

3. Samantha J. L., Duchatel F., Digard P. A. Brief history of bird flu // *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2019. V. 5, № 16. P. 374.

4. Pereira H. G. Tumova B., Webster R. G. Antigenic Relationship between Influenza A Viruses of Human and Avian Origins // *Nature*. 1967. V. 215, № 5104. P. 982-983.

5. Webster R., Walker E. Influenza: The world is teetering on the edge of a pandemic that could kill a large fraction of the human population // *American Scientist*. 2003. V. 91, № 2. P. 122-129.

УДК 619:579

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК МДСК С ПОСЛЕДУЮЩИМ ИХ ВОСТАНОВЛЕНИЕМ ИЗ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Кулешов Д.Б. Большаков С.А.

ОАО «БелВитунифарм», г. Витебск, Республика Беларусь

Аннотация. В статье представлены результаты исследований, проведенных с целью оптимизации режимов криоконсервирования и восстановления из глубокой заморозки (-196°C) клеток МДСК. Клетки выращивали в 1,5 – литровых матрасах на питательной среде Игла (МЭМ) с 10% сыворотки крупного рогатого скота.

Ключевые слова. Криоконсервирование, монослой, надосадок, криосреды.

CRYOPRESERVATION OF TRANSPLANTED MDSC CELLS WITH THEIR SUBSEQUENT RECOVERY FROM DEEP FREEZING

Kuleshov D.B., Bolshakov S.A.

JSC "BelVitunifarm", Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. The article presents the results of studies conducted to optimize cryopreservation and recovery modes from deep freezing (-196°C) of MDSC cells. The cells were grown in 1.5-liter mattresses on an Iгла (MEM) nutrient medium with 10% bovine serum.

Keywords. Cryopreservation, monolayer, superimposition, cryomediation.

Введение. Широкий спектр клеток, имеющих биологическое, медицинское и ветеринарное значение, можно криоконсервировать при

температуре -196°C и хранить в течение многих лет в стабильном состоянии. В большинстве случаев клетки выживают при замораживании только в том случае, если в клеточную суспензию вносят криопротектор (глицерин, диметилсульфоксид и др.), который защищает клетки от повреждения при замораживании.

Материалы и методы. Криопротектор играет ключевую роль при хранении клеток при низких температурах и их восстановлении после заморозки с высоким уровнем сохранности. Первые успехи в криоконсервации были обнаружены случайно благодаря способности глицерина защищать клетки от повреждения замораживанием. За много лет, прошедших с момента установления криопротекторного эффекта глицерина, хранение клеток путем криоконсервирования стало обычным делом во многих областях медицинской и ветеринарной биотехнологии. Выживаемость при замораживании клеток зависит от способности клеток выдерживать различные нагрузки, вызванные физическими и физико-химическими изменениями, происходящими в среде, содержащей криопротектор при замораживании до температуры хранения. Однако следует иметь в виду, что выживаемость клеток зависит также от скорости охлаждения, разморозки и освобождения от криопротектора. Поэтому, при разработке метода криоконсервации клеток важным этапом является скорость и время их поэтапного охлаждения. Криопротекторы оказывают пагубное токсическое и осмотическое воздействие на клетки, поэтому после разморозки клеток и внесения их в питательную среду, важно освободиться от криопротектора, так как это может иметь решающее значение для восстановления клеток.

Основная часть. В данной работе представлены результаты исследований, проведенных с целью оптимизации режимов криоконсервирования и восстановления из глубокой заморозки (-196°C) клеток МДСК. Клетки выращивали в 1,5 – литровых матрасах на питательной среде Игла (МЭМ) с 10% сыворотки крупного рогатого скота. Сформировавшийся клеточный монослой снимали бесцентрифужным способом. Из матрасов сливали питательную среду, ополаскивали раствором Хенкса или забуференным физиологическим раствором (ЗФР). Следует отметить, что ЗФР лучше отмывает клеточный монолой от остатков сыворотки и способствует более быстрому снятию клеток со стекла. ЗФР не содержит в своём составе Са и Mg, тормозящих работу трипсина. Далее клетки в течении 1-2 минут отмывали тёплым (37°C) диспергирующим раствором, состоящем из версена и трипсина, в соотношении 9:1 осторожно покачивая матрас. Затем полностью сливают и помещают матрасы термальную комнату на 10-15 минут. После полного округления клеток в матрасы вносим по 50мл. питательной среды с 10% сыворотки и встряхиванием

