

**ШЕВЧЕНКО МАКСИМ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ОПТИМИЗИРОВАННАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ  
СУСПЕНЗИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ВНК-21/2-17 И  
РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ЯЩУРА**

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

**Научный  
руководитель:**

**Михалишин Дмитрий Валерьевич**  
доктор ветеринарных наук

**Официальные  
оппоненты:**

- Плотникова Эдие Миначетдиновна, доктор ветеринарных наук, доцент, заведующая лабораторией культур клеток и питательных сред ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань;  
- Юрков Сергей Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ «Всероссийский исследовательский центр вирусологии и микробиологии», пос. Вольгинский, Владимирской обл.

**Ведущая организация:**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Московской обл.

Защита состоится *08 октября в 10 часов мск* на заседании диссертационного совета 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, мкрн. Юрьеvec.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.arriah.ru](http://www.arriah.ru) ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Ящур – высококонтагиозное вирусное заболевание домашних и диких парнокопытных животных. Ящур относится к категории трансграничных болезней, способных преодолевать границы между государствами, вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб животноводству (Щербаков А.В., 2015; Diaz-San Segundo F. et al., 2017).

В настоящее время противоящурные вакцины производятся с использованием клеток ВНК-21, полученных в виде суспензии. Преимуществом суспензионной культуры клеток является обеспечение быстрого роста в ферментерах, высокая чувствительность к вирусу ящура и рентабельное производство вакцины (Hassan A. I., 2016; Dill V. et al., 2019).

Для поддержания стабильного роста и размножения клеток ключевым фактором является выбор соответствующей питательной среды, способной обеспечить клетки элементами питания, метаболитами, необходимыми для биосинтеза, регуляторными факторами, веществами, способными выполнять защитные функции. Питательная среда поддерживает выживание и пролиферацию клеток, а также клеточные функции, а это означает, что качество среды напрямую влияет на скорость производства биопрепаратов и соответствие полученной культуры необходимым требованиям (Трухан, И. С., 2018; Verma A. et al., 2020).

Все питательные среды для тканевых культур конструируются на основе какого-либо сбалансированного солевого раствора с достаточной буферной емкостью. Источником аминокислот и витаминов в питательной среде могут быть сыворотка, различные гидролизаты и экстракты (Гизитдинов Н. Н., 1992; Дьяконова Л.П., 2009).

Часто аминокислоты добавляют для того, чтобы либо восполнять неспособность некоторых клеток синтезировать их, либо для компенсации потерь в процессе роста и деления клеток. Необходимость в этих органических кислотах может различаться у клеток различных типов (Фрешни, Р. Я., 2018; Chen M. et al., 2020).

В конце прошлого века учеными были разработаны варианты составов бессывороточных сред для разных клеточных линий. Отсутствие сыворотки в составе питательной среды дает ряд преимуществ: исключает смену питательной среды перед процессом инфицирования вирусом клеточной суспензии и позволяет сразу запустить процесс репродукции вируса ящура непосредственно в реакторе, где подготовлена (или выращена, произведена) суспензия клеток. Однако идентификацию подходящей бессывороточной среды для разных линий клеток животных и условий культивирования следует определять экспериментально (Sinacore M. S. et al., 2000).

Состав питательной среды может влиять на выход иммуногенных компонентов вируса ящура. Важное значение в получении вирусного антигена с высоким накоплением иммуногенных компонентов имеет выбор подходящего клона клеток ВНК-21 для репродукции вируса, а также оптимальные условия культивирования (Kim H. et al., 2019; Park S. et al., 2021; Yao T. et al., 2017).

Поиск новых компонентов и их оптимальных сочетаний для питательных сред, используемых в производственных процессах по культивированию клеток ВНК-21/2-17 и в наработке вирусосодержащего сырья для изготовления противоящурных вакцин, является актуальным направлением для дальнейших исследований.

**Цель и задачи исследования.** Целью наших исследований была оптимизация питательной среды для суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура.

Для достижения основной цели необходимо было решить следующие задачи:

- определить оптимальную концентрацию глюкозы в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- оценить возможность использования гидролизата белков крови в качестве основного источника аминокислот в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- определить оптимальную концентрацию сыворотки крови в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- использовать метод проточной цитометрии для оценки состояния популяции клеток ВНК-21/2-17 в процессе культивирования и репродукции вируса ящура;
- адаптировать линию клеток ВНК-21/2-17 к росту в питательной среде с использованием добавки «Sheff-Vax»;
- адаптировать линию клеток ВНК-21/2-17 к росту в бессывороточной среде «Cellvento»;
- сравнить иммуногенную активность вакцин, изготовленных из антигена вируса ящура, репродуцированного в клетках ВНК-21/2-17, выращенных в бессывороточной среде «Cellvento» и в оптимизированной среде.

**Степень разработанности темы.** Суспензионная культура клеток ВНК-21 обеспечивает крупномасштабное размножение вируса и рентабельное производство вакцины. 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. Также актуальной темой для исследований остается подбор бессывороточных сред для культивирования клеток, способствующих обеспечению безопасности и эффективности конечного продукта. В отношении вируса ящура в последние годы мало публикуется информации о компонентах питательной среды, которые необходимы для выращивания вируса до высоких титров в культуре клеток (Dill V. et al., 2019).

