

УДК 619:578.835.2:616-076

# ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ПИТАТЕЛЬНОЙ РОСТОВОЙ СРЕДЕ НА РЕПРОДУКЦИЮ КЛЕТОК ЛИНИИ ВНК-21/2-17 И ВИРУСА ЯЩУРА

М.А. Шевченко<sup>1</sup>, М.И. Доронин<sup>2</sup>, Н.Д. Ключкина<sup>3</sup>, А.А. Шишкова<sup>4</sup>, Д.А. Лозовой<sup>5</sup>, Д.В. Михалишин<sup>6</sup>

<sup>1</sup>ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shevchenko@arriah.ru

<sup>2</sup>младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: doronin@arriah.ru

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

<sup>4</sup>главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: shishkova@arriah.ru

<sup>5</sup>директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>6</sup>заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: michalishin\_dv@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения влияния разного количества сыворотки крови крупного рогатого скота на производственный процесс суспензионного культивирования клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура.

Ключевые слова: стерильная сыворотка крови крупного рогатого скота, обработанная полиэтиленгликолем сыворотка крови крупного рогатого скота, питательная ростовая среда, клеточная линия ВНК-21/2-17, репродукция вируса ящура.

UDC 619:578.835.2:616-076

# THE INFLUENCE OF CONCENTRATION OF BLOOD SERUM IN THE NUTRIENT GROWTH MEDIUM ON THE REPRODUCTION OF THE CELL LINE ВНК-21/2-17 AND FMD VIRUS

M.A. Shevchenko<sup>1</sup>, M.I. Doronin<sup>2</sup>, N.D. Klukina<sup>3</sup>, A.A. Shishkova<sup>4</sup>, D.A. Lozovoy<sup>5</sup>, D.V. Michalishin<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Leading Veterinarian, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shevchenko@arriah.ru

<sup>2</sup>Junior Researcher, Candidate of Science (Biology Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: doronin@arriah.ru

<sup>3</sup>Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: klukina@arriah.ru

<sup>4</sup>Chief Technologist, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: shishkova@arriah.ru

<sup>5</sup>Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>6</sup>Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: michalishin\_dv@arriah.ru

## SUMMARY

The paper presents results on the effect of different amount of blood serum of cattle in the production process of the suspension cultivation of cell line ВНК-21/2-17 and FMD virus.

Key words: sterile blood serum of cattle, treated with polyethylene glycol the blood serum of cattle, nutrient growth medium, cell line ВНК-21/2-17, reproduction of the virus of foot and mouth disease.

## ВВЕДЕНИЕ

Для репродукции вируса ящура и получения вирус-содержащего сырья, используемого в производстве противоящурных вакцин, применяют суспензионную перевиваемую культуру клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17).

Суспензионное культивирование клеток линии ВНК-21/2-17 в промышленных масштабах осуществляют с применением питательной ростовой среды, содержащей сыворотку крови крупного рогатого скота (КРС). Сыворотка является источником факторов

роста, липидов, гормонов, солей и других веществ, обеспечивающих пролиферацию и развитие клеток [5–7]. При этом следует отметить, что промышленные серии сывороток существенно отличаются друг от друга, поскольку изготавливаются из крови животных, различающихся по возрасту и массе, половым признакам и породе, физиологическому состоянию организма и типу высшей нервной деятельности, условиям содержания и кормления. Ряд авторов также показал зависимость компонентного состава сыворотки крови КРС от сезона и температуры окружающей среды [8]. Данные факторы оказывают влияние на состав сывороток крови и вызывают существенные отличия их серий по биохимическим показателям, в частности по содержанию аминокислот, белков, липидов, углеводов, гормонов, микро- и макроэлементов [5, 6]. Содержание в питательной ростовой среде данных низко- и высокомолекулярных компонентов сыворотки влияет на пролиферативную активность и рост клеток линии ВНК-21/2-17 [6].

