



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116537** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A61K 39/00
A61K 33/38 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 12356	(72) Винахідник(и): Стегній Борис Тимофійович (UA), Стегній Марина Юріївна (UA), Магац Дар'я Юріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.12.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.05.2017	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.05.2017, Бюл.№ 10	

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ АНТИГЕНПРОДУКУЮЧОЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН FLK-71 ТА FLK-SBBL ЗА ДОПОМОГОЮ НАНОЧАСТОК СРІБЛА (АРГЕНТУМУ)

(57) Реферат:

Спосіб підвищення антигенпродукуючої біологічної активності перещеплюваних культур клітин FLK-71 та FLK-SBBL за допомогою наночастинок срібла (Аргентуму) включає перещеплювану лінію клітин FLK-BLV, поживні середовища, сироватку ВРХ, концентрування вірусу лейкозу на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами. Як стимулятор мітотичної активності клітин додають наночастки срібла (Аргентуму) у співвідношенні 1:100 (1 частина наночастинок на 100 частин середовища).

UA 116537 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології та нанобіотехнології, зокрема до способів підвищення біологічної активності перещеплювальних культур клітин FLK-71 та FLK-SBBL за допомогою наночасток срібла.

Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби - хронічне інфекційне захворювання, що викликається вірусом лейкозу ВРХ. Підвищення виходу вірусу лейкозу ВРХ та його антигенів, які продукуються у перещеплювальних культурах клітин, є нагальною потребою виробництва.

Відомий спосіб підвищення антигенпродукуючої активності перещеплювальної культури клітин FLK-BLV під впливом активних форм кисню [Шаповалова О.В. Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., М'яких Н.В. Ветеринарна медицина, Випуск 97, 2013]. За цим способом проводилось випробовування активних форм кисню як стимулятора продукції антигену ВЛ ВРХ в перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфікованих вірусом лейкозу ВРХ (FLK-BLV). Але певні концентрації H_2O_2 викликали деструктивні морфологічні зміни клітин і стану моношару культури FLK-BLV.

Найбільш близьким аналогом до способу, що заявляється, є спосіб удосконалення технології виробництва антигену для серологічної діагностики лейкозу ВРХ в реакції імунодифузії [Стегній Б.Т., Фісенко С.А., Стегній М.Ю., Дунаєв Ю.К., Коновалов А.В., Бабанін М.І. Ветеринарна медицина, Випуск 95, 2011]. За умов застосування цього способу використовували перещеплювану лінію клітин FLK-BLV, поживні середовища; 199, ІГЛА- ДМЕМ, сироватку ВРХ очищену від імуноглобулінів, проводили концентрування вірусу лейкозу на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами і додавали "Актовегін" та "Інсулін" як стимулюючі фактори. Недоліком способу є незначна токсична дія актовегіну на клітини FLK, а додавання інсуліну у дозі $0,5 \text{ од/см}^3$ необхідно у кожному пасажі, тоді як додавання наночасток срібла одноразове, це вплинуло на проліферацію клітин та рівень накопичення антигену вірусу лейкозу.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб підвищення антигенпродукуючої біологічної активності перещеплюваних культур клітин FLK-71 та FLK-SBBL за допомогою наночасток срібла (Аргентуму), що включає перещеплювану лінію клітин FLK-BLV, поживні середовища, сироватку ВРХ очищену від імуноглобулінів, концентрування вірусу лейкозу на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами шляхом одноразового додавання як стимулятора мітотичної активності клітин наночасток срібла (Аргентуму), щоб забезпечити ефективність способу. Ефективність підвищення антигенпродукуючої біологічної активності перещеплюваних культур клітин FLK-71 та FLK-SBBL базується на використанні як стимулятора мітотичної активності клітин наночасток срібла (Аргентуму), завдяки чому підвищується титр лейкозного антигену, збільшується продукція вусу.

Спосіб виконують таким чином.

Для вивчення впливу наночасток срібла на антигенпродукуючу біологічну активність двох субліній FLK-BLV створили 2 дослідні та 2 контрольні групи:

1. Клітини сублінії FLK-SBBL, поживне середовище, яке складається з 45 % Ігла-ДМЕМ, 45 % середовища 199, і 10 % сироватки інактивованої із додаванням відібраних за результатами сринінгу наночасток срібла у дозі 0,1 мл у відповідному розведенні.

2. Клітини сублінії FLK-71, поживне середовище, яке складається з 45 % Ігла-ДМЕМ, 45 % середовища 199, і 10 % сироватки інактивованої із додаванням відібраних за результатами сринінгу наночасток срібла у дозі 0,1 мл у відповідному розведенні.

3. Клітини сублінії FLK-SBBL, поживне середовище за вище вказаним складом.

4. Клітини сублінії FLK-71, поживне середовище за вище вказаним складом (таблиця).

Клітини культури FLK-BLV для дослідів та контролю вирощують в культуральних матрацах площею 25 см^2 за температури $37,5^\circ\text{C}$.

