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 возможный 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 BHK-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 BHK-21 clone 13 (почка сирийского хомячка) из рабочего банка с посевной концентрацией 3,5 x10^{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 BHK-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. Vyshelessky Institute of Experimental Veterinary Medicine", Minsk, Republic of Belarus

It was found that after defrosting of the BHK-21 clone 13 production line (Syrian hamster kidney) from a working bank with a seed concentration of 3.5 x106 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

the viral mass in order to obtain vaccine preparations for the prevention of viral diseases of animals.
Keywords: *cell line, rollers, morphology, adhesion, cultivation, passage, proliferation*

Введение. Развитие наиболее перспективных современных направлений фундаментальных и прикладных исследований в области биологии, медицины и ветеринарной медицины, а также создания новых технологий невозможно без широкого использования культур клеток человека, животных и растений [1].

Благодаря доступности и высокой эффективности клеточные культуры прочно заняли ведущее место в ветеринарных вирусологических исследованиях, а также в производстве противовирусных вакцин и биопрепаратов. Не менее важную роль метод культур клеток играет в диагностике вирусных инфекций, выделении вирусов и их идентификации. Они не только дают возможность расширить диагностику, но и значительно упростить ее. Кроме того, использование перевиваемых клеточных линий позволяет почти полностью исключить из экспериментов дорогостоящих лабораторных и сельскохозяйственных животных, используемых в вирусологических исследованиях [1].

В последние годы перевиваемые клеточные культуры широко используются для производства в большом количестве вируссодержащего материала, что позволяет создавать эффективные и экономически выгодные противовирусные вакцины, против таких заболеваний, как ящур, классическая чума свиней, бешенство, оспа овец, инфекционный ринотрахеид, парагрипп-3, вирусная диарея крупного рогатого скота и других заболеваний сельскохозяйственных животных. Таким, образом, эпизоотическое состояние отечественного животноводства во многом зависит от внедрения клеточных культур в практику ветеринарии. [1]

При производстве ВИБП к перевиваемым клеткам должны предъявляться определенные требования. Критерии оценки перевиваемых линий основаны на современной технологии, обеспечивающей высокую степень очистки готового продукта от посторонних агентов, так как с биопрепаратами в организм сельскохозяйственных животных могут поступать значительные количества веществ, опасных для их здоровья. Поэтому на получении и выращивании качественных перевиваемых линий особенно заостряется внимание производителей вакцинных препаратов [3].

Усилия специалистов должны быть направлены на то, чтобы процессы замораживания – хранения – оттаивания не приводили к гибели, механическому повреждению и, что не менее важно утрате клетками основных функциональных свойств (при воздействии низких температур, обменные процессы, происходящие в клетке, практически полностью останавливаются). В процессе замораживания из внутриклеточной воды образуются кристаллы льда, которые своими острыми гранями повреждают внутриклеточные мембраны. Когда возникает необходимость, клетки размораживают и пересевают в относительно высокой концентрации для более быстрого восстановления культуры [4]. Ампулы должны быть разморожены так быстро, как это возможно, для того чтобы минимизировать внутриклеточные повреждения, вызванные появлением кристаллов льда в ходе процесса нагревания. Одной из основных задач при этом является сохранение максимальной жизнеспособности производственной клеточной культуры, применяемой в качестве субстратов для производства и контроля качества вирусных вакцин для ветеринарного применения [2]. Перевиваемая клеточная линия ВНК - 21 clone 13 наиболее часто и широко применяется во всем мире для производства иммунобиологических препаратов, в научно-исследовательской работе и для диагностики вирусных инфекций [1].

Цель работы – разработать параметры восстановления производственной перевиваемой линии клеток ВНК-21 clone 13 из рабочего банка для роллерного культивирования с целью производства ВИБП.