Существенным недостатком сывороток крови КРС является наличие в них ингибиторов роста, оказывающих отрицательное воздействие на процессы культивирования клеток и вируса [3, 6]. Кроме того, одним из факторов, ограничивающих применение сывороток при получении антигена вируса ящура в клетках линии ВНК-21/2-17, является наличие в их составе различных контаминантов и антител ко многим инфекционным агентам животных, в том числе к вирусу ящура, что может приводить к значительному снижению концентрации 146S-компонента вируса ящура и титра его инфекционной активности в культуре клеток ВНК-21/2-17 [9–12]. Для очистки сыворотки от  $\gamma$ -глобулинов, а также контаминирующих агентов Barteling S.J. с соавт. [12] предложили применять полиэтиленгликоль (ПЭГ) (6000 Да). ПЭГ представляет собой нетоксичный водорастворимый синтетический полимер, обладающий способностью неизбирательно связывать протеины [3, 13, 14]. Данная процедура очищения является достаточно трудоемким процессом по сравнению с получением стерильной нативной сыворотки. Кроме того, в научных публикациях приведены достаточно противоречивые сведения о влиянии ПЭГ на пролиферативный потенциал и развитие клеток [1, 5, 6, 13, 14]. Для суспензионного выращивания данной культуры клеток в производственных масштабах используют сыворотку крови КРС, свободную от противоящурных антител.

Цель исследования — оценить влияние содержания в питательной ростовой среде сыворотки крови КРС разной концентрации на производственный процесс репродукции клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточная линия.** В работе использовали суспензионную перевиваемую клеточную линию ВНК-21/2-17, начиная с 7 пассажа, с посевной концентрацией  $(0,7–0,9) \times 10^6$  клеток/мл. Первые 6 пассажей проводили согласно технологическому процессу суспензионного выращивания клеток для дальнейшего культивирования вируса ящура.

**Оценка интенсивности роста и развития клеток.** Количество жизнеспособных клеток подсчитывали под микроскопом с помощью счетной камеры Горяева. Интенсивность роста и развития клеток оценивали по

индексу пролиферативной активности (ИПА), пользуясь формулой:  $ИПА = x/y$ , где  $x$  — общее количество выросших клеток,  $y$  — общее количество засеянных клеток.

**Питательная ростовая среда.** Для суспензионного культивирования клеток линии ВНК-21/2-17 применяли среду, содержащую необходимый набор солей, аминокислот и витаминов, в сочетании с 0,2% ферментативного гомогидролизата и 2,5–5,0% сыворотки крови КРС (рН среды 7,0–7,2).

**Поддерживающая среда.** Для репродукции вируса ящура использовали среду, содержащую необходимый набор солей и аминокислот, с внесением 0,2% ферментативного гомогидролизата (рН среды 7,7–7,8).

**Сыворотка крови КРС.** Для приготовления ростовой среды применяли сыворотку крови КРС стерильную 1 категории и сыворотку крови КРС, очищенную с помощью ПЭГ, взятые в соотношении 1:1. Оценку ростовых качеств сыворотки крови проводили по значению ИПА клеток линии ВНК-21/2-17, выращенных в питательной среде Игла, содержащей в своем составе 5% сыворотки. В дальнейшей работе для проведения исследований использовали сыворотки крови КРС тех промышленных серий, которые позволяли выращивать клетки с  $ИПА \geq 3,0$ . В работе использовали сыворотку крови, не содержащую антитела против вируса ящура.

**Культивирование клеток и вируса.** Выращивание суспензионной культуры клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура проводили в культиваторах металлических объемом 2000 дм<sup>3</sup>. Все производственные процессы осуществляли строго в соответствии с требованиями, отраженными в «Промышленном регламенте на производство вакцины против ящура сорбированной моно- и поливалентной (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21/2-17)».

