С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің **Ғылым жаршысы (пәнаралық)** = **Вестник науки** Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (**междисциплинарный**). - 2018. - №4 (99). - С.96-106

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИНУДИТЕЛЬНОЙ АДАПТАЦИИ КЛЕТОК ТЕСТИКУЛ И ПОЧЕК ЯГНЯТ И КОЗЛЯТ К НЕПРЕРЫВНОМУ РОСТУ IN VITRO

Кутумбетов Л.Б,
Мырзахметова Б.Ш.
РГП на ПХВ «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК, Жамбылская область

В исследованиях по получению непрерывно пересеваемой культуры клеток - субстрата-продуцента вируса нодулярного дерматита, использованы первичные культуры клеток из тканей почек и тестикул ягнят и козлят. Для адаптации к непрерывному росту in vitro культуры клеток подвергались многократным пассированиям с помощью пересевов и культивирования при температуре 37 ^{o}C. Результаты пассирований и оценка популяций клеток в процессе культивирования показали, что тестикулярные клетки имеют фибробластоподобную морфологию, сравнительно большую адгезивную и пролиферативную активность. После 14 и 16 пассажей у тестикулярных клеток ягнят и козлят пролиферативная активность заметно снизилась. После дальнейших принудительных пассажей и клонирования получены две клоновые популяции клеток тестикул ягнят, которые отличались повышенной пролиферативной активностью. Дальнейшее пассирование и адаптация к размножению in vitro может позволить получить искомую пересеваемую линию клеток.

Ключевые слова: первичная культура клеток, пересеваемые клетки, трипсинизация, пересев, морфология, пролиферация, адгезия, пассажи, адаптация.

Введение

В вирусологической практике для репродукции вирусов in vitro используют культуры клеток, полученные первичной трипсинизацией, и культуры перевиваемых клеток постоянно поддерживаемые в условиях лаборатории [1,2]. У каждого типа культур клеток имеются свои достоинства и недостатки. Первичные культуры клеток готовятся из органов-доноров животных и используются однократно. Для новой партии культуры клеток вновь требуются доноры органов. Так как в практике репродукции вируса нодулярного дерматита используются почечные клетки телят и ягнят, производство вирусной массы строго связано с

наличием этих видов животных [3,4]. Использование телят не технологично и дорогостояще, а ягнята нарождаются сезонно, в связи, с чем и производство препаратов оказывается не постоянным. Поэтому, исходя из того, что культуры клеток, приготовленные из органов перечисленных видов животных, являются чувствительными к целевому вирусу, выбор направления исследований по разработке пересеваемых культур клеток осуществлялся с использованием клеток, приготовленных из органов ягнят и козлят. К тому же по данным ряда авторов, которые изучали биологические и репродуктивные свойства возбудителей рода Capripoxvirus, куда также относится и вирус нодулярного дерматита, свидетельствуют о том, что эти вирусы хорошо реплицируются в культурах клеток из почек и тестикул ягнят и козлят [5,6].

Перевиваемые культуры клеток в отличие от первичных постоянно поддерживаются в условиях лаборатории и, при необходимости, могут быть подвержены стандартизации согласно требованиям целевой технологии. Производство таких культур клеток не зависит от наличия доноров и сезона их появления. Однако многие перевиваемые культуры клеток могут представлять угрозу здоровью реципиента как наиболее потенциальные канцерогены. Поэтому при выборе перевиваемых клеточных культур, необходимых для производства препаратов парентерального назначения, необходимо подвергать их тщательной проверке на негативные параметры и исключить такие свойства. В основном такими свойствами обладают клеточные культуры, полученные из опухолевых образований, такие как HeLa, HEP-2 и др. [7,8].

В практике производства ветеринарных и медицинских препаратов, в том числе живых вакцин, используются отдельные клеточные линии, к которым относятся ВНК-21 и его различные клоновые варианты, Vero. [9,10]. Множество инактивированных вакцин, предназначенных для ветеринарии, готовятся с использованием различных перевиваемых клеточных культур.

В клеточной биотехнологии, кроме первичных и перевиваемых линий, используются также штаммовые культуры клеток, которые гарантированно не обладают канцерогенными свойствами. У таких культур клеток сохранен диплоидный набор хромосом и обладают исходными свойствами первичных культур клеток. Популяции этих культур клеток, также как и перевиваемые, поддерживаются пассированием и длительной криоконсервацией. Поэтому в технологии производства биологических препаратов, особенно живых вакцин, штаммовые культуры клеток наиболее приемлемы и технологичные.

Исходя из приведенных возможностей клеточной

биотехнологии целью данной работы явилась адаптация с помощью пассажей первичных культур клеток, полученных из тестикул и почек ягнят и козлят, к непрерывной пролиферации in vitro для получения пересеваемой культуры клеток со свойствами штаммовых клеток.

Материалы и методика исследований

При приготовлении первичных культур клеток донорами тестикул и почек являлись ягнята и козлята 1-3 месячного возраста.

Тестикулы получали путем асептического изъятия их из организма донора-животного хирургическим способом. Животных, после изъятия тестикул, содержали в помещении до выздоровления.

Тестикулы транспортировали в растворе Хенкса с антибиотиками и в лаборатории их подвергали механической очистке от соединительных тканей, а затем – трипсинизации в растворе 0,25% трипсина. Перед трипсинизацией тестикулярную ткань разрезали на мелкие однородные кусочки размером 50-60 мм^3 (примерно 3-4х3-4х3-4 мм). Трипсинизацию проводили по методике, описанной В.Н.Сюриным и соавторами [1]. Действие трипсина нейтрализовывали сывороткой крови крупного рогатого скота, используемой в составе питательной среды для выращивания клеток. Клетки высевали в концентрациях 100-200х10^3 кл/см^3. В качестве ростовой среды использовали питательную среду по прописи Игла с содержанием 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. Для регулирования скорости роста клеток в питательной среде изменяли концентрацию сыворотки крови.

