

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ВНК-21/2-17 И КОЛИЧЕСТВО ИММУНОГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ВИРУСА ЯЩУРА

М. А. Шевченко¹, М. Н. Гусева², Д. А. Лозовой³, М. И. Доронин⁴, Д. В. Михалишин⁵, В. В. Михалишин⁶

¹ Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

² Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

³ Директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁴ Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: doronin@arriah.ru

⁵ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: michalishin_dv@arriah.ru

⁶ Главный эксперт ИАЦ, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: mihalishin@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Исходным сырьем для приготовления гидролизата белков крови служит цельная кровь животных, ее сгустки и другие отходы сывороточного производства. Отмечена зависимость продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17 от сезона заготовки сырья для гидролизата. Гидролизат белков крови из сырья, полученного в летние месяцы, стимулировал рост клеток в 1,2–1,3 раза больше по сравнению с гидролизатом, изготовленным в осенне-зимний период (различия существенны, $p < 0,001$). Количество иммуногенных компонентов вируса ящура из «летнего» гидролизата белков крови было больше в 1,3–1,6 раза по сравнению с полученным в другие сезоны года (различия существенны, $p < 0,001$). Найдена прямая зависимость между продуктивностью клеточной линии ВНК-21/2-17, концентрацией иммуногенных компонентов вируса ящура и сезонной динамикой содержания следующих аминокислот, входящих в гидролизат белков крови: аланина, аспарагина, валина, гистидина, глицина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, пролина, серина, тирозина, треонина, триптофана, фенилаланина. Для увеличения продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17 и концентрации иммуногенных компонентов вируса ящура предложено в культуральную ростовую среду для выращивания суспензионной культуры клеток в осенне-зимний период наряду с гидролизатом белков крови дополнительно добавлять некоторые аминокислоты.

Ключевые слова: гидролизат белков крови, аминокислоты, месяцы года, продуктивность, иммуногенные компоненты вируса ящура.

UDC 619:578.835.2:57.082.26: 612.124

INFLUENCE OF CHANGES IN AMINO ACID COMPOSITION OF BLOOD PROTEIN HYDROLYSATE ON THE PRODUCTIVITY OF BHK-21/2-17 CELL LINEAGE AND AMOUNT OF FMDV IMMUNOGENIC COMPONENTS

M. A. Shevchenko¹, M. N. Guseva², D. A. Lozovoy³, M. I. Doronin⁴, D. V. Mikhailishin⁵, V. V. Mikhailishin⁶

¹ Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shevchenko_ma@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: guseva_mn@arriah.ru

³ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

⁴ Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: doronin@arriah.ru

⁵ Head of the Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: michalishin_dv@arriah.ru

⁶ Chief Expert, Information and Analysis Centre, Doctor (Veterinary Medicine), Professor FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: mihalishin@arriah.ru

SUMMARY

The raw material for blood protein hydrolysate preparation is whole animal blood, its clots and other serum production wastes. The dependence of BHK-21/2-17 cell lineage productivity on the season of hydrolysate raw material preparation was observed. Cell growth stimulated by blood protein hydrolysate from raw material prepared in summer months 1.2–1.3 times exceeded cell growth stimulated by blood protein hydrolysate prepared in autumn-winter period (differences are significant, $p < 0,001$). The amount of FMDV immunogenic components from “summer” blood protein hydrolysate 1.3–1.6 exceeded the amount obtained during other seasons of the year (differences are significant, $p < 0,001$). There was found a direct correlation between BHK-21/2-17 cell lineage productivity, concentration of FMDV immunogenic components and seasonal dynamics of the contents of the following amino acids composing blood protein hydrolysates: alanin, asparagine, valine, histidine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, proline, serine, tyrosine, threonine, tryptophane, and phenylalanine. To increase BHK-21/2-17 cell lineage productivity and concentration of FMDV immunogenic components it was suggested to add some additional amino acids into the culture growth medium for suspension cell culture in autumn-winter period together with blood protein hydrolysate.

Key words: blood protein hydrolysate, amino acids, months of the year, productivity, FMDV immunogenic components.

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия в биотехнологии сформировано и интенсивно развивается направление, связанное с конструированием питательных сред, содержащих в качестве источников аминокислот ферментативные гидролизаты белков животных и растений [5, 7].

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, 10].

Белковые гидролизаты представляют собой продукты расщепления протеина до аминокислот и простых пептидов. Гидролизаты обычно состоят из аминокислот с вариабельной концентрацией, а также пептидов разной молекулярной массы [4, 8]. Гидролизат белков крови (ГБК) содержит достаточное количество аминокислот, необходимых для роста клеток линии ВНК-21/2-17 [6].