**Вирус ящура.** Для заражения клеток линии ВНК-21/2-17 использовали следующие штаммы культурального вируса ящура: «О/Саудовская Аравия/08», «А/Турция/06», «А-Кути», «Asia-1/Shamir/3/89», депонированные в Коллекции штаммов микроорганизмов (КШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Определение концентрации иммуногенных компонентов в очищенной суспензии вируса ящура.** Количество иммуногенных компонентов (146S-частиц и комплекса 146S- и 75S-частиц) в суспензии вируса ящура определяли в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению содержания вирусспецифического белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной реакции связывания комплемента (РСК)», утвержденной директором ВНИИИ в 1987 г. [2].

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка заключалась в определении средних арифметических значений и достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера [4]. Построение диаграмм проводили с использованием пакета прикладных программ Stat Soft (версия 6.0) и Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы оценивали влияние массовой доли сыворотки крови КРС в составе питательной ростовой среды на пролиферативный потенциал суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17. Для этого

Таблица 1

Влияние содержания сыворотки крови КРС на суспензионное культивирование клеток линии ВНК 21/2-17 (n=9)

Содержание сыворотки крови КРС, %	№ пассажа	Концентрация клеток, 10 <sup>6</sup> клеток/мл		ИПА*
		после посева	окончание культивирования	
2,5	7	0,814±0,016 (p<0,001)	3,891±0,029 (p<0,001)	4,78
	8	0,741±0,022 (p<0,001)	3,631±0,024 (p<0,001)	4,90
	9	0,745±0,019 (p<0,001)	3,755±0,031 (p<0,001)	5,04
	10	0,751±0,022 (p<0,001)	3,823±0,028 (p<0,001)	5,09
3,0	7	0,754±0,028 (p<0,001)	3,657±0,019 (p<0,001)	4,85
	8	0,761±0,022 (p<0,001)	3,767±0,091 (p<0,001)	4,95
	9	0,755±0,020 (p<0,001)	3,813±0,025 (p<0,001)	5,05
	10	0,732±0,034 (p<0,001)	3,733±0,042 (p<0,001)	5,10
4,0	7	0,891±0,029 (p<0,001)	4,375±0,160 (p<0,005)	4,91
	8	0,746±0,050 (p<0,001)	3,750±0,045 (p<0,001)	5,03
	9	0,721±0,031 (p<0,001)	3,675±0,231 (p<0,005)	5,10
	10	0,775±0,085 (p<0,005)	4,001±0,037 (p<0,001)	5,16
5,0	7	0,775±0,027 (p<0,001)	3,860±0,077 (p<0,005)	4,98
	8	0,750±0,045 (p<0,001)	3,840±0,025 (p<0,001)	5,12
	9	0,760±0,031 (p<0,001)	3,934±0,032 (p<0,005)	5,18
	10	0,745±0,016 (p<0,001)	3,956±0,028 (p<0,001)	5,31

\* значения ИПА были рассчитаны с использованием средних значений концентрации клеток.

применяли сыворотку двух типов обработки: стерильную 1 категории и очищенную с помощью ПЭГ, в соотношении 1:1. Выращивание клеток с 7 по 10 пассажи проводили в питательных ростовых средах с разным содержанием сыворотки: 2,5; 3,0; 4,0; 5,0%. Результаты проведенного анализа представлены в табл. 1, а также на рис. 1, 2.

Как следует из табл. 1 и рис. 1, 2, при использовании 5% сыворотки крови КРС ИПА культуры клеток ВНК-21/2-17 на протяжении 7–10 пассажей увеличивался с 4,98 до 5,31. Применение 4% сыворотки крови в составе питательной ростовой среды приводило к росту значений ИПА с 4,91 по 5,16, что на 1–2% ниже по сравнению с использованием 5% сыворотки.

