити вказану стадію підготовки поверхні росту. Пропонований спосіб культивування дає можливість збільшити ефективність культивування поверхневозалежних культур клітин тварин та людини, що використовуються у біотехнологічній галузі для отримання біологічно та імунобіологічно активних речовин, якими є гормони, цитокіни, фактори росту чи вакцини.

Anchorage-dependent cell cultures (ACC) are important biological agents, cultivation of which requires a developed growth surface, most often provided by polymers. Our research shows that domestically produced polyethylene film can be successfully used in production of a fixed bed bioreactors for cultivation of ACC. Cell biomass output is maximized provided a correctly chosen oxidizing modification regime is employed. This work undertakes optimization of the oxidation modification regime (with chrome blend) for the polyethylene film surface. When oxidation of the polyethylene surface in chrome blend is conducted for at most five minutes, it is shown to positively affect cell output. Cultivation of the SDSC on the unprocessed material is also possible. Polyethylene film, processed according to the optimized regime, has been tested in the fixed bed bioreactor for cultivation ACC.

Література

1. Lubiniecki A. S. Historical reflections on cell culture engineering. *Cytotechnology*. 1998 – Vol. 28 – C. 139 – 145.
2. Wei-Shou Hu. Overview of Cell Culture Technology. In: *Cell and tissue reactor engineering. An advanced course in bioprocessing*. - Twin Cities.: University of Minnesota, 2003. - C. 5 – 6
3. Appendix A: Tables, Charts & Forms. Vaccine Excipient & Media Summary. In: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases 8th Edition*. - U. S.: Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services, February 2004. - C. K1 - K5
4. Hesse F., Wagner R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *TIBTECH*. – 2000 – Vol. 18 – C. 173 - 180.
5. Zecchini T.A., Smith R.J. Production of high titre disabled infectious single cycle (DISC) HSV from a microcarrier culture. *Cytotechnology*. – 1999. – Vol. 30 – C. 203 – 210.
6. Grinnell. F. Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int. Rev. Cytol.* – 1978 – Vol. 53 – C. 65-144.
7. Lee J. H., Kopecek J., Andrade J. D. Protein resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants. *J. Biomed. Mater. Res.* – 1989 – Vol. 23 – C. 351 - 368.
8. Dasgupta S. Surface Modification of Polyolefins for Hydrophilicity and Bondability: Ozonization and Grafting Hydrophilic Monomers on Ozonized Polyolefins. *J Appl. Polym. Sci.* –1990 – Vol. 41 – C. 233 – 248.
9. Білоткач К.М., Салюк А.І., Трохименко О.П., Дзюблик І.В. Спосіб культивування поверхнево-залежних культур клітин із метою досягнення високої щільності їхньої біомаси//Український біохімічний журнал, 2003, Т. 75. - № 5. – С. 124
10. Meissner P., Schroder B., Herfurth C., Biselli M. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Cytotechnology*. – 1999 – Vol. 30 – C. 227 – 234.
11. Teare D. O. H., Emmison N., Ton-That C, Bradley N. H. Cellular Attachment to Ultraviolet Ozone Modified Polystyrene Surfaces. *Langmuir*. – 2000 – Vol. 16 – C. 2818-2824.
12. Dewez J.-L., Lhoest J.-B., Detrait E., Berger V., Dupont-Gillain C.C., Vincent L.-M., Schneider Y.-J., Bertrand P., Rouxhet P.G. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. *Biomaterials*. – 1998 - Vol. 19 - C 1441 – 1445.
13. van Wachem P.B. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge. *Biomaterials*. – 1987 – Vol. 7 – C. 323 – 328.
14. ДСТУ 3803-98 Біотехнологія. Терміни та визначення
15. Hendrick V., Muniz E., Geuskens G., Werenne J. Adhesion, growth and detachment of cells on modified polystyrene surface. *Cytotechnology*. – 2001 – Vol. 36 – C. 49 – 53.
16. Klemperer H. G., Knox P. Attachment and growth of BHK and liver cells on polystyrene: effect of surface groups introduced by treatment with chromic acid. - *Lab. Pract.* – 1977. – Vol. 26 – C. 179 – 180.
17. Lydon M. J., Minett T. W., Tighe B.J. Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. *Biomaterials*. – 1985. – Vol. 6 – C. 396 – 402.
18. Schakenraad J. M., Blaauw E. J., van Wachem P. B., Arends J., Wildevuur Ch.R.H., Busscher H. J. Kinetics of cell spreading on protein precoated substrata: a study of interfacial aspects. *Biomater.* – 1989. – Vol. 10 – C. 43 - 50.
19. Schakenraad J. M., Busscher H. J. Cell-polymer interactions: the influence of protein adsorption. *Colloids Surfaces*. – 1989. – Vol. 42 – C. 331 – 343.
20. Dutton R. L., Scharer J. M., Moo-Young M. Hybridoma growth and productivity: effects of conditioned medium and of inoculum size. *Cytotechnology*. – 1999. - Vol 29 – C. 1 – 10.
21. Jones D. A. et al. Flow effects on Leukocyte Adhesion to Vascular Endothelium. In: Peter D. R., Steiner M. *Principles of cell adhesion*. - Boca, Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.: CRS Press, 1995. - C. 148.

Одержано 15.03.04 р.