Почечные клетки получали из почек ягнят и козлят после их убоя с полным обескровливанием. Органы доставляли в лабораторию и подвергали трипсинизации, а также высевали в сосуды для культивирования, так же как и ткани и клетки тестикул.

Концентрацию клеток в культуральной суспензии подсчитывали в камере Горяева [1]. Клетки культивировали при температуре 37^{o}С в течение всего наблюдаемого времени. В процессе роста клеток ежедневно фиксировали данные об адгезии и морфологии клеток, а также их прирост (пролиферативную активность) на поверхности роста.

Для установления адгезивной активности через 24, 48, 72 ч после посева из содержимого сосудов с посеянной суспензией клеток отбирали пробу и подвергали подсчету плавающих клеток. Затем определяли разницу между количеством посеянных и свободных клеток. Полученную разницу брали за количество адгезированных клеток из числа посеянных. Адгезивность клеток оценивали в сутках по прикреплению не менее 50% клеток, посеянных после трипсинизации.

Для определения пролиферативной активности

вначале устанавливали количество адгезированных клеток, затем, после формирования полного монослоя или через 72 ч после посева, – общее количество клеток, имеющихся на поверхности роста. Цифровое значение отношения общего количества клеток к количеству адгезированных принимали за индекс их пролиферативной активности.

Морфологию клеток изучали и оценивали визуально при микроскопировании монослоя культуры клеток.

Для адаптации к непрерывному росту in vitro после формирования полного монослоя культуру клеток подвергали пересеву, т.е. субкультивированию. Для этого клетки в монослое диспергировали раствором трипсина и пересевали содержимое в 2 или 3 или 4 матраса, а в случаях, когда количество клеток в матрасе было ограниченным, пересевали только в «собственный» матрас. После получения субкультуры процесс трипсинизации повторяли и получали следующую генерацию культуры клеток. На каждом пассаже оценивали морфологию, адгезивную и пролиферативную активности культур клеток. На 20-ом пассаже часть популяции клеток подвергали криоконсервации при температуре минус 196^{o}С, а из остальной части популяции выделяли клоны, которые размножали в отдельности, изучая их морфофункциональные свойства.

Для получения клоновых клеток суспензию клеток, полученную путем обработки 0,25% раствором трипсина и тщательного перемешивания в питательной среде Игла, разводили до концентрации не более 10 клеток/см^3 и высевали в матрасы. Клеточную суспензию в матрасах выдерживали в течение 24 ч при температуре 37^{o}С, затем удаляли питательную среду, внутреннюю поверхность матраса промывали в 3-х сменах раствором Хенкса и вносили в свежую питательную среду. Наличие адгезии посеянных клеток контролировали микроскопией и с наружной поверхности матраса отмечали места прикрепления одиночных клеток. За одиночными клетками, адгезированными на внутренней поверхности матраса вели ежедневное наблюдение до их распластывания и формирования небольших колоний.

Колонии клеток или одиночные клетки отслаивали от поверхности адгезии механическим соскабливанием с помощью стерильной Пастеровской пипетки. Затем эту пипетку запаивали в двух сторон над пламенем горелки. Пипетки с одиночными клетками и их колонией вместе с питательной средой, содержащей 15% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота, выдерживали при температуре 37^{o}С в течение 7-10 суток. По завершению этого срока содержимое каждой пипетки переносили во флаконы Павицкого, в которую доливали 4-5 см^3 питательной среды Игла с

содержанием 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота. Через 24 и ежедневно в последующем микроскопировали содержимое флаконов и контролировали морфофункциональное состояние клоновых клеток.

Оценку чистоты культуры клеток от посторонних микробиологических контаминантов осуществляли через каждые 5-10 пассажей согласно требованиям ГОСТ 28085.

Основные результаты исследований НИР

Для получения стандартных результатов все получаемые культуры клеток выращивали в 1,5-литровых плоских матрасах с использованием одинаковой питательной среды и температуры. Тестикулярные клетки ягнят и козлят по морфологии были сходны и характеризовались фибробластоподобными (рисунок 1, 2), а почечные клетки обоих видов животных по морфологии были эпителиоподобными (рисунок 3, 4).

Популяция клеток, полученная путем первичной трипсинизации, при высеве в матрасы адгезировалась не полностью. Часть клеток из посеянного пула в течение первого и второго дня прикреплялась к внутренней поверхности матраса, а оставшаяся часть - плавала в суспензии. Адгезированные клетки в первые несколько часов имели круглую форму, затем через 12-24 ч они распластывались, принимая полигональную (почечные клетки) и вытянутую (тестикулярные клетки) формы и подвергались пролиферации. В первые двое суток к поверхности стекла прикреплялись до 50% посеянных клеток, которые затем, по мере пролиферации, формировали монослой в течение 48-72 часов.