Суспензионное выращивание данной клеточной линии в среде с содержанием 3% сыворотки крови КРС в течение 7–10 пассажей давало возможность увеличивать пролиферативный потенциал клеток с 4,85 по 5,10, что на 2–3% ниже по сравнению с применением 5% сыворотки. Также оценивали влияние 2,5% сыворотки на пролиферативную активность клеток, которая на протяжении 7–10 пассажей увеличивалась с 4,78 по 5,09 и была ниже на 3–4% по сравнению с использованием 5% сыворотки.

Таким образом, увеличение массовой доли сыворотки крови КРС от 2,5 до 5,0% в составе питательной ростовой среды приводило к увеличению пролифера-

Таблица 2

Концентрация иммуногенных компонентов вируса ящура при его репродукции в клетках линии ВНК-21/2-17, выращенных в питательной среде с разным содержанием сыворотки крови КРС (n=9)

Штамм вируса ящура	Название иммуногенных компонентов	Концентрация иммуногенных компонентов (мкг/мл) при			
		2,5%	3,0%	4,0%	5,0%
«О/Саудовская Аравия/08»	146S	1,400±0,078 (p<0,005)	1,470±0,099 (p<0,005)	1,320±0,079 (p<0,005)	1,370±0,140 (p<0,005)
	146S+75S	1,810±0,095 (p<0,005)	2,110±0,130 (p<0,005)	1,800±0,110 (p<0,005)	1,950±0,160 (p<0,001)
«А/Турция/06»	146S	1,700±0,085 (p<0,001)	1,450±0,095 (p<0,001)	1,210±0,055 (p<0,001)	1,800±0,090 (p<0,001)
	146S+75S	3,000±0,120 (p<0,001)	2,300±0,100 (p<0,001)	1,770±0,055 (p<0,005)	2,750±0,105 (p<0,001)
«А-Кути»	146S	2,180±0,100 (p<0,005)	1,890±0,038 (p<0,001)	1,640±0,085 (p<0,001)	2,500±0,085 (p<0,005)
	146S+75S	2,720±0,120 (p<0,005)	2,650±0,105 (p<0,001)	2,800±0,090 (p<0,005)	3,550±0,140 (p<0,001)
«Asia-1/Shamir/3-89»	146S	1,590±0,090 (p<0,001)	1,550±0,105 (p<0,001)	1,420±0,110 (p<0,001)	1,500±0,161 (p<0,001)
	146S+75S	2,100±0,100 (p<0,001)	2,120±0,120 (p<0,001)	1,850±0,150 (p<0,005)	1,950±0,080 (p<0,001)

