

Выводы. На основании полученных данных можно заключить, что истинный процент жизнеспособных восстановленных после криоконсервации клеток возможно определить только путем учета интенсивности роста при высеве 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 пассажирования, а так же использование биологически активных веществ, которые могут способствовать повышению процента жизнеспособных клеток в цикле замораживания-оттаивания.

Список литературы

1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс – Пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – 264 с.
2. Грищенко, В.И. Достижения и развитие криобиологии в Украине. / В.И. Грищенко // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 3. – С. 232-233.
3. Дьяконов, Л.П. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / Л.П. Дьяконов – М.: Спутник+, 2009. – 656 с.
4. Осецкий, А.И. О механизме защиты криоконсервируемых биообъектов с помощью многокомпонентных криопротекторных растворов / А.И. Осецкий, Т.М. Гурина, А.Л. Кирилук, Н.В. Репин // Пробл. криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 231.
5. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных промысловых животных РККК(П), (СХЖ РАСХН): каталог: 2-е издание (дополнительное и уточненное) / [авт. Дьяконов Л.П. и др.]. – Москва, 2006. – 115 с.
6. Madin, S. /S. Madin, N. Darby// Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1958. – V. 98. – p. 574.

DETERMINATION OF RECOVERY RATE OF CELLS MDBK AFTER CRYOPRESEVATION

Kirillova Yu.M., Plotnikova E.M., Khamzina Ye.Yu., Glagoleva I.S.

Federal Center for Toxicological and Radiation Safety of Animals, Kazan

Recovery rate of weave line of cells MDBK after cryopreservation is studied in the article. The viability of cells MDBK after thawing was determined. Absolute adhesion of cells was observed after thawing in two house of incubation.

УДК 619:573. 6: 578: 576.535.001.8

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ РЕПАРАЦИИ КЛЕТОК ВНК-21 В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Манин Б.Л.,* Ночевный В.Т., Хайдуков С.В.,*** Ласкавый В.Н.****

**ФГУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир; **НИВС РАСХН, г. Саратов*

****Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина РАН*

В последнее десятилетие XX века перевиваемые линии клеток (ПЛК), аттестованные в соответствии с требованиями ВОЗ и РД 42-28-10-89, успешно используются в вирусологической практике и производстве иммунологических препаратов (ИБП) медицинского и ветеринарного назначения [1, 2].

Указанные методы контроля качества культуральных моделей (КМ) достаточно трудоёмки и длительны в исполнении. В последние годы для практического использования предложен и апробирован достаточно объективный экспресс метод проточной цитометрии (ПЦ), как для контроля качества, так и отбора наиболее перспективных сублиний клеток, с последующей их паспортизацией [6, 7].

Установлено, что нерегламентированные условия культивирования ПЛК приводят к значительному снижению интенсивности роста, изменению культуральных, морфологических и кариологических показателей, а также переходу изолированных в стационарную фазу роста, где они могут находиться в некробиотическом состоянии, в стадиях паранекроза или программированной клеточной гибели (ПКГ) – апоптозе. При оптимизации условий культивирования клетки, находящиеся в некробиотическом состоянии, как правило, восстанавливают ростовой потенциал, в тоже время большая часть клеток в стадии паранекроза и апоптоза погибает. Экспериментально доказано, что величина апоптоза является объективным показателем, характеризующим жизнеспособность клеток, ростовой потенциал и перспективность для практического применения КМ [8].

С учётом изложенных данных представляло интерес изучить закономерности клеточного цикла при помощи метода ПЦ и определить средства и методы профилактики морфологических и структурных изменений клеток в культуре под воздействием неблагоприятных факторов

Материалы и методы. *Клеточные культуры.* Объектом исследования служили монослойные (ВНК-21/13S и ВНК-21 Шведская) и суспензионный (ВНК-21/2-17) трофоварианты ПЛК почки сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*). Тест-культуры (ТК) выращивали: суспензионный трофовариант в ферментёре КМ-2Т с использованием питательной среды (ПС) Игла-МЕМ с добавлением 0,25 % гидролизата белков крови; монослойные ТК – с использованием среды Игла –МЕМ с 0,25 % гидролизата лактальбумина. В состав ПС дополнительно вносили 5-7 % сыворотки крови (СК) крупного рогатого скота. Образцы ТК сохраняли в жидком азоте, а ин-витро поддерживали стационарным и суспензионным методами. Отделение клеток от субстрата осуществляли смесью растворов трипсина (0,25 %) и версена (0,02 %), взятых в соотношении 1:1.

