

REFERENCES

1. Zviereva, G.V., Yablonskiy, V.A., & Kosenko, M.V. (2001). *Rekomendatsii z profilaktyky neplidnosti khudobu [Recommendations prevention of infertility cattle]*. Kyiv: Naukovyi svit [in Russian].
2. Kaplinskiy, V.V. (2000). Reproduktyvna funktsiia ta rezystentnist do akusherskoi i hinekologichnoi patolohii koriv u zvyazku z polimorfizmom bilkiv syrovatky krovi [Reproductive function and resistance to obstetric and gynecological pathology of cattle due to polymorphism of serum proteins]. *Extended abstract of candidate's thesis*. Lviv [in Russian].
3. Kharuta, H.H. (1995). Klinichni ta laboratorni metody prohnozuvania vidtvornoї funktsii koriv [Clinical and laboratory methods for predicting reproductive function of cows]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Lviv [in Russian].
4. Levchenko, V.I., Sokoliuk, V.M., & Bezukh, V.M. et al. (2002). *Doslidzhenia krovi tvaryn ta klinichna interpretatsii otrymanykh rezultativ [Research the blood of animals and clinical interpretation of the results]*. Bila Tserkva [in Russian].
5. Kondrakhin, A.P., Arkhipov, V.I., & Levchenko V.I. et al. (2004). *Metody Veterinarnoi klinicheskoi laboratornoi diahnostiki [Methods veterinary klynycal laboratory diagnosis]* A.P. Kondrakhin, (Ed.) . Moskva: Kolos [in Russian].
6. Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., & Ratych, I.B. et al. (2012). *Laboratorni metody doslidzhen u biologii, tvarynytstvi ta veterynarnii medytsyni [Laboratory and methods of research in biology, veterinary medicine]* V.V. Vlizlo (Ed). Lviv: SPOLOM [in Russian].
7. Kalter, R.J., Scidmore, A.L., Ferguson, J.D., & Sniffen, C.J. (1990). Development of an expert system for management of dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 73, 162.
8. Lakin, H.F. (1990). *Biometriia [Biometric]*. Moskva: Vysshaia shkola [in Russian].

УДК 636.09:578.4:57.085.23

КЛЕСТОВА З.С., д-р. вет. наук., ст.наук.сп., e-mail: zklestova@yandex.ua

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

САВІНОВА І.В.

Референс-лабораторія UBI

ГОДОВСЬКИЙ О.В., канд. вет. наук., ст. наук. сп.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

**НОВІ БІОЛОГІЧНІ СИСТЕМИ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ
ВІРУСІВ – ПОТЕНЦІЙНИХ ЗБУДНИКІВ ІНФЕКЦІЙНИХ
ЗАХВОРЮВАНЬ ТВАРИН**

*Автори статті започаткували нові дослідження з розширення вивчення екології вірусів, розповсюджених серед дикої фауни, що є елементом у зміцненні системи біобезпеки держави. Відпрацьовані методи отримання первинних культур клітин та створені нові лінії культур клітин холоднокровних тварин, які потенційно придатні для культивування вірусів, визначення шляхів розповсюдження інфекційних хвороб та слугувати моделями для біологічних експериментів. Визначено оптимальну температуру культивування клітин для деяких видів клітин холоднокровних тварин та склад поживного середовища для їх підтримання. Наведені дані відносно особливостей росту культур клітин черепахи червоноухої (*Trachemys scripta elegans*) та двох видів червононогих молюсків ампулярії (*Potamocorbula asinaria*) та равлика виноградного (*Helix pomatia*) за різних режимів*

культивування. Надана оцінка можливостей застосування поживних середовищ різного складу для вирощування культури клітин рептилій та молюсків наведено короткий опис морфологічних особливостей отриманих культур. Зроблено висновки відносно вибору оптимальних параметрів вирощування культур клітин, отриманих від даних видів тварин.

Ключові слова: культура клітин, холонокровні тварини, рептилії, черепаха червоногоуха, черевоногі молюски, ампулярія, равлик виноградний, віруси.

Вступ. Біотехнологія є однією з найбільш перспективних і швидко прогресуючих галузей науково-технічної та промислової діяльності в світі.

Завдяки інноваційним біотехнологіям багато країн світу наповнюють ринок якісними і більш дешевими сільськогосподарськими продуктами. Деякі з цих країн визначили досягнення лідерства в галузі біотехнології одним з пріоритетних завдань їх економічної та екологічної політики. В той же час як розвинуті (і не тільки) країни світу вже давно зробили для себе висновок – майбутнє за біотехнологією, яка відкриває справді фантастичні можливості, в першу чергу в сільському господарстві, Україна, на жаль, втрачає свої позиції, в повній мірі не використовує наявний потенціал і майже опинилась на узбіччі світової біотехнологічної революції.