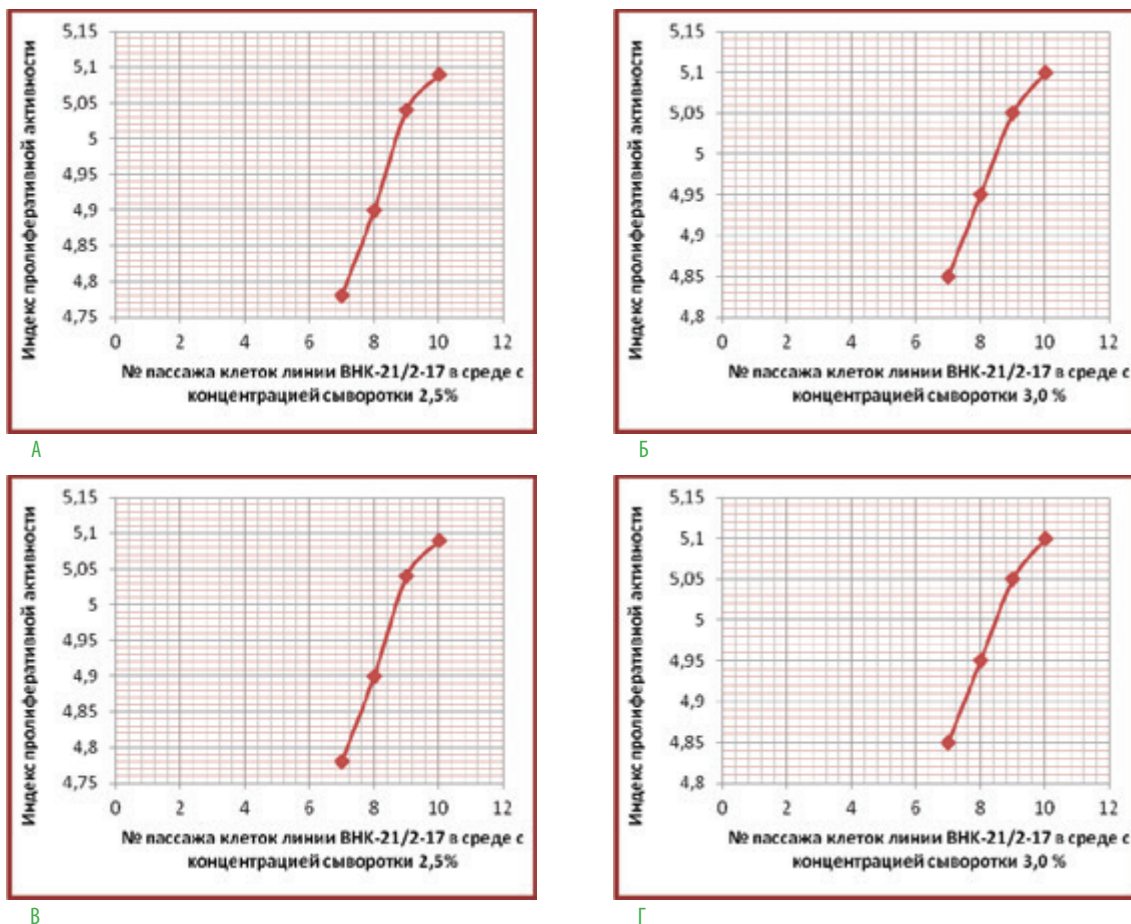


Рис. 1. Графики роста индекса пролиферативной активности клеток линии ВНК-21/2-17 с 7 по 10 пассажи при разном содержании сыворотки крови КРС: 5% (А), 4% (Б), 3% (В), 2,5% (Г) (n=9)

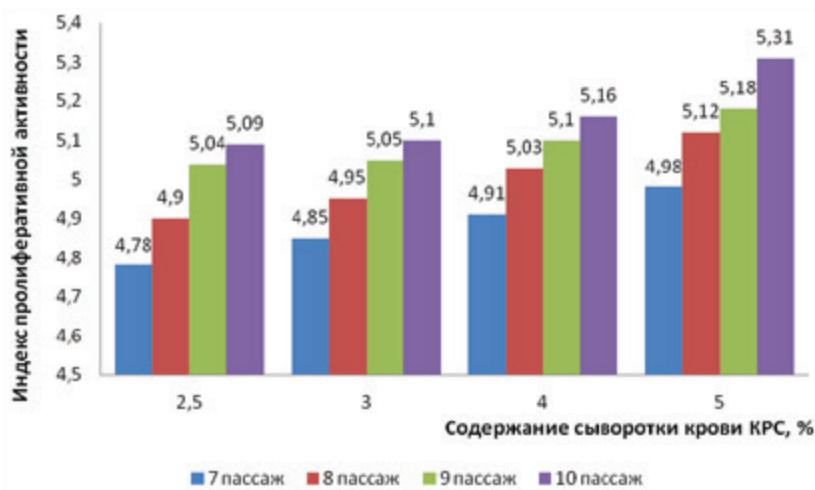


Рис. 2. Влияние концентрации сыворотки крови КРС в составе ростовой среды на индекс пролиферативной активности клеток линии ВНК-21/2-17 с 7 по 10 пассажи (n=9)

тивной активности клеток линии ВНК-21/2-17 на 3–4% в течение 7–10 пассажей. При этом в течение данных пассажей при фиксированном значении содержания сыворотки крови КРС также наблюдался незначительный рост пролиферативного потенциала клеток.