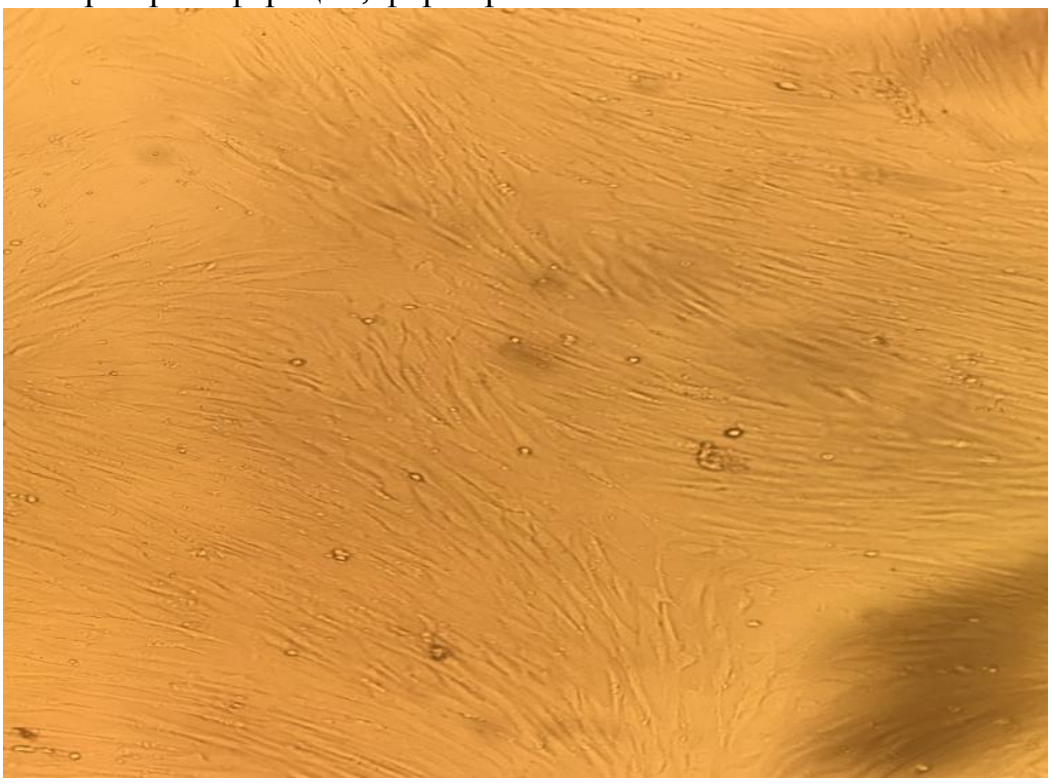

Рисунок 1 - Монослой культуры клеток тестикулы ягненка

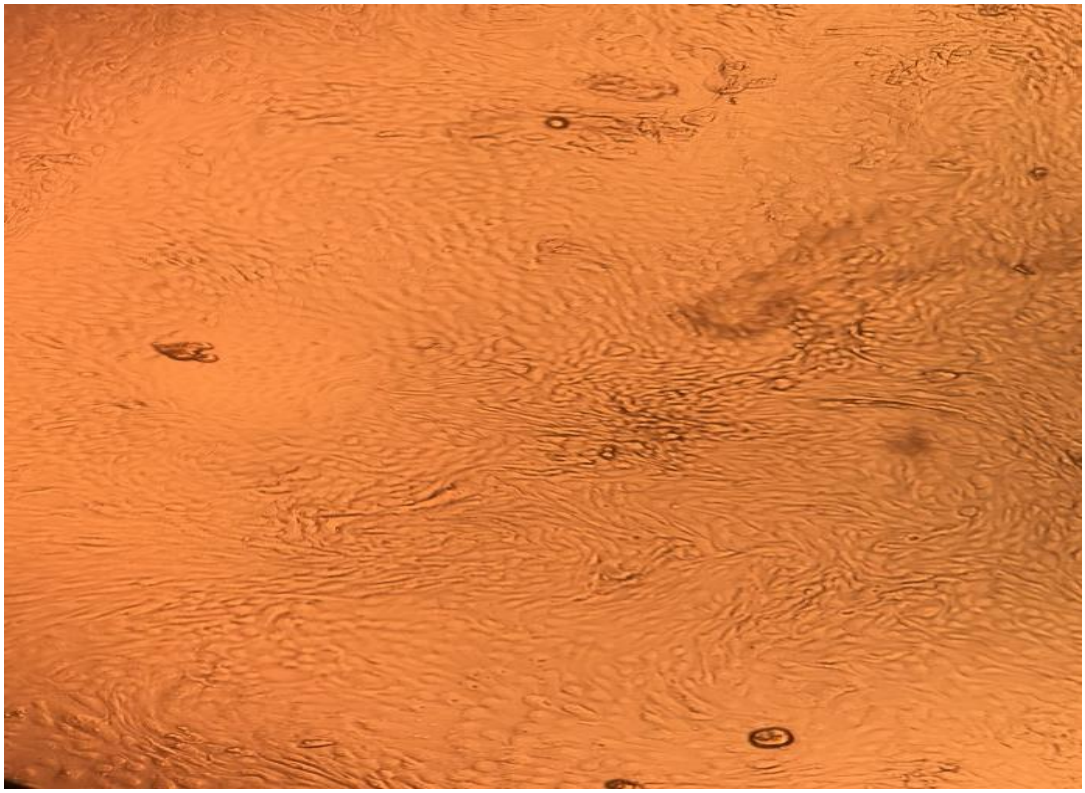

Рисунок 2 - Монослой культуры клеток тестикулы козленка

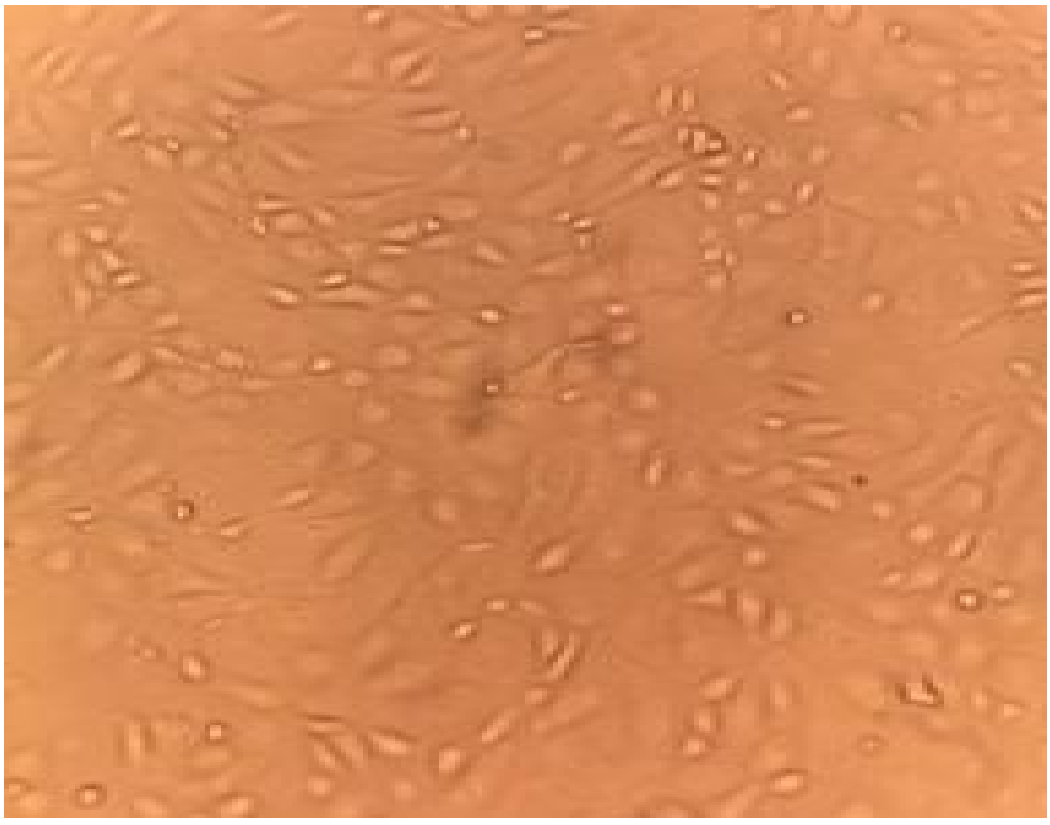

Рисунок 3 - Монослой культуры клеток почки ягненка

