

**Литература.** 1. Биохимические методы исследования в клинико-диагностических лабораториях : практическое пособие / О. А. Тимин О.А. [и др.]. – Томск : STT, 2002. – 244 с. 2. Готовский, Д. Г. Новый малотоксичный препарат для дезинфекции животноводческих помещений / Д. Г. Готовский // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. / БГСХА. – Горки, 2010. – Вып. 13, ч. 2. – С. 225-231. 3. Готовский, Д. Г. Показатели белкового обмена ремонтного молодняка кур при его выращивании в условиях с различным микробным загрязнением воздуха / Д. Г. Готовский, Д. Т. Соболев, В. Н. Гиско // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 2 (9). – С. 6–8. 4. Диагностика, профилактика и терапия болезней свиней : монография / А. Р. Камошенко [и др.]. – Смоленск : Смоленская ГСХА, 2010. – 200 с. 5. Конотоп, Д. С. Влияние факторных патогенов на обмен веществ у свиноматок в условиях комплекса / Д. С. Конотоп, Д. Т. Соболев // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2019. – Т. 55, вып. 3. – С. 34–37. 6. Конотоп, Д. С. Показатели белкового и минерального обмена у хряков и влияние на них факторных патогенов / Д. С. Конотоп, Д. Т. Соболев, В. Ф. Соболева // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2019. – Т. 55, вып. 4. – С. 46–49. 7. Конотоп, Д. С. Применение ронколейкина для профилактики иммунодефицитов у свиноматок при герпесвирусной инфекции / Д. С. Конотоп // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2011. – Т. 47, № 1. – С. 58-64. 8. Основы биометрии : учеб.-метод. пособие / А. В. Вишневец [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2011. – 44 с. 9. Прудников, С. И. Контроль ассоциированных эпизоотических процессов инфекционных болезней молодняка свиней технологическими методами / С. И. Прудников, Т. М. Прудникова // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве : сб. науч. работ / РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 2000. – С. 299-310. 10. Соболев, Д. Т. Динамика индикаторных ферментов сыворотки крови, поджелудочной железы и печени ремонтного молодняка кур, вакцинированного против инфекционного ларинготрахеита / Д. Т. Соболев, Д. В. Елисейкин // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2008. – Т. 44, вып. 2, ч. 2. – С. 142–147. 11. Особенности липидного обмена ремонтного молодняка кур, вакцинированного против ИБК / Д. Т. Соболев [и др.] // Птицеводство Беларуси. – 2003. – № 3. – С. 9–11. 12. Соболев, Д. Т. Ферментный спектр поджелудочной железы, печени и сыворотки крови ремонтного молодняка кур, вакцинированного против болезни Ньюкасла / Д. Т. Соболев, Д. В. Елисейкин // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2010. – Т. 46, вып. 1, ч. 2. – С. 215–219. 13. Шевченко, А. А. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: бактериальные заболевания / А. А. Шевченко [и др.]. – Краснодар : Кубанский ГАУ, 2018. – 701 с.

Поступила в редакцию 22.09.2021.

УДК 576.3.086.83

#### ПОЛУЧЕНИЕ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

\*Костюк Н.И., \*Кныш Н.В., \*Барсукова М.В., \*\*Василевич И.Б., \*\*\*Борисик Р.Н., \*\*\*Руколь В.М., \*\*\*Саакян А.Н., \*\*\*Андреева Е.Г.

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

\*\*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

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

Для биобезопасности и эффективного лечения животных мезенхимальными стволовыми клетками с целью выделения МСК важное значение имеют методы отбора биологического материала, обеспечивающие стерильность и функциональность биоматериала, минимизацию травмирования животных. В связи с этим нами были разработаны методы прижизненного и послеубойного взятия материала в условиях мясокомбината. **Ключевые слова:** биологический материал, жировая ткань, мезенхимальные стволовые клетки, крупный рогатый скот.

