



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91485** (13) **U**

(51) МПК (2014.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 9/76 (2006.01)

C12N 7/00

A61K 39/00

A61K 39/135 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 15479**

(22) Дата подання заявки: **30.12.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.07.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2014, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Клестова Зінаїда Сергіївна (UA),
Савінова Ірина Віталіївна (UA),
Білоконь Валерій Іванович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)**

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПЕРВИННИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ХРЕБЕТНИХ ХОЛОДНОКРОВНИХ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб отримання первинних культур клітин холонокровних хребетних тварин, запропонований для використання в галузі ветеринарної медицини, вірусології, діагностики, біотехнології включає нові технологічні прийоми, що складаються із відбору органів (донорів клітин) дорослих рептилій, використання культуральних середовищ 199 та ДМЕМ у співвідношенні 1:1, попередню обробку культурального посуду шляхом додавання сироватки ВРХ, проведення триразової трипсинізації без фільтрування гомогенату клітин, вирощування клітин за умови витримування у термостаті, що дозволяє економити час, матеріали та підвищує ростові здатності клітин у культурі і слугує створенню нових біологічних моделей для ізолювання і культивування вірусів, при отриманні їх від рептилій, резервуарами яких останні є в природних умовах.

UA 91485 U

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, вірусології, діагностики, біотехнології та може бути використана при детекції вірусів, збудників інфекцій як холоднокровних тварин, так і інфекцій, спільних для людей та теплокровних тварин, що сприятиме розробці заходів переривання епізоотичного та епідеміологічного процесів та можлива для застосування при тестуванні різних лікарських засобів.

Пошук ефективних біологічних систем, чутливих до збудників вірусних інфекцій - один із шляхів успішного виявлення небезпечних патогенів, що можуть викликати вірусні захворювання у людей і тварин. З одного боку, це сприятиме створенню ефективних діагностичних тестів, з іншого боку - отриманню врожаю вірусів, достатнього для вивчення їх біологічних та молекулярно-генетичних характеристик та виявлення відмінностей і особливостей реплікації, інфекційних властивостей і встановленні можливості їх застосування у розробці нових біотехнологій для використання у вакцинології при створенні нових ефективних профілактичних та лікувальних заходів проти вірусних інфекцій людей та тварин.

Культури клітин - одна із біологічних систем, яку застосовують у вірусологічній практиці, що дозволяє проводити успішну роботу з виділення вірусів-збудників захворювань, діагностики, а також для накопичення значної вірусної маси при виготовленні вакцин і діагностичних препаратів.

Це особливо стосується застосування первинно-трипсинізованих культур клітин, вважаючи на їх доступність і високу чутливість до вірусів, особливо до польових ізолятів. В зв'язку з тим, що в інфекційній патології тварин значне місце займають вірусні захворювання, важливим є розширення, для отримання культур клітин, діапазону тканин тваринного походження.

Завдяки культивуванню клітин можливості досліджень і діагностики розширюються майже безмежно, так як є можливість оцінки не тільки морфологічних і біохімічних змін, але і змін в поведінці клітин, їх реакції на різні агенти, в тому числі і на лікарські препарати. Клітинні лінії застосовують для тестування і вивчення механізму дій різних речовин, які можуть бути використані як лікарські препарати, детергентів, косметичних засобів, інсектицидів, консервантів. Результати, отримані на культурах клітин не можна екстраполювати на цілий організм, але якщо результати відтворюються у декількох лініях культивованих клітин, то слід чекати ефекту і на весь організм.

Теоретично любі клітини можуть бути введені у культуру та слугувати засобом та об'єктом у багатьох медико-біологічних дослідженнях. Але, практично не завжди можливо отримати клітини, що ростуть у культурі. Це залежить від багатьох факторів. В тому числі і від осмотичного тиску, який у теплокровних та холоднокровних тварин різний, від вимог до поживних речовин у середовищі, факторів росту і т. ін. В основному відомо з наукової літератури про отримання культур клітин теплокровних тварин, методики для яких розроблені і застосовуються.