У ветеринарній медицині повинні знайти підтримку і розвиток технології та інноваційні біотехнології, що ґрунтуються на використанні культур клітин, ДНК-технологій, отриманні біологічно активних нових речовин, які можуть бути використані для створення лікувальних засобів, вивчення екологічних процесів, розробки технології із направленою селекційного процесу з використанням молекулярних маркерів та ін.

Не дивлячись на серйозний прогрес методів діагностики, застосування методу культури клітин залишається «золотим стандартом» у діагностиці багатьох вірусних інфекцій, оскільки дозволяє отримувати найбільш об'єктивні та достовірні результати, а також може бути використаний у біотехнологічних процесах, при виробництві вакцин, для отримання біологічно активних речовин та при синтезі моноклональних антитіл. У наш час метод культури клітин продовжує вдосконалюватись і вже впевнено став одним з основних інструментів біотехнології, цитології, вірусології, генетики, імунології та багатьох інших біологічних наук [1].

Враховуючи сьогоденні потреби ветеринарної практики, необхідно приділяти більшу увагу дослідженням з вивчення та запобігання зооантропонозних інфекцій.

Виникнення нових інфекцій та зміна перебігу відомих вірусних інфекцій відбувається в природних умовах, при змінах екології та антропогенного навантаження на довкілля внаслідок діяльності людини. При проведенні військових дій, особливо в сучасних умовах проведення АТО в зонах Східних областей України виникають катастрофічні порушення у довкіллі, що може спричинити виникнення та поширення особливо небезпечних вірусних хвороб людей та тварин. Не слід нехтувати також ситуацією, коли поряд із терористичними діями можливі застосування засобів біотероризму із

використанням небезпечних патогенів, в тому числі і тих, що можуть уражати тварин та людей.

Для забезпечення сталого епізоотичного благополуччя і проведення діагностичних, імунопрофілактичних, лікувальних робіт та заходів моніторингу циркуляції патогенних агентів галузь ветеринарної медицини держави має бути забезпечена якісними, високоефективними та специфічними засобами діагностики та захисту тварин. Для вірусних інфекцій цей процес потребує нових біологічних систем виділення та культивування вірусів. Це особливо актуально останнім часом, оскільки швидкими темпами змінюється екологія збудників, що спричиняє появу нових, емерджентних інфекцій, якісна і швидка діагностика яких є запорукою сталого благополуччя тваринництва.

Проте, якщо дослідженню теплокровних тварин присвячені численні наукові праці, то зовсім інший стан із вивченням холоднокровних тварин. Значну роль в цьому відіграє відсутність біологічних систем, в яких можливо виділяти та культивувати віруси, збудників зоонозів та досліджувати їх біологічні властивості. Рептилії є найменш вивченим таксоном, у випадках коли йдеться про культуру клітин. Відсутність широкого комерційного та наукового інтересу пов'язана з тим, що ці тварини (поки що) широко не використовуються у промислових масштабах так як тварини інших класів. Внаслідок чого кількість досліджень, пов'язаних з культурами клітин рептилій, й досі є дуже незначною [2]. В умовах недостатньої вивченості інфекційних хвороб рептилій, дослідження етіології та патогенезу захворювань, що можуть володіти зоонотичним потенціалом є особливо актуальним [3].

Відомо, що представники усіх класів рептилій можуть бути проміжними господарями або резервуарами різних вірусів, що належать до родин арбовірусів, тогавірусів, аденовірусів, герпесвірусів та флавівірусів, які можуть інфікувати людей та інших ссавців, а також птахів. Збудники хвороб можуть еволюціонувати та інфікувати нових господарів, у яких раніше не зустрічались. Крім того, розширення міжнародних відносин впливає і на розширення раціону продуктів, що споживаються як людиною, так і домашніми та продуктивними тваринами, може призвести до виникнення захворювань, які раніше не зустрічались в даній кліматичній зоні. Це може призвести до розповсюдження збудників небезпечних хвороб серед сприйнятливих тварин та людей, а також може мати катастрофічні наслідки для екології.

