

флакона препятствовала прикреплению клеток к поверхности стекла. На поверхности микроносителя был частично сформирован монослой клеток МДБК. Концентрация клеток микроносителя составила 900-100 тыс. клеток в 1 мл.

При проведении выращивания клеток на матрасах помещенных на платформу шуттель-аппарата с перемешивание платформы из расчета 1-2 оборота в минуту, происходило приращение клеток к целлюлозе, а движение платформы шуттель аппарата способствовало нахождению целлюлозы в ресуспензированном состоянии. При этом монослой был сформирован как на поверхности матраса, так и на микроносителе. В данном опыте использована аморфизованная целлюлоза, имеющая плотность 0,97-1,0.

**Заключение.** Изучены адгезивные свойства микроносителей на основе модифицированных полисахаридов. В результате исследований сделаны выводы что выращивание клеток на матрасах помещенных на платформу шуттель-аппарата и концентрация микроносителя от 1до 3% способствует приращению клеток к целлюлозе и формированию монослоя клеток как на поверхности матраса, так и на микроносителе.

**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. Биология вирусов животных / Ф. Феннер [и др.]. – Москва : Мир, 1977. – Т. 1. – 447 с. 3. Блажевич, О. В. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич. – Минск : БГУ, 2004. – 78 с. 4. Дитченко, Т. И. Культура клеток, тканей и органов растений : методические рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007. – 46 с. 5. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. - Москва : «Спутник+», 2009. – 656 с. 6. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под общ. ред. проф. Л. П. Дьяконова. – Москва : «Спутник+», 2009. – 656 с. 7. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток / Р. Я. Фрешни. – Москва : БИНОМ. Лаборатории знаний, 2010. – 714 с. 8. Van Wezel A.L. "Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous cultures.", *Nature*, 1967, 216: 64-65

## **ХАРАКТЕР ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКИСЛЕННОГО ГРАФЕНА НА МОРФО-ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ**

**КОРОЧКИН Р.Б., КРАСОЧКО П.А., ПОНАСЬКОВ М.А.**

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

*За последние 50 лет исследователи материалов активно изучают вопрос использования наночастиц и наноструктурированных материалов в различных секторах биомедицины и ветеринарии. Термин «наночастица» обычно применим к мельчайшим частицам какого-то вещества, имеющим физический размер от 1 до 100 нм. В медицине и ветеринарии в последнее время находят применение наночастицы аллотропных форм углерода, в частности графена. Они обладают широким арсеналом биомодулирующих воздействий на организм. К числу положительных сторон следует отнести их антибактериальное действие. В данной статье авторы провели оценку цитотоксического действия наночастиц окисленного графена на различные типы микроорганизмов по результатам микроскопического исследования. **Ключевые слова:** наночастицы, окисленный графен, световая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, бактериальная морфология.*

## **THE NATURE OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF OXIDIZED GRAPHENE NANOPARTICLES ON MORPHO-TINCTORIAL PROPERTIES OF BACTERIA**

**KOROCHKIN R.B., KRASOCHKO P.A., PONASKOV M.A.**

Vitebsk State Academy Of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*Over the past 50 years, materials researchers have been actively studying the use of nanoparticles and nanostructured materials in various sectors of biomedicine and veterinary medicine. The term "nanoparticle" is usually applied to the smallest particles of some substance having a physical size (diameter) from 1 to 100 nm. In medicine and veterinary medicine, nanoparticles of allotropic forms of carbon, in particular graphene, have recently found application. They have a wide arsenal of biomodulating effects on the body. Among the positive*

aspects should be attributed to their antibacterial action. In this article, the authors evaluated the cytotoxic effect of oxidized graphene nanoparticles on various types of microorganisms based on the results of microscopic examination. **Keywords:** nanoparticles, graphene oxide, light microscopy, atomic force microscopy, bacterial morphology

**Введение.** Нанотехнология стал причиной новой технологической революции в науке. В сельском хозяйстве она позволила решить проблемы, связанные с защитой растений, их выращиванием и устойчивостью к пестицидам. В медицине нановещества нашли широкое применение в качестве антибактериальных веществ [1, 2]. С другой стороны, многие стороны возможного отрицательного воздействия наноматериалов на организм животных, в отношении которых предполагается применение лекарственных веществ на основе наночастиц, изучены не достаточно.

Наноразмерные формы углерода позволяют найти компромисс между высокой антибактериальной активностью и низким организмотоксическим воздействием. Из их числа окисленный графен считается одним из многообещающих материалов в биомедицинских исследованиях. В частности, он известен как антимикробный наноконпонент с удовлетворительной биосовместимостью и наноматериал с приемлемыми свойствами, ценными для биомедицинского применения [3].

**Целью исследований** явилось изучение влияния наночастиц окисленного графена на бактериальные клетки основных представителей условно-патогенной микробиоты (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) с использованием атомно-силовой и классической световой микроскопии.

**Материалы и методы исследований.** В качестве тестового наноматериала с предполагаемым цитотоксическим действием нами был использован образец коллоидного раствора окисленного графена со стабильными физико-химическими параметрами. Исходная концентрация наночастиц в образце составляла 600 мкг/мл, средний диаметр наночастиц находился в пределах 100–120 нм. Исследуемыми микроорганизмами служили 18-ти часовые бактериальные культуры двух микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Тестовые микроорганизмы культивировали в бульоне Мюллера-Хинтона. Параллельно проводили культивирование микроорганизмов на одноименном агаре с добавлением наночастиц окисленного графена, внесенных в вырубленные в толще агара лунки.

На границе зоны ингибиции роста отбирали бактериальные культуры для микроскопического исследования в двух вариантах: путем классической световой микроскопии с окраской по Граму и атомно-силовой микроскопией (после дополнительного контакта с наночастицами).