Исследования многих ученых были посвящены изучению условий культивирования клеток ВНК-21 для оптимального продуцирования вируса ящура: Манин Б.Л., 1998; Hassan A. I., 2016; Dill V. et al., 2018, 2019.

**Научная новизна.** Научная новизна исследований состоит в том, что:

- определена оптимальная концентрация глюкозы в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- доказана эффективность использования гидролизата белков крови в качестве основного источника аминокислот в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- установлена оптимальная концентрация сыворотки крови в питательной среде для культивирования клеток ВНК-21/2-17;
- разработан способ оценки состояния популяции клеток ВНК-21/2-17 методом проточной цитометрии;
- адаптирована линия клеток ВНК-21/2-17 к среде с использованием бессывороточной добавки «Sheff-Vax» и к бессывороточной среде «Cellvento»;
- определена иммуногенная активность вакцин, изготовленных из антигена вируса ящура, репродуцированного в клетках ВНК-21/2-17, выращенных в оптимизированной питательной среде и в бессывороточной среде «Cellvento».

Научная новизна исследований подтверждена получением трёх патентов на изобретение: № 2650768; № 2751664 и № 2722671 (полное библиографическое описание патентов представлено в списке опубликованных работ).

**Практическая значимость работы.** В результате проведенных исследований по оптимизации питательной среды для суспензионного культивирования клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура были разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

«Методические рекомендации по определению биологической активности гидролизата белков крови»;

«Методические рекомендации по получению матрового вируса ящура в монослойной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17)»;

«Методические рекомендации по определению флокулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида)».

Полученные результаты вошли в СТО 00495527-0143-2023 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)», СТО 00495527-0065-2023 «Вакцина против ящура культуральная инактивированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК».

**Методология и методы исследований.** Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных

материалов и естественно восприимчивых животных. В работе использованы вирусологические, химические, иммунологические методы.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- влияние разных концентраций глюкозы в питательной среде на кратность прироста клеток ВНК-21/2-17;
- оптимизация аминокислотного состава питательной среды с использованием гидролизата белков крови;
- результаты изучения разных концентраций сыворотки крови КРС на кратность прироста клеток ВНК-21/2-17 и количество 146S компонента вируса ящура;
- результаты исследования влияния концентрации клеток ВНК-21/2-17 на количество 146S компонента вируса ящура;
- результаты изучения методом проточной цитометрии клеточного цикла линии ВНК-21/2-17;
- адаптация линии клеток ВНК-21/2-17 к среде с использованием специализированной добавки «Sheff-Vax» и к бессывороточной среде «Cellvento»;
- сравнение иммуногенной активности вакцин, изготовленных из антигена вируса ящура, репродуцированного в клетках ВНК-21/2-17, выращенных в оптимизированной питательной среде и в бессывороточной среде «Cellvento».

**Личный вклад соискателя.** Диссертация выполнена автором самостоятельно. Автору принадлежит ведущая роль в планировании и выполнении основных исследований, обобщении и апробации полученных результатов.

За консультативную и методическую помощь автор выражает благодарность заведующему лабораторией профилактики ящура д.в.н. Михалишину Д.В., старшему научному сотруднику к.б.н. Гусевой М.Н., а также за содействие в выполнении отдельных этапов работы сотрудникам лаборатории профилактики ящура д.б.н. Доронину М.И., к.в.н. Борисову А.В. и к.в.н. Елькиной Ю.С.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях методической комиссии и Учёного совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2014 – 2023 гг.); на IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», г. Владимир, 2016 г.; на V Международной научной конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику», г. Владимир, 2019 г. По материалам диссертационных исследований опубликовано 13 научных работ, из них 6 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, получено 3 патента на изобретение. Исследования по

диссертационной работе являются частью комплексных тем НИР, выполнявшихся в ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в 2015-2021 гг.: государственный контракт № 25/19 от 01.04.2019 «Выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по созданию нового защитного препарата на основе циркулирующих вновь выделенных изолятов особо опасных и экзотических инфекций животных и его испытание (противоящурная инактивированная вакцина для ранней защиты против вируса ящура типа Азия-1)»; государственный контракт № 10/20 от 02.03.2020 «Выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по созданию нового защитного препарата на основе циркулирующих вновь выделенных изолятов особо опасных и экзотических инфекций животных и его испытание (противоящурная инактивированная вакцина для ранней защиты против вируса ящура типа А)».

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 140 страницах компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, заключение, список сокращений, список литературы, приложения; иллюстрирована 11 таблицами и 23 рисунками. Список использованной литературы включает 213 источников, из них 124 иностранных. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

## 2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1 Материалы

**Вирус ящура.** В работе использовали штаммы: О №2047/ Саудовская Аравия/08; Азия-1 №1946/Шамир 3/89; А №2029/Турция/06; А №2187/Кути/2013; А№2047/Киргизия/07, А№2171/Кабардино-Балкарский/2013; А№2269/ВНИИЗЖ/2015; Азия-1 №2145/Таджикистан/11.