#### OBTAINING ADIPOSE TISSUE FOR THE ISOLATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN CATTLE

\*Kostyuk N.I., \*Knysh N.V., \*Barsukova M.V., \*\*Vasilevich I. B., \*\*\*Borisik R.N., \*\*\*Rukol V.M., \*\*\*Sahakyan A.N., \*\*\*Andreeva E.G.

\*Institute of Experimental Veterinary Medicine Named after S.N. Vyshellessky, Minsk, Republic of Belarus

\*\*Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS, Minsk, of Belarus

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

For the biosafety and effective treatment of animals with mesenchymal stem cells in order to isolate MSCs, methods of selecting biological material that ensure the sterility and functionality of the biomaterial, minimizing injury to animals are important. In this regard, we have developed methods of intravital and post-slaughter material collection in a meat processing plant. **Keywords:** biological material, adipose tissue, mesenchymal stem cells, cattle.

**Введение.** Работа с тканями животных связана с рядом этических проблем, включая приобретение, последующие манипуляции, а также отдаленные способы использования материала. В основном эти нормы и правила применимы в большинстве стран, ведущих биомедицинские исследования, вводятся в действие или будут вскоре введены законы, регулирующие использование экспериментальных или других животных-доноров для получения тканей [6]. В основном эти нормы и правила относятся к высшим животным, поскольку предполагается, что они имеют достаточно высокоорганизованный мозг, чтобы чувствовать боль и дистресс, и обычно не применяются к низшим позвоночным, таким как рыбы, или к беспозвоночным. Считается, что высшие животные становятся разумными со второй половины эмбрионального развития, поэтому ограничения, связанные с биоэтикой, накладываются на методы забоя или методы обездвиживания и оперативного воздействия в случаях, когда животное остается живым. Основные требования направлены на минимизацию страданий от боли и дискомфорта, причиняемых животным. Использование тканей животных, полученных при соблюдении этических норм, является альтернативой прижизненного отбора биоптата от здоровых животных [4, 6].

Существуют также ограничения, касающиеся содержания животных и ухода за ними как в питомнике и виварии в условиях эксперимента, так и в ветеринарной клинике в клиническом состоянии [6].

Перспективность получения и применения мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) – стволовых клеток взрослого организма, определяется их основными свойствами и признаками [13]. Во-первых, достоверно установлено, что ММСК стабильно самообновляются в клонах без анеуплоидии, генетической нестабильности и малигнизации. При этом они способны пролиферировать в культуре длительное время, формируя стабильные диплоидные клеточные линии. Во-вторых, при индукции к дифференцировке они способны дифференцироваться в нескольких направлениях, в пределах тканевых производных одного зародышевого листка, образуя *in vitro* клетки других тканей [1, 9, 15]. ММСК обладают способностью заселять матрицу-носитель, дифференцироваться в заданном направлении и формировать трехмерные структуры, которые позволяют моделировать ту или иную ткань в искусственных условиях [2, 10]. Легкость их выделения и доступность биологического материала (подкожный и внутренний жир) делает их на сегодняшний момент наиболее перспективной клеточной системой [7, 10].

При проведении оценки пролиферативного потенциала, морфологических и фенотипических характеристик культур клеток мезенхимального происхождения установлено, что первичная культура мезенхимальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) по своему пролиферативному потенциалу превосходит многие культуры. Первичная культура МСК ЖТ характеризуется гетерогенной структурой, высокой пролиферативной активностью, характерным для МСК клеточным фенотипом, который сохранялся на нескольких пассажах [3, 7]. В современных условиях среди всех популяций стволовых клеток значительное внимание уделено МСК ЖТ, к преимуществам использования которой можно отнести простоту и малоинвазивность способа эксплантации их тканевого источника, большой «выход» клеток при выделении, что может свидетельствовать о преимуществе использования МСК ЖТ в качестве клеточной составляющей для создания биологических трансплантатов [3, 4, 5]. Это делает их уникальным материалом и дает начало перспективам для исследований в клеточной биологии, тканевой инженерии, биотехнологии, ветеринарной медицине в связи с их уникальными свойствами и признаками [14, 15].

