

2. Kielstein P. On the occurrence of toxin-producing *Pasteurella multocida* strains in atrophic rhinitis and in pneumonias of swine and cattle. J. Vet. Med. Ser. B. 1986;33:418–424.
3. Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance / P. Kielstein, H. H. Wuthe, O. Angen [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2001. – Vol. 81. – № 3. – P. 243–255.
4. Ross, R. F. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia / R. F. Ross // Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases. – 2006. – Vol. 7. – No 1/2. – P. 13-29. – DOI 10.1017/S1466252307001211.
5. Rubies, X. Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid / X. Rubies, J. Casal, C. Pijoan // Veterinary Microbiology. – 2002. – Vol. 84. – № 1–2. – P. 69–78.

УДК 619:615.37

DOI 10.47804/9785899040313_2022_144

ИЗУЧЕНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ ИЗ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПЕРЕВИВАЕМЫМИ КЛЕТКАМИ

¹Красочко И.А., ²Борисовец Д.С., ¹Красочко П.А.,
¹Волосюк Е.И., ²Зуйкевич Т.А.

¹УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

STUDY OF AMINO ACID CONSUMPTION FROM CULTURE MEDIA BY TRANSPLANTED CELLS

¹Krasochko I.A., ²Borisovets D.S., ¹Krasochko P.A.,
¹Volosyuk E.I., ²Zuykevich T.A.

Ключевые слова: культуры клеток, аминокислоты, метаболизм, потребление.

Key words: cell cultures, amino acids, metabolism, consumption.

Резюме. Цель исследований – провести анализ потребления аминокислот ростовыми питательными средами после культивирования перевиваемых клеток. Установлено, что в процессе роста перевиваемых культур клеток в зависимости от высокого и низкого уровня метаболизма установлена различная степень потребления аминокислот. При репродукции культуры клеток Marc-145 с низким уровнем метаболизма отмечено снижение концентрации лизина, тиронина, фенилаланина, гистидина, лейцина и изолейцина, метионина, треонина, серина, глицина на 1,0-5,0 мкг/л; клеток 3КГ со средним уровнем метаболизма снижена концентрация глицина, фенилаланина, гистидина, лейцина и изолейцина, треонина, серина на 1,0-5,0 мкг/л; клеток MDBK о среднем уровнем метаболизма снижена концентрация лизина, тиронина, фенилаланина, гистидина, лейцина и изолейцина, метионина, треонина, серина, глицина в 1,2-3 раза, СПЭВ - аргинина, фенилаланина, гистидина, лейцина и изолейцина, треонина в 1,1-2 раза; клеток ВНК-21 с высоким уровнем метаболизма - аргинина, фенилаланина, лейцина и изолейцина, в 1,1-10 раз.

Summary. The purpose of the studies is to analyze the consumption of amino acids by growth nutrient media after culturing transplanted cells. It was found that in the process of cell culture growth, depending on the high and low level of metabolism, a different degree of amino acid consumption was established. When reproducing a culture of Marc-145 cells with a low level of metabolism, there was a decrease in the concentration of lysine, tyronin, phenylalanine, histidine, leucine and isoleucine, methionine, threonine, serine, glycine by 1.0-5.0 µg/L; 3KG cells with an average level of metabolism reduced the concentration of glycine, phenylalanine, histidine, leucine and isoleucine, threonine, serine by 1.0-5.0 µg/L; MDBK cells about the average level of metabolism reduced the concentration of lysine, tyronin, phenylalanine, histidine, leucine and isoleucine, methionine, threonine, serine, glycine 1.2-3 times, SPEV - arginine, phenylalanine, histidine, leucine and isoleucine, threonine 1.1-2 times; VNK-21 cells with a high level of metabolism - arginine, phenylalanine, leucine and isoleucine, 1.1-10 time.

Введение. Использование клеточных культур играет важную роль для накопления вирусов с целью изготовления противовирусных вакцин [2]. Для роста и развития клеток вне организма необходимо создать условия максимально сходные со средой, в которой клетки существовали *in vitro* – клеткам необходимы большинство незаменимых аминокислот, витамины, углеводы, минеральные вещества и т.д. [1, 4, 5, 6].

