

**Таблица 4 – Эффективность применения озонированного льняного масла при гнойно-катаральном мастите у коров в период запуска**

Показатель	Мастьет Форте (контроль)	Озонированное льняное масло
Количество животных в эксперименте всего (долей вымени)	10 (14)	10 (14)
В том числе: с воспалением в 1-й доли	7	6
с воспалением в 2 долях	2	4
с воспалением в 3 долях	1	0
Выздоровело, животных (долей)	10 (14)	10 (14)
Средняя кратность введений на одну долю	2,8±0,2	3,1±0,2
Затрачено препарата всего, мл (введений)	328 (41)	860 (43)
Себестоимость препарата на одно введение, рублей	101	6,4
Средняя себестоимость лечения одной доли, рублей	282,80	19,84
Отелилось животных с маститом	0	0

Как показывают проведенные исследования (таблица 4), в лечении коров с острым гнойно-катаральным маститом в период запуска с применением препарата «Мастьет Форте» в среднем требовалось 2,8 интрацистернальных введения, а для исчезновения клинических признаков воспаления вымени с использованием эмульсии из озонированного льняного масла требовалось 3,1 внутрисистернальной инстилляций. Несмотря на то, что количество приготовленной эмульсии было затрачено больше (в 2,6 раза), себестоимость лечения одной доли с применением разработанного средства была в 14,25 раз дешевле по сравнению с применением препарата «Мастьет Форте». При выполнении диагностических исследований через 2 недели после отела не было зарегистрировано рецидива болезни у всех пролеченных животных.

**Заключение.** Таким образом, можно сделать заключение, что в период запуска в секрете вымени у коров с острой формой гнойно-катарального воспаления в 60% присутствуют микроорганизмы в виде монокультур (*Citrobacter spp.*, *Str. agalactiae* и *E. coli*), а в 40% – содержатся смешанные варианты (*Staph. aureus* или *Str. agalactiae* с *E. coli*). Антимикробные свойства эмульсии из озонированного льняного масла зависят от времени ее контакта с микроорганизмами. При условии 2-часового контакта эмульсия на основе озонированного льняного масла вызывает гибель *Staph. aureus*, *Citrobacter spp.*, *E. coli*, *Str. agalactiae* в концентрации от  $10^6$  до  $10^8$  м.т./мл. Эффективность лечения коров с острым гнойно-катаральным маститом в период запуска с применением эмульсии из озонированного льняного масла не значительно отличается по скорости выздоровления больных животных от Мастьет Форте, однако себестоимость лечения при разработанном методе дешевле в 14,25 раз.

**Литература:** 1. Атлас грибов, патогенных для сельскохозяйственных животных и птиц. М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1953. - 160 с. 2. Баркова, А.С. Эффективность использования пробиотических средств для профилактики заболеваний молочной железы у коров / А.С. Баркова // Ветеринария, 2014. - № 4. - С. 40-44. 3. Карташова, В.М. Маститы коров / В.М. Карташова, А.И. Ивашура // М.: Агропромиздат, 1988. - 256 с. 4. Конопельцев, И.Г. Применение озонированного раствора диоксида при мастите у коров в период запуска и сухостя / И.Г. Конопельцев, Ю.Б. Юкляева // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2014. - №3. - С. 81-86. 5. Краткий определитель бактерий Берги. М., 1980. - 496 с. 6. Модин, А.Н. Применение неоксиданта для профилактики и терапии субклинического мастита в период запуска и сухостя: дис... канд. вет. наук. - Воронеж, 2010. - 118 с. 7. Павленко О.Б. Монофункциональное обоснование применения пробиотиков при субклиническом мастите у коров: автореф. дис... д-ра биол. наук / О.Б. Павленко. - Новочеркасск, 2016. - 45 с. 8. Першин С.С. Эффективность применения биологического стимулятора аминокислот в комплексной терапии больных маститом коров: автореф. дис... канд. вет. наук / С.С. Першин. - Саратов, 2016. - 19 с. 9. Притыкин Н.В. Субклинический мастит у коров в период сухостя, его профилактика и терапия с использованием фурадина автореф. дис... канд. вет. наук / Н.В. Притыкин. - Воронеж, 2003. - 20 с. 10. Решетка М.Б. Применение нового фитопрепарата при гнойно-катаральном мастите / М.Б. Решетка, И.С. Коба // Вестник АПК Ставрополя, 2013. - №2 (10). - С. 226-227. 11. Сидоров М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов / М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов, В.Б. Федотов // М.: Колос, 2005. - 319 с. 12. Hameed, K.G. Public health hazard due to mastitis in dairy cows / K.G. Hameed, G. Sender, A. Korwin-Kossakowska // Polish acad. of animal breeding. Jastrzebiec, 2007. - Vol.25, № 2. - P. 73-85.