Культивирование вирусов. Оценивали чувствительность ТК к вирусам ящура (ВЯ) типов А, О, С. Доза заражения культур составляла 0,1-0,001 ТЦД₅₀ / мл. Вирусы культивировали стационарным и глубинным методом в течение 16-20 часов и при температуре (37±0,5) °С. Активность образцов ВЯ оценивали в Ig ТЦД₅₀ / мл.

Проточная цитометрия. Для цитометрического анализа использовали популяцию изолированных клеток ТК (тест-культур) в логарифмической фазе роста через 40-44 часа выращивания стационарным или суспензионным методами.

Фиксация клеток. От культуральной среды изолированные клетки трижды отмывали центрифугированием (7 мин, 450 g) в 3 мл охлаждённого фосфатно-буферного раствора (ФБР) pH=7,2, содержащего 0,15 M NaCl. Полученный осадок клеток фиксировали охлаждённым 70 % этанолом в течение 3 часов при температуре 4 °С.

Окрашивание клеток. Зафиксированные клетки были трижды отмыты от фиксатора центрифугированием (7 мин, 450 g) в 3 мл охлаждённого PBS. После этой процедуры осадок был ресуспендирован в 0,5 мл ФБР, содержащем 40 мкг/мл йодита пропидия (Calbiochem) и 0,5 мг/мл рибонуклеазы (Sigma, США). После 60 мин инкубации клетки анализировали методом ПЦ.

Цитометрический анализ. Анализ культур клеток проводили на лазерном проточном цитофлуориметре-сортире EPICS[®] «Elite» (Coulter, США), оборудованном аргоновым лазером CYONICS (Uniphase, США) с длиной волны возбуждения 488 нм и мощностью луча 15 мВт. Метод ПЦ зарегистрирован Министерством Здравоохранения России за №2000/257 от 26 июня 2000 г.

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

Среднестатистические размеры клеток. Величину клеток оценивали по рассеиванию света под малыми углами (0-10°) в сравнении со стандартными микросферами (Flow Check, Beckman-Coulter, USA), имеющими диаметр 10 микрон.

Гранулярность неокрашенных клеток определяли по рассеиванию света под углом 90°. Образцы культур анализировали с использованием барьерных фильтров 488 ВК, 488 ВР, 488 DL. Для дискриминации частиц, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, в программу анализа вводили логические ограничения.

Распределение ДНК по фазам клеточного цикла. Результаты исследований оценивали путем анализа клеток, окрашенных йодитом пропидия, в интегральном канале флуоресценции с использованием барьерных фильтров 488ВК, 488ВР и 625ВР. Для удаления из популяции изолированных клеток агрегатов в программу вводили логические ограничения.

Количество клеток, находящихся в состоянии спонтанного апоптоза, определяли по распределению клеток, окрашенных йодитом пропидия, в логарифмическом канале флуоресценции с использованием барьерных фильтров 488ВК, 488ВР и 625ВР. Клетки, содержащие ДНК менее 2n, считали апоптотическими.

Полученные гистограммы подвергали математической обработке с использованием программ EXPO32 (Beckman-Coulter, USA) и MultiCycle (Phoenix Flow Systems, USA).

Результаты исследований. Учитывая значимость трофовариантов линий клеток почек сирийского хомячка, для получения и контроля клеточного субстрата и производства противоящурного антигена представляло интерес оценить методом ПЦ влияние технологических параметров культивирования и условий хранения на восстановление морфологических показателей и ростового потенциала ТК.

