

УДК 619:576.34:57.082.26

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ВНК-21/2-17

М.Н. Гусева<sup>1</sup>, Д.В. Михалишин<sup>2</sup>, А.А. Шишкова<sup>3</sup>, Д.С. Большаков<sup>4</sup>, Б.Л. Манин<sup>5</sup>, М.А. Шевченко<sup>6</sup>

<sup>1</sup> старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: guseva\_mn@arriah.ru

<sup>2</sup> заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shishkova@arriah.ru

<sup>4</sup> старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

<sup>5</sup> ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: manin\_bl@arriah.ru

<sup>6</sup> аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko\_ma@arriah.ru

### РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты исследований оптимизации аминокислотного состава питательных сред, предназначенных для суспензионного культивирования клеток ВНК-21-2/17, путем изменения количества аминокислот, входящих в них.

Установили, что интенсивность прироста в контрольной и опытной питательной среде была 5,6; динамика роста клеток также была одинаковой.

Утилизация различных аминокислот в питательной среде происходила по-разному. Больше всего клетки потребляли глутамина, серина, тирозина, метионина (до 90, 55, 40 и 60% соответственно).

Был отмечен рост аланина (от 10% в контроле и до 60% в опыте). Количество триптофана и глутаминовой кислоты оставалось постоянным. Утилизация глицина, треонина, изолейцина проходила интенсивно первые 24 ч (7–13%, 10–18%, 34–41% соответственно в контроле — опыте). Затем концентрация несколько увеличивалась (на 7–45%, на 16–21%, на 20–50% соответственно в контроле — опыте).

При репродукции ящура в клетках, выросших в опытной и контрольной среде, значимых различий в выходе иммуногенных компонентов вируса не наблюдали.

Ключевые слова: клетки ВНК-21/2-17, аминокислоты, аминокислотный состав, гидролизат белков крови, питательная среда.

UDC 619:576.34:57.082.26

## OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION FOR ВНК-21/2-17 SUSPENSION CULTURE

M.N. Guseva<sup>1</sup>, D.V. Mikhailishin<sup>2</sup>, A.A. Shishkova<sup>3</sup>, D.S. Bolshakov<sup>4</sup>, B.L. Manin<sup>5</sup>, M.A. Shevchenko<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: guseva\_mn@arriah.ru

<sup>2</sup> Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shishkova@arriah.ru

<sup>4</sup> Senior Researcher, Candidate of Science (Chemistry), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

<sup>5</sup> Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: manin\_bl@arriah.ru

<sup>6</sup> post-graduate student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: shevchenko\_ma@arriah.ru

### SUMMARY

The paper demonstrates results of the research aimed at optimization of amino acid composition of the nutrient media used for ВНК-21/2/17 suspension cultivation by change of amino acid amount in such media.

Growth level in the control and tested media amounted to 5.6; cell growth dynamics was also similar.

In-media utilization of different amino acids was different. The cells mostly consumed glutamin, serine, tyrosine, methionin (up to 90%, 55%, 40% and 60%, respectively).

Growth of alanine level was reported (from 10% in the control sample and up to 60% in the test sample). Amount of tryptophan and glutamic acid remained stable. Glycine, threonine, isoleucine were actively utilized within the first 24 hours (7-13%, 10-18%, 34-41%, respectively in the control experiment). Hereafter, the concentration slightly increased (by 7-45%, by 16-21%, by 20-50%, respectively in the control experiment).

During the FMDV reproduction in the cells grown in the test and control media no significant differences in the yield of immunogenic virus components were reported.

Key words: ВНК-21/2-17 cells, amino acids, amino acid composition, blood-derived protein hydrolysate, nutrient medium.