**Животные.** Для экспериментов использовали белых мышей массой 18-20 г и подсвинков массой 30-50 кг.

**Культуры клеток.** Вирусологические исследования выполняли с использованием линий клеток: первично-трипсинизированная культура клеток почки свиньи (СП); суспензионная перевиваемая клеточная линия из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17).

**Оборудование.** При проведении научных исследований использованы: рН-метр марки Hanna HI 2210 (Германия); центрифуга марки ThermoScient (США); термостат марки Binder (Германия); шуттель аппарат марки THYS-2; аппараты для получения эмульсий Сильверсон 5 LM (Великобритания); флаконы стеклянные объемом 500 см<sup>3</sup>; культиваторы металлические с контроллером рН, рабочим объемом 50 дм<sup>3</sup> (КМ) фирмы Tris; культиваторы стеклянные рабочим объемом 6 дм<sup>3</sup> (КС-6);

культиваторы стеклянные рабочим объемом 40 дм<sup>3</sup> (КС); культиваторы металлические рабочим объемом 50, 1000, 2000 дм<sup>3</sup> (КМ), проточный цитометр «Accuri С6» (США), набор для работы с цитометром BD Cyslents; набор для определения ДНК клеток С6 Flow Cytometer Fluid Ki» (США); воздушные фильтры Minisart фирмы Sartorius, (Германия).

**Адьюванты.** При приготовлении инактивированных вакцин использован масляный адьювант Montanide ISA – 206VG фирмы «Seppic», Франция.

**Растворы и реактивы.** В работе использованы: фосфатно-буферный раствор 1/15М, рН 7,4-7,6; 4% раствор NaOH; 18-26% раствор аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ); уксусная кислота, ледяная кислота, ХЧ, ГОСТ 61-75; хлороформ, ГОСТ 20015-74 или ТУ 6-09-4263-76; 7,5% раствор бикарбоната натрия. Все растворы готовили на бидистиллированной воде ГОСТ 6709.

**Питательные среды:** В работе использованы: стандартная питательная среда для выращивания клеток по прописи ВНИИИ; среда Игла; раствор Эрла; раствор Хенкса; сухая бессывороточная клеточная среда «Cellvento ВНК-200» фирмы «Мерк» (Германия), бессывороточная добавка Sheff-Vax, Kerry, Inc. (Ирландия).

## 2.2 Методы исследований

**Культивирование суспензии клеток ВНК-21/2-17.** Проводили отъемно-доливным способом, отдельными циклами по 10-12 пассажей. При посевной концентрации 0,50-0,60 млн/см<sup>3</sup> 48 часов культивирования в оптимальном режиме концентрация составляет 4,00-5,50 млн /см<sup>3</sup>. В процессе культивирования проводили аэрацию суспензии стерильным воздухом в количестве 0,5-1,7 л воздуха/л среды. Температура культивирования клеток составляла 37,0±0,5°С, рН среды поддерживался в пределах 6,6-7,2 путем добавления 7,5%-ого раствора бикарбоната натрия.

**Культивирование вируса ящура в суспензии.** Выращивание вируса в суспензии проводили в культиваторах КС-6, КС-40 и КМ-50, КМ-2000 при температуре 37±0,4°С (не более 24 часов). Культуру клеток заражали вирусом из расчета 0,001-0,1 ТЦЦ<sub>50</sub>/кл. Через 6 часов инкубирования подсчитывали в камере Горяева процент живых и мертвых клеток, окрашивая клетки в вирусной суспензии трипановым синим. При достижении количества мертвых клеток 85-90% культивирование прекращали, вируссодержащую суспензию контролировали на стерильность, содержание общего вирусного белка и количество 146S компонента.

**Определение кратности прироста.** Кратность прироста (КП) клеток рассчитывали, как отношение конечной концентрации клеток к исходной в одном пассаже.

**Количественное определение 146S компонента вируса ящура.** Определение содержания 146S компонента в вируссодержащих суспензиях проводили по модифицированной методике определения содержания общего



вирусного белка и компонентного состава вируса ящура с помощью количественной РСК.

**Определение аминокислот.** Аминокислоты определяли 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».

**Анализ ГБК.** Анализ различных серий гидролиза белков крови проводили согласно ГОСТ 13805-76, ГОСТ 29311-92.

**Инактивация вируса.** Инактивацию инфекционности вируса проводили АЭЭИ в концентрации 0,03-0,05% при температуре 37°C в течение 12 часов при рН 7,4-7,6. Полученный антиген охлаждали.

**Очистка вирусной суспензии.** Для очистки вирусной суспензии от балластных примесей использовали раствор полигексаметиленгуанидина в концентрации 0,005-0,01%. Флокулированные и нерастворимые примеси отделяли седиментацией с последующей декантацией осветлённой суспензии антигена.

**Реакция микронеутрализации.** Для определения титра вируснейтрализующих антител (ВНА) использовали реакцию микронеутрализации (РМН). Постановку РМН осуществляли на первично-трипсинизированной культуре клеток СП по общепринятой методике с двукратным разведением исследуемых сывороток и постоянной дозой вируса 100 ТЦД<sub>50</sub> соответствующего штамма.