Статья передана в печать 17.04.2017 г.

УДК 619:578.247

#### ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

\*Красочко П.А., \*\*Костюк Н.И., \*\*Бучукури Д.В., \*\*Стрельченя И.И., \*\*Бурко А.Н., \*\*Ткалич Е.С., \*\*Войшнарович Н.И., \*\*Шкроб К.К.

\*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

\*\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», г. Минск, Республика Беларусь

Целью настоящего исследования являлась оценка цитотоксичности сыворотки крупного рогатого скота с использованием перевиваемых клеточных линий. Установлено, что после внесения цитотоксической сыворотки через 2 суток на культуре клеток MDBK отмечается начальный период дегенерации монослоя, округление клеток, их частичное отслоение от поверхности стекла. На 3-и сутки культивирования в монослое отмечены существенные дегенеративные изменения. Монослой клеток разрушен, видны скопления ок-

руглившись клетки. На 6-е сутки монослой практически отслоился от стекла, отмечена гибель клеток. Клетки взвешены в среде в виде конгломератов. Приведенные результаты по использованию культур клеток для оценки цитотоксичности сыворотки крови крупного рогатого скота, используемой в биотехнологическом производстве, свидетельствуют, что использованный метод является простым, экологически безопасным и объективным. Оцененные таким методом разные серии сыворотки крови позволяют в дальнейшем их целенаправленно использовать для выращивания культур клеток и накопления вирусов при стационарном или роллерном культивировании. **Ключевые слова:** культура клеток MDBK, сыворотка крови, монослой, цитотоксичность.

#### APPLICATION OF CELL CULTURES FOR ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF BLOOD SERUM OF THE CATTLE

<sup>†</sup>Krasochko P.A., <sup>\*\*</sup>Kostyuk N.I., <sup>\*\*</sup>Buchukuri D.V., <sup>\*\*</sup>Štelchenya I.I., <sup>\*\*</sup>Burko A.N.,  
<sup>†</sup>Tkalich E.S., <sup>\*\*</sup>Voyshnarovich N.I., <sup>\*\*</sup>Shkrob K.K.

\* «Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine», Vitebsk, Republic of Belarus

\*\* «Institute of Experimental Veterinary Medicine name S.N Vyshesleski», Minsk, Republic of Belarus

*The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of bovine serum using continuous cell lines. It was found that after the introduction of cytotoxic serum after 2 days on a culture of MDBK cells marked the initial period of degeneration monolayer cell rounding, their partial detachment from the surface of the glass. On the 3rd day of cultivation in monolayer marked significant degenerative changes. A monolayer of cells destroyed visible accumulations of rounded cells. On day 6 monolayer virtually peeled off the glass, marked by the death of cells. Cells were suspended in a medium in the form of conglomerates. The results on the use of cell cultures to assess cytotoxicity of the serum of cattle used in biotechnological production indicate that the method used is simple, environmentally friendly and objective. Measured by this method different series of serum allow them to further purposefully used for growing cell cultures and virus accumulation in stationary roller or cultivation. **Keywords:** MDBK cells culture, blood serum, monolayer, cytotoxicity.*

**Введение.** Современная ветеринарная вирусология и вся ветеринарная биопромышленность немислимы без широкого использования культур клеток для размножения патогенных или аттенуированных (вакцинных) штаммов вирусов *in vitro* [1].