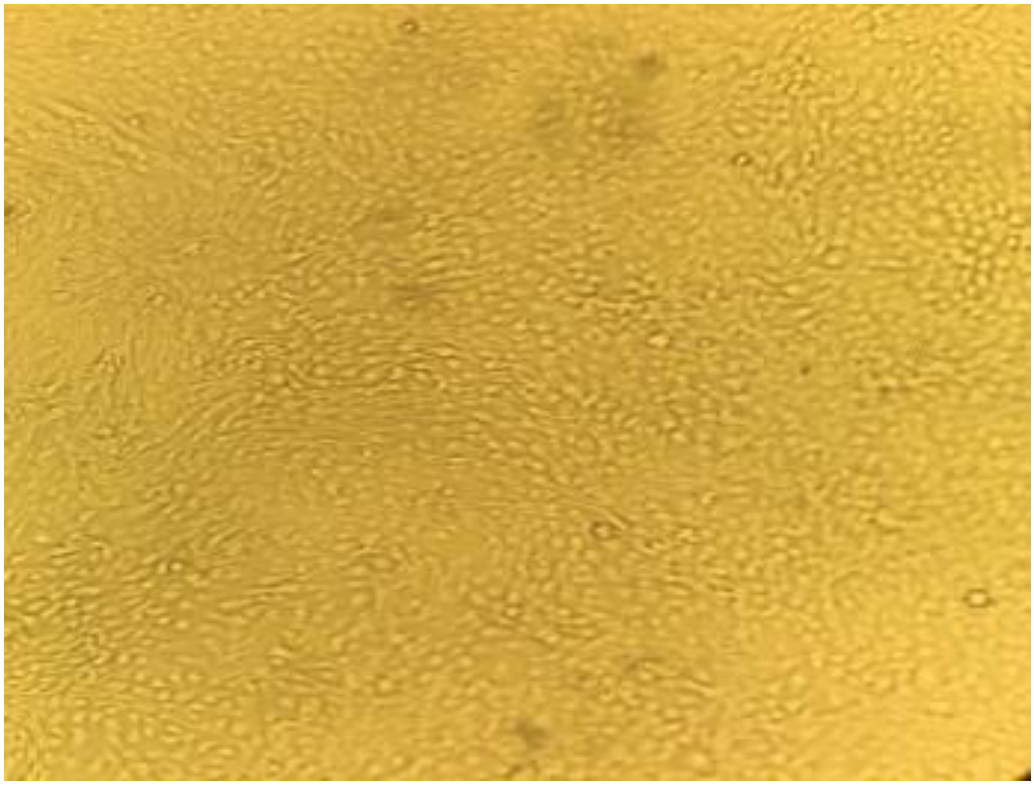

Рисунок 4 - Монослой культуры клеток почки козленка

Пролиферативная активность фибробластоподобных клеток была сравнительно выше, чем у эпителиоподобных. Результаты оценки адгезивной и пролиферативной активности, а также характеристики морфологии клеток по пассажам приведены в таблице 1.