Вірусні хвороби, якими хворіють холоднокровні тварини та переносниками або резервуарами яких вони можуть бути - є майже недослідженим та актуальним питанням, що ставить сьогодні перед сучасною вірусологією. Дослідження вірусів рептилій - порівняно новий напрямок науки, що почав швидко розвиватись упродовж кількох останніх десятиріч [1-6]. На сьогоднішній день відомо, що представники усіх класів рептилій можуть бути проміжними господарями або резервуарами небезпечних патогенів [7, 6]. Від цих тварин було виділено та описано велику кількість вірусів [2, 4, 5, 6]. Серед них представники родин арбовірусів, тогавірусів, аденовірусів, герпесвірусів та флавівірусів, які можуть інфікувати людей та інших ссавців, а також птахів [3, 4, 6, 8, 22, 23]. Багато досліджень свідчать, що арбовіруси володіють величезним патогенним потенціалом. У останні 20-30 років під впливом демографічних, соціально-економічних та екологічних факторів склалась унікальна сукупність умов, які, як ніколи раніше, сприяли підсиленню епідемічного потенціалу цілого ряду арбовірусів (вірусу жовтої лихоманки, лихоманок Західного Нілу, Денге, Чикунгунья), а також їх розповсюдженню на території, де вони раніше не зустрічались і де виникають інтенсивні епідемії [1, 9, 35, 36]. Науково доведено, що найрізноманітніші представники родини арбовірусів можуть інфікувати будь-які види рептилій [6]. Вплив певної температури може призводити до розвитку віремії у цих тварин. Останні дослідження демонструють, що деякі арбовіруси персистують в організмі рептилій взимку. Це фактор, який може відігравати значну роль у епідеміології інфекцій, викликаних цими та іншими вірусами [3, 7, 9, 10]. Дослідження, проведені вченими декількох університетів штату Алабама, свідчать, що холоднокровні хребетні можуть слугувати резервуарними господарями вірусу східного енцефаломієліту коней (Eastern equine encephalomyelitis (EEE)), вірусу японського енцефаліту та ін. [6, 7, 11].

Також від рептилій ізолювали і *Ranavirus* наприкінці 90-х років XX ст. На даний час ранавірусна інфекція серед амфібій набула загрозливого масштабу та занесена до списку МЕБ

[19]. У 2005 р. групою Marschang [17, 18] від цвіркунів та рептилій було виділено генетично ідентичні штами ірідовірусів (Iridoviridae). Представники родини Adenoviridae, що викликають захворювання у птахів та ссавців, описані, також у рептилій і найбільш вірогідно, філогенетично походять від рептилій [12-15]. Крім того, є повідомлення про виділення рабдовірусів від австралійських ящірок. Ці віруси реплікувались в клітинних лініях рептилій [10], амфібій, але розмножувались краще в культурах клітин ссавців.

Згідно з останніми дослідженнями дедалі частішають випадки ураження аденовірусами неспецифічних господарів [10, 14].

Інтерес до збудників, що можуть інфікувати як холоднокровних, так і теплокровних господарів, зосереджений переважним чином на ролі рептилій у епідеміології захворювань, викликаних даними родинами вірусів. Також слід зазначити важливість дослідження вірусних захворювань рептилій для ветеринарних спеціалістів, які лікують таких пацієнтів, для населення, яке тримає вдома цих тварин, а також з наукової точки зору при дослідженні таксономічної приналежності та при вивченні еволюції вірусів.

В Україні питання дослідження вірусних хвороб, якими можуть хворіти чи бути переносниками рептилій, не вивчене, так як і немає клітинних ліній рептилій для досліджень та виділення вірусів від таких холоднокровних тварин. Але, як відомо, для успішних вірусологічних досліджень з виявлення та надійної ідентифікації необхідні чутливі культури клітин до збудника. Такими клітинами можуть бути як первинні культури клітин різних тканин холоднокровних тварин (в тому числі і рептилій), так і субкультури та їх перещеплювані лінії клітин.

У світі в науковій літературі є повідомлення про культури клітин рептилій, які застосовувались з різною метою, наприклад для астронавтики, при вивченні процесів старіння астронавтів при польотах на далекі відстані у Всесвіті та при дослідженні відновлювальних процесів тканин [24, 25]

Були повідомлення про успішне культивування меланомacroфагів, гепатоцитів та фібробластів, отриманих від черепах [26, 27]. Фібробласти отримували від молодих та старих мулових жовтих черепах (*Kinosternon flavescens*), від споріднених короткоживучих видів черепах та від коробчастої мальованої (прикрашеної) (*Terrapene ornata*) і від (*Chelydra serpentina*) - двох довго живучих черепах. Фібробласти від черепах видів *Kinosternon*, *Chelydra*, *Terrapene* та розмальованої північноамериканської черепахи (*Chrysemys picta*) з природніх популяцій досліджував Хрістіансен [28], починаючи з 1973 р.