Доказано, что можно получить культуры из зрелых жировых клеток. Жировые клетки (адипоциты) – это терминально дифференцированные, специализированные клетки, основная физиологическая роль которых классически характеризуется как энергетический резервуар для организма. Адипоциты являются хранилищем триглицеридов при избыточном поступлении энергии и источником энергии в форме свободных жирных кислот, высвобождающихся путем липолиза тогда, когда эта энергия понадобится, и играют важную роль как активные регуляторы углеводного и жирового метаболизма. При этом совершенно не важно, из какого участка забирается жировая ткань: количество, жизнеспособность и функциональная активность клеток будет одинаковой. Так, из 100 г жира сразу после его забора можно выделить около 1 млн стволовых клеток, через 2 часа – 500 тыс., а через 18 часов при температуре хранения плюс 4<sup>0</sup>С их количество уменьшится на 50%. Однако неправильно отобранный материал из-за наличия контаминантов может влиять на качество МСК и безопасность их применения [5, 8, 11, 12].

Целью нашей работы являлась разработка методов отбора стерильного и функционального биоматериала для выделения мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани крупного рогатого скота с соблюдением норм биоэтики.

**Материалы и методы исследований.** С целью сравнительного анализа пролиферативного потенциала первичных культур ММСК осуществляли получение биологического материала (жировой ткани) крупного рогатого скота прижизненно от клинически здоровых животных из благополучных по инфекционным и инвазионным болезням хозяйств и в убойном цеху во время планового убоя в условиях Минского мясокомбината с соблюдением правил асептики и антисептики.

Отбор проб выполняли от бычков голштинской породы в возрасте 16–18 месяцев. Материалом для отбора служил подкожный жир в области основания хвоста в объеме 5–10 см<sup>3</sup>. Получение

жировой ткани крупного рогатого скота от убойных животных осуществлялось не позднее 15–30 минут после убоя стерильными хирургическими инструментами, поддерживая максимально возможный уровень стерильности. Поверхность жировой ткани на месте разреза прижигали нагретым шпателем и делали глубокий надрез скальпелем, извлекая стерильным пинцетом жировую ткань. Биоптаты жировой ткани крупного рогатого скота, полученные прижизненно, проводили под местной анестезией. Место забора ЖТ обрабатывали 70% этиловым спиртом и делали надрез скальпелем. Извлекали стерильным пинцетом жировое скопление, поддерживая максимально возможный уровень стерильности. После взятия биоптата, в условиях хозяйств, на подкожно-жировую клетчатку и кожу были наложены швы.

Для обработки условий получения жировой ткани крупного рогатого скота, обеспечивающих стерильность и функциональность биоматериала, было проведено изучение нескольких способов предварительного обеззараживания отобранного материала. Часть отобранного подкожного жира сразу помещали в стерильные флаконы с фосфатно-буферным раствором с добавлением антибиотиков (пенициллин 200 ЕД/мл, стрептомицин 200 мкг/мл). Вторую часть отобранного материала перед помещением в стерильные флаконы с фосфатно-буферным раствором с добавлением антибиотиков на 30 секунд помещали в 70% этиловый спирт. Контроль стерильности отобранного биологического материала проводили в ламинарном боксе (2 класс защиты) бактериологическими методами посева на селективные питательные среды (Государственная фармакопея Республики Беларусь, Т.1, раздел 2.61).

Для контроля биологического материала на стерильность в 2 пробирки с тиогликолевой средой вносили по 1 мл исследуемого материала. Помещали пробирки в термостат и инкубировали при 37 °С в течение 14 суток. Через 14 суток проводили визуальный учет исследования. Для контроля биологического материала на контаминацию дрожжеподобными грибами в 2 чашки Петри со средой Сабуро вносили по 10,0–20,0 мл исследуемого материала и равномерно распределяли шпателем по поверхности агара. Помещали чашки Петри в термостат и инкубировали при 22 °С в течение 14 суток. Через 14 суток провели визуальный учет исследования.

Выделение МСК из полученной ткани осуществляли в лаборатории Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси по отработанной ранее методике [3].