В биотехнологическом производстве противовирусных вакцин одним из основных компонентов при их изготовлении является использование культур клеток. Использование клеточных культур играет важную роль для накопления вирусов с целью изготовления противовирусных вакцин [2, 4, 6, 7, 8].

Клеточные культуры нуждаются в большом числе факторов роста. Для биосинтетической деятельности клеток животных в культуре необходимо присутствие заменимых и незаменимых аминокислот, водорастворимых витаминов, углеводов, минеральных веществ и т. д. Наличие этих веществ в питательной среде обеспечивает пластическую и энергетическую потребности клеток животных, необходимые для поддержания их жизнедеятельности и размножения. Следовательно, основное условие успешного проведения технологического процесса культивирования клеток – подбор питательных сред, обеспечивающих максимальное накопление целевого продукта. Для выращивания культур клеток применяют питательные среды, имеющие сложный состав. Они komponуются из высококачественного сравнительно дорогого сырья с последующим внесением питательных и ростовых добавок. Одним из основных компонентов ростовых питательных сред является сыворотка крови, которая применяется для культивирования большинства клеточных линий [2, 3, 9].

В состав сыворотки крови входят факторы роста, которые способствуют клеточной пролиферации, а также факторы адгезии вещества, обладающие антитрипсиновой активностью, способствующие прикреплению клеток. Сыворотка является источником белков, аминокислот, минеральных веществ, липидов и гормонов, белков, витаминов. Альбумин является важным переносчиком липидов, минералов, стимулирует клеточный рост и прикрепления клеток. Белки повышают вязкость среды, снижая стресс от повреждений при механическом воздействии на клетки, увеличивают буферную емкость среды. Для клеточных культур используют сыворотку крови телят, эмбриональную телячью сыворотку и сыворотку крупного рогатого скота и лошадей. Эмбриональная сыворотка и сыворотка крупного рогатого скота используется наиболее широко. Сыворотку крови получают из крови клинически здоровых животных, благополучных по инфекционным заболеваниям [5, 10].

Одним из важнейших технологических приемов культивирования клеток остается выбор, состав и концентрация добавляемой в культуральную среду сыворотки.

Разные серии сыворотки могут значительно различаться по своим свойствам. Эти различия обусловлены разными методами приготовления и стерилизации, различным сроком и условиями хранения, а также породами животных, у которых берут сыворотку, рационом, климатом, в котором животных выращивают. Важно выбрать серию сыворотки и использовать ее как можно дольше и заменить ее со временем на максимально сходную по свойствам [4].

Для выращивания культуры клеток MDBK, СПЭВ, 3-КГ, ВНК в основном используется сыворотка крупного рогатого скота, изготовленная в условиях РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского». В работе с культурой клеток нами используется сыворотка, подвергнутая облучению гамма-лучами на гамма-установке УГУ-420.

Целью настоящего исследования являлась оценка цитотоксичности сыворотки крупного рогатого скота с использованием перевиваемых клеточных линий.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводились в условиях отделов вирусных инфекций и культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского».

Сыворотку крови крупного рогатого скота получали от убойных клинически здоровых бычков в условиях Витебского мясокомбината. После тотального обескровливания с соблюдением условий асептики, кровь для отстаивания помещали в контейнер и оставляли при температуре +2+4°C в течение 36-48 часов. Отделившуюся от фибрина сыворотку крови декантировали, отделяли от формен-

ных элементов путем центрифугирования на проточной центрифуге HANIL J-075, фасовали и подвергали стерилизации. В работе с культурой клеток нами используется сыворотка крупного рогатого скота, подвергнутая облучению гамма-лучами. Радиационная обработка проводится на гамма-установке УГУ-420 с использованием закрытых радионуклидных источников гамма-излучения кобальт-60 без непосредственного контакта с облучаемой сывороткой. Процесс является экологически чистым