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 [2, 4, 8]. Они komponуются из высококачественного, сравнительного дорогого сырья с последующим внесением питательных и ростовых добавок. Это создает предпосылки для использования отработанной питательной среды, содержащей продукты метаболизма неинфицированных культур клеток, с целью создания ветеринарных препаратов, обладающих общим биотонизирующим и иммуномодулирующим действием, стимулирующих рост и развитие молодняка животных, увеличивающих общую устойчивость животных к инфекционным заболеваниям и стрессовым факторам [3, 7,8, 9, 10].

Цель настоящих исследований – провести анализ потребления аминокислот ростовыми питательными средами после культивирования перевиваемых клеток.

Материалы и методы. Исследования проводили в условиях отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней , институте прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». С целью изучения потребления аминокислот ростовыми питательными сред перевиваемыми клетками МДБК, СПЭВ, ВНК 21/13, ЗКГ, MARK-145 вначале проведен анализ сред, используемых для их культивирования (см. табл. 1).

При проведении исследований учитывали интенсивность роста и пролиферации клеток, высокий и низкий уровень метаболизма и т.д.

Таблица 1 - Ростовые питательные среды, используемые для культивирования перевиваемых культур клеток

| № п/п | Питательная среда | Степень пролиферации |
|-------|---|----------------------|
| 1 | Ростовая среда к.кл. ЗКГ (ФГМС+Игла DMEM) | Средний |
| 2 | Ростовая среда к.кл. СПЭВ (Игла MEM+199) | Средний |
| 3 | Ростовая среда к.кл. Марс-145 (Игла DMEM) | Низкий |

| | | |
|---|---|---------|
| 4 | Ростовая среда к.кл. ВНК 21/13 (ФГМС+Игла DMEM) | Высокий |
| 5 | Ростовая среда к.кл. MDBK (Игла MEM C-9) | Средний |

При проведении исследований изучали ростовые среды до внесения на монослой и среды после получения сформированного монослоя на 2-5-е сутки культивирования.

Концентрацию аминокислот проводили методом капиллярного электрофореза.

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

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.

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

Результаты исследований. В процессе исследований был проведен анализ клеточных линий МДБК, СПЭВ, ЗКГ, ВНК-21 клон 13, Marc-145 на интенсивность уровня их пролиферации.

На основании вышеизложенного анализа все используемые культуры клеток можно разделить на 3 группы:

высокий уровень пролиферации – рассев 1:10-1:20 (ВНК 21/13);

средний уровень пролиферации – рассев 1:3-1:6 (МДВК, СПЭВ, ЗКГ);

низкий уровень пролиферации – рассев 1:1-1:3 (Marc-145).

Установлено, что для полноценного роста клеток в основном используются ростовые среды Игла (МЭМ и ДМЭМ), 199 и ФГМС с 10% нормальной или эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота, имеющие в своем составе аминокислоты, витамины микро- и макроэлементы (до 50 компонентов), а богатый их состав обеспечивает клетки питательными веществами и факторами роста.

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

Содержание аминокислот определяли в ростовых питательных средах до и после культивирования монослойных культур клеток с высоким и низким уровнем метаболизма.

В таблицах 2-6 представлены результаты изучения содержания аминокислот в средах культивирования перевиваемых культур 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-е суток после культивирования |
|-----------|-----------------------|---------|--------------------|---|
| 1 | аргинин | Arg | 21.92 | н/и |
| 2 | лизин | Lys | 27.28 | 27.95 |
| 3 | тиронин | Tyr | н/и | 10.18 |
| 4 | фенилаланин | Phe | 15.23 | 14.38 |
| 5 | гистидин | His | 6.774 | 5.526 |
| 6 | лейцин и изолейцин | Leu+Ile | 49.23 | 42.67 |
| 7 | метионин | Met | н/и | 5.624 |
| 8 | валин | Val | 13.53 | 16.93 |
| 9 | пролин | Pro | 11.20 | 9.521 |
| 10 | треонин | Thr | 20.16 | 18.57 |
| 11 | серин | Ser | 16.35 | 15.49 |
| 12 | аланин | Ala | 20.88 | 21.40 |
| 13 | глицин | Gly | 12.89 | 7.89 |

Приведенные в таблице 2 данные свидетельствуют, что на 2-е сутки репродукции культуры клеток ЗКГ отмечено снижение таких аминокислот,

как глицин, фенилаланин, гистидин, лейцин и изолейцин, треонин, серин на 1,0-5,0 мкг/л.