Таблица 1 Динамика морфофункциональных показателей пассажных культур клеток

Уровень пассажа	Морфофункциональные показатели культур клеток											
	Адгезия, 50%/сутки				Пролиферация, индекс				Морфология, форма			
	ТЯ	ТК	ПЯ	ПК	ТЯ	ТК	ПЯ	ПК	ТЯ	ТК	ПЯ	ПК
1	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
2	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
3	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
4	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
5	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
6	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
7	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
8	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП

9	1-2	1-2	2-3	2-3	3	2,5	2	2	ФП	ФП	ЭП	ЭП
10	1-2	1-2	2-3	-	3	2,5	2	-	ФП	ФП	ЭП	-
11	1-2	1-2	2-3	-	3	2,5	2	-	ФП	ФП	ЭП	-
12	1-2	1-2	2-3	-	3	2,5	2	-	ФП	ФП	ЭП	-
13	1-2	1-2	-	-	3	2,5	-	-	ФП	ФП	-	-
14	1-2	1-2	-	-	3	1,5	-	-	ФП	ФП	-	-
15	1-2	1-2	-	-	3	1,5	-	-	ФП	ФП	-	-
16	1-2	1-2	-	-	2	1,5	-	-	ФП	ФП	-	-
17	1-2	1-2	-	-	2	1,5	-	-	ФП	ФП	-	-
18	1-2	-	-	-	2	-	-	-	ФП	-	-	-
19	1-2	-	-	-	2	-	-	-	ФП	-	-	-
20	1-2	-	-	-	1,5	-	-	-	ФП	-	-	-
21	1-2	-	-	-	1,5	-	-	-	ФП	-	-	-

Примечание:
1 ФП – фибробластоподобные;
2 ЭП – эпителиоподобные;
3 « - » - пассажи еще не проводились.

Как видно из данных таблицы 1, в целях получения пересеваемых клеток с тестикулярными клетками ягнят и козлят проведены 21 и 17 пассажей, соответственно, а с клетками из почек ягнят и козлят – 12 и 9, соответственно. За проведенные сроки пассажей адгезивные свойства всех 4-х видов культур клеток не изменились и не менее 50% тестикулярных клеток ягнят и козлят прикреплялись к поверхности стекла матрасов за 1-2 суток, а такое же количество почечных клеток этих же животных за 2-3 сутки. Индекс пролиферации на первых пассажах был сравнительно выше у культуры клеток, приготовленных из клеток тестикул ягнят, который равнялся 3, а аналогичные клетки козлят имел индекс несколько ниже, который составил 2,5. У клеток культур, приготовленных из почек ягнят и козлят, индекс пролиферации был низкий и равнялся у обеих культур клеток 2.

В процессе пассажей у тестикулярных клеток ягнят, начиная с 16 пассажа, индекс пролиферации снизился, и до 19 пассажа он составил 2, а на 20 и 21 пассажах рост клеток замедлился еще больше и кратность размножения не превышал 1,5. У клеток аналогичного органа козлят пролиферативная активность заметно не изменялась до 13 пассажа, а в последующих четырех их рост замедлился, и индекс пролиферации снизился с 2,5 на 1,5. У клеток почек ягнят и козлят за проведенные 12 и 9 пассажей, соответственно, индекс пролиферации был невысокий и

оставался без изменений, который постоянно составлял 2.

На протяжении всех пассажей морфологическая структура клеток не изменялась и тестикулярные представляли фибробластоподобный, а почечные – эпителиоподобный характер.

Полученные результаты принудительной адаптации клеток к непрерывному росту вне организма показывают, что начиная с 14 -16 пассажей у клеток тестикулярной ткани ягнят и козлят начинаются функциональные изменения, которые отражаются на их пролиферативной активности снижением индекса. Вероятные дальнейшие изменения в морфофункциональной характеристике культур клеток ожидаются в следующих пассажах, для установления которых и получения популяции одиночных клеток, адаптированных к непрерывному росту in vitro, было проведено их клонирование после 21 пассажа.

Всего получено 7 клоновых клеток путем раздельного культивирования отдельных клеток и популяции (колонии из одной клетки) клеток тестикулярной ткани ягнят в микротрубочках и флаконах Павицкого (рисунок 5, 6). Первая генерация клоновых клеток, которая по общему счету для них являлась 22 пассажем, происходила в микротрубочках. Затем популяцию клеток, которая появилась в результате размножения одной клетки, переносили во флаконы Павицкого и культивировали их до формирования очаговых клеточных колоний очередного 23 пассажного уровня. На данном пассажном уровне из 7 клонов только 4 клона сформировали видимые колонии клеток во флаконе. Поэтому последующие адаптационные пассажи проводили с клетками указанных клонов.