Наприклад, все більше споживається продуктів моря, в тому числі і моллюсків. Однак, на цей час роль моллюсків в біогеоценозі вірусної патології тварин та людини практично не вивчено. Отримання культури клітин моллюсків та вивчення її придатності для біотехнологічних цілей дозволить вивчити можливі шляхи розповсюдження інфекційних захворювань і надасть можливість отримати нові біопрепарати для профілактики вірусних захворювань домашніх улюбленців та продуктивних тварин. Тому, пошук і розробка нових біологічних систем для культивування збудників вірусних інфекцій тварин, в тому числі і нових культур клітин, є одним із актуальних питань ветеринарної вірусології, біотехнології та екології.

Саме метод культури клітин є чудовою експериментальною моделлю і незамінним інструментом для проведення вірусологічних та епізоотичних досліджень. З метою забезпечення дослідників більш широким арсеналом діагностичних та дослідницьких інструментів, створені величезні світові колекції та клітинні банки - такі як ECACC, ATCC, DSMZ та ін., які нараховують десятки тисяч найрізноманітніших клітинних культур. Однак, клітинним лініям холонокровних наземних хребетних досі не було приділено належної уваги. В даний час в Американській колекції типових культур міститься лише чотири клітинні лінії рептилій, які були отримані в середині минулого століття і зберігаються до теперішнього часу [4 - 9]. Але з цілого ряду причин ці клітинні лінії майже недоступні для вітчизняних дослідників, оскільки їх придбання потребує отримання дозволу CITES (Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora/ Конвенція про міжнародну торгівлю видами дикої фауни і флори, що перебувають під загрозою зникнення) та інших дозвільних документів, процедури транспортування та розмитнення займають тривалий час, а зберігання таких клітинних систем вимагає суворого дотримання певних температурних режимів і може тривати за нестабільних умов не більше 2 - 3-х діб. Українські колекції та банки клітинних культур не містять не лише жодної вітчизняної клітинної лінії від рептилій, а навіть штамів з міжнародних колекцій.

Таким чином, розширення досліджень з отримання культур клітин від рептилій та молюсків, створення в подальшому вітчизняних перещеплювальних клітинних ліній та винайдення нових пермісивних систем для вивчення морфології, еволюції, екології епізоотичного та антропозоотичного потенціалу вірусів є безперечно актуальним напрямком досліджень. Створення нових клітинних ліній сприятиме поліпшенню діагностики, науковим дослідженням в галузі вірусології, епізоотології, епідеміології та започаткуванню створення нової колекції культур клітин холонокровних тварин, що буде національним надбанням. Створення такої колекції надасть можливість забезпечити профільні заклади клітинними лініями та сприятиме міжнародному обміну колекціями культур клітин, та може стати предметом продажу, як новий інноваційний продукт, а також сприятиме створенню нових вітчизняних діагностичних систем та методів контролю за розповсюдженням вірусних інфекцій.

Мета роботи. Дослідити можливість культивування клітин холонокровних тварин (хребетних та безхребетних) *in vitro* та оптимізувати умови їх культивування для подальшого визначення можливості використання цих клітин в якості моделі для біотехнологічних, токсикологічних, екологічних цілей.

Матеріали і методи досліджень. Тварини. В якості донорів тканин для отримання первинної культури клітин використали молоду черепаху червоновуху (*Trachemys scripta elegans*), вагою 21,3 г, та черевоногих молюсків ампулярію (*Pomacea bridgesii*) та равлика виноградного (*Helix pomatia*). Для дослідження відбирали молюсків розміром раковини від 1 до 2 см, яких

попередньо витримували в акваріумі з дистильованою водою з додаванням антибіотиків.

Первинну культуру клітин черепахи червоновухої було отримано згідно з Методичними рекомендаціями для отримання первинно-трипсинізованих культур клітин холоднокровних тварин [10].

Усі роботи з культурами клітин проводили використовуючи стерильні поживні середовища та розчини з дотриманням асептичних технік при роботі з культурами клітин [11]. Використані розчини та середовища були приготовані напередодні проведення досліджень та після приготування були стерилізовані шляхом фільтрації через 0,22 μm фільтр (Millex®-GS) і їх робочі аліквоти зберігалися до використання у стерильному посуді при 4 °C у захищеному від світла місці.