**Определение стерильности препаратов.** Биологический контроль на стерильность питательных сред, суспензий культуры клеток, антигена и готовой вакцины осуществляли в соответствии с ГОСТом 280085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

**Изготовление эмульсионных моновалентных вакцин.** При изготовлении моновалентных эмульсионных вакцин использовали инаktivированную антигенсодержащую суспензию, которую концентрировали с помощью проточной ультрафильтрации. В качестве адьюванта использовали Montanide ISA-206 VG. Концентраты антигенов и адьюванта Montanide ISA-206 VG диспергировали в соотношении 50:50 по массе.

**Контроль иммуногенности вакцин.** При определении иммуногенности вакцин руководствовались СТО 00495527-0065-2020 Вакцина против ящура культуральная инаktivированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК».

**Определение авирулентности и безвредности вакцины.** Контроль авирулентности противоящурной вакцины осуществляли согласно СТО 00495527-0065-2020 «Вакцина против ящура культуральная инаktivированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК».

**Оценка реактогенности вакцин на лабораторных животных.** Критерием оценки реактогенности (Кр, %) считали изменение массы лап после инъекции

испытуемых образцов относительно массы лап мышей после инъекции контрольного образца. Формула расчета коэффициента реактогенности:

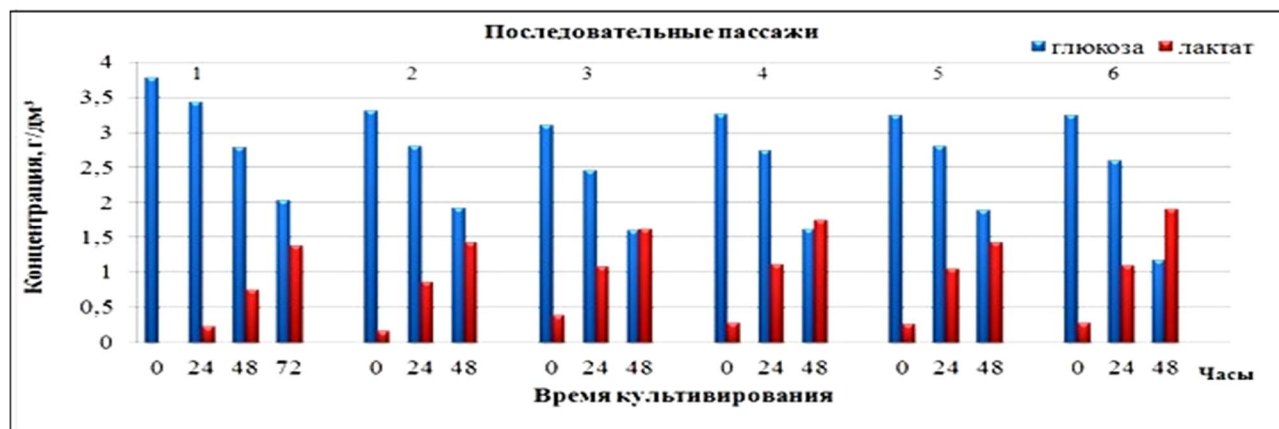
$$K_p = \frac{x_0 - x_k}{x_k} \times 100\%,$$

где  $x_k$  и  $x_0$  – средние арифметические массы лап после введения контрольного и испытуемого образцов масел, соответственно.

**Статистическая обработка результатов исследований.** Цифровой материал статистически обрабатывали на персональном компьютере общепринятыми методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической ( $M$ ), стандартной ошибки ( $\pm m$ ), и коэффициента корреляции ( $R$ ) с использованием программы Microsoft Excel.

### 2.3 Результаты собственных исследований

**Изучение влияния разного количества глюкозы на кратность прироста клеток ВНК 21/2-17 и репродукцию вируса ящура.** С помощью биохимического анализатора BioProfile 400 измеряли содержание глюкозы, лактата, давление кислорода в питательной среде и в динамике в 6 пассажах, а также изучали влияние различного количества глюкозы на репродукцию вируса ящура. Результаты исследований отражены на рисунке 1.



