

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ЖИВОТНЫХ

* П.А. КРАСОЧКО, ** Д.С. БОРИСОВЕЦ, * Л.Н. КАШПАР,
* В.В. ОВЧИННИКОВА, ** Т.А. ЗУЙКЕВИЧ

* УО «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины»
** РУП «Институт экспериментальной
ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

Abstract. The results of the estimation of the cytotoxicity of microcarriers based on modified polysaccharides on a transplanted culture of animal cells are presented. It has been established that such types of cellulose as amorphized, cotton microcrystalline, wood microcrystalline and granular hydroxyl containing negative effects on the cellular monolayer have not been established.

Key words: cellulose, microcarriers, cell culture

ВВЕДЕНИЕ

Производство вирусных препаратов включает несколько стадий. Культивирование вирусов является одной из основных стадий процесса производства препаратов. Биотехнология культивирования вирусов включает массовое выращивание клеток в культуре и является центральным звеном любого технологического процесса, основанного на использовании клеток животных, и в первую очередь производства вирусных препаратов. Стадия культивирования определяет массу и качество клеток и тем самым в целом технологию получения вирусного сырья. Выбор способа культивирования вируса в значительной мере определяется способностью клеток размножаться на поверхности плотного субстрата или в суспензионной культуре [1, 4].

Культивирование клеточных культур *на микроносителях* сочетает преимущества стационарного и суспензионного способов. Микроносители – это мелкие твердые прозрачные частицы, на которых клетки растут в форме монослоя. [2, 6]. Число различных типов микроносителей постоянно растет.

Разработка микроносителей для изготовления инактивированных вакцин и энтеросорбентов для животных, основанное на использовании возобновляемого сырья – полисахаридов позволит удовлетворить потребности рынка в высокоэффективных отечественных средствах для профилактики и лечения инфекционных заболеваний животных.

К микроносителям для культивирования культуры клеток предъявляется ряд требований таких как: небольшой положительный заряд в пределах 1,5-1,8 МЭКВ/г. В связи с тем, что большинство клеток животных имеют слабо отрицательный заряд, они легче будут прикрепляться к такому МН; плотность 1,05—1,15 г/см; указанная плотность является оптимальной для поддержания МН во взвешенном состоянии; диаметр частиц от 100 до 250 мкм, что обеспечивает площади для роста нескольких сотен клеток; гладкая поверхность; прозрачность; *отсутствие токсичности компонентов для клеток*; незначительное впитывание компонентов среды; универсальность, обеспечивающая возможность использования их для первичных, диплоидных и гетероплоидных клеток. [2, 6].

Целью наших исследований была оценка цитотоксичности микроносителей на основе модифицированных полисахаридов на культуру клеток МДБК.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в условиях отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», лаборатории катализа полимеризационных процессов Учреждения Белорусского государственного университета

Существует несколько различных методов, позволяющих оценить жизнеспособность клеточной культуры или образца ткани, применяющихся в зависимости от конкретной задачи исследования. Их можно условно разделить на следующие группы:

1. Оценка целостности морфологической структуры клеток (неспецифическая оценка жизнеспособности).
2. Оценка метаболической активности клеток.
3. Оценка пролиферативной активности.
4. Оценка функциональной активности клеток *in vitro* [2].

Изучение цитотоксичности микроносителей на основе модифицированных полисахаридов: аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы, на культуру клеток проводилось методом неспецифичной оценки жизнеспособности клеточных культур. Данный метод предполагает визуализацию и распознавание клеток после окраски их специфическими красителями, которые проникают внутрь клетки только при повреждении её оболочки. Таким образом, окрашенные клетки признаются не жизнеспособными. Результаты окрашивания оцениваются либо при помощи микроскопии и визуального подсчета доли мертвых клеток относительно общего их числа, либо с помощью проточной цитофлуориметрии. Наиболее распространенным красителем является трипановый синий, проникающий только в погибшие клетки. [5].

Для оценки цитотоксичности микроносителей на основе модифицированных полисахаридов на культуру клеток животных использованы следующие материалы и оборудование:

- термостат, обеспечивающий температуру $+37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$;
- магнитная мешалка, обеспечивающая скорость перемешивания до 100 оборотов в минуту;
- роллерная установка, обеспечивающая скорость движения до 100 оборотов в минут;
- микроскоп инвертированный;
- морозильная камера, обеспечивающая температуру $-20,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$;
- автоклав – сухожар, обеспечивающий температуру $+200,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$;
- ламинарный бокс;
- роллерные флаконы объемом 500,0 мл;
- весы настольные электронные до 1 кг;
- РН метр;
- разовые матрасы объемом 100, мл;
- культура клеток МДБК;
- питательная среда Игла МЭМ (производство НИИ им.Чумакова, Москва);
- питательная среда 199 (производство НИИ им.Чумакова, Москва);
- сыворотка крови крупного рогатого скота;
- эмбриональная сыворотка крови крупного рогатого скота;
- антибиотики (пенициллин, гентамицин, амфотерицин)
- раствор Хэнкса;
- стерильная дистиллированная вода.
- 0,2% раствор трипанового синего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении влияния аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы использовался сформированный монослой культуры клеток МДБК на матрасах объемом 100 мл. Для проведения работы использовано 13 матрасов (по 3 на каждый вид целлюлозы) и 1 - контроль. В каждый матрас

внесена аморфизованная целлюлоза, хлопковая микрокристаллическая целлюлоза, древесная микрокристаллическая целлюлоза и гранулированная гидроксилсодержащая целлюлоза до 1% конечной концентрации (по сухой массе целлюлозы). За состояние монослоя наблюдали в течение 6 суток.