На следующем этапе работы суспензионную культуру клеток ВНК-21/2-17 ((3,0–3,2) × 10<sup>6</sup> клеток/мл), выращенную в питательной среде с разным содержанием сыворотки крови КРС, заражали сле-

дующими штаммами культурального вируса ящура: «О/Саудовская Аравия/08», «А/Турция/06», «А-Кути», «Asia-1/Shamir/3/89». После культивирования и очистки антигена вируса определяли концентрацию его иммуногенных компонентов в РСК. Полученные данные отражены в табл. 2 и на рис. 3.

Как следует из табл. 2 и рис. 3, концентрации иммуногенных компонентов (146S+75S) штамма культурального вируса ящура «О/Саудовская Аравия/08» в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17, выращенных в питательной ростовой среде с концентрациями сыворотки крови КРС: 2,5; 3,0; 4,0; 5,0%, составляли 1,81; 2,11; 1,80; 1,95 мкг/мл соответственно. Используя клетки, выращенные в тех же условиях, проводили их заражение штаммом культурального вируса ящура «А/Турция/06», в результате этого концентрации 146S+75S-компонентов составили: 3,00; 2,30; 1,77; 2,75 мкг/мл. Культивируя штамм вируса ящура «А-Кути» в клетках, выращенных с применением 2,5; 3,0; 4,0; 5,0% сыворотки крови КРС, получили иммуногенные компоненты с концентрациями: 2,72; 2,65;



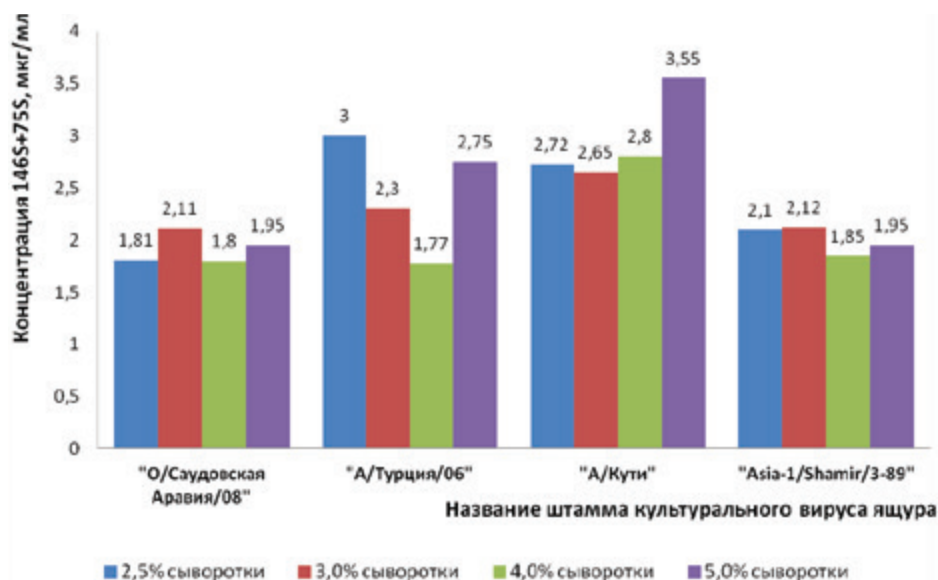


Рис. 3. Накопление 146S+75S иммуногенных компонентов культурального вируса ящура разных штаммов в клетках линии ВНК-21/2-17, выращенных в питательной среде с разным содержанием сыворотки крови КРС (n=9)

2,80; 3,55 мкг/мл. Концентрации 146S+75S-компонентов штамма вируса ящура «Asia-1/Shamir/3-89», полученных в аналогичных условиях, составляли 2,10; 2,12; 1,85; 1,95 мкг/мл. Иными словами, наибольшее накопление иммуногенных компонентов штамма вируса ящура «О/Саудовская Аравия/08» наблюдалось при заражении клеток, выращенных в среде с 3,0% сыворотки, штамма «А/Турция/06» — с 2,5%, штамма «А-Кути» — с 5,0%, «Asia-1/Shamir/3-89» — с 2,5%.