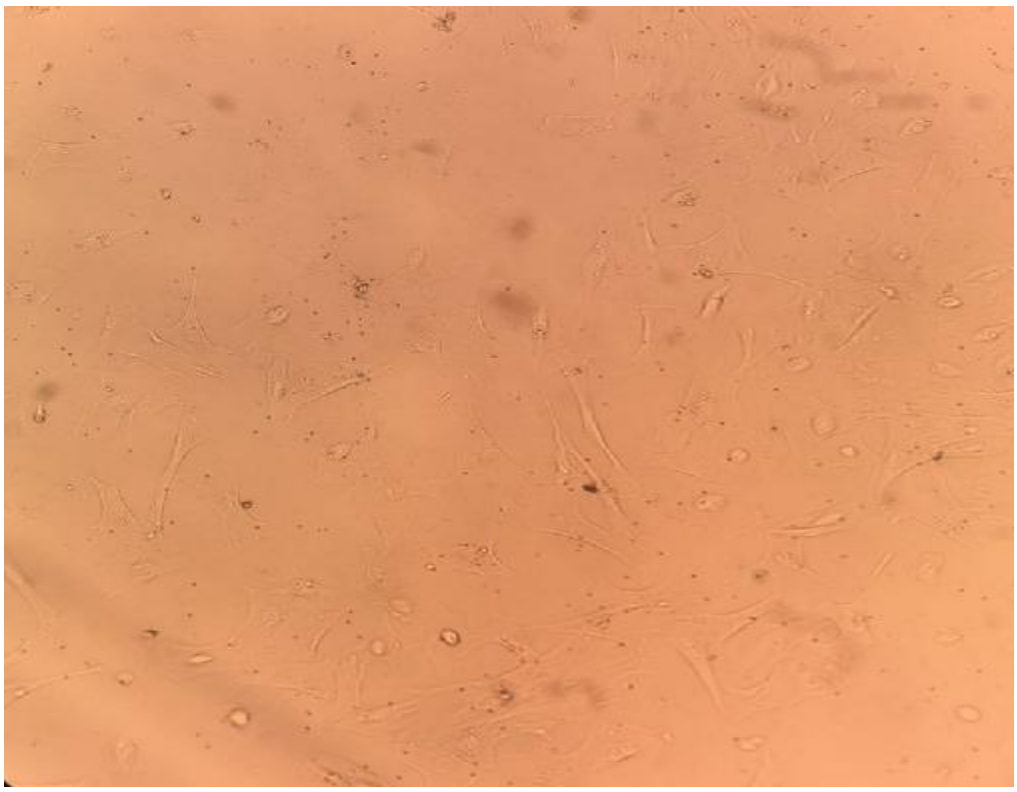

Рисунок 5 - Клоновые клетки тестикулярной ткани ягнят

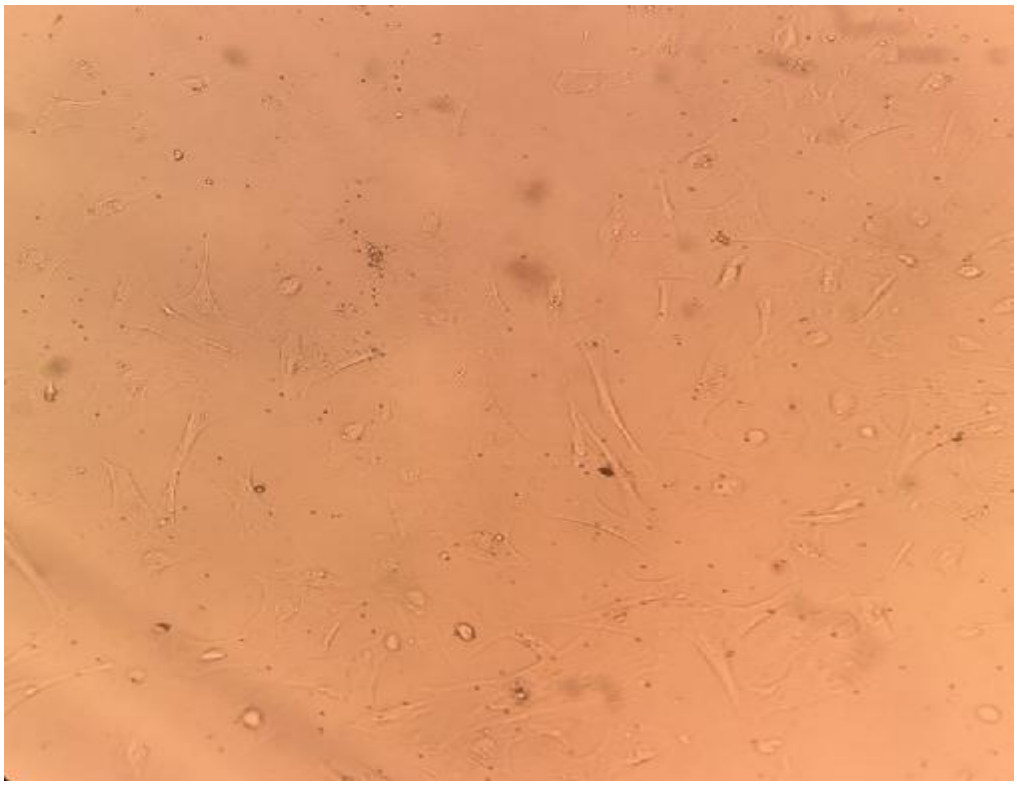

Рисунок 6 - Клоновые клетки тестикулярной ткани ягнят

Результаты размножающего культивирования и оценки их морфофункциональных показателей по пассажам приведены в таблице 2.

Таблица 2 Морфофункциональные показатели клонов пассажных клеток тестикул ягнят

Уровень пассажа	Морфофункциональные показатели клонов клеток тестикул ягнят											
	Адгезия, 50%/сутки				Пролиферация, индекс				Морфология, форма			
	Обозначения клонов				Обозначения клонов				Обозначения клонов			
	ТЯ1	ТЯ2	ТЯ3	ТЯ4	ТЯ1	ТЯ2	ТЯ3	ТЯ4	ТЯ1	ТЯ2	ТЯ3	ТЯ4
24	2	1	1	2	1	2	2	1,5	ФП	ФП	ФП	ФП
25-29	2-3	1	1	2	1	2	2	1	ФП	ФП	ФП	ФП
30-32	-	1	1	-	-	3	2,5	-	-	ФП	ФП	-

Как видно из данных таблицы 2, клоновые популяции клеток под номерами ТЯ1 и ТЯ4 до 29 пассажа имели невысокую адгезивную активность и с 30-го пассажа перестали прикрепляться к поверхности стекла сосуда. В то время как клоновые популяции клеток под номерами ТЯ2 и ТЯ3 обладали хорошей адгезивной активностью и адгезировались к поверхности стекла в течение первой сутки после пересева. При этом отмечено, что в популяции клеток клона ТЯ2 адгезии подвергаются примерно 90%, а клона ТЯ3 – 70%. Их индекс пролиферативной активности с 24 по 30 пассаж стабильно равнялся двум, а в последних 2-3 пассажах указанный индекс увеличился до 2,5 у клона ТЯ3 и до 3 у клона ТЯ2. Несмотря на произошедшие изменения в адгезивной и пролиферативной активности клонов на последних пассажах, их морфологическая характеристика оставалась без нарушений.

