

УДК 619:578.247

АНАЛИЗ ПОТРЕБЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК

*Красочко П.А., **Красочко И.А., **Костюк Н.И., **Борисовец Д.С., *Притыченко А.В., **Стрельчяня И.И.,
*Рябинкова И.М. **Войшнарович Н.И.

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

**РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

*Цель исследований – изучение потребления аминокислот в ростовых питательных средах после выращивания на них перевиваемых неинфицированных культур клеток. Установлено, что различные клетки потребляют различное количество аминокислот. При этом в средах после культивирования концентрация таких аминокислот, как фенилаланин, лейцин и изолейцин, лизин, тиронин снижается в 1,1-10 раз. Но отмечается и увеличение концентрации отдельных аминокислот – серина, аланина, пролина. В основном увеличение концентрации аминокислот отмечено в средах, где в питательной среде имеется такой компонент, как ФГМС (ферментативный гидролизат мышц сухой). **Ключевые слова:** культура клеток, аминокислоты, культивирование, питательные среды.*

THE ANALYSIS OF CONSUMPTION OF AMINO ACIDS AT CULTIVATION OF THE INTERTWINED CULTURES OF CELLS

*Krasochko P. A., **Krasochko I.A., **Kostiuk N.I., **Borisovets D.S., *Pritychenko A.V.,
*Ryabinkova I.M., **Voyshnarovich N.I.

* Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

** Institute of Experimental Veterinary Medicine name S.N Vyshellesski, Minsk, Republic of Belarus

*The purpose of researches – studying of consumption of amino acids in growth nutrient mediums after cultivation on them the intertwined not infected cultures of cages. It is established that various cages consume various amount of amino acids. At the same time in environments after cultivation concentration of such amino acids as phenylalanine, a leucine and an isoleucine, a lysine, тиронин decreases by 1,1-10 times. But also increase in concentration of separate amino acids – Cerina, an alanin, proline is noted. Generally increase in concentration of amino acids is noted in environments where in nutrient medium there is such component as (EHMD (enzymatic hydrolyzate muscles dry). **Keywords:** cell culture, amino acids, cultivation, nutrient mediums.*

Введение. В современных условиях отмечено существенное увеличение роли вирусных инфекций в патологии сельскохозяйственных животных. В этой связи одним из наиболее эффективных средств борьбы с ними является специфическая профилактика с использованием живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин. Биотехнологическое производство вирус-вакцин основано на использовании живых клеток, которые выращивают с использованием различных питательных компонентов – сывороток крови, питательных сред и т.д. [1, 6, 7, 9]. В этой связи использование клеточных культур играет важную роль для накопления вирусов с целью изготовления противовирусных вакцин. Многие клеточные культуры нуждаются в большом числе факторов роста. Для биосинтетической деятельности клеток животных в культуре необходимо присутствие заменимых и незаменимых аминокислот, водорастворимых витаминов, углеводов, минеральных веществ и т. д. Наличие этих веществ в питательной среде обеспечивает пластическую и энергетическую потребности клеток животных, необходимые для поддержания жизнедеятельности и размножения в культуре. Следовательно, основное условие успешного проведения технологического процесса культивирования клеток – подбор питательных сред, обеспечивающих максимальное накопление целевого продукта. Для выращивания животных клеток применяют питательные среды, имеющие сложный состав. Они komponуются из высококачественного, сравнительно дорогого сырья с последующим внесением питательных и ростовых добавок [2, 3, 4, 5, 8, 10].

Процесс культивирования монослойных культур клеток для дальнейшего их заражения вакцинным вирусом проводится до момента формирования сплошного монослоя клеток на поверхности культуральных матрасов и роллеров, после чего отработанная питательная среда сливается, заменяется на поддерживающую и утилизируется в достаточно больших объемах как отходы производства. При этом утилизируемая питательная среда, кроме продуктов метаболизма клеток, содержит в своем составе в достаточном количестве неиспользованные клетками в процессе роста и размножения заменимые и незаменимые аминокислоты, углеводы, минеральные вещества, витамины и т.д. [1, 4, 5].