Клетки французской КМ ВНК-21/13S были исследованы по показателям ПЦ непосредственно после разморозки (A1) и на уровне 4 пассажа в оптимальный период (72 ч) логарифмического роста (AII). Экспериментально установлено, что процессы криоконсервирования и разморозки суспензии ТК отрицательно влияют на их жизнеспособность, адгезивные и ростовые свойства, а количество апоптотических клеток (AK) ВНК-21/13S возрастает до 65 %. Серийное пассирование этой сублинии в течение 4 последовательных пересевов способствовало восстановлению морфологии и ростового потенциала КМ, а количество АК в популяции изолированных клеток снизилось до 3,9 % (рис. 1).

На модели Шведской линии ВНК-21Шв (10 пассаж) оценивали влияние длительности культивирования ТК в монослой на ростовые свойства, морфологию клеток и показатели ПЦ. В оптимальные сроки выращивания (72 часа) клетки сублинии формировали монослой, который был представлен эпителиоподобными и фибробластоподобными элементами. Урожай клеток достигал 0,4-0,6 млн/мл, а количество АК не превышало 3,2 % (BI). Дополнительное выдерживание монослойной ТК в стационарной фазе роста в течение 24 часов приводило к достоверному увеличению количества АК до 21,7 % (табл. 1; рис. 1, BII).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика культуральных и цитоморфологических показателей сублинии клеток ВНК-21 при оптимальных и нерегламентированных условиях выращивания

Наименование показателей		Значение показателей							
		Наименование тест-культур							
		ВНК-21/13S AI		ВНК-21/13S AII(K)		ВНК-21Ш BI		ВНК-21Ш BII(K)	
Культуральные свойства									
Сроки образования монослоя		3-4		2-3		2-3		2-3	
Урожайность клеток, млн/ мл		0,3-0,4		0,5-0,6		11,0±2,0		0,4-0,6	
Индекс пролиферации, ИП		3-4		4-5		4-5		4-5	
% жизнеспособности		85-90		92-95		85-90		90-95	
Титр вируса ВЯ, Ig ТЦД ₅₀ /мл		-		7,0±0,34		-		7,0±0,41	
Цитометрический анализ клеточного цикла									
Размеры клеток, мкм		11,0±2,0		11,0±2,0		11,0±3,0		11,0±3,0	
Гранулярность (МЕАМ)		109,8		103,4		106,9		104,0	
Апоптоз, %		65,8		3,9		21,7		3,2	
Фазы клеточного цикла	S %	32,5		8,3		26,9		5,0	
	G2/G1	1,926		1,934		1,931		1923	
	S+G2+M	48		18,7		30,1		18,0	
	Показатели	PC %	CV	PC %	CV	PC %	CV	PC %	CV
	G1+G0	52,0	4,4	81,3	3,6	69,8	4,5	8,2	3,4
	G2+M	15,5	4,1	10,4	3,7	3,2	2,7	13	4

Обозначения: AI – ТК после размораживания; AII- ТК через 4 пассажа после размораживания; BI – ТК в стационарной фазе роста; BII- ТК в фазе активного роста; PC% – процент клеток в исследуемой фазе роста; CV коэффициент вариаций.

Соотношение фаз клеточного цикла, зафиксированные методом ПЦ, также находится в прямой зависимости от стандартности и стабильности условий культивирования, а также от влияния артефактов, которыми, в данном случае, оказалась заморозка-оттаивание, хранение клеток в жидком азоте и длительность стационарной фазы роста. После размораживания ТК ВНК-21/13S увеличивается количество клеток в S-фазе до 32 % и в G2-фазе до 15,5 %, а диплоидных клеток становится меньше 57 % (рис. 2, A1). После адаптации сублинии клеток в течение 3-4 пассажей нормализуется соотношение фаз клеточного цикла, а количество клеток в G-1 фазе превышает 80 %(рис. 2, A2).