Обсуждение полученных данных и заключение

В результате проведенных исследований установлено, что у первичнотрипсинизи-рованных клеток почек и тестикул как ягнят, так и козлят способность к адгезии на культивируемой поверхности матраса неравномерная. Так как часть популяции клеток в течение первых 24 ч прикрепляется к поверхности матраса, а остальная часть остается в суспензии. Но эти клетки, при переносе в другой сосуд прикрепляются к стеклу, но не полностью, также как и при первичном высеве. Получение субкультур клеток из первичной путем пересева и анализ их адгезивности показал, что с пассажами адгезивная активность пересеваемых клеток повышается и, после 5-7 пассажей, к поверхности стекла прикрепляются не менее чем 80% пересеваемых клеток монослоя. Не исключается также увеличение популяции адгезивных клеток за счет селекции таких единиц в процессе пассирования, при котором остаются только адгезивные, а слабо адгезивные или не адгезивные удаляются из матраса при замене питательной среды на

свежую, которое проводится через каждые 3-4 дня. Из приведенных данных можно заключить о том, что в процессе пассирования пересевами состав культуры клеток подвергается естественной селекции, подвергаясь очищению от слабо адгезивных и не адгезивных популяций клеток. Такому селекционному процессу в наших исследованиях подверглись все 4 вида культур клеток и у них стабилизировались показатели адгезивности после 3-5 пассажей.

Результаты наблюдения за пролиферативной активностью культур клеток показал, что у тестикулярных клеток этот показатель оставался стабильным до 13 (ТК) и 15 (ТЯ) пассажей. После указанного количества генераций пролиферативная активность у этих культур клеток снизилась от 3 до 2 (ТЯ) и от 2,5 до 1,5 (ТК), свидетельствовавшая об истощении физиологических возможностей клеток, которые заложены организмом животного-донора.

На этапе снижения пролиферативной активности из культуры клеток ТЯ, приготовленной в 7 матрасах, были забракованы 5. Клетки культуры подвергались вакуолизации, приобретали зернистость в цитоплазме. К 20-21 пассажам у культуры клеток ТЯ индекс ростовой активности снизилась до 1,5.

В дальнейшем с целью выделению отдельных клеток, способных к пролиферации сравнительно активно, было проведено клонирование популяции тестикулярных клеток ягнят. Результаты культивирования клоновых клеток показали, что среди них имеются две популяции клеток, которые приобрели способность пролиферировать с индексом, равным с показателем пролиферации первичных клеток тестикул ягнят. Указанные клоны клеток после 30 пассажей имели пролиферативный индекс 2,5-3, т.е. ростовая их активность увеличилась в два раза. Полученная тенденция к повышению пролиферативной активности свидетельствует о том, что в популяциях этих клеток произошли генетические сдвиги, которые кодируют возможность активного роста.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при многократном последовательном пассировании у культур клеток, приготовленных из тестикулярной ткани ягнят, изменяются адгезивные и пролиферативные свойства. На первых порах эти изменения характеризуются стабилизацией адгезивности и пролиферативности, затем через определенные пассажи, при стабильной адгезивности, снижается их пролиферативная активность. Принудительное дальнейшее пассирование с клонированием отдельных клеток дает возможность получить популяции клеток, способных вновь активизировать свои пролиферативные свойства.

У культур клеток, приготовленных из почек ягнят, тестикул и почек козлят,

вследствие немногочисленности проведенных пассажей, заметные изменения в морфофункциональных показателях не отмечены.

Для получения субстрата-продуцента, способного непрерывно расти in vitro, и продуцировать вирус нодулярного дерматита, необходимо продолжить пассирование культуры клеток из тестикул ягнят.

Список литературы

1. Сюрин В.Н. Руководство по ветеринарной вирусологии [Культивирование клеток тканей животных] - М. Колос, 1966. - 680 с.

2. Шумилова И.Н. Лабораторная практика [Культивирование вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота в перевиваемых линиях культур клеток] / С.В. Кононова, Б.Л. Манин, Н.В. Коропова, А.В. Кононов. – М. 2017, - С. 53-57.

3. Сюрин В.Н. Вирусные болезни животных [Нодулярный дерматит] / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. - М.: ВНИТИБП, 1998. - 928 с.

4. Кутумбетов Л.Б. Технологические основы изготовления вакцин против оспы овец, оспы коз и оспы птиц [Культивирование вирусов оспы животных и птицы] : дис…докт. вет. наук: 16.00.03: защищена 26.08.10: утв. 16.06.11 / Кутумбетов Л.Б. - А., 2010. - 340 с. - Библиогр.: с. 201-207.

5. Майхин К.Т. Технология изготовления вакцины против оспы овец из аттенуированного штамма «КазНИВИ» с использованием перевиваемой культуры клеток [Поддержание субстрата для репродукции вирусов оспы овец] : дис…канд.вет.наук: 16.00.03: защищена 12.08.03: утв. 09.06.04 / Майхин К.Т. - А., 2003. - 97 с.

6. Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). Epidemiol. Infect. (2001), 126, 317-321. United Kingdom. Cambridge University.

7. Tuppurainen E.S.M., Lubinga J.C., Stoltsz W.H., Troskie M., Carpenter S.T., Coetzer J.A.W., Venter E.H., Oura C.A.L. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Rhipicephalus appendiculatus male ticks. Epidemiol. Infect. (2013), 141, 425-430. United Kingdom. Cambridge University.

8. Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. Medical and Veterinary Entomology (2003), 17, 294-300.

9. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, 2012. 7 th Ed. Vol. 1. Chap. 2.4.14. P. 762-774.