Цель настоящих исследований – изучение потребления аминокислот в ростовых питательных средах после выращивания на них перевиваемых неинфицированных культур клеток.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в условиях отделов вирусных инфекций и культур клеток и питательных сред РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Для работы использовали ростовые среды до внесения на монослой и среды после получения сформированного монослоя на 2-7-е сутки культивирования.

Для проведения исследований нами отобраны образцы ростовых питательных сред до и после культивирования перевиваемых культур клеток (таблица 1).

Для оценки обмена аминокислот в ростовых питательных средах до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма использован метод капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105» на базе НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

Таблица 1 - Ростовые питательные среды до и после культивирования перевиваемых культур клеток

1	Питательная среда Игла DMEM C-28 от 28.11	→	Ростовая среда к. кл. Marc-145 (Игла DMEM), 2-е сутки от 29.04.16
2	Питательная среда Игла MEM C-9 от 18.05	→	Ростовая среда к. кл. MDBK, 3-и сутки
3	Питательная среда Игла MEM+199 (НИИ им. Чумакова)	→	Ростовая среда к. кл. СПЭВ (Игла MEM+199 (НИИ им. Чумакова) (чум.), 7-е сутки от 29.04.16
4	Питательная среда ФГМС+Игла DMEM C-5 от 17.05	→	Ростовая среда к. кл. ЗКГ (ФГМС+Игла DMEM), 2-е сутки от 29.04.16
5	Питательная среда ФГМС+Игла DMEM C-5 от 17.05	→	Ростовая среда к. кл. ВНК 21/13 (ФГМС+Игла DMEM), 5-е сутки от 29.04.16

В основе капиллярного электрофореза лежат электрокинетические явления — электромиграция ионов и других заряженных частиц и электроосмос. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно, высокого напряжения. Если раствор находится в тонком капилляре, например, в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости, в результате чего проба разделяется на индивидуальные компоненты, так как параметры электромиграции специфичны для каждого сорта заряженных частиц. В то же время, такие возмущающие факторы, как диффузионные, сорбционные, конвекционные, гравитационные и т. п., в капилляре существенно ослаблены, благодаря чему достигаются рекордные эффективности разделений.

Метод капиллярного электрофореза применяется для анализа разнообразных веществ (неорганических и органических катионов и анионов, аминокислот, витаминов, наркотиков, красителей, белков и т. д.) и объектов (для контроля качества вод и напитков, технологического контроля производства, входного контроля сырья, анализа фармпрепаратов и пищевых продуктов, в криминалистике).

Исследования проводили с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель-105», предназначенного для количественного и качественного определения состава проб веществ в водных и водно-органических растворах методом капиллярного электрофореза.

Пробоподготовку и проведение исследований проводили на основе инструкции по использованию системы капиллярного электрофореза «Капель-105».

Результаты исследований. В таблицах 2-6 приведены результаты изучения содержания аминокислот в ростовых средах до и после культивирования клеток.

Таблица 2 - Результаты изучения содержания аминокислот в среде ФГМС+Игла DMEM и после культивирования клеток ЗКГ на 2-е сутки (мг/л)

№ п/п	Аминокислота		До культивирования	Через 2 суток после культивирования	+/-
1	лизин	Lys	27,28+1,46	27,95+4,13	+0,67
2	фенилаланин	Phe	15,23+2,54	14,38+3,63	-0,85
3	гистидин	His	6,774+1,76	5,526+0,73	-1,248
4	лейцин и изолейцин	Leu+Ile	49,23+4,15	42,67+5,6	-6,56
5	валин	Val	13,53+1,55	16,93+3,74	+3,4
6	пролин	Pro	11,20+1,33	9,521+2,93	-1,679
7	треонин	Thr	20,16+1,23	18,57+4,84	-1,59
8	серин	Ser	16,35+3,03	15,49+4,51	-0,86
9	аланин	Ala	20,00+2,73	21,40+6,74	+1,4
10	глицин	Gly	12,89+3,43	7,89+2,07	-5,0

Таблица 3 - Результаты изучения содержания аминокислот в среде Игла DMEM+199 (чум.) и после культивирования клеток Marc-145 на 2-е сутки (мг/л)