Из таблицы 3 видно, что после культивирования клеток Marc-145 на 2-е сутки отмечено снижение таких аминокислот, как лизин, тиронин, фенилаланин, гистидин, лейцин и изолейцин, метионин, треонин, серин, глицин на 1,0-5,0 мкг/л.

Из данных таблицы 4 видно, что на 3-е сутки после культивирования клеток MDBK отмечено снижение таких аминокислот, как лизин, тиронин, фенилаланин, гистидин, лейцин и изолейцин, метионин, треонин, серин, глицин в 1,2-3 раза.

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

| №№ п/п | Аминокислота | | До культивирования | Через 2-е суток после культивирования |
|-----------|-----------------------|---------|--------------------|---|
| 1 | аргинин | Arg | н/и | 28.60 |
| 2 | лизин | Lys | 20.43 | 10.87 |
| 3 | тиронин | Tyr | 23.16 | 6.302 |
| 4 | фенилаланин | Phe | 10.82 | 6.796 |
| 5 | гистидин | His | 4.924 | 3.794 |
| 6 | лейцин и изолейцин | Leu+Ile | 35.11 | 18.44 |
| 7 | метионин | Met | 17.07 | 1.838 |
| 8 | валин | Val | 11.13 | 6.875 |
| 9 | пролин | Pro | 1.259 | 4.981 |
| 10 | треонин | Thr | 15.60 | н/и |
| 11 | серин | Ser | 5.022 | н/и |
| 12 | аланин | Ala | 19.45 | н/и |
| 13 | глицин | Gly | 7.602 | 1.072 |

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

| №№ п/п | Аминокислота | | До культивирования | Через 2-е суток после культивирования |
|-----------|--------------|-----|--------------------|--|
| 1 | аргинин | Arg | 26.70 | н/и |
| 2 | лизин | Lys | 16.25 | 7.131 |
| 3 | тиронин | Tyr | 8.877 | 13.29 |

| | | | | |
|----|-----------------------|---------|-------|-------|
| 4 | фенилаланин | Phe | 8.269 | 4.888 |
| 5 | гистидин | His | 4.620 | 3.533 |
| 6 | лейцин и изолейцин | Leu+Ile | 30.71 | 5.938 |
| 7 | метионин | Met | 15.25 | н/и |
| 8 | валин | Val | 7.162 | н/и |
| 9 | пролин | Pro | 8.852 | 2.912 |
| 10 | треонин | Thr | 3.707 | 3.971 |
| 11 | серин | Ser | 1.355 | н/и |
| 12 | аланин | Ala | 7.533 | 3.994 |
| 13 | глицин | Gly | н/и | 8.320 |

Данные таблицы 5 свидетельствуют, что после культивирования клеток СПЭВ 7-е сутки отмечено снижение концентрации таких аминокислот, как аргинин, фенилаланин, гистидин, лейцин и изолейцин, треонин в 1,1-2 раза.