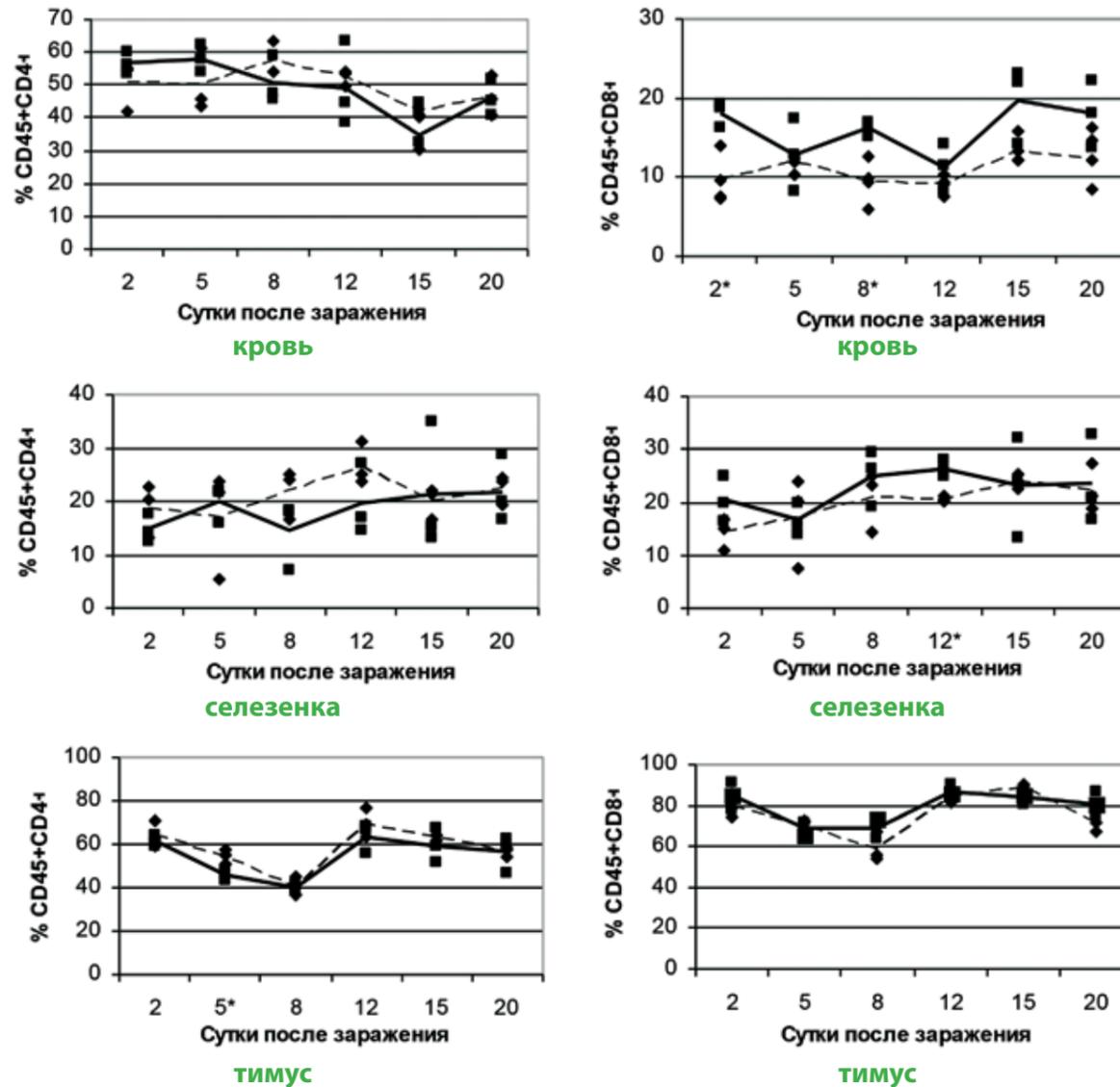


Рис. 5. Динамика относительного количества субпопуляций лимфоцитов цыплят в различные сроки после заражения изолятом МПВ птиц

Отдельные символы представляют процентное количество клеток для индивидуальной птицы:

◆ — из контрольной группы, ■ — из инфицированной группы.

Линии представляют среднее арифметическое значение по группе:

сплошная линия — инфицированная группа, пунктирная линия — контрольная группа.

\* показывает процентное содержание субпопуляций лимфоцитов опытной группы, которые существенно отличались от таковых контрольной группы,  $p < 0.05$ ; Mann-Whitney U-test.

10. Methyltransferase-defective avian metapneumovirus vaccines provide complete protection against challenge with the homologous Colorado strain and the heterologous Colorado strain and the heterologous Minnesota strain / J. Sun, Y. Wei, A. Rauf [et al.] // J. Virol. — 2014. — Vol. 88. — P. 12348–12363.

11. Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated in the United States and comparison with subgroup A and B viruses / H. Shin, K.T. Cameron, J.A. Jacobs [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40 (5). — P. 1687–1693.

12. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV)

reveal a novel APV subgroup / M.H. Băyon-Auboyer, C. Arnauld, D. Toquin, N. Etteradossi // J. Gen. Virol. — 2000. — Vol. 81. — P. 2723–2733.

13. Pathogenic and immunogenic responses in turkeys following *in ovo* exposure to avian metapneumovirus subtype C / R.M. Cha, M. Khatri, M. Mutnal, J.M. Sharma // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2011. — Vol. 140. — P. 30–36.

14. Rautenschlein S. Local and systemic immune responses following infection of broiler-type chickens with avian metapneumovirus subtypes A and B / S. Rautenschlein, Y.H. Aung, C. Haase // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2011. — Vol. 140. — P. 10–22.

**ВВЕДЕНИЕ**

Все питательные среды для тканевых культур конструируются на основе сбалансированного солевого раствора с достаточной буферной емкостью. Чаще всего ими являются растворы Хенкса и Эрла. Неотъемлемым компонентом большинства ростовых сред является сыворотка крови животных (телячья, бычья, лошадиная). Также в состав сред могут входить и субстраты, полученные в результате частичной обработки естественных продуктов (эмбриональные экстракты, гидролизат лактальбумина, гидролизат белков крови, аминокислоты и т.д.), а также синтетические химические чистые вещества (аминокислоты, витамины, соли).

Было установлено, что для роста клеток позвоночных вне организма необходимы 13 аминокислот (изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин, аргинин, глутамин, гистидин, тирозин, цистин) [2, 6].

Все аминокислоты участвуют в биосинтезе разнообразных белков и нуклеиновых кислот. Выполнение аминокислотой той или иной функции in vitro во многом зависит от условий культивирования. Одной из причин необходимости присутствия в среде пяти аминокислот, которые не требуются для целого организма, является ограниченный их синтез в культуре [5].

Некоторые авторы отмечают, что потребность в этих органических кислотах может различаться у клеток различных типов. Часто аминокислоты добавляют для того, чтобы либо компенсировать неспособность неко-

торых клеток синтезировать их, либо для компенсации их утечки в среду. Концентрация аминокислот обычно определяет максимальную плотность культуры, и при достижении равновесия влияет на выживаемость клеток и скорость их роста [16].

Различные аминокислоты потребляются из питательной среды растущими клетками с неодинаковой скоростью. Отмечено, что регулярное добавление аргинина (20–40 мг/дм<sup>3</sup>) и увеличение количества глутамина до 450 мг/дм<sup>3</sup> благоприятствуют росту взвешенных культур [14]. Кроме того, в процессе культивирования аминокислоты, как правило, утилизируются только на 20–25%, при этом pH среды снижается обычно на 0,4–0,7 [8].

Широко распространение получили питательные среды на основе ферментативных гидролизатов, которые эффективны при выращивании различных культур клеток [2–6, 9, 12]. За последние 10–15 лет в биотехнологии сформировано и интенсивно развивается направление, связанное с конструированием питательных сред, содержащих в качестве источников аминокислот ферментативные гидролизаты белков животных и растений [8].

Гидролизаты обычно содержат 16–20 аминокислот в вариabельной концентрации, а также полипептиды разной молекулярной массы [6, 14]. Гидролизат белков крови содержит достаточное количество аминокислот, необходимых для роста клеток ВНК-21/2-17 [4].

Целью нашей работы являлась оптимизация состава питательной среды для суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали:

- клетки ВНК-21/2-17;
- культиваторы металлические рабочим объемом 1800 дм<sup>3</sup> (КМ);
- стандартную питательную среду для выращивания клеток, изготовленную согласно «Промышленному регламенту на производство вакцины против ящура различных типов», в состав которой дополнительно добавляют такие аминокислоты, как глутамин, аргинин, метионин, цистин, тирозин, триптофан, треонин, изолейцин [13].

– опытную питательную среду для выращивания клеток, содержащую в своем составе необходимые соли, гидролизат белков крови (ГБК), аминокислоты аргинин и глутамин в количествах, прописанных в «Регламенте» [13].