**Результаты исследований.** В результате исследований было установлено, что при помещении отобранного материала в фосфатно-буферный раствор с добавлением антибиотиков без предварительного обеззараживания в спирте наблюдалась контаминация в 2 из 5 случаев. При обеззараживании поверхности отобранного жира путем погружения в 70% этиловый спирт в течение 30 секунд на селективных питательных средах роста микроорганизмов не обнаружено.

В лаборатории биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси из полученных во время планового убоя и прижизненно отобранных образцов ткани крупного рогатого скота получена культура клеток с 92,0–97,0% жизнеспособных морфологически идентичных клеток, которые представляли собой гомогенную культуру характерного ветереновидного, фибробластоподобного вида с высокой адгезивной способностью, образующих монослой с кофлюэнтностью около 90%, обладающих высокой клоногенностью и пролиферативной способностью. В клетках при дополнительном увеличении (400х) отчетливо было видно ядро с ядрышком, гомогенная цитоплазма. Размер данных клеток варьировал от 20 до 40 мкм, они делились и образовывали колонии.

Анализ иммунофенотипа культур клеток (2-3 пассаж) показал высокое содержание клеток, экспрессирующих такие белки, как CD44 и CD90 (90–95%), и низкий процент клеток, экспрессирующих CD45 (0,8-1,2%), что соответствует критериям подлинности для МСК. Культуры МСК имели стабильный иммунофенотип, высокую пролиферативную активность и жизнеспособность (более 90%).

По результатам проделанной работы разработан лабораторный протокол эксплантации жировой ткани и лабораторный протокол на выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани крупного рогатого скота с целью использования в ветеринарной медицине.

**Заключение.** На основании наших исследований, в убойном цеху во время планового убоя в условиях мясокомбината, был оптимизирован способ отбора жировой ткани у крупного рогатого скота с погружением образцов ткани в 70% спирт с целью снижения поверхностной контаминации, не повреждая центральную часть образца. По результатам микробиологического контроля в исследуемом материале отсутствовал рост микроорганизмов. Полученный биологический материал считается прошедшим контроль и является пригодным для дальнейшего использования.

Нами установлено, что из биоматериала, отобранного на мясокомбинате не позднее 30 минут после планового убоя, выделены фибробластоподобные жизнеспособные мезенхимальные стволовые клетки гомогенной популяции с высокой адгезивной способностью, образующие монослой и обладающие высокой клоногенностью и пролиферативной активностью. Преимуществом такого подхода является отсутствие вреда, причиняемого здоровым животным, что не приведет к большому числу осложнений во время получения прижизненного биоптата и позволит свести к минимуму стрессовое состояние и боль при проведении процедур по отбору биологического материала.

Полученные результаты свидетельствуют, что биоптат, полученный после убоя крупного рогатого скота в условиях мясокомбината, сохраняет высокое качество мезенхимальных стволовых клеток. В связи с этим послеубойный забор ткани является безопасным и простым в выполнении.