Поживні середовища, сироватки і розчини. Для проведення досліджень були використані наступні поживні середовища: DMEM (SH30243.01; HyClone, USA), RPMI-1640 (R8758; Sigma-Aldrich®), 199 («Біо Тест Лабораторія», Україна), F10 (N6013; Sigma-Aldrich®), F12 (N6760, Sigma-Aldrich®). В якості хелатних агентів та дезагрегуючих розчинів були використані: розчин трипсину 0,25 %, розчин Версену 0,02%, без Ca^{2+} Mg^{2+} («Біо Тест Лабораторія», Україна). Антисептичні, антибактеріальні та фунгіцидні агенти: розчин гентаміцину сульфату 4 % («ПАТ «Артеріум», Україна); пеніцилін-стрептоміцин (10 тис.ОД/мл пеніциліну і 10 мг/мл стрептоміцину сульфату) (P0781; Sigma-Aldrich®) флуконазол 0,2% («Юрія-Фарм», Україна); спирт етиловий 70% («ВФК» Біо-Фарма ЛТД», Україна). Інші розчини та добавки до поживних середовищ: фетальна сироватка крові ВРХ (FBS) (S7524; Sigma-Aldrich®), готові фарби Мая-Грюнвальда та Романовського-Гімзи (ТОВ «Хімторг», Росія).

Морфологічна оцінка. Для вивчення морфологічних особливостей отриманих клітин проводили мікроскопічну оцінку нативних та пофарбованих препаратів. Оцінку нативних клітинних зразків проводили під інвертованим мікроскопом Leica DM IL LED при 10-, 20- та 40-кратних збільшеннях із застосуванням методу фазового контрасту. Для морфологічної оцінки клітинну культуру вирощували на стерильних, попередньо знежирених покривних скельцях та фарбували за Папенгеймом [12].

Визначення оптимальних параметрів культивування. Для визначення оптимальних умов культивування клітинних субкультур оцінювали наступні параметри: температура інкубації (від 15 °C до 37 °C) та декілька типів поживних середовищ і їх комбінації. Критеріями оцінки слугували такі показники, як проліферативна активність клітин (оцінювали за індексом проліферації (ІП) [1]) та час утворення моношару. Для вираховування ІП, в даному випадку, проводили підрахунок клітин у культуральних флаконах. Рахували живі прикріплені та розпластані клітини у 10 полях зору при стократному збільшенні. Підрахунок ІП здійснювали за формулою:

$$\text{ІП} = a/b, \text{ де}$$

a – остаточно кількість клітин/10 полів зору,

b – посівна кількість клітин/10 полів зору.

Контроль контамінації. Для контролю контамінації клітинних ліній мікроорганізмами застосовували мікробіологічний та цитологічний методи [10]. Субкультивування первинних культур проводили після досягнення ними моношару в різні терміни від моменту посіву (від 15 днів до 3 місяців).

Результати досліджень та їх обговорення. Вперше в Україні проведені експерименти з отримання нових біологічних моделей, а саме культур клітин холонокровних тварин, які потенційно можливо застосувати для використання у біотехнології, екології, ветеринарії для діагностики зоонозів та виділення вірусів, що їх викликають.

Проліферативну активність клітинних культур було досліджено за різних температур їх інкубації. Досліджуваний температурний діапазон був у межах 15–37 °C (для рептилій -23–3 °C, для молюсків 15–37 °C).

Для проведення досліджень з культивування клітин рептилій використали поживне середовище DMEM, з додаванням 50 тис.ОД пеніциліну, 50 мг стрептоміцину сульфату, 2,0 мг гентаміцину сульфату, 4,0 мг флуконазолу/100 мл середовища, та FBS 15%. Суспензію клітин культур черепахи червоновухої з посівною концентрацією $\approx 5 \times 10^5$ кл/см³ висівали в культуральні флакони та проводили інкубацію за різних температурних режимів, від 23 до 33 °C. Культивування за температури 23 °C не призводило до клітинної адгезії та проліферації, більша частина клітин залишалася не прикріпленими і знаходилася у суспензії. Поодинокі клітини що прикріпилися, виявляли слабку проліферативну активність, їх ділення відбувалось дуже повільно. За такого температурного режиму інкубації моношар не утворювався, поодинокі клітини, що утворювали острівці, загинули через кілька тижнів. За температури інкубації 26 °C кількість прикріплених клітин була більша, ніж за 23 °C, прикріплені клітини утворювали острівці, які згодом зливалися між собою і за 12 днів спостерігалось формування моношару. За температури 29 °C було відмічено значний відсоток прикріплених клітин, які виявляли високу проліферативну активність і утворювали суцільний моношар впродовж 7 днів культивування. При спробах культивування отриманих субкультур за температурного режиму 33 °C спостерігався найбільший відсоток прикріплених та активнопроліферуючих клітин, ознаки поділу відзначалися вже впродовж перших двох годин після посіву. На першу добу культивування спостерігалися острівці клітинного росту досить значної площі, але на третю добу відбувалась їх дегенерація, округлення та відокремлення від субстрату. На п'яту добу вирощування при 33 °C майже всі клітинні острівці були відокремлені від субстрату і знаходилися в суспензії у вигляді конгломератів. Отримані дані представлені у табл.1.