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

| №№ п/п | Аминокислота | | До культивирования | Через 2-е суток после культивирования |
|-----------|-----------------------|---------|--------------------|--|
| 1 | аргинин | Arg | 26.70 | н/и |
| 2 | лизин | Lys | 16.25 | 6.697 |
| 3 | тиронин | Tyr | 8.877 | 9.431 |
| 4 | фенилаланин | Phe | 8.269 | 2.198 |
| 5 | гистидин | His | 4.620 | 0.3933 |
| 6 | лейцин и изолейцин | Leu+Ile | 30.71 | 2.452 |
| 7 | метионин | Met | 15.25 | 1.967 |
| 8 | валин | Val | 7.162 | н/и |
| 9 | пролин | Pro | 8.852 | 4.089 |
| 10 | треонин | Thr | 3.707 | 3.615 |
| 11 | серин | Ser | 1.355 | н/и |
| 12 | аланин | Ala | 7.533 | 20.83 |
| 13 | глицин | Gly | н/и | 13.64 |

Таблица 6 - Результаты изучения содержания аминокислот в среде ФГМС+Игла DMEM и после культивирования клеток ВНК-21 на 5-е сутки (мг/л)

| №№ п/п | Аминокислота | | До культивирования | Через 5-е суток после культивирования |
|-----------|--------------|-----|--------------------|--|
| 1 | аргинин | Arg | 21.92 | 18.91 |
| 2 | лизин | Lys | 27.28 | 27.37 |
| 3 | тиронин | Tyr | н/и | 13.39 |
| 4 | фенилаланин | Phe | 15.23 | 6.418 |

| | | | | |
|----|-----------------------|---------|-------|-------|
| 5 | гистидин | His | 6.774 | н/и |
| 6 | лейцин и изолейцин | Leu+Ile | 49.23 | 33.48 |
| 7 | метионин | Met | н/и | н/и |
| 8 | валин | Val | 13.53 | 24.35 |
| 9 | пролин | Pro | 11.20 | 14.02 |
| 10 | треонин | Thr | 20.16 | 17.49 |
| 11 | серин | Ser | 16.35 | 39.69 |
| 12 | аланин | Ala | 20.88 | н/и |
| 13 | глицин | Gly | 12.89 | 21.43 |

Таким образом, проведенные исследования по изучению потребления аминокислот клетками ВНК-21 после культивирования свидетельствует о том, клетки в основном потребляют аргинин, фенилаланин, лейцин и изолейцин, треонин различное количество аминокислот - их концентрация снижается в 1,1-10 раз.

Выводы:

1. В процессе роста перевиваемых культур клеток в зависимости от высокого и низкого уровня метаболизма установлена различная степень потребления аминокислот.

2. При репродукции культуры клеток Marc-145 с низким уровнем метаболизма отмечено снижение концентрации таких аминокислот, как лизин, тиронин, фенилаланин, гистидин, лейцин и изолейцин, метионин, треонин, серин, глицин на 1,0-5,0 мкг/л.

3. При репродукции культуры клеток ЗКГ со средним уровнем метаболизма отмечено снижение концентрации таких аминокислот, как глицин, фенилаланин, гистидин, лейцин и изолейцин, треонин, серин на 1,0-5,0 мкг/л; клеток MDBK о среднем уровне метаболизма отмечено снижение концентрации таких аминокислот, как лизин, тиронин, фенилаланин, гистидин, лейцин и изолейцин, метионин, треонин, серин, глицин в 1,2-3 раза, клеток СПЭВ - снижение концентрации аргинина, фенилаланина, гистидина, лейцина и изолейцина, треонина в 1,1-2 раза.

5. При репродукции культуры клеток ВНК-21 с высоким уровнем метаболизма отмечено снижение концентрации таких аминокислот, как аргинин, фенилаланин, лейцин и изолейцин, треонин различное количество аминокислот - их концентрация снижается в 1,1-10 раз.