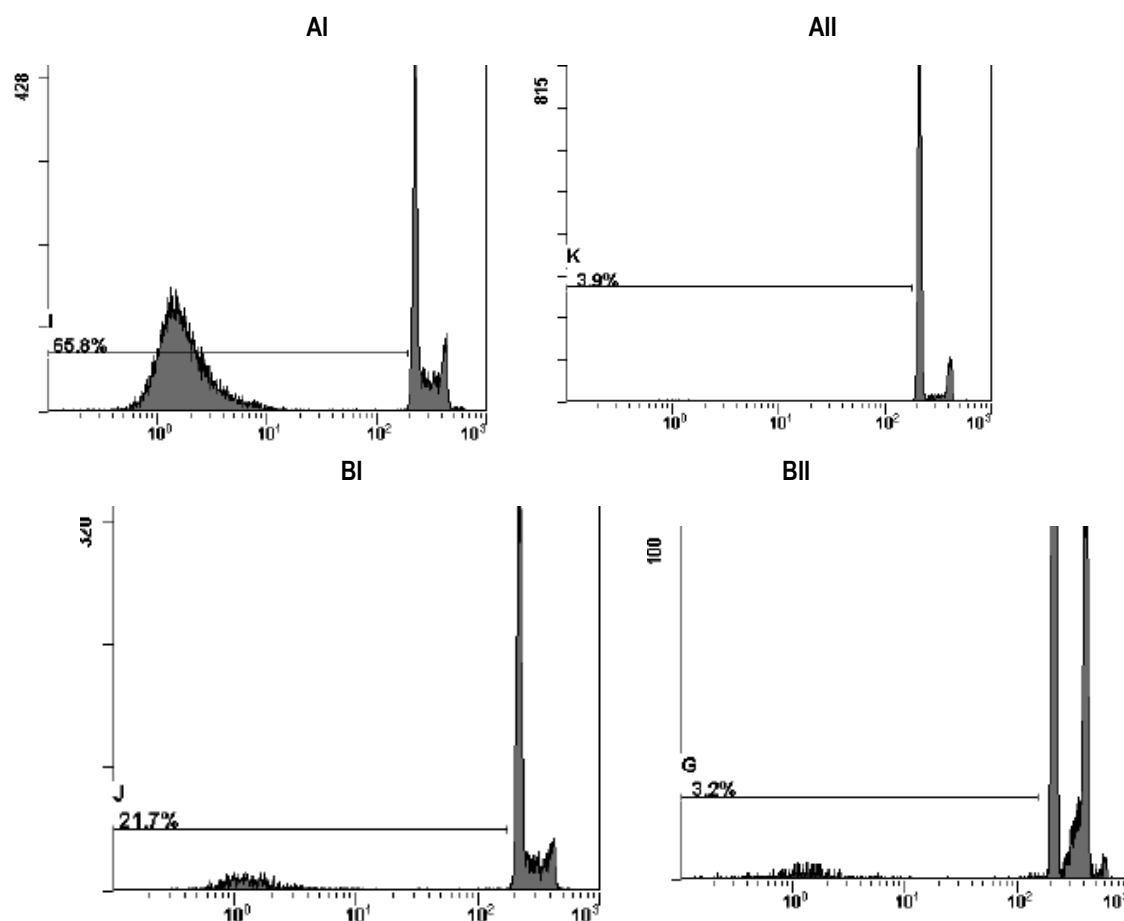


Рис. 1 Влияние условий культивирования перевиваемых линий ВНК21/13S(A) и ВНК-21Шв (B) на показатель апоптоза
Обозначения: AI – процент АК после размораживания; AII – процент АК через 4 пассажа после размораживания; BI – процент АК в стационарной фазе (96 ч) роста; BII – процент АК в фазе активного (72 ч) роста