Суспензионную культуру клеток выращивали и заражали вирусом также согласно «Промышленному регламенту». Для заражения клеток использовали культуральный вирус ящура штаммов: «Азия-1 Шамир/Израиль 3/89», «О/ПанАзия-2», «А2171/Кабардино-Балкарский-2013».

Количество общего вирусного белка и компонентный состав устанавливали согласно «Методике определения содержания вирусспецифического белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной РСК» [1].

Качественный и количественный аминокислотный состав питательных сред определяли на различных этапах культивирования клеток ВНК-21/2-17 в последнем пассаже перед заражением вирусом ящура.

Концентрацию клеток ВНК-21/2-17 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови, dA0.000.851, которая соответствует ТУ 64-1-816-84 [15].

Величину интенсивности прироста (ИП) рассчитывали как отношение конечной концентрации клеток и исходной в одном пассаже.

Для воспроизведения стандартных условий культивирования (объемы культивируемой клеточной суспензии, барботаж и др.) исследования проводили в шестом пассаже в трех повторностях.

Аминокислоты определяли на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Россия), снабженной УФ-детектором, немодифицированным кварцевым капилляром внутренним диаметром 50 мкм и эффективной длиной 65 см (общая длина 75 см). Применяли гидродинамический ввод пробы при 150 мбархс. Сбор и обработку данных проводили с программным обеспечением «Мультихром» и «Эльфран» (ЗАО «Амперсэнд», Россия) [10].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При изучении аминокислотного состава ГБК и перевара по Хоттингеру, входящих в состав питательных сред [3], было отмечено, что добавление и ГБК, и перевара обогащает среду. Количество некоторых аминокислот увеличивается в 3–5 раз, к среде добавляются заменимые аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутаминовая кислота, пролин и серин, которые отсутствуют в стандартной среде Игла МЕМ (табл. 1).

Следующим этапом работы было исследование возможности культивирования суспензии клеток ВНК-21/2-17 в питательной среде, которая содержала необходимые соли, сыворотку крови и ГБК. К данной питательной среде добавляли только аргинин и глутамин, так как этих аминокислот было недостаточно в ГБК. Результаты исследований представлены на рис. 1, 2.

Из представленных на рис. 1 и 2 данных видно, что через 48 ч кратность прироста и в контроле, и в опыте была 5,6, динамика роста клеток также была одинаковой. Было отмечено, что pH в опытной среде изменялся на 8%, а в контрольной — на 12%, что, вероятно, связано с повышенным содержанием диаминодикарбоновых аминокислот, таких как лизин и гистидин (из ГБК), добавленных глутамина и аргинина.

На следующем этапе работы исследовали изменения аминокислотного состава питательных сред в процессе суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17. Результаты исследований представлены на рис. 3, 3а, 3в, 3с, 3д, 3е.

В начале культивирования клетки разбавляли питательной средой в соотношении 1:5, поэтому содержание аминокислот в питательной среде, содержащей и не содержащей клетки, различалось.

Из представленных данных видно, что в контрольной питательной среде содержание аминокислот в 1,2–2,2 раза было выше, чем в опытной (различия незначимы). Динамика утилизации аминокислот происходила одинаково как в контроле, так и в опыте.

В соответствии с представленными данными очевидно, что утилизация различных аминокислот в питательной среде происходила по-разному. Больше всего клетки потребляли глутамина, серина, тирозина, метионина, фенилаланина, гистидина (до 90, 55, 40, 60, 35 и 42% соответственно). Таким образом, вероятно, имен-

но эти аминокислоты непосредственно или опосредованно влияют на процессы биосинтеза, происходящие в клетках ВНК-21/2-17. Известно, что избыток какой-либо одной аминокислоты оказывает тормозящее влияние на обмен целого ряда других аминокислот. Такое торможение может быть как прямым (в том смысле, что нарушается обмен определенной аминокислоты), так и косвенным [9]. Поэтому избыток аминокислот в контрольной и опытной средах может отрицательно влиять на выживаемость клеток.