Для оценки качества облученную сыворотку крупного рогатого скота подвергают тестированию по основным параметрам:

1. *Ростовые свойства*: Каждую серию сыворотки тестируют в диапазоне концентрации от 2% до 20%. Данный подход позволит нам выявить, какая из сывороток будет проявлять равную активность в более низких концентрациях. Это даст возможность использовать партию сыворотки в течение более длительного времени. Кроме того, если сыворотка окажется токсичной, то при высокой концентрации она проявится. Сыворотка крови не должна вызывать дегенеративные изменения в монослойное перевиваемой тест-культуры клеток MDBK.

2. *Оценка роста*. Строится график кривой роста клеток при их выращивании на каждой серии сыворотки и определяются lag-период, время удвоения и плотность насыщения (плотность клеток при выходе кривой на плато). Сыворотка должна обеспечивать жизнеспособность клеток не менее 95%.

3. *Сохранение свойств культуры клеток*. Клетки с новой партией сыворотки должны иметь типичную для данной линии морфологию, обладать высокой чувствительностью к заражению к специфическим агентам (вирусам), сохранять стабильность всех биологических свойств в течение всего срока культивирования (количество пассажей).

4. *Стерильность*. Сыворотка не должна быть контаминирована микроорганизмами.

Охарактеризованная по вышеуказанным параметрам партия сыворотки хранится при минус 20°C в течение года и используется для выращивания культур клеток.

Оценку цитотоксических свойств сыворотки определяли по методу, описанному А.Я. Самуйленко, В.И. Еремцом, Э.Ф. Токариком и др. (2006). Для работы использована культура клеток MDBK.

Клетки MDBK характеризуются высокой пролиферативной активностью (индекс пролиферации - 5,0), а также чувствительностью к вирусам инфекционного ринотрахеита, диареи и коронавирусам. Популяция клеток обладает устойчивостью к криоконсервированию (жизнеспособность - 95-99% при -196°C в течение 10 лет); при 4°C хранится до 10 суток (жизнеспособность - 90-95%). Клетки адаптированы к монослойному культивированию на матрасах или в роллерных флаконах, выдерживают колебания pH в пределах 6,6-7,4, в пассажах - и до 6,8-7,3.

Для работы были использованы клетки MDBK из рабочего банка клеток РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», хранившиеся в виде кратных частей в криопробирках при -196°C (в жидком азоте) объемом 1,0-2,0 мл или в холодильнике при температуре -85°C.

Ампулы с суспензией клеток извлекали из банка, помещали в водяную баню с температурой 37-40°C и выдерживали до полного оттаивания. Суспензию клеток центрифугировали, осадок клеток ресуспендировали в питательной среде и переносили в матрасы с ростовой средой, добавляя ее небольшими порциями для предотвращения осмотического шока клеток в 4 приема с интервалом в 1 минуту. Отбирали пробу для контроля стерильности и подсчета клеток.

Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева под малым увеличением микроскопа. После реконсервации суспензию клеток доводили питательной средой для монослойного выращивания до концентрации 200-300 тыс./мл жизнеспособных клеток, после чего высевали в 100 мл матрас. Клетки выращивают 72-120 ч при pH - 7,0-7,4 и температуре 37°C. Через 24 часа проводили смену питательной среды. Сформировавшийся клеточный монослой для проведения последующих пассажей снимали раствором версена с добавлением трипсина. Отслоившиеся от стекла клетки ресуспендировали в небольшом количестве питательной среды путем энергичного встряхивания, затем добавляли удвоенное количество питательной среды. Пересев проводили с коэффициентом 1:2. На следующем пассаже пересев осуществляют в 1,5 л матрас, проводя все операции, как описано выше. В дальнейшем для исследований использовали выращенные клетки в 2-3 последующих пассажах.

Оценку цитотоксичности сыворотки крови проводили путем ее внесения на сформированный клеточный монослой.