**Результаты исследований.** Отбор бактериальной культуры проводили на границе зоны ингибиции роста бактерий, где ожидалась параингибирующая концентрация наночастиц. В качестве контроля отбирали колонии микроорганизмов на одноименной среде без добавления наночастиц.

Сравнение морфо-тинкториальных характеристик культур микроорганизмов позволило оценить характер цитотоксического действия наночастиц субингибирующей концентрации окисленного графена.

При световой микроскопии микропрепаратов отмечали сохранение типичных морфологических свойств *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* (короткие палочки и кокки, соответственно). Тем не менее, при окраске по Граму отмечали необычный феномен тинкториальной трансверсии культуры стафилококка, при которой он частично менял свою принадлежность с грамположительной на грамотрицательную. Данный феномен имел кластерный характер, но отмечался только в микропрепаратах культур, отобранных на границе зоны ингибирования роста бактерий, где ожидалась паралетальная концентрация наночастиц. В культуре кишечной палочки подобного феномена не отмечалась, однако данный микроорганизм принадлежит к числу грамотрицательных.

В связи с тем, что грампринадлежность определяется структурой бактериальной клеточной стенки, а именно содержанием в ней пептидогликана, можно предположить, что наночастицы окисленного графена оказывают токсическое воздействие на внешние оболочки микроорганизма, а его сублетальные концентрации существенно нарушают ее состав.

Атомно-силовая микроскопия позволила визуально оценить характер морфологических изменений в бактериальных клетках и всей бактериальной популяции в целом, обусловленных токсическим действием наночастиц окисленного графена. Контрольные образцы бактериальных культур при АСМ визуально соответствовали типичной морфологии и размерам тестовых микроорганизмов.

В микропрепаратах бактериальных культур, как изолированно обработанных наночастицами окисленного графена, так и отобранных на границе ингибиции роста, отмечались морфологические изменения самих бактериальных клеток и композиции всей микробной культуры. Характер изменений в целом был одинаков, и их наличие выявлялось спустя 30 минут после обработки наночастицами окисленного графена. Первоначальные изменения характеризовались нарушением контуров бактериальных клеток по сравнению с контрольными образцами: была резко снижена выраженность очертаний бактериальных клеток, межклеточное пространство было уменьшено, контуры сканируемых

объектов теряли свою пространственную контрастность, отмечался частичный выход цитоплазмы за пределы бактериальных клеток.

#### **Заключение:**

1. Наночастицы окисленного графена имеют антибактериальные свойства, которые проявляются очевидными цитотоксическими эффектами в отношении прокариотических клеток.

2. При действии токсических концентраций наночастиц окисленного графена на отдельные грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) отмечается тинкториальная трансверсия с изменением их грампринадлежности, что указывает на возможное токсическое действие на структуру или состав бактериальной клеточной стенки.

3. Действие токсических концентраций наночастиц окисленного графена в течение 30 минут на основные типы бактерий (кокки, палочки) сопровождается морфологической деградацией клеток.

#### **Литература**

1. Красочко, П. А. Определение минимальной ингибирующей и бактерицидной концентрации нано- и коллоидных частиц серебра / П. А. Красочко, Р. Б. Корочкин, М. А. Понаськов // Ветеринарный журнал Беларуси. – Витебск, 2019. – №2(11). – С. 46–50

2. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания : монография / А. А. Шевченко [и др.] ; Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – 484 с.

3. Сравнительная оценка антибактериальной активности антибиотиков и наночастиц диффузионным методом / П.А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2019. – №1(12). – С. 51-56.

4. Graphene oxide functionalization via epoxide ring opening in bioconjugation compatible conditions / B. Ranishenka, E. Ulashchik, M. Tatulchenkov, O. Sharko, N. Dremova, A. Panarin, V. Shmanai // FlatChem. – 2021. – Vol. 27. – P. 100235.

### **ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ ВНК-21 cl-13 ИЗ РАБОЧЕГО БАНКА**

**КОСТЮК Н.И., СТРЕЛЬЧЕНЯ И.И, ВАСИЛЬКОВА М.В., КАЗАКОВА Е.Ф., БУРКО А.А.**

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

*Установлено, что после размораживания производственной линии ВНК-21 clone 13 (почка сирийского хомячка) из рабочего банка с посевной концентрацией  $3,5 \times 10^6$  при роллерном культивировании клетки были жизнеспособными и характеризовались высокой адгезией, интенсивным восстановлением и высокой пролиферацией с сохранением типичной для данной культуры фибробластоподобной морфологией. Индекс жизнеспособности при культивировании клеток составил 98%. Культура клеток сохранила свои биологические свойства после разморозки, при роллерном культивировании, соответствовала предъявляемым требованиям и может быть использована для наращивания вирусной массы с целью получения вакцинных препаратов для профилактики вирусных заболеваний животных.*

**Ключевые слова:** клеточная линия, роллеры, морфология, адгезия, культивирование, пассаж, пролиферация.

### **RESTORATION OF THE PRODUCTION CELL TRANSFERABLE LINE ВНК-21 cl-13 FROM THE WORKING BANK**

**KOSTYUK N.I., STRALCHENYA I.I., VASILKOVA M.V., KAZAKOVA E.F., BURKO A.A.**

RUE "S. N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine", Minsk, Republic of Belarus

*It was found that after defrosting of the ВНК-21 clone 13 production line (Syrian hamster kidney) from a working bank with a seed concentration of  $3.5 \times 10^6$  during roller cultivation, the cells were viable and characterized by high adhesion, intensive recovery and high proliferation while maintaining the fibroblast-like morphology typical for this culture. The viability index during cell culture was 98%. The cell culture retained its biological properties after defrosting, during roller cultivation, met the requirements and can be used to increase*