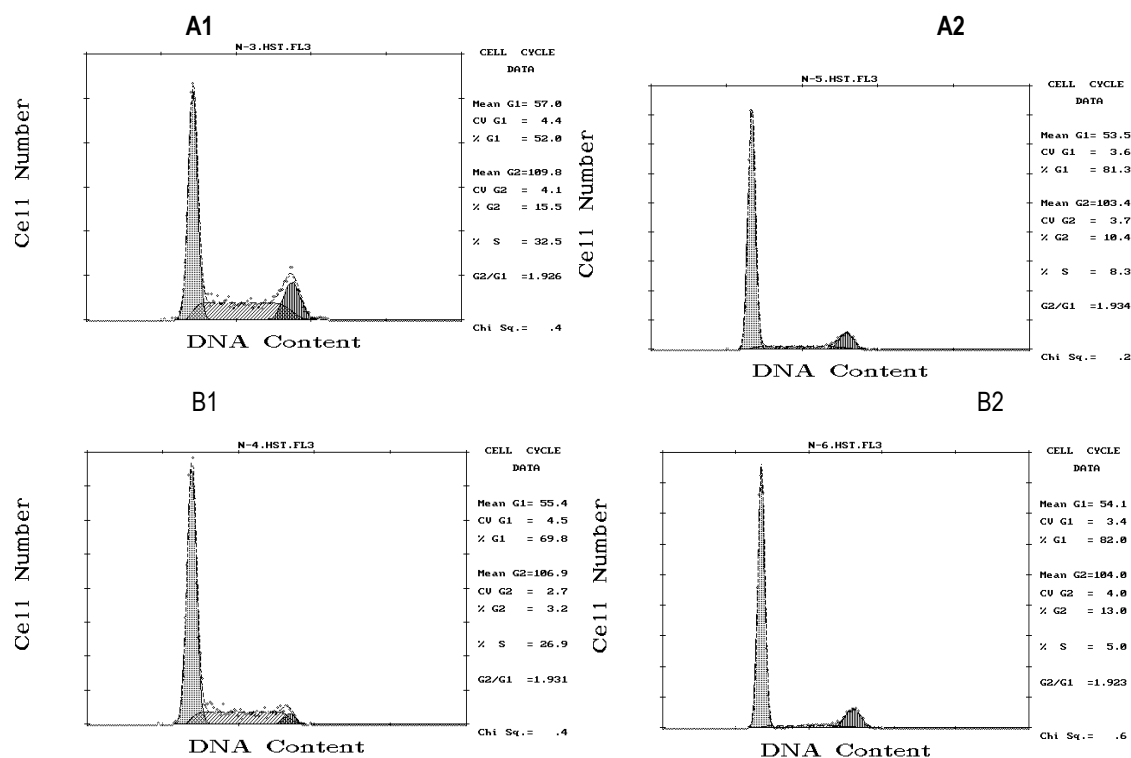


Рис. 2 Распределение клеток сублиний ВНК-21/13S (A) и ВНК-21Шв (B) по фазам клеточного цикла
Обозначения: A1 – после размораживания; A2 – через 4 пассажа после размораживания; B1 – в стационарной фазе (96ч) роста; B2 – в фазе активного роста.

При увеличении на 24 часа сроков инкубирования ТК в стационарной фазе роста уменьшается количество делящихся клеток в фазе G2 до 3,2 % и в фазе G1 до 55 %. В этот период, по сравнению с нормальной культурой, происходит синхронизация клеток в S – фазе до 27 % (табл. 1; рис. 2, B1, B2).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что при неадекватных условиях культивирования ТК существенно меняются не только показатели апоптоза, но и соотношение фаз клеточного цикла. В восстановительный период роста в монослое некротируют апоптотические клетки, активизируется синтетическая и метафаза, а доля диплоидных клеток уменьшается. При передержке монослоя в стационарном состоянии более 24 часов, уменьшается количество делящихся клеток и происходит торможение клеток в синтетической фазе роста ТК.

Оценивали также влияние процессов криоконсервирования и длительности хранения (при температуре жидкого азота) на жизнеспособность, ростовые свойства и показатели ПЦ суспензионной линии ВНК-21/2-17 (рис. 1).

Исходная суспензия клеток была получена в ферментёре через 44 ч культивирования. Затем сконцентрирована (до 25 млн/мл), расфасована в ампулы по 80 мл. и криоконсервирована традиционным способом [9]. Жизнеспособность клеток в исходной суспензии и после 12 летнего хранения была достаточно высокой и составляла соответственной 97-100 %. Необходимо однако отметить, что в размороженной суспензии методом ПЦ было выявлено 42,7 % апоптотических клеток, что по видимому, связано с воздействием факторов криоконсервирования и размораживания суспензии. В результате указанных процедур происходит фрагментация ДНК в фазе S (0,6 %) – в период формирования первичных хромосом. При дальнейшем культивировании, размножение клеток в данной суспензии в течение первых 24 часов не происходило. Активный рост клеток регистрировался лишь через 26 часов инкубирования. В последующие сроки рост клеток возрастал практически на 100% и достигал максимальной концентрации (3-3,5 млн./мл) через 72 часа культивирования. При последующем пятикратном масштабировании КМ в реакторах, объём суспензии и количество клеток увеличивались соответственно в 180 и 15000 раз, а показатели апоптоза не превышали 5%.