снимали клетки со стекла. К клеткам добавляли 50-100мл среды Хенкса и центрифугировали в течении 6-7 минут при 1000 об/мин. Такой режим центрифугирования снижал сдавливание клеток при образовании осадка и позволял освободиться от клеточного детрита. Надосадоk сливали, а к клеткам добавляли готовую среду, состоящую из 10% диметилсульфоксида (ДМСО), 40% питательной среды и 50% эмбриональной сыворотки с последующим осторожным пипетированием до полного устранения конгломератов. Затем их переносили в криопробирки до 10 млн. клеток в 1мл криосреды, до 150 млн. в 2мл криосреды. Важно чтобы объём клеточной массы не превышал 50% в криосреде. Криопробирки с клетками выдерживают 15-20 мин при комнатной температуре (22-24°C), затем криопробирки переносят в холодильник на +4С и выдерживают 40 мин с концентрацией клеток 10 млн., 1,5 часа с концентрацией клеток до 50 млн. и 2 часа с концентрацией клеток свыше 50 млн. После этого криопробирки с клетками помещают в коробку из пенопласта и переносят в низкотемпературный холодильник с температурой минус 70-85°C. После недельной заморозки криопробирки переносят в сосуд дюара с азотом (-196°C).

При разморозке криопробирки с криоконсервированными клетками извлекали из сосуда с азотом и оттаивали, погружая и в водяную баню с температурой 37°C периодически встряхивая до тех пор, пока суспензия полностью не оттаивала. После оттаивания клетки осторожно пипетируют для поднятия осадка после чего переносят в 50мл флакон, где осторожным пипетированием разбивают клеточные конгломераты и затем переносят в матрасы с питательной средой.

Экспериментально установлено, что клетки МДСК хранившиеся в течении 2-х лет в жидком азоте, сохраняли на 98 -100% жизнеспособность и не утратили чувствительность к вирусу ВГП гриппа птиц.

Заключение. Полученные данные показывают, что перевиваемые клетки МДСК с криопротектором (диметилсульфоксидом) можно в течении длительного времени хранить в жидком азоте (-196°C) без потери жизнеспособности и чувствительности к вирусу гриппа.

Список использованной литературы

- 1. Технологический процесс криоконсервации перевиваемых клеточных линий. Методические рекомендации. М, 2009, 15 с.*
- 2. Михайлова Г.Р., Подчерняева Р.Я., Мазуркова Н.А., Лопатина О.А., Фирсова Е.Л. Сравнительное изучение кариологических характеристик клеток Vero(B), восстановленных в различных питательных средах после длительной криоконсервации. Информационный бюллетень «Клеточные культуры», Санкт-Петербург, 2013, 29: 79—85.*

3. Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Firsova E.L., Gushhina E.A. Effect of singlewalled carbon nanotubes on the biological properties of the cell cultures of human embryonic fibroblasts. 3rd International Scientific and Practical Conference «Science and Society» ISPC 2013,3:175—184.

УДК 619:615.371

ПОДБОР АДЬЮВАНТОВ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ПАСТЕРЕЛЛЕЗОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Красочко П.А., Красочко П.П., Иващенко И.А., Понаськов М.А.

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

***Аннотация.** В статье приведены результаты исследования по подбору оптимальных адьювантов при конструировании поливалентной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и пастереллезов крупного рогатого скота на лабораторных животных. Установлено, что при разработке вакцины против вирусно-бактериальных инфекций молодняка крупного рогатого скота, более высокие показатели иммуногенности, отражающие стимулирование гуморального иммунного ответа, были получены при применении масляных депонирующих веществ Монтаниды ИЗА 61 (Montanidae, Seppic, Франция) в концентрации 15%.*

***Ключевые слова:** морские свинки, адьювант, респираторные инфекции, вакцина, инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, рекомбинантный белок, респираторно-синцитиальный вирус, пастерелла.*

SELECTION OF ADJUVANTS IN THE DESIGN OF VACCINES AGAINST VIRAL RESPIRATORY INFECTIONS AND BOVINE PASTEURILLOSIS ON LABORATORY ANIMALS

Krasochko P.A., Ivashchenko I.A., Ponaskov M.A.

EE “Vitebsk order “Badge of Honor”

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