Все аминокислоты участвуют в биосинтезе разнообразных белков. Выполнение аминокислотой той или иной функции *in vitro* во многом зависит от условий культивирования клеток. Одной из причин необходимости присутствия в среде аминокислот, которые не требуются для целого организма, является их ограниченный синтез в культуре [4, 11].

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

рых клеток синтезировать их, либо для компенсации их утечки в среду [13].

Различные аминокислоты потребляются из культуральной среды растущими клетками с неодинаковой скоростью. Отмечено, что регулярное добавление аргинина (20–40 мг/дм³) и увеличение количества глутамина до 450 мг/дм³ повышали интенсивность роста у взвешенных культур [12]. Кроме того, в процессе культивирования аминокислоты, как правило, утилизируются только на 20–25%, при этом pH среды снижается обычно на 0,4–0,7 единицы [7].

ГБК является сырьем для изготовления ростовых сред при культивировании суспензии клеток ВНК-21/2-17 [6, 9], но, к сожалению, в литературе практически не встречаются данные о влиянии сезонных изменений аминокислотного состава ГБК на продуктивность и концентрацию иммуногенных компонентов вируса ящура.

Целью работы было изучение влияния изменений аминокислотного состава ГБК в зависимости от сезона заготовки сырья на продуктивность клеточной линии ВНК-21/2-17 и количество иммуногенных компонентов вируса ящура.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. В работе использовали суспензионную перевиваемую культуру клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17).

Культивирование клеток. Клетки выращивали согласно «Промышленному регламенту на производство вакцины против ящура различных типов» в металлических культиваторах с рабочим объемом до 1800 дм³.

Гидролизат белков крови. В процессе культивирования клеток использовали гидролизат белков крови жидкий, полученный из ООО НПП «Биохимсервис».

Вирус ящура. Для заражения использовали культуральный вирус ящура типов А, О, Азия-1.

Определение концентрации и жизнеспособности клеток. Концентрацию клеток линии ВНК-21/2-17 в суспензии определяли с помощью камеры Горяева для счета форменных элементов крови. Жизнеспособность оценивали путем учета количества живых клеток с использованием 1%-го водного раствора трипанового синего.

Определение продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17. Продуктивность рассчитывали как отношение конечной концентрации клеток к исходной в одном пассаже.

Рис. 1. Продуктивность суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК

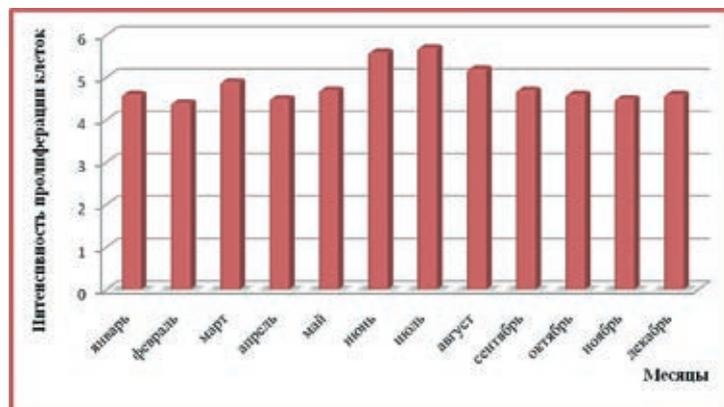


Таблица 1

Продуктивность суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК

Показатель	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
Продуктивность средняя (M)	4,6	4,4	4,9	4,5	4,7	5,6	5,7	5,2	4,7	4,6	4,5	4,6
Стандартная ошибка ($\pm m$)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Количество опытов (n)	119	72	115	95	88	107	80	24	85	89	85	84

Измерение концентрации общего вирусного белка и компонентов вируса ящура осуществляли в соответствии с «Методикой определения содержания вирусспецифического белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной РСК» [1].

Оценку аминокислотного состава ГБК проводили в соответствии с методикой М-04-38-2009 «Корма, комбикорма и сырье для их производства. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза “Капель”».

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки полученных результатов вычисляли значение средней арифметической и ее ошибку. Степень различия между средними двух выборок оценивали с помощью критерия Стьюдента (*t*), который представлял собой отношение разности между средними к ошибке этой разности. Для характеристики линейной корреляции между двумя признаками вычисляли коэффициент корреляции (*R*), который может принимать значение от +1 до -1 в зависимости от тесноты связи. При полной прямой корреляции *R* = 1, при полной обратной *R* = -1. Когда корреляция отсутствует, коэффициент близок к 0. Как правило, величина *R* в интервале 0,20–0,30 свидетельствует о наличии слабой, 0,50–0,60 – средней, 0,80–0,90 – сильной (тесной) корреляции между признаками [3].