Анализ полученных результатов свидетельствует о стабильности и высоком ростовом потенциале и перспективности сублинии ВНК-21/2-17 для клеточного субстрата в производственном масштабе. Это обусловлено стабильностью и генетической однородностью клеточной популяции при соблюдении оптимальных условий культивирования. В активной фазе роста наблюдается довольно высокий процент (до 20) пролиферирующих клеток (S+G2+M) и максимальный уровень соотношения G2/G1, равный 1,992, что свидетельствует о высоком ростовом потенциале ТК и отсутствии в популяции аномальных клеток с изменённым количеством ДНК.

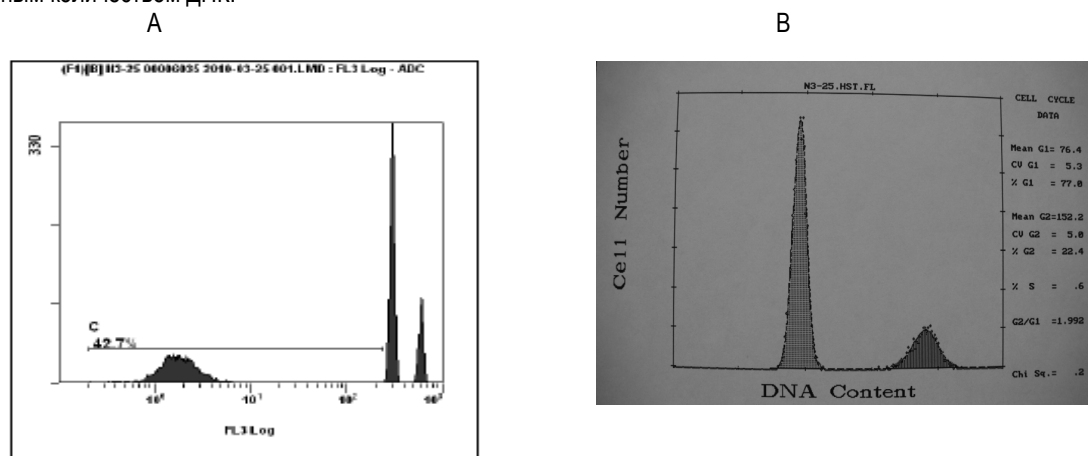


Рис. 3 Распределение клеток ВНК-21/2-17 по апоптозу (А) и фазам клеточного цикла (В) после криоконсервирования

Выводы. В результате экспериментальных и производственных исследований подтверждена значимость и перспективность экспресс-метода ПЦ для оценки ростового потенциала ТК и эффективности крупномасштабного производства и контроля клеток ВНК-21. Метод ПЦ позволил выявить причины ингибиции роста и гибели клеток в культуре. В частности показано, что процессы концентрирования, криоконсервирования и размораживания суспензии клеток, дефицит в составе питательных сред, накопление метаболитов, резкое изменение pH и условий культивирования приводят к достоверному снижению жизнеспособности, ростовых свойств клеток и увеличению ПКГ – апоптоза. Следует однако отметить, что апоптозу подвергается только определённая часть клеточной популяции, находящаяся в уязвимой фазе клеточного цикла (S). Восстановление репродуктивной функции КМ возможно при оптимизации условий культивирования и наличии в суспензии достаточного количества клеток в фазах G1 и G2. Для эффективного производства монослойных культур клеток ВНК-21/13S и ВНК-21Ш в соответствии с мониторингом ПКГ необходима строго регламентированная периодичность пересевов и смены ПС, поддержание pH среды и условий культивирования на оптимальном уровне. Кроме того показано, что криоконсервирование также стимулирует механизм апоптоза. В результате кристаллизации растворов наблюдаются структурные и функциональные изменения клеточных структур, проницаемости мембран, фрагментация нуклеиновых кислот, что приводит к апоптозу, некрозу и многим другим неконтролируемым изменениям, которые реализуются после размораживания и последующего культивирования КМ ин-витро. [10]. Отмеченные факты указывают на необходимость мониторинга ПКГ культуральных моделей методом ПЦ как с целью своевременной коррекции технологических процессов производства культур клеток так и вируссодержащих антигенов.