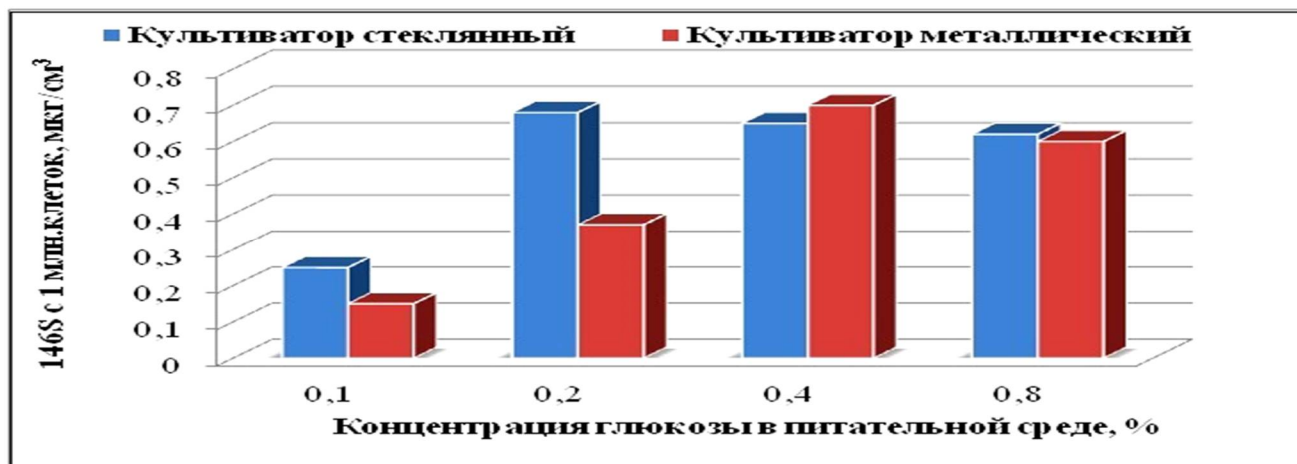
**Рисунок 1 – Динамика содержания глюкозы и лактата в питательной среде в процессе культивирования клеток ВНК-21/2-17 (n=14)**

Результаты исследований показали, что количество глюкозы уменьшалось в 1,86 раза в 1 пассаже и в 2,76 раза в 6 пассаже. В то же время в каждом пассаже наблюдалось увеличение содержания лактата в питательной среде от начала культивирования до окончания культивирования (48 часов). Количество лактата в питательной среде от начала до окончания культивирования возрастало от 0 до 1,37 г/дм<sup>3</sup> в 1 пассаже и в 8,88; в 4,1; в 6,25; в 5,5; в 7,1 раз во 2-6 пассажах, соответственно. Начиная с 4 пассажа, парциальное давление кислорода в среде снижалось в 1,40–2,10 раз по сравнению с первыми пассажами.

Сравнивали влияние различных концентраций глюкозы (0,1-0,8%) в питательной среде на кратность прироста клеток ВНК-21/2-17 в стеклянном и металлическом культиваторах (КС и КМ) в течение 6 пассажей.

Результаты исследования показали, что наибольшая кратность прироста (4,5 в КС и 4,45 в КМ) была отмечена при культивировании клеток в среде с использованием глюкозы в концентрации 0,8%. Наименьшие значения кратности прироста клеток в КС и КМ (2,6 и 2,4, соответственно) наблюдались при концентрации глюкозы в среде 0,1%.

С целью определения количества 146S компонента вируса ящура исследовали репродукцию вируса ящура штамма А №2045/Киргизия/07 в среде с различным содержанием глюкозы (0,1-0,8 %) в стеклянном и металлическом культиваторах. Количество 146S компонента определяли согласно «Методическим рекомендациям по определению концентрации 146S, 75S, 12S компонентов вакцинных штаммов культурального вируса ящура в реакции связывания комплемента (РСК) (Доронин М.И. и др., 2017). Результаты исследования представлены на рисунке 2.



**Рисунок 2 – Динамика накопления 146S компонента вируса ящура в зависимости от концентрации глюкозы в питательной среде (n=12)**

Результаты исследований показали, что высокое накопление 146S компонента при репродукции вируса ящура в КС наблюдалось при концентрации глюкозы 0,2; 0,4 и 0,8% (0,68±0,01, 0,65±0,02 и 0,62±0,03 мкг/см<sup>3</sup>, соответственно). При снижении концентрации глюкозы до 0,1 % снижалось количество 146S компонента в 2,75 раза. При репродукции вируса ящура в КМ с разной концентрацией глюкозы наименьшее накопление 146S компонента наблюдалось при концентрации 0,1% и 0,2% (0,15±0,28 и 0,37±0,03 мкг/см<sup>3</sup>, соответственно), время репродукции вируса увеличивалось на 8,5 часов при снижении концентрации глюкозы до 0,1%. Наибольшее накопление 146S компонента (0,7±0,41 мкг/см<sup>3</sup>) было отмечено при концентрации глюкозы в среде 0,4%.

**Изучение изменений аминокислотного состава питательных сред в процессе культивирования клеток ВНК-21/2-17.** Было проведено исследование

по определению аминокислотного состава гидролизата белков крови (ГБК) и питательной среды. Результаты исследований показали, что в ГБК в наибольшем количестве содержится изолейцин в сумме с лейцином и составляет 17%. В наименьшем количестве в ГБК содержатся такие аминокислоты, как аргинин 1%; метионин 2%; триптофан 2%. При изучении аминокислотного состава питательной среды было определено, что количество глутаминовой кислоты в питательной среде меньше в 4,5 раза, чем в ГБК. Количество гистидина с лейцином также было меньше в 1,54 раза. Однако аргинина в питательной среде было больше в 9 раз, чем в ГБК, а валина – в 1,9 раз.

На следующем этапе работы исследовали изменения аминокислотного состава питательной среды в процессе суспензионного культивирования клеток.