В работе использовали матрасы с клетками объемом 100-250 мл. Из матрасов с 48-часовой культурой клеток сливают ростовую среду и заменяют ее равным объемом (10 см<sup>3</sup>) поддерживающей (среда Игла - 100%). Далее во флакон добавляли испытуемую серию сыворотки в количестве 10%. Одним образцом сыворотки инокулировали культуры клеток в 3 матрасах. В матрасы с контрольными культурами клеток добавляют по 10% среды Игла. Продолжают инкубацию клеточных культур в термостате в течение 6 суток, проводя ежедневно под микроскопом визуальный контроль состояния клеточных культур.

Оценить токсичность образца визуально с помощью микроскопа можно только в тех случаях, когда этот образец вызывает явные цитопатические изменения. Такие изменения нами регистрировались при фотографировании культуры клеток под микроскопом. При этом нами использован инвертированный микроскоп «Nikon TS100» с фотокамерой.

**Результаты исследований.** В подготовленный монослой культуры клеток MDBK в матрасах объемом 100,0 мл вносили 10% от объема поддерживающей среды испытуемую сыворотку крови. На рисунке 1 приведена микрофотография культуры клеток MDBK с использованием нецитотоксичной сыворотки до внесения испытуемой серии сыворотки крови крупного рогатого скота.

Из рисунка 1 видно, что на поверхности матраса на 5-е сутки сформирован сплошной 100% монослой. Клетки имеют типичную для данной линии морфологию, тип роста - эпителиоподобный. Не содержит посторонних агентов (бактерий, грибов и т.д.)

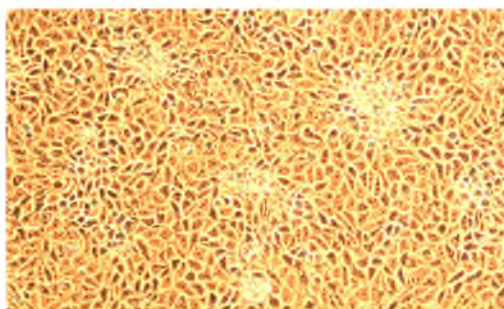
На рисунках 2-4 приведена динамика изменений культуры клеток MDBK под воздействием токсичной серии сыворотки крови крупного рогатого скота.

Через 2 суток после внесения цитотоксической сыворотки (рисунок 2) на культуре клеток отме-

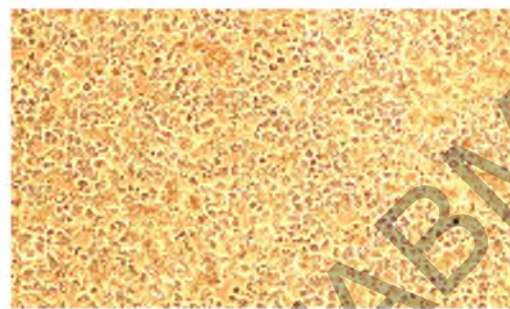
чается начальный период дегенерации монослоя, округление клеток, их частичное отслоение от поверхности стекла.

На 3-и сутки культивирования перевиваемых клеток MDBK с токсичной сывороткой (рисунок 3) в монослое отмечены существенные дегенеративные изменения. Монослой клеток разрушен, видны скопления округлившейся клетки.

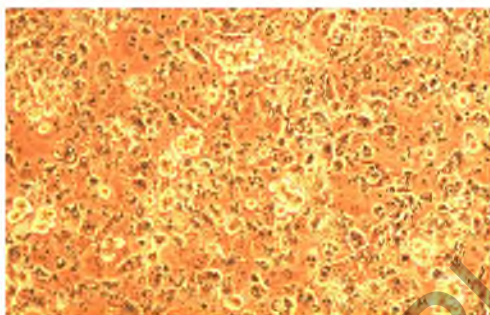
На 6-е сутки (рисунок 4) монослой практически отслоился от стекла, отмечена гибель клеток. Клетки взвешены в среде в виде конгломератов.