10. Tuppurainen E.S. M., Venter E.H., Coetzer J.A. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. Onderstepoort J.Vet.Res. 2005; 72(2): 153-164.

REFERENCES

1. Syurin V.N. Guidelines for Veterinary Virology [Cultivation of animal tissue cells] - M. Kolos, 1966. - 680 p.

2. Shumilova I.N. Laboratory practice [Cultivation of bovine nodular dermatitis virus in transplantable cell culture lines] / S.V. Kononov, B.L. Manin, N.V. Koropova, A.V. Kononov. - M. 2017, - p. 53-57.

3. Syurin V.N. Viral diseases of animals [Nodular dermatitis] / V.N Syurin, A.Ya. Samuylenko, B.V. Soloviev, N.V. Fomin. - M .: VNITIBP, 1998. - 928 p.

4. Kutumbetov L.B. Technological basis for the manufacture of vaccines against sheep pox, smallpox goats and smallpox birds [Cultivation of animal pox viruses and birds]: dis ... dr. vet sciences: 16.00.03: it is protected 26.08.10: utv. 16.06.11 / Kutumbetov L.B. - A., 2010. - 340 p.

5. Maykhin K.T. The technology of making a vaccine against sheep pox from an attenuated KazNIVI strain using a transplantable cell culture [Maintaining a substrate for the reproduction of sheep pox viruses]: dis ... kand. vet sciences: 16.00.03: it is protected 12.08.03: utv. 09.06.04 / Maykhin K.T. - A., 2003. - 97 p.

6. Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). Epidemiol. Infect. (2001), 126, 317-321. United Kingdom. Cambridge University.

7. Tuppurainen E.S.M., Lubinga J.C., Stoltsz W.H., Troskie M., Carpenter S.T., Coetzer J.A.W., Venter E.H., Oura C.A.L. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Rhipicephalus appendiculatus male ticks. Epidemiol. Infect. (2013), 141, 425-430. United Kingdom. Cambridge University.

8. Chihota C.M., Rennie L.F., Kitching R.P., Mellor P.S. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. Medical and Veterinary Entomology (2003), 17, p. 294-300.

9. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris, 2012. 7 th Ed. Vol. 1. Chap. 2.4.14. p.762-774.

10. Tuppurainen E.S. M., Venter E.H., Coetzer J.A. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. Onderstepoort J.Vet.Res. 2005; 72(2): p.153-164.

АҒЗАДАН ТЫС IN VITRO ЖАҒДАЙЫНДА ҚОЗЫ МЕН ЛАҚ БҮЙРЕГІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ АТАЛЫҚ БЕЗДЕРІ ЖАСУШАЛАРЫН ДАМЫЛСЫЗ ӨСУГЕ БЕЙІМДЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ

Кутумбетов Л.Б,
Мырзахметова. Б.Ш.

«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ШИК РМК ҚР ҒБМ ҒК, Жамбыл облысы, Қордай ауданы

ТҮЙІН

Нодулярлы дерматит вирусын өндіруге жарамды дамылсыз көбейгіш жасуша өсіндісін алу мақсатында жүргізілген зерттеулерде қозы мен лақ бүйрегі және осы төлдердің аталық бездерінің алғаш трипсинделген жасушалары қолданылды. Дамылсыз in vitro жағдайында өсуге бейімдеу үшін олар температурасы 37 ^{o}С жағдайда көп қайтара сеуіп өсіру әдістері арқылы белгілі сан пассаждарынан өтті. Жасалынған пассаждау мен өсіру барысында жасуша жиынтықтарын бағалау нәтижелерінің арқасында аталық без жасулары фибробласттық морфологияға ие екені және олардың бүйрек жасушаларына қарағанда жабысу, көбею қабілеттері жоғары екені анықталды.

Қозы мен лақ аталық бездері жасушаларының 14 және 16 пассаждан кейін көбею қабілеттері айтарлықтай төмендегені байқалды. Бірақ, қыштарлай пассаждаудың және клондау жұмыстарының арқасында пролиферативтік қабілеті жоғары екі клондық жасуша популяциясы бөлініп алынды. Алынған нәтижелер қайтара өсіру пассаждарының ықпалымен in vitro жағдайында өсуге бейімдеу арқылы қажетті дамылсыз өскіш жасуша өсіндісін алуға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: алғашқы жасуша өсндісі, дамылсыз өсетін жасушалар, трипсиндеу, қайта себу, морфология, пролиферация, жабысу, пассаждау, бейімдеу

THE RESULTS OF FORCED ADAPTATION OF THE CELLS OF THE TESTICLES AND KIDNEY LAMBS AND GOAT KIDS TO CONTINUOUS GROWTH IN VITRO

Kutumbetov L.B., Myrzakhmetova B.Sh
Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan
Science Committee
«Scientific-research Institute for Biological Safety Problems»

SUMMARY

In studies for obtaining continuously transplanted cells culture - substrate-producer of the virus lumpy skin disease, a primary culture of cells from the tissues of the kidneys and testicles of lambs and goat kids was used. To adapt to growth under conditions of undeveloped in vitro, they went through certain numerical passages using multiple cultivation methods at 37°C.

The results of passages and evaluation of cell populations in the process of cultivation showed that testicular cells have fibroblast-like morphology, a relatively large adhesive and proliferative activity. After 14 and 16 passages in testicular cells of lambs and goats proliferative activity decreased significantly. After further forced passages and cloning, two clone populations of testicular cells

of lambs were obtained, which were characterized by increased proliferative activity. Further passages and adaptation to reproduction in vitro can allow to obtain the desired cell line.

Key words: primary cells, transplanted cells, trypsinization, transplanting, morphology, proliferation, adhesion, passages, adaptation.