Таблиця 1

Вплив температури інкубації на показники росту субкультур клітин черепахи червоновухої (*Trachemys scripta elegans*)

Показники	Температура інкубації, °С			
	23	26	29	33
Час формування моношару, діб	—	12	7	—
Індекс проліферації	2,2±0,2	3,1±0,1	3,9±0,1	4,2±0,2

Для оцінки впливу різних поживних середовищ на ріст клітин черепахи червоновухої проводили вирощування отриманих культур у наступних ростових середовищах: 1) DMEM; 2) 199; 3) RPMI-1640. До усіх типів середовищ було добавлено однакову кількість антибактеріальних та фунгіцидних компонентів, а саме: 50 тис. Од. пеніциліну, 50 мг стрептоміцину сульфату, 2,0 мг гентаміцину сульфату, 4,0 мг флуконазолу/100 мл середовища, а також FBS 15%. Суспензію клітин з посівною концентрацією $\approx 5 \times 10^5$ кл/см³ висівали у культуральні флакони та додавали різні поживні середовища. Даний дослід проводили за температури інкубації +28°C. При застосуванні поживного середовища DMEM спостерігалася активна проліферація клітин, утворення колоній з клітин, що прикріпилися, збільшення щільності клітинної популяції та утворення острівців зливного росту на п'яту добу після посіву. Утворення щільного моношару спостерігали на 8 добу, індекс проліферації складав 3,9±0,2. Середовище RPMI-1640 забезпечувало приблизно такі самі результати: утворення моношару було відмічено на 9 добу після посіву, ІІ дорівнював 4,1±0,1. Середовище 199 не забезпечувало росту клітин. Навіть на п'яту добу після посіву прикріплення, розпластування чи проліферації клітин не спостерігалось, майже усі клітини знаходилися в суспензії. Отримані дані представлені у табл. 2.

Таблиця 2

Вплив типу поживного середовища на показники росту субкультур клітин черепахи червоновухої (*Trachemys scripta elegans*)

Показники	Поживне середовище		
	DMEM	RPMI-1640	199
Час формування моношару, діб	8	9	—
Індекс проліферації	3,9±0,2	4,1±0,1	0,2±0,2

Морфологічна оцінка. Після посіву клітини рівномірно розподіляються по поверхні субстрату. За морфологією клітини фібробластоподібні, однорідні, видовжені, веретеноподібної форми з довгими цитоплазматичними відростками. По мірі ущільнення моношару клітини ще більше видовжуються

та формують пучки, що переплітаються хаотично, компактно прилягаючи один до одного (рис. 1). Ядро овальної форми, розташоване відцентровано та оточене чітко вираженою цитоплазмою (рис. 2).



Рис. 1. Моношар фіброластоподібних клітин черепахи червоновухої, нативний препарат, x100.

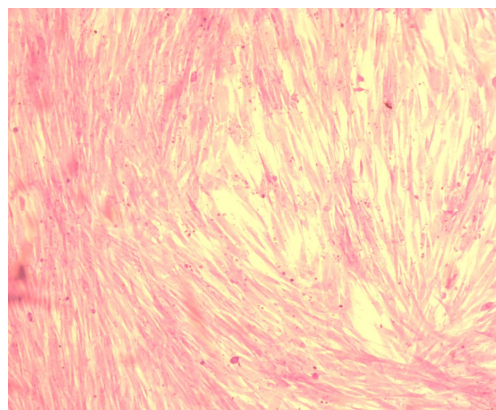


Рис. 2. Моношар фіброластоподібних клітин черепахи червоновухої, фарбування за Паппенгеймом, x100.