№ п/п	Аминокислота		До культивирования	Через 2 суток после культивирования	+/-
1	лизин	Lys	20,43+3,43	10,87+3,99	-9,56
2	тиронин	Tyr	23,16+4,13	6,302+1,94	-16,858
3	фенилаланин	Phe	10,82+2,66	6,796+2,43	-4,024
4	гистидин	His	4,924+1,13	3,794+1,15	-1,13
5	лейцин и изолейцин	Leu+Ile	35,11+7,16	18,44+4,28	-16,67
6	метионин	Met	17,07+4,19	1,838+0,53	-15,232
7	валин	Val	11,13+3,01	6,875+2,17	-4,245
8	пролин	Pro	1,259+0,16	4,981+1,43	+3,722
9	глицин	Gly	7,602+2,49	1,072+0,12	-6,53

Приведенные в таблице данные свидетельствуют, что на 2-е сутки в процессе репродукции культуры клеток ЗКГ отмечено снижение таких аминокислот, как глицин на 5,0 мг/л, гистидин - на 1,248 мг/мл, лейцин и изолейцин - на 6,56 мг/л, пролин - на 1,679 мг/л, треонин - на 1,59 мг/л, фенилаланин и серин - на 0,85-0,86 мг/л. Но отмечено и увеличение концентрации отдельных аминокислот: количе-

ство лизина увеличилось на 0,67 мг/л, валина - на 3,4 мг/л.

Из данных таблицы 3 видно, что после культивирования клеток Marc-145 на 2-е сутки отмечено снижение концентрации в питательной среде практически всех аминокислот: лизина - на 9,56 мг/л, тиронина - на 16,858 мг/л, фенилаланина - на 4,024 мг/л, лейцина и изолейцина - на 16,67 мг/л, метионина - на 15,232 мг/л, валина - на 4,245 мг/л, глицина - на 6,53 мг/л, гистидина - на 1,13 мг/л. Однако отмечено и увеличение концентрации отдельных аминокислот: количество пролина увеличилось на 3,722 мг/л.

Таблица 4 - Результаты изучения содержания аминокислот в среде Игла MEM C-9 и после культивирования клеток MDBK на 3-и сутки (мг/л)

№ п/п	Аминокислота		До культивирования	Через 2 суток после культивирования	+/-
1	лизин	Lys	16,25+4,13	7,131+2,03	-8,94
2	тиронин	Tyr	8,877+2,43	13,29+3,77	+4,413
3	фенилаланин	Phe	8,269+1,16	4,888+1,21	-3,381
4	гистидин	His	4,620+0,54	3,533+0,43	-1,087
5	лейцин и изолейцин	Leu+Ile	30,71+5,17	5,938+1,23	-24,772
6	пролин	Pro	8,852+1,79	2,912+0,21	-5,94
7	треонин	Thr	3,707+0,22	3,971+0,44	+0,264
8	аланин	Ala	7,533+1,74	3,994+0,76	-3,589

Таблица 5 - Результаты изучения содержания аминокислот в среде Игла MEM C-9 и после культивирования клеток СПЭВ на 7-е сутки (мг/л)

№ п/п	Аминокислота		До культивирования	Через 2 суток после культивирования	+/-
1	лизин	Lys	16,25+3,04	6,697+1,13	-9,553
2	тиронин	Tyr	8,877+2,43	9,431+2,31	+0,554
3	фенилаланин	Phe	8,269+1,16	2,198+0,43	-6,071
4	гистидин	His	4,620+0,54	0,3933+0,011	-4,2267
5	лейцин и изолейцин	Leu+Ile	30,71+5,17	2,452+0,13	-28,258
6	метионин	Met	15,25+3,43	1,967+0,31	-13,283
7	пролин	Pro	8,852+1,79	4,089+1,21	-4,763
8	треонин	Thr	3,707+0,22	3,615+0,74	-0,092
9	аланин	Ala	7,533+1,74	20,83+4,66	+13,297

Из данных таблицы 6 видно, что в ростовых средах после культивирования клеток MDBK на 3-и сутки отмечено снижение многих аминокислот: лизина - на 8,94 мг/л, фенилаланина - на 3,381 мг/л, гистидина - на 1,087 мг/л, лейцина и изолейцина - на 24,772, пролина - на 5,94 мг/л, аланина - на 3,589 мг/л. Но установлено и увеличение концентрации отдельных аминокислот: количество тиронина увеличилось на 4,413 мг/л, треонина - на 0,264 мг/л.