Список литературы

1. Требования к перевиваемым линиям клеток, используемых для производства биологических препаратов. Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биол. препаратов (Серия технических докладов ВОЗ №745). –М., 1988. – С. 85-89.
2. Методические указания (РД 42-28-10-89) по аттестации перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских иммунобиологических препаратов. – М.,

1989. 3. Пашкевич, В.А. Пригодность перевиваемых клеточных линий для производства препаратов, вводимых людям. // Культивирование клеток животных и человека. Мат. III Всесоюз. совещания. – Пущино, 1992. – С. 88-89. 4. Медуницин, Н.В. Вакцинология. – М.: Триада-Х, 1999. – 272 с. 5. Биотехнология / Тихонов И.В., Рубан Е.А., Грязнева Т.Н. и др. – СПб.: ГИОРД, 2005. 792 с. 6. Полетаев, А.И. Прочная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине. Общие проблемы физико-химической биологии. Итоги науки и техники ВИНИТИ. – М., 1989. – Т. 12. – С. 3-87. 7. Мораска, Л., Эрба, Э. Проточная цитометрия. Культура животных клеток. Методы. – М.: Мир, 1989. – С. 182-213. 8. Колышкин, В.М., Ночевный, В.Т., Новохатский, А.С. Апоптоз клеток в культуре: особенности проявления и влияние на эффективность биотехнологического производства (обзор) // ЖМЭИ, 2005. – №6. – С. 99-105. 9. Криоконсервирование клеточных суспензий (под ред. А.А. Цуцаевой) – Киев: «НАУКОВА ДУМКА», 1983. – 240 с. 10. Пушкар, Н.С., Капрелянт, А.С., Панков, Е.А. Ультраструктура клетки при низких температурах. – Киев, «НАУКОВА ДУМКА», 1978. – 140. 11. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение (Под ред. С.В. Хайдукова, А.В. Зурочки) – Челябинск, 2008. – 195 с.

EFFICIENCY OF FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS USED TO STUDY OF MECHANISMS OF REPARATION OF BHK-21 CELLS IN THE PROCESS OF CULTIVATION AND CRYOCONSERVATION

Manin B.L., * Nochevny V.T., ** Khaidukov S.V., *** Laskavy V.N. **

FGI "ARRIAH", Vladimir, **SRVS RAAS, Saratov, ***Institute of Bioorganic Chemistry named after M.M. Shemyakin of RAS

Results of studies of effect of non-standard cultivation and cryoconservation on the extent of apoptosis and distribution of the BHK-21 cell subline populations in cell cycle phases are presented in the article.

УДК 330.341.1.001.13:615.35:001.892

ВИКОРИСТАННЯ НАНОТЕХНОЛОГІЙ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ НОВИХ ВЕТПРЕПАРАТІВ ДЛЯ РИНКУ УКРАЇНИ

Мельниченко О.М., Бітюцький В.С., Соломонюк Я.В., Бітюцька Н.В., Маляр Д.Д.

Білоцерківський національний аграрний університет

У нашій країні нанотехнологіям приділяється з кожним роком все більше уваги навіть в умовах дуже обмеженого і явно недостатнього фінансування науки. Сьогодні термін «нанотехнологія» значно розширив свій сенс і охоплює та поєднує технологічні системи та процеси машин і механізмів, які здатні виконувати надточні операції у масштабі кількох нанометрів.