Також відомо з літературних джерел про методику одержання клітинних ліній із шкіри черепах, взятої при біопсії з ноги або хвоста [29, 30]. Незважаючи на окремі повідомлення про культури клітин рептилій [31-34], вони описували виведення культур від інших видів тварин та і з інших органів, та із застосуванням інших реагентів і методик, що відрізняє наші дослідження від аналогів.

Крім того, процес отримання первинних культур клітин у наших дослідженнях відрізняється від аналогів цілим рядом методологічних прийомів як за методом отримання клітин із органів холоднокровних тварин, так і підготовки культурального посуду, прописом культурального середовища.

Оскільки виділення та дослідження вірусів рептилій було обмежене тим, що бракувало культур клітин, в яких можливо було б культивувати збудники вірусних хвороб, як найближчий аналог вирано повідомлення, опубліковане у 2012 році, про отримання первинної культури клітин з м'якої оболонки ембріонів черепах [25]. Так, в аналогу, дослідники обрали як донорів первинних клітин черепах виду *Pelodiscus sinensis*. Вони застосовували середовище L-15 з додаванням антибіотиків (10,000 ОД/см³ пеніциліну і 10,000 мг/см³ стрептоміцину). Проводили десятиразове фільтрування через нейлонові фільтри після двохвилинної обробки 0,25 % розчину трипсину. Гомогенат центрифугували при 18 g протягом 3 хвилин. Інкубували клітини у T-25 флаконах та у 24-луночних планшетах за умови 5 % CO₂ (інкубатора) та при + 25 °C. Автори обрали три середовища як оптимальні для росту клітин при + 37 °C: MEM, L-15, RPMI 1640, з додаванням 10 % фетальної сироватки ВРХ. Посівна концентрація 1 × 10000 клітин/см³.

Задачею запропонованої корисної моделі є створення способу отримання первинних культур клітин хребетних холоднокровних тварин для виведення нових біологічних систем, чутливих до збудників, придатних для виділення вірусів холоднокровних тварин (в т.ч. рептилій) та тих, що вражають і теплокровних.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб отримання первинних культур клітин хребетних холоднокровних тварин включає відбір органів (донорів клітин) дорослих рептилій, використання культуральних середовищ 199 та ДМЕМ у співвідношенні 1:1, попередню обробку культурального посуду шляхом додавання сироватки ВРХ, проведення триразової трипсинізації без фільтрування гомогенату клітин, вирощування клітин за умови витримування в термостаті.

У дослідженнях використані:

Холоднокровні хребетні тварини:

1. Хамелеон пантеровий (*Furcifer pardalis*) - один з найбільш розповсюджених видів, що утримується як домашній улюбленець, але, зазвичай, завозиться нелегально.

2. Ящірка прудка (*Lacerta agilis*) - типовий представник української герпетофауни, широко розповсюджена по усій території Європи.

3. Черепаха середньоазійська (*Testud horsfieldii*) - один з найбільш розповсюджених домашніх улюбленців, імпортується на територію України з країн Середньої Азії.

З пантерового хамелеона одержано клітини нирок, серця, яйцеводів, яєчників. З ящірки прудкої - клітини серця, нирок, яєчників, тестикулів. З черепахи середньоазійської отримали клітини серця, легенів.

Поживні середовища і розчини.

Оскільки клітини в умовах життя *in vitro* виходять із під впливу нейрогуморальної регуляції організму, вони дуже чутливі до несприятливих факторів зовнішнього середовища, потребують дотримання суворої асептики і забезпечення стерильних умов, вимогливі до складу і якості поживного середовища, не переносять присутності в ньому токсичних речовин, чутливі до зміни pH, температурного режиму тощо.

Для вирощування клітин в культурі застосовують спеціальні поживні середовища і збалансовані сольові розчини, щоб після вивільнення клітин із тканин чи організму і розміщення їх у культуру культуральне середовище забезпечувало всі зовнішні умови, які клітини мали в системі *in vivo*. Це забезпечує виживання клітин, їх проліферацію і диференціювання. За кількістю та якістю компонентів поживні середовища значно різняться між собою. Гарними ростовими якостями володіють середовища, які вміщують всі необхідні компоненти, весь спектр поживних речовин для росту та виживання клітин. При використанні як підтримуючого середовища для первинних клітин застосовують середовища без добавок, а з додаванням сироватки - як ростове середовище для клітин, що розмножуються.

Оскільки нормальне функціонування культури клітин тварин висуває певні вимоги до рідких поживних середовищ, а також до газоподібної (концентрації газів) та твердої фази (поверхні субстрата), ми відпрацювали ці етапи при отриманні нових первинно-трипсинізованих культур клітин холоднокровних тварин.