В таблице 1 приведены результаты влияния различных видов целлюлозы на монослой культуры клеток МДБК.

Из таблицы видно, что аморфизованная, хлопковая микрокристаллическая, древесная микрокристаллическая и гранулированная гидроксилсодержащая целлюлозы не оказывают отрицательного действия на монослой культуры клеток МДБК в течение 6 суток наблюдения. При добавлении к клеткам 0,2% трипанового синего окрашивания клеток не выявлено, т.е. все клетки оставались в жизнеспособном состоянии.

Таблица 1. Результаты влияния различных видов целлюлозы на монослой культуры клеток МДБК

Дни наблю- дения	Вид целлюлозы			
	аморфизованная	хлопковая микрокристаллическая	древесная микрокристалл- лическая	гранулированная гидроксил- содержащая
До внесения	Монослой сформированный, без стерильных окон, клетки имеют четкую очерченность			
1 сутки	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений
2 сутки	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений
3 сутки	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений
4 сутки	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений
5 сутки	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений
6 сутки	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений	Монослой без изменений

ВЫВОДЫ

Отрицательных последствий влияния аморфизованной целлюлозы, хлопковой микрокристаллической целлюлозы, древесной микрокристаллической целлюлозы и гранулированной гидроксилсодержащей целлюлозы на клеточный монослой не установлено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных : разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко [и др.]; под ред. Н. А. Ковалева. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 492 с.
2. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л.П. Дьяконова. - М. : «Спутник+», 2009. – 656 с.
3. Красочко, П. А. Анализ современных способов накопления вируса бешенства для изготовления антирабических вакцин / П. А. Красочко [и др.] // Ученые записки учреждения образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины": научно-практический журнал. - Витебск, 2017. - Т. 53, вып. 3. - С. 41-47.
4. Красочко, П. А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23 / П. А. Красочко ; ФГУ ВНИТИБП РАСХН. – Щелково, 2009. – 46с.
5. Митрошина, Е. В. Определение жизнеспособности клеточных культур: Учебно-методическое пособие. Е. В. Митрошина, Т. А. Мищенко, М. В. Ведунова– Нижний

Новгород: Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского, 2015. - 21 с.

6. Решетникова О. В. Биотехнология культивирования вирусов (статья). Материалы всероссийской науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы теории и практики современной биотехнологии» 15 сентября 2015 . - СПб.: ЛГУ им А. С. Пушкина, 2015.- С.155-161.

УДК: 619:616.98:578.831.31:636.2.053

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ТЕЛЯТ ПРИ ЭНТЕРИТАХ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА «АРГОБИФИЛАК»

П.А. КРАСОЧКО, М.А. ПОНАСЬКОВ, В.А. МАШЕРО

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

Abstract. The results of the study of the microbiocenosis of the gastrointestinal tract of calves in the enteritis of the viral-bacterial etiology are presented after the application of the complex probiotic preparation "Argobifilac". The positive effect of the complex probiotic preparation "Argobifolac" on the parameters of the microbiocenosis of the gastrointestinal tract of calves was revealed and promoted the rapid recovery of the calves.

Key words: calves, enteritis, complex probiotic preparation, microbiocenosis.

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее острой проблемой молочного скотоводства являются желудочно-кишечные болезни молодняка.

В этиологии желудочно-кишечных болезней телят из вирусных антигенов принимают участие корона-, рота-, парво- энтеровирус, возбудители вирусной диареи – болезни слизистых и другие [1, 2, 5, 6]. Из бактериальных инфекций стоит выделить представителей родов энтеробактер, протеус, иерсиния, псевдомонас, клебсиелла, морганелла и другие [2,3].

В последние годы большое внимание медицинские и ветеринарные исследователи уделяют вопросу формирования нормального микробиоценоза желудочно-кишечного тракта, что связано с расширяющимися знаниями о его многогранных влияниях на физиологические функции организма [3, 9].

Условно-патогенная микрофлора проявляет свое отрицательное влияние на организм при воздействии различных предрасполагающих факторов: несвоевременное выпаивание новорожденным молозива, нарушение зоогигиенических и ветеринарно-санитарных правил содержания животных, стресс, несбалансированное кормление, повышенная обсемененность кормов, резкая смена рационов, иммунодефицитное состояние, нерациональное применение ветеринарных препаратов, нарушение общей экологической обстановки и др.

Возникновение желудочно-кишечных болезней, их тяжесть, длительность течения и исход зависят от состояния организма, уровня его резистентности и условий содержания [4, 10, 12].

Особенно критичным периодом в возникновении желудочно-кишечной патологии являются первые 7-10 дней жизни новорожденного, когда ему приходится сталкиваться с огромным количеством факторов, способных препятствовать нормальному формированию его микрoэкологического статуса, который в свою очередь выполняет роль защитного неспецифического барьера, вступающего в борьбу с патогенной и условно-патогенной микрофлорой ещё до начала работы других неспецифических и специфических механизмов защиты [2, 4, 12]. В этой связи для нормализации микробиоценоза здоровых и переболевших телят часто используют пробиотические препараты [2, 8].

Цель работы. Целью наших исследований было изучение терапевтического влияния комплексного пробиотического препарата «Аргобифилак» на состояние микробиоценоза