Исследования показали, что интенсивнее всего происходила утилизация валина (до 70%), аргинина (до 42%), был отмечен рост концентрации аланина (от 5 до 49%). Изолейцин потреблялся клетками в большей степени (до 70%) по сравнению с фенилаланином, глутаминовой кислотой и цистином (до 42%). Серин потреблялся клетками активнее (до 70%) по сравнению с треонином (до 42 %) и тирозином (до 45 %). Триптофан потреблялся клетками в минимальном количестве (до 7 %).

При сравнении КП клеток в стандартной питательной среде, в состав которой дополнительно вносят такие аминокислоты, как глутамин, аргинин, метионин, цистин, тирозин, триптофан, треонин, изолейцин, и в опытной среде, содержащей в своем составе необходимые соли, гидролизат белков крови (ГБК), а из аминокислот только аргинин и глутамин, было установлено, что через 48 часов концентрация клеток в контрольной и в опытной средах была равна 3,93-3,90 млн/см<sup>3</sup>, кратность прироста составила 5,60. Не наблюдалось значимых различий и в количестве 146S компонента при репродукции вируса ящура разных штаммов в клетках, выросших в опытной и контрольной средах (0,22-0,86 мкг/см<sup>3</sup> с 1 млн клеток). Время репродукции вируса составило 14–17 часов. Таким образом, ГБК можно использовать в качестве основного источника аминокислот в питательной среде, включая в ее состав только аргинин и глутамин.

**Влияние гидролизата белков крови, полученного в разные месяцы года, на кратность прироста клеточной линии ВНК-21/2-17 и количество 146S компонента вируса ящура.** Определяли кратность прироста суспензионной клеточной линии ВНК-21/2-17, выращиваемой в питательной среде с использованием ГБК из сырья, заготовленного в разные месяцы года. Для заражения выращенных клеток с целью определения количества 146S компонента использовали вирус ящура О №2047/Саудовская Аравия/08.

Результаты исследований показали, что ГБК из сырья, заготовленного в летние месяцы, стимулировал рост клеток в 1,2-1,3 раза больше по сравнению с остальными сезонами года. При репродукции вируса ящура в суспензии клеток, выращенных в среде с использованием ГБК из сырья, заготовленного в летние

месяцы, было получено в 1,3–1,6 раза больше 146S компонента вируса ящура, чем при использовании ГБК из сырья, заготовленного в осенне-зимний период.

**Влияние содержания сыворотки крови в питательной среде на репродукцию клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура.** В исследованиях оценивали влияние массовой доли сыворотки крови КРС в составе питательной среды на кратность прироста (КП) суспензионной культуры клеток ВНК-21/2-17. Выращивание клеток с 7 по 10 пассажи проводили в питательной среде с 2,5; 3,0; 4,0; 5,0% содержанием сыворотки.

Результаты исследования показали, что при использовании в питательной среде сыворотки крови КРС в концентрации 5% КП культуры клеток ВНК-21/2-17 на протяжении 7-10 пассажей увеличивалась с 4,98 до 5,31. Применение 4% сыворотки крови в составе питательной среды приводило к росту значений КП клеток с 4,91 до 5,16. Использование сыворотки крови КРС в концентрации 3% увеличивало КП клеток с 4,86 до 5,10; 2,5% сыворотки в составе питательной среды способствовало увеличению КП клеток с 4,78 до 5,09.

Определяли количество 146S компонента вируса ящура при его репродукции в клетках линии ВНК-21/2-17 с концентрацией 3,0-3,2 млн/см<sup>3</sup>, выращенных в питательной ростовой среде с разным содержанием сыворотки крови. Результаты представлены в таблице 1.

**Таблица 1 - Количество 146S компонента вируса ящура, полученное при репродукции в клетках ВНК-21/2-17, выращенных в питательной среде с разным содержанием сыворотки крови КРС**

(n=4, M±m, p<0,05)

Содержание сыворотки в питательной среде при культивировании клеток ВНК-21/2-17, %	Концентрация 146S компонента вируса ящура штаммов, мкг/см <sup>3</sup>			
	О №2047/Саудовская Аравия/08	А №2029/Турция/06	А №2187/Кути/13	Азия-1 №1946/Шамир 3/89
2,5	1,41±0,09	1,73±0,10	2,18±0,12	1,69±0,08
3,0	1,47±0,16	1,44±0,10	1,88±0,09	1,49±0,12
4,0	1,32±0,12	1,20±0,04	1,64±0,10	1,37±0,15
5,0	1,36±0,15	1,80±0,14	2,45±0,23	1,39±0,18

Как следует из таблицы 1, наибольшее накопление 146S иммуногенного компонента штамма вируса ящура О №2047/Саудовская Аравия/08 наблюдалось при заражении клеток, выращенных в среде с 3,0% сыворотки, штамма А№2029/Турция/06 - с 2,5%, штамма А№2187/Кути/2013 - с 5,0 %, Азия-1 №1946/Шамир 3/89 - с 2,5%.