Так, нами встановлено, що найкращими середовищами для ведення культур клітин холоднокровних тварин є стандартні середовища (але у певних пропорціях): середовище 199 та DMEM. Середовище 199 (pH 7,2-7,4) - багатокомпонентне середовище, яке широко застосовують для культивування первинно-трипсинізованих і перещеплюваних культур клітин теплокровних тварин та ссавців. Як відомо, середовище 199 розроблене у 1950 році.

Середовище Дульбекко DME або DMEM (подвійна модифікація середовища Ігла). Використовується для культивування клітин різних типів, в тому числі нетрансформованих клітин. Воно є основою для без сироваткових середовищ, вміщує подвійну концентрацію амінокислот, гліцерин, серин, піруват, залізо.

Для оптимального росту клітин ми додавали до середовища фетальну (ембріональну) сироватку BPX.

Як відомо, до головних функцій сироватки належать: забезпечення гормональними факторами, що стимулюють ріст клітин і їх функції; забезпечення факторами прикріплення і розпластування клітин; забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди, тощо. Один і той же тип клітин може бути стимульованим різними ростовими факторами.

Нами встановлено, що оптимальний склад культурального середовища для вирощування первинно-трипсинізованих культур клітин хребетних холоднокровних тварин є: суміш середовищ DMEM та 199 у пропорції 1:1 (виробник "Біо Тест Лабораторія", Україна), з додаванням 0,04 мг/мл гентаміцину сульфату (виробника "ПАТ Артеріум", Україна) та 20 % ембріональної сироватки BPX (виробник "Sigma Chemical Co., USA"), прогрітої при + 56 °C протягом 1 години.

Використані нами поживні середовища, сольові розчини і сироватка великої рогатої худоби, які застосовували для культивування клітин були перевірені на стерильність, були прозорими і без осаду, не виявляли токсичного ефекту.

Відомо, що багато тваринних клітин, перш ніж розпочати проліферацію і утворювати клітинний моношар, повинні прикріпитись до субстрату і розпластатись на ньому. В зв'язку із цим постає питання про підходящий матеріал культурального посуду. Як субстрат використовують декілька матеріалів. Наприклад, скло та пластик. Але, відомо, що деякі види скла, наприклад натрійсилікатне скло, можуть залужнювати середовище і його необхідно

спеціально обробляти. Такою обробкою є кип'ятіння в розчині слабкої кислоти перед застосуванням. Але, з кожним використанням придатність такого скла падає. Іншим субстратом, на якому вирощують культури клітин є пластик. Частіше за все використовують пластик з полістиролу, полікарбонату, полівінілхлориду, тефлону та інші.

5 Клітини прикріплюються до культурального посуду за рахунок електростатичних взаємодій, тому їх поверхня має бути змоченою та від'ємно зарядженою. Цього можливо досягти хімічною обробкою закислюючими агентами чи фізичним впливом (високовольтним зарядом, ультрафіолетовим світлом, бомбардуванням високоенергетичними електронами).

10 Як субстрат для вирощування клітинних ліній був використаний скляний та пластиковий стерильний культуральний посуд (у двох варіантах - попередньо оброблений та необроблений):
 - пластикові (полістиролові) культуральні флакони Т-25 (виробника "Sarstedt", Німеччина);
 - скляні культуральні матраси Т-25 (ємністю 50 мл, українського виробника).

15 Для покращення якості субстрату для прикріплення та вирощування клітин, нами застосований методологічний прийом передобробки культурального посуду. Він заключався в тому, що цю обробку (підготовку посуду) здійснювали шляхом додавання у культуральний посуд інактивованої сироватки крові ВРХ (виробник "Біо Тест Лабораторія", Україна), яку витримували в ньому впродовж двох тижнів перед посівом клітин за температури +4 °С.

Заявлений спосіб одержання клітинних ліній реалізували наступним чином.