**Литература.** 1. Биология стволовых клеток и клеточные технологии: в 2 т. / М. А. Пальцева [и др.] ; под ред. М. А. Пальцева. – Москва : Медицина, 2009. – Т. 1. – 272 с. 2. Зуева, Е. Е. Стволовые клетки. Некоторые биологические особенности и терапевтические возможности / Е. Е. Зуева, А. В. Куртова, Л. С. Комарова // Гематология. – 2005. – Т. 6. – С. 705-724. 3. Использование мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани для лечения крупного рогатого скота с гнойно-некротическими болезнями / Н. И. Костюк [и др.] // Экология и животный мир. – 2020. – № 1. – С. 70–78. 4. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фрешни. – Москва : БИНОМ. – 2014. – С. 211-220, 444-446. 5. Методические наставления по выделению мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из тканей взрослых особей млекопитающих, изучению их свойств и признаков / И. П. Савченкова, Л. К. Эрнст, М. И. Гулюкин, Е. В. Викторова. – Москва : Спутник+, 2010. – 23 с. 6. Основы биотехники : учеб. пособие / Я. С. Яскевич [и др.] ; под ред. Я. С. Яскевич, С. Д. Денисова. – Минск : Выш. школа, 2009. – 291 с. 7. Применение мезенхимальных стволовых клеток при лечении инфицированной раны у коровы / Н. И. Костюк [и др.] // Эпизоотология. Иммунология. Фармакология. Санитария. – 2021. – № 1. – С. 27-33. 8. Получение биологического материала для выделения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток у сельскохозяйственных животных / Е. В. Викторова, И. П. Савченкова // Веткорм. – 2012. – № 4. – С. 28-29. 9. Мезен, Н. И. Стволовые клетки : учеб.-метод. пособие / Н. И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. – 2-е изд., доп. – Минск : БГМУ, 2014. – 62 с. 10. Савченкова, И. П. Перспективы использования стволовых клеток в ветеринарии / И. П. Савченкова, М. И. Гулюкин // Ветеринария. – 2011. – № 7. – С. 3-5. 11. Современные способы выделения и культивирования клеток человека и животных : учебное пособие / Т. Д. Колокольцова, И. Н. Сабурова, А. А. Кубатиев ; ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия профессионального образования». – Москва : ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016. – 50 с. 12. Тулинна, М. А. Разработка методологических основ регулирования качества клеточных продуктов : дисс. ... канд. фарм. наук : 14.04.01 / М. А. Тулина. – Москва, 2017. – 147 с. 13. Animal cell technology: basic and applied aspects / ed. by K. Funatsu [et al.]. – Boston, 2004. – V. 8. – 35 p. 14. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species / A. B. T. Hill [et al.] // Stem Cell Res. Ther. – 2019. – V. 10. – 44 p. 15. Fortier, L. A. Stem cells in veterinary medicine / L. A. Fortier, A. J. Travis // Stem Cell Res. Ther. – 2011. – V. 2. – 9 p.

Поступила в редакцию 17.09.2021.

УДК 619:617.3:636.2

#### КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ НЕКРОЗЕ КОПЫТЦЕВОЙ КОСТИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

\*Костюк Н.И., \*Ломако Ю.В., \*Кныш Н.В., \*Барсукова М.В.,  
\*\*Руколь В.М., \*\*Борисик Р.Н., \*\*Саакян А.Н., \*\*Андреева Е.Г.

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

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

*Изучена сравнительная эффективность разработанного нами метода лечения коров в комплексном лечении мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) из жировой ткани крупного рогатого скота при некрозе копытной кости. Полученные результаты клинических исследований свидетельствуют о том, что введение МСК жировой ткани в область раны способствует быстрой эпителизации и восстановлению кожных покровов. **Ключевые слова:** некроз, корова, мезенхимальные стволовые клетки, трансплантация клеток, конечности.*

#### COMPLEX TREATMENT OF CATTLE IN NECROSIS OF THE COFFEE BONE WITH USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS

\*Kostyuk N.I., \*Lamaka Y.V., \*Knysh N.V., \*Barsukova M.V.,  
\*\*Borisik R.N., \*\*Rukol V.M., \*\*Sahakyan A.N., \*\*Andreeva E.G.

\*Institute of Experimental Veterinary Medicine Named after S.N. Vyshellessky, Minsk, Republic of Belarus

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

*The comparative effectiveness of the method of treatment of cows developed by us in the complex treatment with mesenchymal stem cells (MSCs) from the adipose tissue of cattle with necrosis of the hoof bone was studied. The obtained results of clinical studies indicate that the introduction of MSCs of fatty tissue into the wound area promotes rapid epithelialization and restoration of the skin. **Keywords:** necrosis, cow, mesenchymal stem cells, cell transplantation, limbs.*

**Введение.** Регенеративная медицина в ветеринарной медицине – это новое развивающееся направление медицины, позволяющее восстанавливать нарушенные функции органов или целого организма путем стимуляции внутренних восстановительных процессов. Наиболее изученным направлением регенеративной медицины являются клеточные технологии [10, 11]. Успешная разработка методов выделения и длительного культивирования стволовых клеток (СК) открыли широкие перспективы для применения их и в ветеринарной практике [9].