Был отмечен рост количества аланина (от 10% в контроле и до 60% в опыте). Количество триптофана и глутаминовой кислоты оставалось постоянным. Утилизация глицина, треонина, изолейцина проходила интенсивно первые 24 ч (7–13, 10–18, 34–41% соответственно в контроле — опыте). Затем концентрация несколько увеличивалась (на 7–45, 16–21 и 20–50% соответственно в контроле — опыте). В предыдущих исследованиях [3] была замечена такая же закономерность в последнем, 6 пассаже.

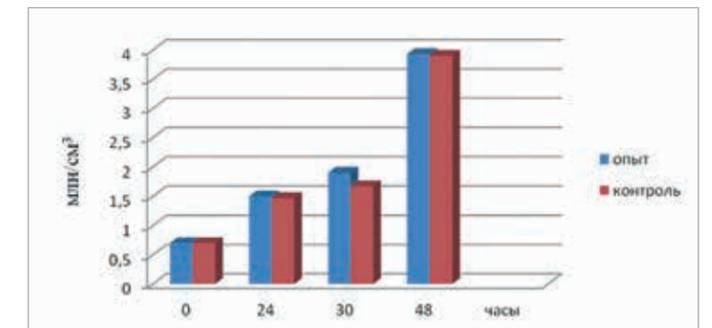
Полученные клетки заражали вирусом ящура следующих штаммов:

1. «О/ПанАзия-2»,
2. «А2171/Кабардино-Балкарский-2013»,
3. «Азия-1 Шамир/Израиль 3/89».

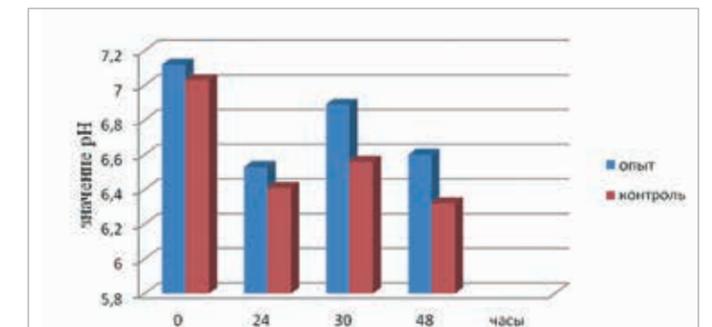
Результаты опытов представлены в табл. 2. В соответствии с представленными данными, мы не наблюдали значимых различий в иммуногенных компонентах вируса при репродукции ящура в клетках, выросших в опытной и контрольной среде (выход 146+75С с 1 млн клеток

**Таблица 1**  
Качественный и количественный аминокислотный состав стандартной среды Игла МЕМ и производственной

№	Аминокислоты	Стандартная Игла МЕМ, мг/дм <sup>3</sup>	Производственная среда, мг/дм <sup>3</sup>
1	аланин	–	120
2	аргинин	126,4	120
3	валин	46,9	300–500
4	гистидин	41,9	250–300
5	глицин	–	58–66
6	глутаминовая кислота	–	30–60
7	изолейцин (в сумме с лейцином)	52,5+52,5	130–160
8	лизин	73,06	160–200
9	метионин	14,9	50
10	пролин	–	60–90
11	серин	–	80–105
12	тирозин	36,22	80–95
13	треонин	47,64	140–175
14	триптофан	10,2	42–58
15	фенилаланин	33,02	100–110
16	цистин	31,3	90–140
17	глутамин	292,3	510



**Рис. 1.** Динамика роста клеток ВНК-21/2-17 при культивировании в среде без дополнительных аминокислот



**Рис. 2.** Динамика изменения водородного показателя ионов при выращивании клеток ВНК-21/2-17 в среде без дополнительных аминокислот

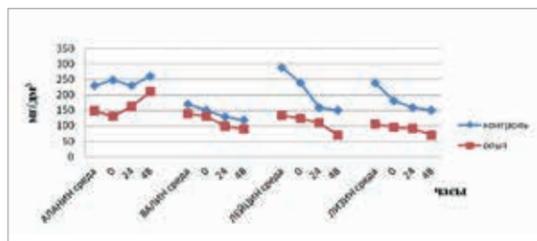


Рис. 3. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по аланину, валину, лейцину, лизину)