20 Для отримання клітинної суспензії відбирали внутрішні органи без видимих патанатомічних змін, вміщували у стерильну чашку Петрі, подрібнювали скальпелем на шматочки 3-4 мм³. Подрібнену тканину тричі відмивали до якомога більш повного знекровлення р-ном Хенксу з додаванням 0,08 мг/см³ гентаміцину сульфату, після чого переносили у стерильну колбу з магнітиком для трипсинізації. У колбу з шматочками тканини додавали 0,25 % розчин трипсину з протеолітичною активністю в межах 65-80 ОД, підігрітий до температури +32-37 °С у такій кількості, щоб тканина була покрита рідиною на 1,5-2,0 см та ставили на магнітну мішалку. При отриманні первинно-трипсинізованих культур клітин холоднокровних тварин нами відпрацьовані наступні режими трипсинізації: холодова (за температури +4 °С протягом 16-18 год.) і теплова (за температури +37 °С. Цикл трипсинізації повторювали не менше 3-х разів, кожні 15-30 хв., зливаючи клітинну суспензію у стерильний флакон та додаючи до тканини свіжий розчин трипсину). Тканини рептилій з невідомих причин важко піддаються трипсинізації (при застосуванні обох її методів). Досить тривалий час (20 хв. та більше) необхідний для отримання клітинної суспензії з тканин під час трипсинізації. Кращі результати виявлені при застосуванні теплової трипсинізації (при +37 °С, на середніх обертах мішалки, щоб не допускати піноутворення). Для ослаблення пошкоджуючого впливу трипсину у порції клітинної суспензії, що зливають, додають до 1/2 за об'ємом повного ростового середовища. Отриману клітинну суспензію необхідно центрифугувати при 100g (протягом 5 хв.), надосадову рідину відбирати, отриманий осад ресуспендувати у повному поживному середовищі. Враховуючи велику кількість тканини, що піддається трипсинізації, фільтрування відібраної суспензії клітин не проводити. Відбирати пробу для проведення підрахунку клітин у камері Горяєва за загальноприйнятою методикою. Посівна концентрація клітин становить приблизно 10⁶ кл/см³, яку розливають у культуральні флакони по 7-10 см³ у кожен та інкубують. Як ростове середовище необхідно використовувати середовище DMEM та 199 у співвідношенні 1:1 з додаванням 20 % фетальної сироватки крові великої рогатої худоби.

45 Первинні культури клітин інкубували у термостаті (не у CO₂ інкубаторі) за різних варіантів температур: +28 °С, +30 °С, +35 °С+37 °С.

50 На другу добу після отримання клітинних ліній (трипсинізації) у всіх матрасах проводили заміну середовища. Середовище, з суспензією клітин, що не прикріпились до субстрату зливали у центрифужні пробірки, осаджували при 100 g, надосадову рідину використовували як кондиціоноване середовище, клітини, що залишились ресуспендували у розчині трипсину 0,25 % впродовж 3-5 хв. Після чого ресуспендували у повному поживному середовищі і висівали у нові матраси.

55 В перші кілька діб після отримання (при +35 та +37 °С) у матрасах спостерігаються острівці росту клітин різної морфології в одному матрасі. Здебільшого це були клітини, що можна було охарактеризувати як фібробласто- або епітеліоподібні, з рівними краями, прозорі, без включень чи вакуолізації. При інкубуванні через 2-3 тижні у матрасах почали переважати клітини певної морфології: дуже дрібні фібробластоподібні. За первинними культурами вели тривале (біля 5 місяців) спостереження.

60 Впродовж декількох перших місяців культивування не проводили пасажів отриманих культур клітин, а лише заміну середовища (за ступенем його закислення) на свіже: один раз на три тижні. При інкубуванні культур було відмічено зміну морфології клітин моношару в окремому

культуральному посуді: в одних стали переважати епітеліоподібні клітини, в інших з'явилися острівці фібробластоподібних клітин.

Початок експоненціального росту було зафіксовано з третього по п'ятий тижні. Моношар у матрасах утворювався на 1-3 місяць культивування за температури +35 - +37 °C, та майже на 4 місяць за температури +30 °C.

Клітинні лінії від середньоазійської черепахи та ящірки прудкої росли однаково як за +35 °C, так і за +37 °C і лише трохи повільніше за +30 °C. Моношар клітин, що утворювався, був дуже щільним з орієнтованими зонами росту уніморфних фібробластоподібних клітин, межі між якими майже не видно.

У підготовленому - обробленому попередньо (за запропонованим способом) культуральному посуді кількість клітин, що прикріпилася та дала острівці росту, була приблизно на 40 % більшою, ніж при використанні не підготовленого за нашою методикою посуду.

У скляному необробленому (за запропонованим способом) посуді клітини прикріплювались та росли краще, ніж у пластиковому необробленому посуді. При цьому у пластикових матрасах середовище дуже швидко залужнювалось, у порівнянні зі скляним культуральним посудом.