Материалы и методы. Работа выполнена в отделе культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Нами было изучено восстановление производственной клеточной линии ВНК-21 clone 13 из рабочего банка, которая хранилась при температуре $-86^0 \pm 1^0$ С в течении 12 месяцев и использовалась в качестве субстрата для производства и контроля качества ветеринарных биопрепаратов. Проводили размораживание клеточной суспензии из криопробирки с концентрацией клеток $3{,}5 \times 10^6$кл/мл. С этой целью клеточную суспензию подогревали на водяной бане с температурой $+40^0 \pm 1^0$ С в течение 1 минуты, затем медленно вносили ростовую питательную среду, постоянно перемешивая, длительность этого процесса занимала 5-7 минут.

Клеточную суспензию рассевали в стеклянные роллеры объёмом 3000 см^3 с добавлением ростовой питательной среды ФГМ-С:ДМЕМ 3:1, содержащую 10% сыворотки КРС и антибиотиков (стрептомицина сульфата и бензилпенициллина натриевой соли по 100 ед/мл). Затем, отбирали пробу клеток с целью определения концентрации сохранившихся клеток, для чего в суспензию добавляли равный объём 0,2 % трипанового синего, окрашивающего мертвые клетки в синий цвет. Окрашенную суспензию заправляли в счётную камеру Горяева. После определения жизнеспособности клеток, роллеры с внесённой культурой

клеток помещали в термальную комнату на роллерную установку «Weaton» со скоростью вращения 0,5 об/мин. Культивирование проводили при температуре +37±0,5°С.

Смену среды проводили через 24 часа, с целью удаления криоконсерванта (ДМСО), так как центрифугирование после размораживания не проводили. Во время исследований определяли начальную адгезию перевиваемой линии ВНК к поверхности субстрата, скорость и качество формирования монослоя на 1,3 и 5 сутки оценивали визуально с помощью инвентированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 в фазовом контрасте (объектив 10Х).

Результаты исследований. При просмотре культуральных роллеров под микроскопом спустя 4 часа наблюдали прикрепление и распластание клеток по субстрату, их вступление в фазу активного деления, и что свидетельствовало о высокой адгезивной способности клеток к поверхности роллера. Клетки имели типичную фибробластоподобную форму (рисунок 1). При просмотре культуральных роллеров под микроскопом установлено, что конфлюэнтность монослоя составила 33%.

На 3-е сутки наблюдалось экспоненциальное нарастание количества клеток (рисунок 2).

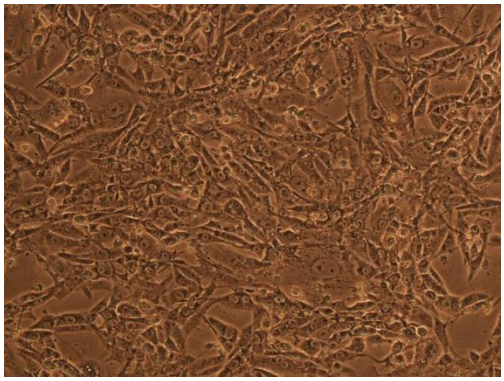

Рисунок 1 – Перевиваемая культура клеток ВНК-21 clone 13. Клеточный монослой через 24 ч культивирования. Объектив. 10Х

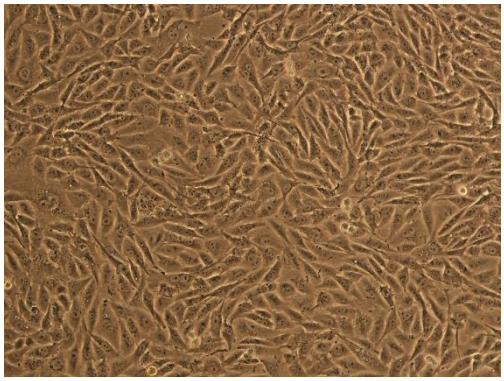

Рисунок 2 – Перевиваемая культура клеток ВНК-21 clone 13. Клеточный монослой на 3-е сутки культивирования. Объектив. 10Х

На 5-е сутки наблюдали конфлюэнтный монослой, вся поверхность оказалась занята клетками, которые контактировали друг с другом (рисунок 3).

Рисунок 3 – Перевиваемая культура клеток ВНК-21 clone 13. Клеточный монослой на 5-е сутки культивирования. Объектив. 10Х

Рисунок 4 – Конфлюэнтный монослой, растущий в культуральном роллере (5-е сутки).