Уровень значимости отражал степень достоверности полученных данных и показывал вероятность случайного возникновения исследуемых показателей; в опытах его коэффициент составлял не более 0,05 (5%) [3].

Цифровой материал статистически обрабатывали на персональном компьютере общепринятыми методами вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях, проведенных ранее, изучали зависимость аминокислотного состава ГБК от сырья, полученного в разные сезоны года. Отметим, что содержание аминокислот менялось по сезонам. Пик, как правило, приходился на летние месяцы, когда их количество увеличивалось в 1,2–2,3 раза, а в осенне-зимний период оно понижалось в 1,2–1,4 раза (различия существенны, *p* < 0,05). Пик роста для глутаминовой и аспарагиновой кислот приходился на ноябрь, когда их количество было в 1,4 раза больше, чем в предыдущие месяцы (*p* < 0,01).

Таким образом, отмечали прямую зависимость динамики содержания аминокислот в ГБК и физиолого-биохимических показателей крови крупного рогатого скота (КРС) (так как для приготовления ГБК исходным сырьем являлась цельная кровь КРС, ее сгустки и другие отходы сывороточного производства) от сезонов года.

На данном этапе работы определяли продуктивность клеточной линии ВНК-21/2-17 в суспензии с исследуемым ГБК. Гидролизат белков крови из сырья, заготовленного в летние месяцы, стимулировал рост суспензии клеток в 1,2–1,3 раза больше по сравнению с остальными сезонами года (различия существенны, *p* < 0,001) (табл. 1, рис. 1).

Выявлена корреляция между продуктивностью и динамикой сезонного колебания содержания аминокислот в ГБК (табл. 2). Коэффициент корреляции изменялся в пределах от -0,367 до 0,947, что свидетельствовало о слабой, средней или тесной зависимости между признаками. Корреляционной связи между содержанием аргинина, аспарагиновой кислоты и продуктивностью клеток не обнаружено. Глутаминовая кислота имела обратную слабую корреляцию с продуктивностью (*R* = -0,367). Пролин, аспарагин, изолейцин, метионин, серин, тирозин имели среднюю степень корреляции с продуктивностью, при этом *R* составлял

Рис. 2. Концентрация иммуногенных компонентов вируса ящура при репродукции в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК

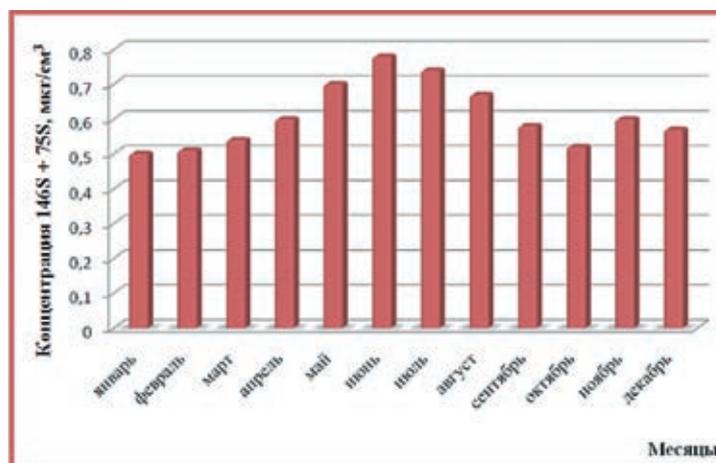


Таблица 2

Концентрация иммуногенных компонентов вируса ящура при репродукции в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17 в зависимости от месяца заготовки сырья для ГБК

Показатель	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
Концентрация 146S + 75S в 1 млн клеток (мкг/см³), среднее (M)	0,50	0,51	0,54	0,60	0,70	0,78	0,74	0,67	0,58	0,52	0,60	0,57
Стандартная ошибка (±m)	0,02	0,03	0,02	0,13	0,04	0,03	0,03	0,05	0,04	0,02	0,04	0,04
Количество опытов (n)	116	80	129	119	85	102	73	28	78	91	80	86

Таблица 3
Корреляция между динамикой сезонного колебания состава аминокислот в ГБк, продуктивностью клеток ВНК-2/2-17 и количеством иммуногенных компонентов вируса ящура