**Влияние концентрации клеток ВНК-21/2-17 на количество 146S компонента вируса ящура.** Провели культивирование штамма вируса ящура А№2029/Турция/06 в КМ с автоматическим регулированием рН и культиваторе металлическом с ручным регулированием рН с целью сравнения концентрации 146S компонента, полученного в результате заражения суспензии с разной концентрацией клеток. Результаты исследований представлены в таблице 2.

**Таблица 2 – Влияние концентрации клеток линии ВНК-21/2-17 на количество 146S компонента вируса ящура**

(M±m, p<0,05)

№ опыта	Концентрация клеток, млн/см <sup>3</sup>	КМ с ручным регулированием рН	КМ с автоматическим регулированием рН	Тип вируса для заражения
		146S, мкг/см <sup>3</sup>	146S, мкг/см <sup>3</sup>	
1	2,51	1,93	1,90	А №2029/ Турция/06
2	3,16	1,87	2,00	
3	2,70	1,50	1,8	
M±m	2,79±0,19	1,76±0,13	1,9±0,05	
1	5,16	2,01	3,70	А №2029/ Турция/06
2	5,05	1,90	4,20	
3	5,25	2,00	3,50	
M±m	5,15±0,15	1,97±0,03	3,8±0,20	

Данные таблицы 2 показали, что при использовании КМ с ручным регулированием рН при средней концентрации клеток 2,79±0,19 млн/см<sup>3</sup> после репродукции вируса получали 1,76±0,13 мкг/см<sup>3</sup> 146S компонента. При репродукции вируса в КМ с автоматическим регулированием рН при той же концентрации клеток получали 1,90±0,05 мкг/см<sup>3</sup> 146S компонента, что больше в 1,10 раза. При концентрации клеток 5,15±0,15 млн/см<sup>3</sup> в КМ с автоматическим регулированием рН 146S компонент был получен в количестве 3,80±0,20 мкг/см<sup>3</sup>, что больше в 1,93 раза.

Из-за невозможности оснащения КМ-2000 автоматическим регулированием рН был отработан метод получения 146S компонента другим способом: клеточную суспензию, полученную на оптимизированной питательной среде с концентрацией клеток 3,53±0,03 млн/см<sup>3</sup>, брали в исходных объемах, а суспензию клеток с концентрацией от 5,50±0,08 млн/см<sup>3</sup> разводили средой до концентрации 3,65±0,20 млн/см<sup>3</sup>, после чего заражали вирусом ящура штамма А №2269/ВНИИЗЖ/2015.

Результаты исследований показали, что при использовании КМ с ручным регулированием с концентрацией клеток в суспензии 3,53±0,03 млн/см<sup>3</sup> в результате репродукции вируса количество 146S компонента составило 2,25 ±0,10 мкг/см<sup>3</sup>. При использовании КМ с ручным регулированием с концентрацией клеток в суспензии 5,50±0,08 млн/см<sup>3</sup>, которую разбавили средой до концентрации 3,65±0,20

млн/см<sup>3</sup>, получили  $2,29 \pm 0,18$  мкг/см<sup>3</sup> 146S компонента. Разница в количествах 146S компонента была незначительной. Однако расчетное (планируемое) количество доз вакцины из антигена, полученного на основе клеточной суспензии, которую разбавляли средой перед заражением вирусом, было больше в 1,83 раза, чем количество доз вакцины из антигена, изготовленного из вируса, репродуцированного в клетках с исходной концентрацией  $3,53 \pm 0,03$  млн/см<sup>3</sup>. Следовательно, экономически эффективнее получать большие объемы антигена путем разбавления суспензий с большей концентрацией клеток перед заражением вирусом.

**Исследование клеточного цикла линии ВНК-21/2-17 методом проточной цитометрии.** В исследованиях изучили динамику клеточного цикла методом проточной цитометрии при суспензионном культивировании клеточной линии ВНК-21/2-17 в течение 48 часов, а также оценили влияние постоянного значения рН среды на фазы клеточного цикла.

Было установлено, что через 8 часов от начала культивирования происходило увеличение количества апоптозных клеток и дебриса (до 31% в КМ с ручным регулированием рН и 59% в КМ с автоматическим регулированием рН). При культивировании в КМ с ручным регулированием рН происходило еще несколько пиков роста нерепродуктивных клеток. Увеличение их количества было связано с низкими значениями рН среды. Установили, что через 20, 24, 38 и 42 часа значение рН колебалось в пределах  $6,38 \pm 0,17$ , в то время как для данной линии ВНК значение рН оптимально в пределах 6,6-6,7. В клеточном цикле линии ВНК- 21/2-17 преобладала фаза начального роста G1 (приходилось от 30% до 75% клеток) Фаза S занимала от 2% до 33%, а фаза подготовки к митозу и сам митоз (G2 + M) – от 2% до 18%.

Провели изучение изменений, происходивших в разные фазы клеточного цикла при культивировании вируса ящура в клетках суспензионной линии ВНК-21/2-17. Клетки ВНК–21/2–17 заражали вирусом ящура штамма Азия-1 №1946/Шамир 3/89. Результаты исследований показали, что к 3 часам культивирования вируса фаза G1 сократилась на 15–17%, через 6 ч выделялся пик уменьшения G1 и увеличения апоптоза. Через 7–9 часов наблюдался процесс тотального разрушения клеток. Через 6 часов репликации вируса количество клеток в S-фазе возрастало линейно вплоть до конца репродукции, что коррелировало с двумя небольшими пиками G1 и одним пиком G2. Выявлено, что основной мишенью для вируса ящура являлись клетки, находившиеся в G1-фазе, которые полностью разрушались к концу культивирования. Во время фазы G2 + M массового разрушения клеток не наблюдалось.