Данные таблицы 5 свидетельствуют, что в ростовой питательной среде после культивирования клеток СПЭВ на 7-е сутки отмечено существенное снижение концентрации многих аминокислот: лизина - на 9,553 мг/л, фенилаланина - на мг/л, гистидина - на 4,2267 мг/л, лейцина и изолейцина - на 28,258 мг/л, метионина - на 13,283 мг/л, пролина - на 4,763 мг/л, треонина - на 0,092 мг/л. Но увеличение концентрации установлено при изучении тиронина на 0,554 мг/л и аланина - на 13,297 мг/л.

При этом установлено, что после культивирования перевиваемых клеток ВНК на 5-е сутки отмечено значительное потребление аминокислот. Так, отмечено снижение концентрации фенилаланина на 8,812 мг/л, аргинина - на 3,01 мг/л, лейцина и изолейцина - на 15,75 мг/л, треонина - на 2,67 мг/л. Однако отмечено и увеличение концентрации отдельных аминокислот: количество валина увеличилось на 10,82 мг/л, пролина - на 2,82 мг/л, серина - на 23,34 мг/л, глицина - на 8,54 мг/л.

Таблица 6 - Результаты изучения содержания аминокислот в среде ФГМС+Игла DMEM и после культивирования клеток ВНК на 5-е сутки (мг/л)

№ п/п	Аминокислота		До культивирования	Через 5 суток после культивирования	+/-
1	аргинин	Arg	21,92+4,67	18,91+4,98	-3,01
2	лизин	Lys	27,28+6,23	27,37+6,07	+0,09
3	фенилаланин	Phe	15,23+3,02	6,418+1,44	-8,812
4	лейцин и изолейцин	Leu+Ile	49,23+7,89	33,48+9,45	-15,75
5	валин	Val	13,53+4,07	24,35+6,95	+10,82
6	пролин	Pro	11,20+2,55	14,02+2,23	+2,82
7	треонин	Thr	20,16+4,75	17,49+3,54	-2,67
8	серин	Ser	16,35+5,23	39,69+6,69	+23,34
9	глицин	Gly	12,89+4,78	21,43+5,43	+8,54

Заключение. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что различные клетки потребляют различное количество аминокислот. При этом в средах после культивирования концентрация таких аминокислот, как фенилаланин, лейцин и изолейцин, лизин, тиронин, снижа-

ется в 1,1-10 раз. Но отмечается и увеличение концентрации отдельных аминокислот – серина, аланина, пролина. В основном увеличение концентрации аминокислот отмечено в средах, где в питательной среде имеется такой компонент, как ФГМС (ферментативный гидролизат мышц сухой). Эти данные согласуются с исследованиями ведущих исследователей по культивированию клеток – Р.Я. Фрешни, Л.П. Дьяконова, Т.И. Дитченко, О.В. Блажевич и др. [2, 3, 4, 5].

Литература. 1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных : разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко, Н. А. Ковалев, И. В. Насонов, А. С. Ястребов, Д. В. Бучукири, М. М. Усеня, П. П. Красочко, Д. С. Борисовец, В. П. Красочко, Н. М. Авласко; под ред. Н. А. Ковалева. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 492 с. 2. Культивирование клеток : курс лекций / О. В. Блажевич – Минск : БГУ, 2004. – 78 с. 3. Культура клеток, тканей и органов растений : методические рекомендации для занятий студентов / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2007 г. – 46 с. 4. Культура животных клеток : практическое руководство / Р. Я. Фрешни; пер. пятого английского издания – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. – 691 с. 5. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) / под. общ. ред. проф. Дьяконова Л. П. – М.: «Спутник+», 2009. – 656 с. 6. Ковалев, Н. А., Красочко, П. А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека : монография. – Минск : Беларуская навука, 2012. – 426 с. 7. Частная эпизоотология : учебное пособие / В. В. Максимович, Н. В. Синица, В. Ф. Багряков, А. В. Бублов, Г. Э. Дремач, О. Р. Билецкий, П. А. Красочко, И. А. Красочко, В. А. Машеро, Н. А. Ковалев, Ю. Г. Лях, С. Л. Гайсенко, А. А. Вербицкий. – Минск, 2010. – 628 с. 8. Красочко, П. А. Вирусные пневмоэнтериты телят / П. А. Красочко, Ю. Г. Зелютков, И. А. Красочко. – Минск, 1999. – 168 с. 9. Красочко, П. А. Моно- и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия) : автореф. дис. ... д-ра вет. наук / П. А. Красочко. – Минск, 1997. – 37 с. 10. Ветеринарная энциклопедия в 2-х т. / С. С. Абрамов и др. ; под ред. А. И. Ятусевича. – Минск, 2013. – Т. 2: К-Я. – 597 с.