Після виповнення моношару поживне середовище буде замінено на вище вказане, і на клітини дослідних груп у стадії активного росту вносять наночастки срібла у відповідних розведеннях.

Для вивчення впливу наночасток срібла на антигенпродукуючу біологічну активність двох субліній FLK-BLV зі збірної проби культуральної рідини для кожної сублінії окремо проводять очистку та концентрування ВЛ на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами.

Оцінку антигену ВЛВРХ здійснюють за активністю у реакції імунодифузії (РІД) та кількісним виходом доз (доз АГ з 1 дм^3 вірус-культуральної рідини). Для чого сконцентрований антиген ресуспендують у фосфатно-сольовому фізіологічному розчині з рН 7,0-7,2. Активність антигену оцінюють за серологічним методом граничних розведень в реакції імунодифузії (РІД) з використанням контрольної позитивної діагностичної сироватки з "Набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)" за ТУУ 24.4. - 00497087-647-2002.

Постановку реакції і облік результатів проводять відповідно до "Листівки-вкладки до набору компонентів для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії" (№ 3272-14-0525-04/08-1/0 від 18.03.08) у 2 повторях на чашках Петрі з використанням прямокутного штапу. Для визначення кінцевого титру антигену готують послідовні розведення експериментальних його серій від нативного до 1:6 та більше. Компоненти реакції вносять у лунки агару в об'ємі 40 мкл.

Під впливом наночасток Аргентуму в розведенні 1:100 титр лейкозного антигену збільшується у FLK-SBBL з 1:3,0 до 1:6,0, у FLK-71 з 1:2,0 до 1:4,0.

Приклад. Вивчення впливу препарату "Інсулін" на антигенпродукуючу біологічну активність двох субліній FLK-BLV.

Для вивчення впливу препарату "Інсулін" на антигенпродукуючу біологічну активність двох субліній FLK-BLV створили 2 дослідні та 2 контрольні групи:

1. Клітини сублінії FLK-SBBL поживне середовище із додаванням препарату "Інсулін" у дозі 2 од/см³ поживного середовища.

2. Клітини сублінії FLK-71 поживне середовище із додаванням препарату "Інсулін" у дозі 2 од/см³ поживного середовища.

3. Клітини сублінії FLK-SBBL, поживне середовище за вище вказаним складом.

4. Клітини сублінії FLK-71, поживне середовище за вище вказаним складом наведено у таблиці.

Під впливом інсуліну в розведенні 1:100 титр антигену збільшувався у FLK-SBBL з 1:3,0 до 1:4,0, а у FLK-71 з 1:2,0 до 1:3,0, але у порівнянні з додаванням наночасток срібла титр антигену був нижчим.

Таким чином, вплив наночасток срібла на антигенпродукуючу біологічну активність двох субліній FLK-71, FLK-SBBL дозволить забезпечити високий рівень виходу вірусу та його антигенів, мінімальний видаток поживних середовищ і сироваток, а також зниження енергетичних затрат.

Спосіб підвищення антигенпродукуючої біологічної активності перещеплюваних культур клітин FLK-71 та FLK-SBBL за допомогою наночасток срібла (Аргентуму) можна використовувати у біопромисловості для накопичення лейкозного антигену для лабораторної діагностики лейкозу BPX в РІД.

Таблиця

Спосіб підвищення антигенпродукуючої біологічної активності перещеплюваних культур клітин FLK-71 та FLK-SBBL за допомогою наночасток срібла (Аргентуму)

Клітинна культура	Контроль	Ag 1:100	Інсулін
	1:1,5 +++++	1:1,5 +++++	1:1,5 +++++
	1:2,0 +++++	1:2,0 +++++	1:2,0 +++++
FLK-SBBL	1:2,5 +++	1:3,0 +++++	1:2,5 +++++
	1:3,0 ++	1:4,0 +++++	1:3,0 +++
		1:5,0 +++	1:4,0 ++
		1:6,0 ++	
	1:1,5 +++++	1:1,5 +++++	1:1,5 +++++
	1:2,0 +++	1:2,0 +++++	1:2,0 +++
FLK-71	1:2,5 -	1:2,5 +++++	1:2,5 +++
		1:3,0 +++	1:3,0 ++
		1:4,0 +++	
		1:5,0-	

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб підвищення антигенпродукуючої біологічної активності перещеплюваних культур клітин FLK-71 та FLK-SBBL за допомогою наночасток срібла (Аргентуму), що включає перещеплювану лінію клітин FLK-BLV, поживні середовища, сироватку BPX, концентрування вірусу лейкозу на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами, який **відрізняється** тим, що як стимулятор мітотичної активності клітин додають наночастки срібла (Аргентуму) у співвідношенні 1:100 (1 частина наночасток на 100 частин середовища)

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що наночастки срібла (Аргентуму) додають одноразово.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601