Литература

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. - М.: Мир.- 1983.- 263 с.
2. Красочко П. А. и др. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси под ред. Н.А. Ковалева. - Минск: Беларуская навука, 2016. - 492 с.
3. Корочкин Р.Б. и др. Ветеринарная вирусология. Практикум: учеб.пособие. - Минск: ИВЦ Минфина, 2020.- 348 с.
4. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) /Под. общ. ред. проф. Дьяконова Л.П. - М.: «Спутник+», 2009.- 656 с.
5. Красочко П.А. и др. Исследование обмена белков и биоэлементов в ростовых питательных средах после культивирования на них культур клеток // Мат. XIII межд. научн. конф. молодых ученых «Молодежь в науке - 2016», г. Минск, 22 - 25 ноября 2016.- Минск, 2016. - С.14.
6. Красочко П.А. и др. Питательные среды для культивирования культур клеток : учеб.-метод. пособие для студентов факультета ветеринарной медицины по специальности 1 - 74 03 02 «Ветеринарная медицина» и слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям - Витебск: ВГАВМ, 2021.-С.40.
7. Блажевич О.В. Культивирование клеток. Курс лекций.– Минск: БГУ, 2004. - 78с.
8. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: Методические рекомендации для занятий студентов. - Минск: БГУ, 2007г.- 46 с.
9. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство пер. пятого английского издания. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014г.- 691с.
10. Красочко П.А. и др. Применение культур клеток для оценки цитотоксичности сыворотки крови крупного рогатого скота // Ученые записки учреждения образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины": научно-практ. журнал. - Витебск, 2017. - Т. 53, вып. 2. - С. 65-68.
11. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / пер. 5-го англ. изд. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. - 691 с.

References

1. Adams R. Cell culture methods for biochemists. - M.: Mir. - 1983. - 263 p.
2. Krasochko P. A. et al. Biological preparations for the prevention of viral diseases in animals: development and production in Belarus, ed. N. A. Kovaleva. - Minsk: Belarusian Science, 2016. - 492 p.
3. Korochkin R.B. etc. Veterinary virology. Workshop: study guide. - Minsk: Information Center of the Ministry of Finance, 2020. - 348 p.
4. Animal cell in culture (methods and applications in biotechnology) /Under. total ed. prof. Dyakonova L.P. - M.: "Sputnik +", 2009.- 656 p.
5. Krasochko P.A. et al. Investigation of the metabolism of proteins and bioelements in growth media after cultivation of cell cultures on them // Mat. XIII int. scientific conf. young scientists "Youth in Science - 2016", Minsk, November 22 - 25, 2016. - Minsk, 2016. - P.14.

6. Krasochko P.A. Nutrient media for cultivating cell cultures: textbook.-method. manual for students of the Faculty of Veterinary Medicine in the specialty 1 - 74 03 02 "Veterinary Medicine" and students of the FPC and PC in veterinary specialties - Vitebsk: VGAVM, 2021.- P.40.
7. Blazhevich O.V. Cell cultivation. Course of lectures. - Minsk: BSU, 2004. – 78p.
8. Ditchenko T.I. Culture of cells, tissues and organs of plants: Guidelines for students. - Minsk: BSU, 2007. - 46 p.
9. Freshni R.Ya. Animal cell culture: a practical guide trans. fifth English edition. - M.: BINOM. Knowledge Laboratory, 2014. – 691p.
10. Krasochko P.A. Application of cell cultures to assess the cytotoxicity of blood serum of cattle // Scientific notes of the educational institution "Vitebsk Order of the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine": scientific and practical. magazine. - Vitebsk, 2017. - V. 53, no. 2. - P. 65-68.
11. Freshni R.Ya. Animal cell culture: a practical guide / per. 5th English ed. — M.: BINOM. Knowledge Laboratory, 2010. - 691 p.

УДК 619:615.37

DOI 10.47804/9785899040313_2022_153

ОТРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ ДОЗЫ ВВЕДЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВИРУСВАКЦИНЫ «ПНЕВМОВИР»

¹Красочко И.А., ¹Красочко П.А., ¹Овчинникова В.В., ¹Притыченко А.В.,
²Еремец В.И.

¹УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь
²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический
институт биологической промышленности», Московская область,
г.о. Лосино-Петровский, п. Биокомбината; e-mail: vnitibp@mail.ru

DEVELOPMENT OF OPTIMAL DOSE OF INACTIVATED CULTURE PNEUMOVIR VACCINE

¹Krasochko I.A., ¹Krasochko P.A., ¹Ovchinnikova V.V., ¹Pritychenko A.V.,
²Eremets V.I.

Ключевые слова: вакцина «Пневмовир», коровы, антитела, вирусы, иммунный ответ