Час утворення моношару за однакових умов культивування суттєво відрізнявся у різних клітинних лініях. Найшвидший ріст спостерігався у клітинних лінях, отриманих з легень та серця усіх видів тварин, у підготовлених (оброблених за нашою методикою) матрасах за температури +35-37 °C. Найповільніший ріст за цих умов - у клітинних лінях тестикулів та яєчників від усіх трьох видів тварин. Первинна культура клітин, отримана з нирок та тестикулів ящірок прудких переживає при +28 °C до 16 діб.

Таким чином, встановлено, що за запропонованим способом, оптимальними умовами отримання та культивування первинних клітинних клітин холоднокровних тварин визначено наступні: температурний режим за +35-+37 °C, склад культурального середовища: DMEM та 199 у співвідношенні 1:1 (виробника "Біо Тест Лабораторія", Україна) із додаванням 10 % фетальної сироватки ВРХ (виробника фірми "Sigma Chemical Co., USA"); за використання культурального скляного посуду, попередньо підготовленого за нашою методикою (шляхом витримування у ньому інактивованої сироватки крові ВРХ (виробника "Біо Тест Лабораторія", Україна) впродовж двох тижнів перед посівом клітин за температури +4 °C).

Спосіб отримання первинних культур може бути застосований для будь-яких видів холоднокровних хребетних тварин. Дані клітинні лінії можуть слугувати джерелом матеріалу для досліджень у галузях вірусології, генетики, еволюції та інших видів досліджень.

Запропонований спосіб отримання первинно-трипсинізованих клітин холоднокровних хребетних тварин відрізняється від аналога низкою відмінностей. По-перше, видом вибраних тварин-донорів для отримання клітин (в нашому способі - Хамелеон пантеровий (*Furcifer pardalis*), Ящірка прудка (*Lacerta agilis*), Черепаха середньоазійська (*Testud horsfieldii*), а не черепах виду *Pelodiscus sinensis*, як в аналогу. По-друге, видом тканин, які вибрані як донори клітин: в аналозі вибрані ембріон черепахи (причому, клітини з м'якої оболонки). У запропонованому способі використовують як донорів органи дорослих тварин (нирки, серце, легені, тести кули, яєчники і т. ін.). По-третє: в запропонованому способі встановлено, що оптимальним ростовим середовищем є комбінація середовищ 199 та ДМЕМ у пропорції 1:1, а в аналогу інші середовища - MEM, L-15, RPMI 1640. По-четверте: встановлено, що оптимальним є застосування антибіотику гентаміцину сульфату, а не суміші пеніциліну із стрептоміцином, як запропоновано в аналозі. По-п'яте, в запропонованому способі використовують трикратний цикл трипсинізації без фільтрування гомогенату клітин, а в аналозі застосована десятиразова обробка розчином трипсину з подальшим фільтруванням через нейлонові фільтри. Застосування запропонованих наших способів трипсинізації (холодової та теплової) економить час проведення процедур та призводить до економії (за рахунок відсутності застосування десяти нейлонових фільтрів (на одну культуру клітин) для фільтрації гомогенату клітин). По-шосте, в аналозі і в наших дослідженнях застосовані різні режими центрифугування отриманого кінцевого гомогенату клітин. По-сьоме, в нашому способі використана для покращення якостей матриксу для прикріплення клітин, проведення попередньої обробки культурального посуду шляхом додавання у нього до посіву клітин інактивованої сироватки ВРХ з подальшим двотижневим витримуванням при +4 °C. Цей прийом дозволив покращити до 40 % здатність клітин до прикріплення до субстрату та підвищити їх ростові властивості. Таким чином, запропонований прийом щодо попередньої обробки посуду дозволяє використовувати для культивування клітин не тільки пластиковий, а і скляний посуд, що при наявності в лабораторіях скляного багаторазового культурального посуду дозволяє економити кошти за рахунок не придбання пластикового одноразового посуду. По-восьме, застосовано спосіб культивування клітин із застосуванням термостату, а не CO₂-інкубатора, що дозволило використовувати як

пластиковий, так і скляний культуральний посуд. Крім того, це здешевлює процес культивування, оскільки не потребує дорогого обладнання, як CO₂-інкубатор, а також призводить до ще однієї економії - не потребує затрат на використання та постійну заміну CO₂, а також тому і не потребує балонів для CO₂. По-дев'яте: оптимальна температура культивування +25 °C в інкубаторі. При дотриманні запропонованої технології у способі температурний режим може бути іншим, при якому клітини добре культивуються.