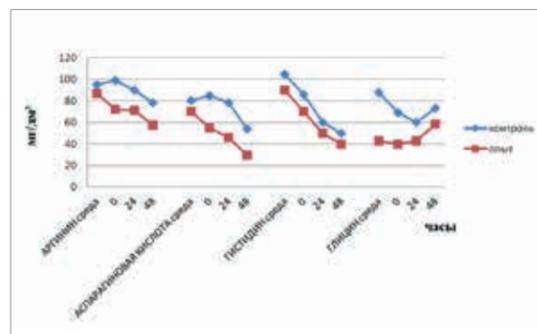


Рис. 3а. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по аргинину, аспарагиновой кислоте, гистидину, глицину)

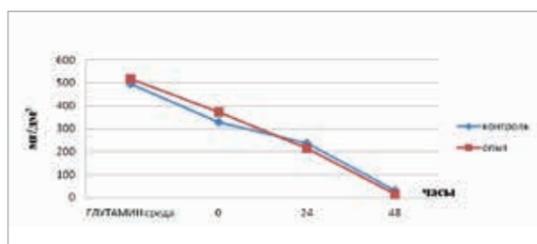


Рис. 3в. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по глутамину)

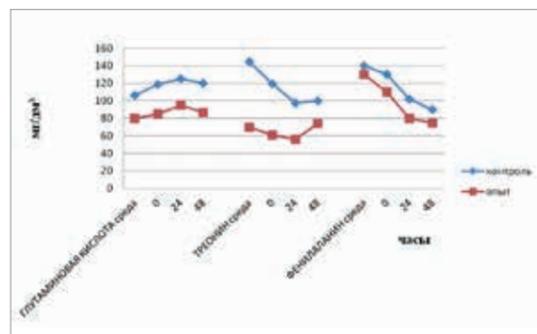


Рис. 3с. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по глутаминовой кислоте, треонину, фенилаланину)

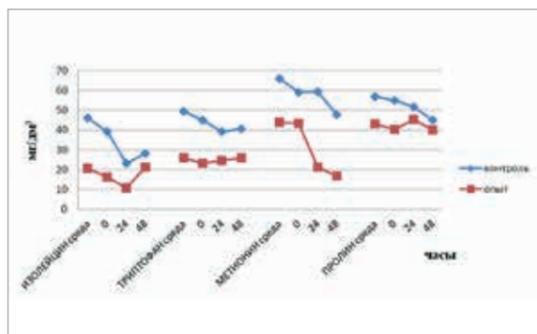


Рис. 3д. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по изолейцину, триптофану, метионину, пролину)

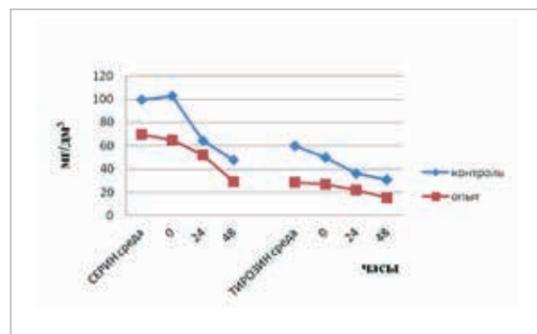


Рис. 3е. Динамика изменения аминокислотного состава питательной среды (по серину и тирозину)

варьировался у разных штаммов с 0,22 до 0,86 мкг/см<sup>3</sup> Не было различий ни во времени репродукции вируса (14–17 ч), ни в процентах пораженных клеток (78–90%).

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, проведена попытка оптимизации состава питательной среды для суспензионного культивирования культуры клеток ВНК-21/2-17 путем изменения количества аминокислот, входящих в нее.

В среду дополнительно добавляли только глутамин и аргинин и исключали такие аминокислоты, как

метионин, цистин, тирозин, триптофан, треонин, изолейцин.

Установлено, что интенсивность прироста клеток была идентичной и в контрольной, и в опытной питательной среде; динамика роста клеток также была одинаковой.

Снижение количества аминокислот в питательной среде не оказывало отрицательного воздействия на репродукцию клеток и вируса. Количественная характеристика аминокислотного состава ГБК позволяет оптимизировать состав питательной среды.