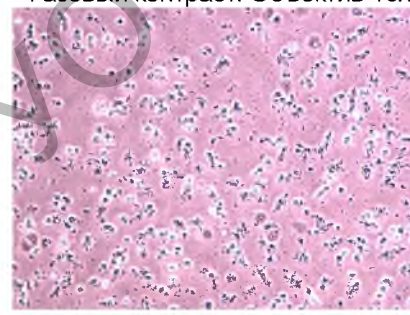
**Рисунок 1 - Монослой культуры клеток MDBK (5 суток) с использованием нецитотоксичной сыворотки, контроль.** Фазовый контраст. Объектив 10х



**Рисунок 2 - Дегенеративные изменения в монослое культуры клеток MDBK на 2-е сутки под влиянием токсичной сыворотки крови крупного рогатого скота.** Начальный период дегенерации монослоя. Фазовый контраст. Объектив 10х



**Рисунок 3 - Дегенеративные изменения в монослое культуры клеток MDBK на 3-и сутки под влиянием токсичной сыворотки крови крупного рогатого скота.** Монослой клеток разрушен, видны скопления округлившейся клетки. Фазовый контраст. Объектив 10х



**Рисунок 4 - Дегенеративные изменения в культуре клеток MDBK на 6 сутки под влиянием токсичной сыворотки крови крупного рогатого скота.** Полное разрушение монослоя культур клеток. Фазовый контраст. Объектив 10х

**Заключение.** Приведенные результаты по использованию культур клеток для оценки цитотоксичности сыворотки крови крупного рогатого скота, используемой в биотехнологическом производстве свидетельствуют о том, что использованный метод является простым, экологически безопасным и объективным. Оцененные таким методом разные серии сыворотки крови позволяют в дальнейшем их целенаправленно использовать для выращивания культур клеток и накопления вирусов при стационарном или роллерном культивировании.

**Литература.** 1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных : разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. В. Насонов, А. С. Ястребов, Д. В. Бучукири, М. М. Усеня, П. П. Красочко, Д. С. Борисовец, В. П. Красочко, Н. М. Авласко; под ред. Н. А. Ковалева. - Минск : Беларуская навука, 2016. - 492 с. 2. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич – Минск : БГУ, 2004.-78 с. 3. Культура клеток, тканей и органов растений : методические рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007. - 46 с. 4. Культура животных клеток : практическое руководство / Р. Я. Фрешни. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 691 с. 5. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. - М.: «Спутник+», 2009. - 656 с. 6. Частная эпизоотология : учебное пособие / В. В. Максимович, Н. В. Сеница, В. Ф. Багрецов, А. В. Бублов, Г. Э Дремач, О. Р. Билецкий, П. А. Красочко, И. А. Красочко, В. А. Машеро, Н. А. Ковалев, Ю. Г. Лях, С. Л. Гайсенко, А. А. Вербицкий. - Минск, 2010. - 628 с. 7. Ковалев, Н. А., Красочко, П. А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека : монография / Н. А. Ковалев, П. А. Красочко. – Минск : Беларуская навука, 2012. – 426 с. 8. Эпизоотология и инфекционные болезни : учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В. В. Максимович, В. Ф. Багрецов, О. Р. Билецкий, А. В. Бублов, А. А. Вербицкий, С. Л. Гайсенко, В. А. Головки, М. И. Гулюкин, А. А. Гусев, Г. Э. Дремач, Н. А. Ковалев, П. А. Красочко, И. А. Красочко, Ю. Г. Лях, В. А. Кузьмин, В. А. Машеро, Н. В. Сеница ; ред. В. В. Максимович. – Минск : ИВЦ Минфина, 2012. – 775 с. 9. Красочко, П. А. Вирусные пневмоэнтериты телят / П. А. Красочко, Ю. Г. Зелютков, И. А. Красочко. – Минск, 1999. – 168 с. 10. Ветеринарная энциклопедия : в 2-х т. / С. С. Абрамов и др. ; под ред. А. И. Ятусевича. – Минск, 2013. – Т. 2 : К-Я. – 597 с.

Статья передана в печать 04.04.2017 г.