При отриманні первинних культур клітин з молюсків було досліджено придатність для культивування клітин поживних середовищ DMEM, RPMI-1640, 199, F-10, F-12 з додаванням 6–10 % сироватки ВРХ та температур культивування 15, 20, 25 та 37°C. Коефіцієнт приросту клітин виділених з ампулярії на рівні 8 пасажу при використанні поживних середовищ різного складу та різних температурних режимів протягом наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Коефіцієнт приросту клітин, виділених з ампулярії (*Pomacea bridgesii*) на рівні 8 пасажу при використанні поживних середовищ різного складу та різних температурних режимів

Поживні середовища	Температура культивування			
	15±1,5 °C	20 ±1,5 °C	25 ±1,5 °C	37 ±1,5 °C
DMEM	1:1	1:1	1:1	1:1
RPMI-1640	1:1	1:1,5	1:1,4	1:1
199	1:1	1:1,3	1:1	1: 0,8
F-10	1:1,6	1:2,5	1:2,0	1:1,5
F-12	1:1,5	1:1,8	1:1,5	1:1,2

Найкращі результати були отримані при використанні поживного середовища F-10 з додаванням 6 % сироватки крові ВРХ за кімнатної температури 20±1,5 °C. Тому подальше культивування клітин проводили за цих умов. Оптимальну концентрацію сироватки ВРХ в складі поживного

середовища визначали шляхом додавання до нього різних концентрацій сироватки: 5-12 %. Шляхом послідовного пасажування встановлено, що для клітин ампулярії оптимальною концентрацією сироватки ВРХ є 6 %.

Аналогічну серію дослідів було проведено з клітинами сухопутного молюска равлика виноградного (*Helix pomatia*). В результаті досліджень встановлено, що на рівні сьомого пасажу поживне середовище F-12 найбільш придатне для культивування клітин, отриманих від цього молюска за умови наявності сироватки ВРХ в концентрації 10 % (табл. 4).

За отриманими субкультурами вели тривале (більше 3 місяців) спостереження. За зміни рН середовища у лужний бік (що є нормою для клітин холонокровних тварин, оскільки обмінні процеси та поділ клітин відбуваються дуже повільно) проводили його заміну на свіже.

Таблиця 4

Коефіцієнт приросту клітин виділених з равлика виноградного (*Helix pomatia*) на рівні 7 пасажу при використанні поживних середовищ різного складу та різних температурних режимів

Поживні середовища + 10 % сироватки ВРХ	Температура культивування			
	15±1,5 °C	20±1,5 °C	25±1,5 °C	37±1,5 °C
DMEM	1:1	1:1	1:1	1:1
RPMI-1640	1:1	1:1,5	1:1,4	1:1
199	1:1	1:1,3	1:1	1: 0,8
F-10	1:1,5	1:1,6	1:1,4	1:1,3
F-12	1:1,6	1:2,2	1:2,0	1:1,5

Нами вперше в Україні проведене успішне культивування первинних культур клітин та субкультур клітин з черепахи червоноухої (*Trachemys scripta elegans*) та двох видів черевоногих молюсків: ампулярії (*Pomacea bridgesii*) та равлика виноградного (*Helix pomatia*).

Також, в результаті проведених досліджень було зроблено висновок, що культури клітин черепахи червоноухої можуть рости у певних поживних середовищах, розроблених для інших клітинних ліній. У наших дослідах середовища DMEM (SH30243.01; HyClone) та RPMI-1640 (R8758; Sigma-Aldrich®) забезпечували найкращий ріст клітин, найшвидше виповнення моношару і достатньо високий ІП. Середовище 199 («Біо Тест Лабораторія», Україна) не забезпечувало достатній рівень адгезії та проліферації досліджуваних субкультур клітин черепахи червоноухої.

Дослідження впливу різних температур інкубації на проліферативну активність субкультур клітин черепахи червоноухої дозволили дійти висновку, що оптимальними температурними умовами для вирощування культур клітин даного виду тварин можна вважати температурні межі 26–29 °C.

Отже, для отримання культур клітин холонокровних тварин нами відпрацьовані: оптимальні температурні режими культивування, склад ростових середовищ, відпрацьовані технології отримання та підтримання *in vitro* первинних клітин та їх субліній.

Вищезначене дозволяє започаткувати в Україні колекцію клітинних ліній холонокровних тварин, проведення широких досліджень щодо можливості їх використання в біотехнології, вірусології, ветеринарії тощо.