Статья передана в печать 14.04.2017 г.

УДК 615.28:616.98:639.3

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА «МОНКЛАВИТ-1» ДЛЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИКРЫ ПРИ САПРОЛЕГНИОЗЕ

*Кузнецова Е.В., **Нечаева Т.А., *Мосягина М.В., *Печенкина А.А.

*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет», г. Пушкин, Российская Федерация

В статье представлен способ обработки икры рыб препаратом «Монклавит-1», состоящей в том, что обработку икры проводят в две стадии (при закладке икры на инкубацию и на стадии «глазка»). Дозировка препарата «Монклавит-1» при обработках икры составляла 100-300 мл/10 л воды при экспозиции от 10 до 20 минут на каждой стадии. По результатам исследования получен патент РФ № 2421987 «Способ повышения сопротивляемости икры к заболеваниям». **Ключевые слова:** сапролегниоз, икра, радужная форель, Монклавит-1.

THE USE OF THE MEDICINE "MONKLAVIT-1" FOR TREATMENT-AND-PROPHYLACTIC PROCESSINGS OF CAVIAR AT SAPROLEGNIOZ

*Kuznetsova E.V., **Nechayeva T.A., *Mosyagina M.V., *Pechenkina A.A.

* Saint-Petersburg state academy of veterinary medicine, Saint-Petersburg, Russian Federation

** Saint-Petersburg state agricultural university, Pushkin, Russian Federation

The article presents the way of processing fish roe with medicine «Monklavit-1», the roe processing is carried out in two stages (at the spawn on incubation and at the eyed eggs). Dosage of medicine «Monklavit-1» with roe treatments was 100-300 ml/10 l water upon exposure of 10 to 20 min. at each stage. The study is on the RF patent № 2421987 «Way to improve resilience of roe to diseases». **Keywords:** saprolegniosis, roe, rainbow trout, Monklavit-1.

Введение. При инкубации икры рыб возможно возникновение сапролегниоза – болезни рыб и икры, широко распространенной в рыбоводных предприятиях. Сапролегниоз вызывается плесневыми грибами порядка сапролегниевые (*Saprolegniales*), относящимися к нескольким родам: *Achlya*, *Aphonomycetes*, *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Saprolegnia* и др. Наиболее распространенными и патогенными являются следующие виды: *Ach. flagellata*, *Aph. laevis*, *D. monosporus*, *S. ferax*, *S. mixta*, *S. parasitica*.

Оптимальной для роста и размножения плесневых грибов является температура воды в пределах 12-20°C.

Сапролегниоз распространен повсеместно, так как возбудители этой болезни, являясь сапрофитными организмами, постоянно присутствуют в воде, грунте и на поверхности тела рыб. Болезнь может возникать в любое время года, описана для всех искусственно воспроизводимых видов рыб, а также для икры в период ее инкубации. Она также встречается у рыб и на икре в естественных водоемах. Сапролегниозом обычно поражается неоплодотворенная, травмированная, физиологически неполноценная икра в период ее инкубации. Сапролегниоз часто сопутствует ряду инфекций, инвазий, осложняя их. Интенсивность развития грибов на икре зависит от процента травмированной и неоплодотворенной икры.

Здоровая икра, как правило, заражается сапролегниозом при контакте с мертвой пораженной икрой. Установлено, что у рыб с длительным сроком инкубации икры возможно заражение и живых развивающихся икринок [1]. Под воздействием гриба происходит разрыхление поверхности оболочек икры, их деструкция, вакуолизация. В ряде случаев гифы прорастают внутрь икринок.

При этом сапролегниозы могут наносить значительный ущерб рыбному хозяйству. В связи с