У НДІ екології та біотехнології Білоцерківського національного аграрного університету (БНАУ) проведені необхідні дослідження щодо розроблення антианемічних препаратів, нанотехнологія одержання яких та механізм впливу на метаболічні процеси відповідають напряду інноваційної діяльності виробників ветеринарних препаратів – створення іншої лікарської форми препарату, що певним чином змінює його дію [1-2]. З метою приведення національної системи стандартизації та сертифікації до міжнародних вимог нами проведена робота щодо розроблення стандартів для ветеринарних препаратів для профілактики та лікування анемічного стану поросят-сисунів та телят – Полімет-В12 та Вітамет, впровадження яких дозволить споживачеві підвищити рентабельність тваринництва та отримати безпечну продукцію високої якості. Для виробників таких препаратів наукова документація дасть чітку регламентацію технічних вимог щодо цієї продукції [3].

З огляду на особливості метаболізму у моногастрічних і полігастрічних тварин нами було сформовано мету щодо отримання багатокомпонентних ін'єкційних препаратів для профілактики і лікування анемії новонароджених телят та визначено завдання для досягнення поставленої мети.

Матеріали та методи. Для виробництва комплексних антианемічних препаратів Полімет-В12 та Вітамет сконструйовано та придбано прилади і обладнання для здійснення технологічного процесу: зворотноосмотична система для нанофільтрації хелатів металів та вітамінів, одержання апірогенної води, багатофункціональні хімічно та термостійкі керамічні фільтри для здійснення розподілу реагентів (хелатів, вітамінів) у режимі тангенціальної ультрафільтрації та нанофільтрації. Використано нанофільтраційні керамічні мембрани на основі оксидів різних металів з регульованими пористістю, розмірами пор, адсорбційною здатністю, каталітичною активністю та електроповерхневими властивостями [4]. Проведено моделювання та розрахунки процесів очищення, розділення та концентрування розчинів хелатів, вітамінів та нанодисперсних систем.

Методи дослідів на тваринах, визначення та контролювання вмісту вітамінів та металів в організмі тварин, препаратах, технології синтезу наноматеріалів, клінічні та доклінічні випробування створених препаратів опубліковані в попередніх статтях та працях [5-8].

Результати досліджень. Важливим аспектом феротерапії, особливо молодяку сільськогосподарських тварин, зокрема телят, є терапевтична безпека препаратів Феруму, що використовуються. Високий ризик виникнення побічних ефектів, інтоксикації Ферумом при терапії сольовими препаратами Феруму, зумовлені механізмом всмоктування двовалентного Феруму шляхом пасивної дифузії. Сольові препарати містять Ферум у двовалентній формі. Для того, щоб бути засвоєним, Fe^{2+} підлягає окисненню, що сприяє утворенню вільних радикалів. До нових високоефективних та безпечних препаратів Феруму належать створені в НДІ екології та біотехнології БНАУ препарати, що являють собою неіонні сполуки Феруму на основі гідроксид-декстринового комплексу (ГДК) тривалентного Феруму [5, 6]. Структура комплексу складається з багатоядерних центрів Феруму гідроксиду (III), оточених нековалентно зв'язаними молекулами декстринів. У процесі створення препаратів були використані нанотехнології для включення органічних сполук у композицію з неорганічними. Сформовані нанодисперсні структури захищених міцел Феруму, що підтверджується аналізом спектральних характеристик одержаних комплексів. У складі препаратів Полімет-В12 та Вітамет містяться вітаміни групи В в оптимальних кількостях і мікроелементи, які забезпечують оптимальне функціонування ферментних систем та метаболізм вітамінів. При створенні препаратів використано мікроелементи у структурі координаційних сполук, які є структурними та функціональними аналогами активних центрів металоферментів [7, 8]. При одержанні біохелатів застосовано принципи ефективно діючих біоорганічних комплексів, які функціонують у клітинах *in vivo*. У процесі конструювання біокомплексів було залучено сучасні дані про шляхи утворення і транспорту біосистем, що моделюються, форми, у яких вони елімінуються з оточуючого середовища транспортуються крізь мембрани клітин і досягають кінцевого пункту, де утворюють відповідні біокомплекси.

Процес створення ветеринарних препаратів включав етапи визначення програми досліджень та методів контролю одержаної продукції, а також розробку нормативної документації (Технічних умов, ДСТУ), виготовлення та випробування