Таким чином, запропонований спосіб отримання первинно-трипсинізованих культур клітин холоднокровних хребетних тварин має ряд переваг перед аналогами, від яких відрізняється щонайменше за дев'ятьма відмінностями.

ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ:

1. Буаро М.И. Бумбали С. Трофимов Н.М. Зайцева В.Н. и др. Новые и вновь появляющиеся арбовирусные инфекции: лихорадка чикунгунья// Медицинские новости. - 2008. - № 15. - С. 12-16.
2. Васильев Д.Б. Швед В.С. Вирусные болезни рептилий // Научные исследования в зоологических парках. - 2007. - № 22. - С. 182-215.
3. Ahne W. Viruses of Chelonia. //Zentralbl Veterinarmed B. - 1993. - 40(1). - P. 35-45.
4. Ariel E. Viruses in reptiles.//Vet. Res. - 2011. - 42:100. Doi: 10.1186/1297-9716. - P. 42-100.
5. Jacobson E. Infection diseases and pethology of reptiles, CRC Press Taylor & Francis Group. - New York.
6. Marschang, Rachel E. Viruses Infecting Reptiles [Electronic resource] // Viruses. - 2011 November; 3(11): 2087-2126. Mode of access: WWW. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3230843/>. - Title from the screen.
7. Klenk K. Snow J. Morgan K. Bowen R. et al. Alligators as WHV amplifiers// Emerg. Infect. Dis. - 2004. - 10(12). - P. 34-42.
8. Fhiel H., Collett M., Gould E. et all. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevir Academic Press: Amsterdam, Netherlands. - 2005. - p.
9. Jacobson Elliott R., Ginn Pamela E., Troutman Mitchell., Farina Lisa., Stark Lillian., etc. West Nile Virus infection in fermed American alligators (alligator mississippiensis) in Florida //Journal of Wildlife Diseases. - 2005. - 41(1). - pp. 96-106.
10. Clark Fred H. Growth and Attenuation of Rabies Virus in Cell Cultures of Reptilian Origin// Experimental Biology Medicine. - 1972. - vol.139. - P. 14-18.
11. Karstad L. Reptiles as a possible reservoir hosts for Eastern encephalitis virus.// Trans 26th North. Am. Wildlife Conf. - 1961. - p. 186-202.
12. Just, F. Essbauer, S. Blahak, S. Occurrence of an invertebrate iridescent-like virus (Iridoviridae) in reptiles//J. Vet. Med. - 2001. - vol. 48. - pp. 685-694.
13. Cupp, Eddie W. Zhang, Dunhua, Yue Xin, Cupp, Mary S. Guyer Craig. Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in aneastern equine encephalomyelitis virus focus in central Alabama// J. Trop. Med. Hyg. - 2004. - 71(3).- pp. 212-216.
14. Eunice C Chen, Shigeo Yagi, Kristi R. Kelly, Sally P. Mendoza, Nicole Maninger., et al. Cross-Species Transmission of a Novel Adenovirus Associated with a Fulminant Pneumonia Outbreak in a New World Monkey Colony//PLoS Pathogens. - 2011. - 7.(7). - P. 51-59.
15. Komar N. West Nile virus: Epidemiology and ecology in North America //J.Adv. Virus. Res. - 2003. - 61. - P. 185-234.
16. James L. Christiansen, Eric R. Henderson, Brian Budke, Michael Lynch, Quan Lu, and James C. Johnson. / A final report of studies of the hayflick limit in reptiles, a test of potential immortality. - (2001). - Proceedings of the Iowa Space Grant Consortium.
17. Marchang R., Papp T., Weinmann N., Teifke J., Becher P., at al Invertebrate iridoviruses in lizards// Proc. ARAV. - 2005. - pp. 14-15.
18. Marschang R., Becher P... at al. Iridovirus infections in reptiles//Proc. Int. Colloq. PMRA. - 2004. - p. 12-20.
19. Mazzoni Rolando, Jose de Mesquita Albenones, Fleury Luiz Fernando F, at al. Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles Rana catesbeiana from Brazil// Vet. Pathol. - 2010. - 65. - pp. 25-27.
20. Johnson, A.J. Pessier, A.P. Jacobson, E.R. Experimental transmission and induction of ranaviral disease in western ornate box turtles (Terrapene ornate ornata) and red-eared sliders (Trachemys scripta elegans)// Vet. Pathol. - 2007. - 44, - pp. 285-297.
21. Jancovich, J.K. Bremont, M. Touchman, J.W. Jacobs, B.L. Evidence for multiple recent hostspecies shifts among the ranaviruses (family Iridoviridae)//J. Virol. - 2010. - 84. - pp. 636-647.