При просмотре культуральных роллеров под микроскопом на 1-е, 3-е и 5-е сутки наблюдали фибробластоподобные клетки, имеющие мультиполярную форму, с ядром овальной формы без вакуолизации и грануляции. В культуральной среде во взвешенном состоянии наблюдались единичные

клетки шаровидной формы. На 5-е сутки клеточный монослой составлял 100% и количество клеток в культуре достигло насыщения (конечная плотность клеток). Клетки имели биполярную форму и были менее распластаны с образованием характерных решеток и завитков, при этом скорость роста культуры клеток ВНК-21 clone 13 замедлилась. Культивируемые клетки полностью покрывали поверхность культурального флакона (рисунок 4).

Для оценки стабильности клеточного субстрата при его культивировании нами было проведено 10 последовательных пассажей, в результате которых установили, что клетки имели жизнеспособность 95-98% и кратность прироста 1:38, что обеспечивало постоянство производства требуемого продукта.

Заключение. В процессе выращивания восстановленной после криоконсервации клеточной линии ВНК-21 cl-13 на роллерах было установлено, что клетки имели типичную морфологию и сохраняли стабильность биологических свойств в течение всего срока культивирования.

Установлено, что производственная клеточная линия ВНК-21 clone 13 быстро восстанавливается после криоконсервирования с посевной концентрацией клеток $3{,}5 \times 10^6$ и имеет кратность прироста 1:38, а жизнеспособность клеток составляет 95-98% при роллерном культивировании. Это позволяет использовать клеточную линию ВНК-21 clone 13 для накопления вирусной массы с целью получения ветеринарных иммунобиологических препаратов.

Литература.

1. Блажевич, О.В. Культивирование клеток Курс лекций / О.В. Блажевич – Мн.: БГУ. – 2004. – 78 с.

2. Горохова, Н.А. Кріоконсервування культивованих фібробластоподібних клітин шляхом повільного заморожування і вітрифікації: автореф. дис. канд. біол. наук. 03.00.19/ Н.А. Горохова, ИПКиК НАНУ. – 2005. – 26 с.

3. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешн. – пер. 5-го англ. изд.– М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2014. – 691с.

4. Фуллер, Б. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия / Б. Фуллер, К. Грин, В.И. Грищенко. // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 2. – С. 62–83.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ - ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АКТИВАТОРЫ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

[1]КРАСОЧКО И.А., [1]ЧАЙКОВСКИЙ Н.А., [2]ПОПОВА П.Ю., [1]ОВЧИННИКОВА В.В., [2]БЫЧКОВА Т.К., [1]ВОЛОСЮК Е.И.

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

[2]ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия», г. Смоленск, Российская Федерация

Приведены результаты анализа литературных данных по источникам, получению, механизму действия на иммунитет и применению бактериальных липополисахаридов. Показано, что полные молекулы ЛПС (т.н. S-форма) состоят из трех компонентов, различающихся по структуре и биологическим функциям: липидной части (липида А), полисахаридной цепи (О-специфическая цепь, О-полисахарид) и расположенного между ними олигосахарида – кора (лат. core – ядро). Липополисахариды стимулируют многие защитные реакции организма: увеличивают количество лейкоцитов и их фагоцитарную активность, повышают активность системы комплемента, резистентность клеточных и субклеточных мембран к действию повреждающих агентов. Под влиянием ЛПС макрофаги, полиморфно-ядерные нейтрофилы и другие клетки продуцируют интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6), простагландины, оксид азота (NO), кислородные радикалы и др.

Ключевые слова: *бактериальные липополисахариды, иммунитет, стимуляция, резистентность, поствакцинальный иммунитет.*

BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES ARE POLYCLONAL ACTIVATORS OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY

[1]KRASOCHKO I.A., [1]TCHAIKOVSKY N.A., [2]POPOVA P.YU., [1]OVCHINNIKOVA V.V., [2]BYCHKOVA T.K., [1]VOLOSYUK E.I.