Таблица 2

Влияние модифицированной питательной среды при выращивании суспензии клеток ВНК-21/2-17 на репродукцию вируса ящура

Среда	Штаммы вируса ящура	Конц-я клеток, млн/см <sup>3</sup>	Количество вирусного белка, мкг/см <sup>3</sup>			% пораж. кл.	Время репродукции вируса, ч
			После инакт. и очистки	146+75S, % к общему	146+75S с 1 млн		
Опыт	О/ПанАзия-2	3,5	1,83	1,53 (83,7)	0,44	78	17
	A2171/Кабардино-Балкарский-2013	3,1	1,20	0,62 (50,5)	0,20	89	16,5
	Азия-1 Шамир/Израиль 3/89	3,3	2,14	1,95 (91,1)	0,59	90	16
Контроль	О/ПанАзия-2	3,4	1,00	0,83 (83,4)	0,22	85	16
	A2171/Кабардино-Балкарский-2013	3,1	1,04	0,62 (59,2)	0,20	87	16
	Азия-1 Шамир/Израиль 3/89	3,5	3,29	3,00(93,2)	0,86	89	14

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Бондаренко А.Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. — Суздаль, 1994. — 92 с.
- Гизитдинов Н.Н. Питательные среды для выращивания культур клеток и вирусов // Достижения науки и техники. — 1992. — № 6. — С. 22–23.
- Гудимо О.С., Колесникова Н.А., Шошиев Л.Н. Культивирование клеток HeLa на питательных средах с гидролизатами сыворотки крови человека и животных // Вопросы вирусологии. — 1961. — № 3. — С. 375–379.
- Доценко В.В. Изготовление и исследование эффективности новых основ питательных сред для культивирования клеток и вирусов // Научные основы промышленного производства ветеринарных биологических препаратов: тез. докл. 5 Всерос. конф. — Щелково, 1996. — С. 36–37.
- Дьяконов Л.П. Культуры клеток животных: современные аспекты биотехнологии и взаимодействия клеток с инъекционными патогенами // Цитология. — 1994. — Т. 36, № 6. — С. 503–504.
- Дьяконов Л.П., Строкина Г.М., Конюхов А.Ф. Гидролизаты молочных мышечных и растительных белков как основы питательных сред для культивирования клеток и вирусов // Цитология. — 1994. — Т. 36, № 6. — С. 522.
- Изучение изменений аминокислотного состава питательных сред в процессе культивирования клеток ВНК-21/2-17 / М.Н. Гусева, Д.А. Лозовой, Е.Г. Кузнецова [и др.] // Ветеринария сегодня. — 2014. — № 3 (10). — С. 35–38.
- Конюхов А.Ф. Метаболические потребности клеточных культур сельскохозяйственных животных и конструирование питательных сред на основе отече-

- ственных компонентов // Ветеринарная иммунология и биотехнология. — 1988. — Т. 66. — С. 125–129.
- Куликова И.Л., Дьяконов Л.П., Жидков С.А. Культура клеток сосудов теленка и чувствительность клеток этой культуры к вирусу диареи крупного рогатого скота // Цитология. — 1992. — Т. 34, № 9. — С. 75.
- М-04-38-2009. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» / ООО «Люмэкс-маркетинг». — СПб., 2014. — (Корма, комбикорма и сырье для их производства). — 49 с.
- Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм. — М.: Бином, 2011. — 633 с.
- Питательная среда для выращивания культур клеток животных: пат. 1025722 СССР, МПК<sup>3</sup> С12N1/00 / Г.Е. Панкова, В.А. Сергеев, Л.П. Дьяконов [и др.]. — заявл. 30.10.81; опубл. 30.06.83, Бюл. № 24.
- Промышленный регламент на производство вакцины против ящура сорбированной моно- и поливалентной (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21) / ФГБУ «ВНИИЗЖ». — Владимир, 2012. — 243 с.
- Строкина Г.М. Конструирование питательных сред для культивирования клеток животных на основе гидролизатов белков сыворотки молока // Питательные среды и сыворотки для культивирования клеток: тез. докл. Всесоюз. конф., Кольцово, 14–17 окт. 1991. — Новосибирск, 1991. — С. 12.
- ТУ 64-1-816-84. Камеры для счета форменных элементов крови и клеточных элементов спинно-мозговой жидкости. — С. 5.
- Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — 691 с.