22. Farkas SL, Benko M., et al., Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply common origin with the members of the proposed new genus *Atadenovirus*// J Gen Virol. 2002. - 83. - pp. 3-10.
23. Harrach B. Reptile adenoviruses in cattle// Acta Vet Hung. - 2000. - 48. - pp. 85-90.
- 5 24. James L. Christiansen, Eric R. Henderson, Brian Budke, Michael Lynch, Quan Lu, and James C. Johnson. / A final report of studies of the hayflick limit in reptiles, a test of potential immortality.- (2001). - Proceedings of the Iowa Space Grant Consortium.
25. Pen-Chen Liu, Chi-Young Wang, Shiun-Long Lin et al. Establishment of a soft shell turtle, *Pelodiscus sinensis*, embryo primary cell culture for studies of soft shell turtle poxvirus-like virus replication and characteristics // African Journal of Microbiology Research. - 2012. - Vol.6(5). - P. 960-967.
- 10 26. Rund C.R., Christiansen J.L., Johnson J.C. In vitro culture of melanomacrophages from spleen and liver of turtles// Comments on melanomacrophage morphology Pigment Cell Res. - 1998. - 11. - P. 114-119.
- 15 27. Johnson, P. T. J., K. B. Lunde, E. G. Ritchie, and A. E. Launer. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship //Science. - 1999. - 284. - P. 802-804.
28. Christiansen, J.L.B.J. Gallaway, and J.W. Bickham... Population estimates and geographic distribution in the yellow mud turtle (*Kinosternon flavescens*) in Iowa //Jour. Iowa Acad. Science. - 1990-97. - P. 105-108.
- 20 29. Koment R.W., Haines H. Characterization of a reptilian epitheloid skin cell line derived from green turtle, *Chelonia mydas* // In Vitro. 1982. - 18. - P. 227-231.
30. Tariq Ezaz, Denis O'Malley, Alexander E. Quinn et al. A simple non-invasive protocol to establish primary cell lines from tail and toe explants for cytogenetic studies in Austrakien dragon lizards//Cytotechnology. - 2008. - 58. - P. 135-139.
- 25 31. Lu Y, Nerurkar VR, Aguirre AA, Work TM, Balazs GH, Yanagihara R. Establishment and characterization of 13 cell lines from a green turtle (*Chelonia mydas*) with fibropapilloma// In Vitro Cell Dev Biol Anim. - 1999. - Jul-Aug.35(7). - P. 389-93.
32. Sultan K.R., haagsman H.P. specific-specific primary cell cultures: a research tool in veterinary science//VetScite. 2001. - 1.P. 1-7.
- 30 33. Mansell J.M., Elliott R.J., Gaskin J.M. Initiation and ultrastructure of a reptilian fibroblast cell line obtained from cutaneous fibropapillomas of the green turtle, *Chelonia mydas* //In Vitro Cell Dev Biol Anim. - 1989. - 25. - P. 1062-1064.
34. MelodyK. Moore, Thierry M.Work, George H. Balazs et al. Preparation, cryopreservation and growth of cells prepared from the green turtle (*Chelonia mydas*) //Methods in Cell Science. - 1997. - 19. - P. 161-168.
- 35 35. Nevarez J., Mitchell, M., Kim D.Y., Poston R., Lampinen H., et al. West Nile virus in alligator, *Alligator mississippiensis*, ranches from Louisiana// H. Hep. Med. Surg. - 2005. - vol. 15. - pp. 4-9.
36. Rivera Sam, Wellehan James F. X, Jr., McManamon Rita, Innis Charles J, Garner Michael M., Raphael Bonnie L., et al. Systemic Adenovirus Infection in Sulawesi Tortoises (*Indotestudo Forsteni*) Caused by a Novel Siadenovirus// J. VET. Diagn. Invest. - 2009. - 21: 415. Mode of access: <http://vdi.sagepub.eom/content/21/4/415>.-Title from the screen.
- 40

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 45 Спосіб отримання первинних культур клітин холоднокровних хребетних тварин, що включає відбір органів (донорів клітин) дорослих рептилій, використання культуральних середовищ 199 та ДМЕМ у співвідношенні 1:1, попередню обробку культурального посуду шляхом додавання сироватки ВРХ, проведення триразової трипсинізації без фільтрування гомогенату клітин, вирощування клітин за умови витримування у термостаті.
- 50

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601