Аминокислота	Содержание, мкг/см ³												R1	R2
	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь		
Аланин	5638,9	4908,0	6463,3	4426,9	5457,0	7274,3	7272,7	5785,0	5265,9	5956,3	5531,1	5664,4	0,863	0,566
Аргинин	1702,2	1867,3	1134,2	1326,2	1772,5	1768,9	1607,8	1653,3	2300,0	1366,1	2030,0	2756,0	-0,189	-0,006
Аспарагин	2068,8	1768,6	1497,2	2458,6	2190,0	2967,7	2705,7	2296,7	2153,8	2258,1	2225,2	2171,4	0,621	0,772
Аспарагиновая кислота	4028,1	4677,9	6889,6	3126,9	3282,5	3898,2	4269,2	4000,0	4278,1	4391,1	6361,7	4786,1	-0,124	-0,356
Валин	5565,9	5022,0	6112,5	4767,7	5489,5	7689,2	7380,1	5863,3	5364,4	6184,9	5554,6	5875,2	0,884	0,646
Гистидин	3525,2	3146,7	3663,3	2929,2	3496,0	4661,9	4506,7	3603,3	3295,0	3802,2	3614,6	3641,6	0,854	0,657
Глицин	2535,6	2144,0	2610,8	2153,8	2555,5	3642,4	3534,2	2990,0	2577,5	2742,1	2571,8	2548,0	0,947	0,768
Глутаминовая кислота	4563,0	5558,7	5529,2	3673,8	3577,0	4045,5	4475,0	4295,0	4953,8	5231,4	7315,9	5286,4	-0,367	-0,465
Изолейцин	1152,9	1074,3	884,7	1015,6	652,7	1490,4	1570,6	1096,7	1121,3	1120,5	972,9	1177,8	0,681	0,383
Лейцин	7711,7	6845,7	7046,3	8090,0	7413,3	10308,0	10443,6	7120,0	7085,6	7640,5	7500,8	7977,4	0,780	0,717
Лизин	6655,6	5684,0	7320,4	5288,5	6803,0	8935,0	9011,5	7833,3	6504,4	7660,7	6774,3	6818,8	0,893	0,651
Метионин	1509,6	1192,7	1553,3	1538,5	1971,0	1824,5	1758,1	1458,3	1320,0	1379,3	1301,1	1396,8	0,595	0,746
Пролин	2037,0	1784,1	2471,7	1957,7	2213,5	2867,8	2864,6	2630,0	2206,9	2492,5	2896,4	3163,6	0,499	0,452
Серин	3701,9	3408,7	3965,4	3071,8	3803,2	4293,3	4510,5	4491,7	3886,3	4185,0	4166,8	4285,6	0,651	0,461
Тирозин	871,5	693,3	1248,3	640,8	930,0	1102,2	1204,7	1433,3	943,8	1238,6	1019,6	1004,8	0,598	0,313
Треонин	3671,9	3282,0	4457,1	3225,4	3987,0	5021,4	5208,5	4998,3	3772,5	4700,4	3931,8	3892,5	0,855	0,607
Триптофан	1157,8	1112,1	1205,4	1043,8	1116,0	1528,8	1443,7	1470,0	1107,5	1395,0	1188,2	1124,0	0,819	0,567
Фенилаланин	4541,5	4107,3	4952,9	3791,5	4708,0	5748,5	6019,0	4790,0	5061,3	4967,1	4967,5	5204,4	0,774	0,587

Показатели для корреляционного анализа

$C_{146S+75S}$ в 1 млн клеток (МКГ/СМ ²)	0,5	0,51	0,54	0,6	0,7	0,78	0,74	0,67	0,58	0,52	0,6	0,57	-	-
Продуктивность клеток	4,6	4,4	4,9	4,5	4,7	5,6	5,7	5,2	4,7	4,6	4,5	4,6	-	-

R1 – коэффициент корреляции между продуктивностью клеток и сезонным содержанием аминокислот в ГБк;

R2 – коэффициент корреляции между концентрацией иммуногенных компонентов вируса ящура и сезонным содержанием аминокислот в ГБк;

$C_{146S+75S}$ – концентрация иммуногенных компонентов 146S и 75S культурального вируса ящура.

0,774–0,947. Остальные аминокислоты, такие как аланин, валин, гистидин, глицин, лейцин, лизин, треонин, триптофан, фенилаланин, имели прямую высокую корреляцию с продуктивностью клеток (R находился в пределах 0,774–0,947).