Таким образом, из анализа полученных результатов следует, что изменение массовой доли сыворотки крови КРС от 2,5 до 5,0% в составе питательной среды, предназначенной для роста и развития клеток линии ВНК-21/2-17, не оказывает влияния на концентрацию иммуногенных компонентов культурального вируса ящура.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка влияния на репродукцию суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17 и культурального антигена вируса ящура сыворотки крови КРС разной концентрации стерильной и очищенной с помощью ПЭГ в соотношении 1:1 в составе питательной среды.

Выявлено, что увеличение содержания сыворотки крови КРС с 2,5 до 5,0% вызывало незначительный (на 3–4%) рост индекса пролиферативной активности клеток. На протяжении 7–10 пассажей при фиксированном значении содержания сыворотки крови КРС также наблюдалось небольшое (на 5–6%) увеличение пролиферативного потенциала клеток.

Определено, что содержание разного количества сыворотки крови КРС в питательной ростовой среде, предназначенной для выращивания клеток линии ВНК-21/2-17, не оказывало существенного влияния на репродукцию вируса ящура и выход его иммуногенных компонентов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. — М.: Мир, 1983. — 263 с.
2. Бондаренко А.Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. — Суздаль, 1994. — 92 с.
3. Влияние полиэтиленгликоля на пролиферативную активность клеток ВНК-21/2-17 / Д.В. Михалишин,

М.Н. Гусева, Е.В. Белик, В.В. Михалишин // Ветеринария и кормление. — 2010. — № 6. — С. 28–29.

4. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. — М.: Практика, 1999. — 459 с.

5. Дроздова Т.И. Стандартизация сыворотки крови и амниотической жидкости крупного рогатого скота, используемой в вирусологии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1980. — 14 с.

6. Использование очищенной от антител сыворотки крови крупного рогатого скота для промышленного культивирования суспензионных клеток ВНК-21 и вируса ящура / М.В. Котова, А.Н. Бурдов, В.В. Прохоров [и др.] // Ящур (К новой стратегии борьбы с ящуром): матер. Междунар. конф. — Владимир, 1992. — Ч. 2. — С. 24–31.

7. Культура животных клеток. Методы / под ред. Р. Фрешни. — М.: Мир. — 1989. — 333 с.

8. Малахов А.Г., Винокурова Т.К. Биохимический полиморфизм белков и ферментов и его использование в диагностике заболеваний и селекции сельскохозяйственных животных // Сб. науч. трудов Московской ветеринарной академии. — 1973. — Т. 70. — С. 5–8.

9. Особенности парвовирусной инфекции КРС / В.А. Мищенко, А.А. Гусев, В.М. Захаров [и др.] // Ветеринария. — 2000. — № 5. — С. 19–21.

10. Особенности проявления вирусных и ассоциативных вирусно-бактериальных болезней КРС / А.Г. Глотов, Н.А. Шкиль, Т.Н. Глотова [и др.] // Ветеринария с.-х. животных. — 2006. — № 8. — С. 15–24.

11. Особенности респираторных инфекций телят / В.А. Мищенко, А.А. Гусев, Н.А. Яременко [и др.] // Ветеринария. — 2000. — № 9. — С. 5–6.

12. Barteling S.J. Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing BHK-suspended cell cultures // Bull. OIE. — 1974. — Vol. 81, № 11–12. — P. 1243–1254.

13. Mesquita J.A., Carneiro A.S. Foot-and-mouth disease vaccine with antigens produced in cell cultures grown with PEG-treated bovine serum // Bol. CPFA. — 1979. — № 33–34. — P. 62.

14. Mesquita J.A., Vieira A. Polyethyleneglycol-treated bovine serum for use in cell cultures // Bol. CPFA. — 1979. — № 35–36. — P. 64.