Вперше в Україні нами отримано нові потенційно чутливі культури клітин, які нададуть нові можливості їх використання як для тестувань цитотоксичної дії сполук (лікарських препаратів), в тому числі і виявлення антивірусної дії речовин у нових моделях, а також для виділення вірусів – патогенів особливо небезпечних хвороб, спільних для людей і тварин, таких як збудники лихоманки Західного Нілу, лихоманки Ласса, лихоманки Ебола та ін.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Відпрацьовані методи отримання первинних культур клітин від двох класів холонокровних тварин (моллюсків та рептилій).
2. Визначені температурні режими культивування первинних клітин та субкультур холонокровних тварин.
3. Підібрано оптимальний склад поживного середовища для певного виду клітин та концентрацію сироватки крові ВРХ, яка забезпечує успішне розмноження клітин.
4. Данні, отримані в результаті проведених досліджень, дають підстави для продовження дослідів в напрямку отримання нових біологічних моделей (нових ліній культур клітин) та поглибленого їх вивчення як потенційно нового напрямку в розвитку біотехнології.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Животная клетка в культуре / под. общ. ред. Л.П. Дьяконов. – М.: Спутник +, 2009. – 246 с.
2. Reproductive Sciences in Animal Conservation: Progress and Prospects / W.V., Holt, J. L. Brown. – NY.: Springer, 2014. – P. 393.
3. Васильев Д.Б. Теоретические и методологические основы ветеринарной герпетологии: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. вет. наук : спец. 16.00.02 – «Патология, онкология и морфология животных» / Д.Б. Васильев. – Москва, 2007. – 35 с.
4. Clark H.F. Terrapene heart (TH-1), a continuous cell line from the heart of the box turtle *Terrapene Carolina* / H.F. Clark, D.T. Karzon // Exp. Cell Res. – 1967. – №48. – P. 263–268.
5. Cohen M.M. The somatic chromosomes of 3 lizard species: *Gekko gecko*, *Iguana iguana*, and *Crotaphytus collaris* // Experientia. – 1967. – №23. – P. 769–771
6. Clark H.F., et al. Characterization of reptilian cell lines established at incubation temperatures of 23 to 36 degrees // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1970. – №133. – P. 1039–1047.
7. Cohen M.M. Spontaneous chromosomal alteration in cell lines of poikilothermic origin (*Gekko gecko*) / M.M. Cohen, H.F. Clark // Cytogenetics. – 1968. – №7. – P. 16–26.
8. Clark H.F., et al. Comparative characterization of a C-type virus-producing cell line (VSW) and a virus-free cell line (VH2) from *Vipera russelli* // J. Natl. Cancer Inst. —1973. – №51. – P. 645–654.
9. Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture / edit. G. V. Cristofalo, A.R. Rothblat. – London.: Academic Press, 1972. – P. 463.

10. Методичні рекомендації з отримання первинно-трипсинізованих культур клітин холоднокровних тварин: метод. рекомендації. — К. : Планета, 2014. — 48 с.
11. Cell culture basic. Handbook. Gibco Thermo Fisher Scientific Inc. — 2014. — P. 11.
12. Микроскопическая техника / ред. Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. — М.: Медицина, 1997. — 290 с.

НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ / Клестова З.С., Савинова И.В., Годовский А.В.

*Авторы статьи начали новые исследования по разработке инструмента изучения циркуляции и экологии вирусов в дикой фауне, что является элементом в укреплении системы биобезопасности в ветеринарной медицине. Отработаны методы получения первичных культур клеток холоднокровных животных и созданы новые линии их культур клеток, которые могут быть применимы для культивирования вирусов, исследования путей распространения инфекционных болезней и служить моделями для экологических, биотехнологических и биологических экспериментов. Определено оптимальную температуру культивирования клеток для некоторых видов клеток холоднокровных и состав питательной среды для их поддержания. Представлены данные относительно особенностей роста субкультур клеток черепахи красноухой (*Trachemys scripta elegans*) при различных температурных режимах культивирования. Дана оценка возможности применения питательных сред различного состава для выращивания культуры клеток рептилий и приведено краткое описание морфологических особенностей полученных субкультур клеток черепахи красноухой (*Trachemys scripta elegans*). Сделаны выводы относительно выбора оптимальных параметров выращивания культур клеток, полученных от данного вида животных. В будущем планируется исследовать чувствительность клеток пресмыкающихся и моллюсков к вирусам – потенциальным возбудителям заболеваний животных и выяснить возможность использования этих клеток в диагностике, биотехнологии, для экологических исследований, а также в гуманной медицине как продуцентов полезных соединений. Исследования свойств клеток холоднокровных продолжаются, а окончательное место этого направления в практике еще не определена.*

Ключевые слова: культура клеток, хладнокровные животные, рептилии, черепаха красноухая (*Trachemys scripta elegans*), брюхоногие моллюски, ампулярия (*Pomacea bridgesii*), улитка виноградная (*Helix pomatia*), вирусы.

NEW BIOLOGICAL SYSTEMS DESIGNED FOR ISOLATION AND CULTIVATION OF VIRUSES, PATHOGENS OF INFECTIOUS DISEASES OF ANIMALS / Klestova Z., Savinova I., Godovskyi A.