Обнаружена корреляция между количеством иммуногенных компонентов вируса ящура и динамикой сезонного колебания содержания аминокислот в ГБК. При этом коэффициент корреляции R изменялся в пределах от $-0,356$ до $0,772$, что свидетельствовало о слабой или средней корреляции между признаками. Корреляция между содержанием аргинина и концентрацией иммуногенных компонентов вируса ящура не выявлена. Зависимость выхода $146S + 75S$ -компонентов от количества аспарагиновой и глутаминовой кислот имела обратную слабую корреляцию – R составлял $-0,356$ и $-0,465$ соответственно. Прямую слабую связь между признаками наблюдали также с тирозином, изолейцином, пролином, серином (R находился в пределах $0,313$ – $0,461$). Остальные аминокислоты, такие как аланин, аспарагин, валин, гистидин, глицин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин, имели прямую среднюю корреляцию с выходом иммуногенных компонентов вируса ящура (R составлял $0,566$ – $0,772$).

Гидролизат белков крови из сырья, заготовленного в летние месяцы, стимулировал увеличение концентрации иммуногенных компонентов вируса ящура при репродукции его в суспензии клеток в $1,3$ – $1,6$ раза больше по сравнению с остальными сезонами года (различия существенны, $p < 0,001$) (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, обнаружена зависимость между сезонными колебаниями концентрации аминокислот в ГБК, продуктивностью клеток и количеством иммуногенных компонентов вируса ящура после репродукции в клеточной линии ВНК-21/2-17, выращенной с использованием ГБК (табл. 3). При этом во всех случаях отсутствовала корреляция с аргинином и аспарагиновой кислотой. Для остальных аминокислот наблюдали разную степень зависимости между продуктивностью и концентрацией иммуногенных компонентов вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований изучено влияние сезонного изменения аминокислотного состава гидролизата белков крови на продуктивность клеточной популяции ВНК-21/2-17 и количество иммуногенных компонентов вируса ящура.

Отмечена зависимость продуктивности клеточной линии ВНК-21/2-17 от сезона заготовки сырья для ГБК. Выявлена прямая зависимость между продуктивностью клеточной линии ВНК-21/2-17, концентрацией иммуногенных компонентов вируса ящура и сезонной динамикой изменения содержания аланина, аспарагина, валина, гистидина, глицина, изолейцина, лейцина,

лизина, метионина, пролина, серина, тирозина, треонина, триптофана, фенилаланина, входящих в гидролизат.

Для увеличения продуктивности клеточной популяции ВНК-21/2-17 и концентрации иммуногенных компонентов вируса ящура в культуральную ростовую среду для выращивания суспензионной культуры клеток в осенне-зимний период наряду с ГБК целесообразно дополнительно добавлять такие аминокислоты, как аланин, аспарагин, валин, гистидин, глицин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин, до уровня, сравнимого с их содержанием в сырье, заготовленном в летние месяцы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков: метод. материал. – Суздаль: Влад. НИИ сел. хоз-ва, 1994. – 92 с.
2. Гидролизаты молочных мышечных и растительных белков как основы питательных сред для культивирования клеток и вирусов / Л. П. Дьяконов, Г. М. Строкина, А. Ф. Конюхов [и др.] // Цитология. – 1994. – Т. 36, № 6. – С. 522–524.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
4. Дьяконов Л. П. Культуры клеток животных: современные аспекты биотехнологии и взаимодействия клеток с инъекционными патогенами // Цитология. – 1994. – Т. 36, № 6. – С. 503–504.
5. Ермакова Н. В. Сезонность и технологический стресс в животноводстве // Ученые записки Орловского гос. ун-та. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. – 2014. – № 3 (59). – С. 148–151.
6. 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. – С. 35–42.
7. Конюхов А. Ф. Метаболические потребности клеточных культур сельскохозяйственных животных и конструирование питательных сред на основе отечественных компонентов // Ветеринарная иммунология и биотехнология. – 1988. – Т. 66. – С. 125–129.
8. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 636 с.
9. Оптимизация состава питательных сред для культивирования суспензии клеток ВНК-21/2-17 / М. Н. Гусева, Д. В. Михалишин, А. А. Шишкова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 4. – С. 35–39.
10. Питательные среды для выращивания культур клеток и вирусов / Н. Н. Гизитдинов [и др.] // Достижения науки и техники. – 1992. – № 6. – С. 22–23.
11. Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вирусы и вирусные вакцины. – М: Библионика, 2007. – 524 с.
12. 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.
13. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практ. руководство. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. – 691 с.