Introduction. *Viruses of lower vertebrates recently became a field of interest to the public due to increasing epizootics and economic losses of poikilothermic animals. Poikilothermic animals are hosts to diverse viral infections. We are still learning about the diversity of infectious agents in this animals and the clinical significance of these agents. The viruses are of great epidemiological interest in human and veterinary medicine. The ectothermic animals maintain inapparent arbovirus infections during hibernation and they play role as reservoirs for these viruses. There is also evidence that pathogens may evolve to infect novel species other than their host species. Veterinary diagnostics and treatments aim at early detection of infectious diseases and development of effective treatment protocols, including effective quarantine practices and health screens of newly imported/collected animals. Diagnostic tools need to be developed to screen captive and wild populations for exposure to pathogens. Effective measures need to be implemented to protect the*

habitat of wild reptile and amphibian populations and also prevent introduction of pathogens into wild populations. Cell culture is still a golden standard for virus isolation and identification. Reptiles encompass the least studied taxon when it comes to in vitro techniques, such as cell culture.

The goal of the work. The aim of our work was investigation and optimization the lower vertebrates' cell culture condition.

Materials and methods. We used three lower vertebrates' animal species for primary cell culture initiating. There were *Trachemys scripta elegans*, *Pomacea bridgesii* and *Helix pomatia*. The five different culture media and temperature cultivation range from 15 to 37 °C were tested.

Results of research and discussion. Here we describe the characterization of primary cell cultures derived from this three animal species. Characterization included cells morphology and optimizing culture conditions. These cells exhibited a fibroblast-like morphology and grew optimally at near the 20 °C for mollusks' cells and temperature range from of 26 to 29 °C were optimal for reptilian cells. The results of this study showed that the DMEM and RPMI-1640 mediums with 10 % FBS were the optimal for turtle cell culture growth. And F-10 and F-12 culture mediums with 6 to 10 % FBS were the best for mollusks' cell culture growth.

Conclusions and prospects for further research. The results of this research can be use in virology, biotechnology and preservation of biodiversity investigations.

Keywords: cell culture, cold-blooded animals, reptiles, Red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*), mollusks, Mystery snail (*Pomacea bridgesii*), Burgundy snail (*Helix pomatia*), viruses.

REFERENCES

1. D'jakonov, L.P. (Eds.). (2009). *Zhivotnaja kletka v kul'ture [Animal cell in the culture]*. Moscow: Sputnik + [in Russian].
2. Holt, W.V. (Eds.). (2014). *Reproductive Sciences in Animal Conservation: Progress and Prospects*. NY.: Springer.
3. Vasil'ev, D.B. (2007). Teoreticheskie i metodologicheskie osnovy veterinarnoj gerpetologii [Theoretical and methodological bases of veterinary herpetology]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Moscow [in Russian].
4. Clark, H.F., & Karzon, D.T. (1967). Terrapene heart (TH-1), a continuous cell line from the heart of the box turtle *Terrapene Carolina*. *Exp. Cell Res.*, 48, 263-268.
5. Cohen, M.M. (1967). The somatic chromosomes of 3 lizard species: Gekko gekko, Iguana iguana, and *Crotaphytus collaris*. *Experientia*. 23, 769-771.
6. Clark, H.F. (1970). Characterization of reptilian cell lines established at incubation temperatures of 23 to 36 degrees. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133, 1039-1047.
7. Cohen, M.M., & Clark, H.F. (1968). Spontaneous chromosomal alteraion in cell lines of poikilothermic origin (Gekko gekko). *Cytogenetics.*, 7, 16-26.
8. Clark H.F., et al. (1973). Comparative characterization of a C-type virus-producing cell line (VSW) and a virus-free cell line (VH2) from *Vipera russelli*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 645-654.
9. Cristofalo G.V., Rothblat A.R. (Eds.). (1972). *Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture*. London: Academic Press.
10. Klestova Z.S., Savinova I.V., & Belokon' V.I. (2014). *Metodidchni rekomendacii z otrimannja pervinno-tripsinizovanih kul'tur klitin holodnokrovnih tvarin [Guidelines to obtain primary cell cultures from poikilothermic animals]* Kyev: Planeta [in Ukrainian].
11. Cell culture basic. *Handbook*. (2014). Gibco Thermo Fisher Scientific Inc.
12. Sarkisov, D.S., & Perov, Ju.L. (Eds.). (1997). *Mikroskopicheskaja tehnika [Microscopy technic]*. Moscow: Medicina [in Russian].