**Применение бессывороточной добавки «Sheff-Vax» в питательных средах для культивирования клеток ВНК-21/2-17.** Клетки ВНК-21/2-17, выращенные в питательной среде с сывороткой крови в концентрации 3-4%, адаптировали к питательной среде с бессывороточной добавкой «Sheff-Vax» на протяжении 7 последовательных пассажей.

По результатам исследований было определено, что седиментированная популяция имела стандартную морфологию клеток для данной клеточной линии, на которых наблюдали множество динамических выростов, что, в свою очередь, свидетельствовало о нормальной физиологической активности.

Проводили изучение влияния добавки «Sheff-Vax» на концентрацию клеток в процессе культивирования. В качестве контролей использовали: №1 – оптимизированную среду с концентрацией глюкозы 0,4%, с ГБК из сырья, полученного в летние месяцы, с добавлением аргинина и глутамина и сывороткой крови КРС в концентрации 3-4%; № 2 – среду со снижением процента сыворотки в 2 раза на каждом следующем пассаже клеток; в качестве опыта – среду со специализированной добавкой «Sheff-Vax» в концентрации 10 г/дм<sup>3</sup>.

Результаты исследований показали, что концентрация клеток в контрольных образцах в 1-7 пассажах при окончании культивирования варьировала от  $1,45 \pm 0,04$  млн/см<sup>3</sup> до  $2,32 \pm 0,29$  млн/см<sup>3</sup>. В опытном образце концентрация клеток изменялась от  $1,03 \pm 0,03$  млн/см<sup>3</sup> в 1 пассаже до  $1,60 \pm 0,05$  млн/см<sup>3</sup> в 7 пассаже. Кратность прироста клеток в опытном образце на протяжении первых 6 пассажей была ниже контроля в 1,18–1,80 раза. Внесение добавки не влияло на pH среды при культивировании.

Проводили заражение суспензии клеток ВНК-21/2-17 вирусом ящура с целью определения влияния добавки «Sheff-Vax» в питательной среде на количество 146S компонента. Результаты представлены в таблице 4.

**Таблица 4 – Репродукция вируса ящура в клетках линии ВНК-21/2-17, выращенных в присутствии добавки «Sheff-Vax»**

(n=4, M±m, p<0,05)

Среда	Штамм вируса ящура	Концентрация клеток, млн/см <sup>3</sup>	Количество 146S, мкг/ см <sup>3</sup>
Оптимизированная	Азия-1 №2145/ Таджикистан/11	1,50±0,31	0,58±0,09
С уменьшением количества сыворотки		1,50±0,23	0,91±0,20
С добавкой «Sheff-Vax»		1,50±0,17	1,40±0,10

Из представленных результатов видно, что при репродукции вируса в клетках, выращенных в присутствии специализированной добавки «Sheff-Vax», количество 146S компонента было больше в 2,41 и 1,53 раза, чем при репродукции вируса ящура в клетках ВНК-21/2-17, выращенных в питательных средах с



постоянным содержанием сыворотки и с уменьшением ее количества. Бессывороточная добавка «Sheff-Vax» может быть использована как альтернативная добавка для культивирования клеток ВНК-21/2-17 и репродукции вируса ящура.

**Адаптация клеток ВНК-21/2-17 к бессывороточной среде, репродукция вируса ящура.** Была проведена адаптация клеточной линии ВНК-21/2-17 к бессывороточной среде. Опытную суспензию клеток ежедневно разбавляли питательной средой «Cellvento» в 2 раза, а контрольную – оптимизированной питательной средой с добавлением сыворотки в течение 6 суток. Результаты исследований представлены в таблице 5.

**Таблица 5 - Адаптация линии клеток ВНК-21/2-17 к бессывороточной среде «Cellvento»**

(n=8, M±m, p<0,05)

Сутки	Опыт		Контроль	
	Концентрация клеток, млн/см <sup>3</sup>	pH	Концентрация клеток, млн/ см <sup>3</sup>	pH
0	0,74±0,05	7,10±0,03	0,69±0,08	7,02±0,14
1	1,85±0,30	6,69±0,04	1,45±0,07	6,5±0,07
2	2,29±0,23	6,66±0,08	1,91±0,41	6,57±0,09
3	2,43±0,13	6,67±0,03	2,13±0,70	6,43±0,09
4	2,20±0,07	6,76±0,03	2,30±0,80	6,46±0,10
	Полная смена среды на бессывороточную			
0	0,99±0,06	6,98±0,03	1,30±0,10	6,88±0,10
1	2,08±0,19	6,65±0,07	2,30±0,20	6,37±0,11
2	2,49±0,04	6,90±0,02	2,35±0,20	6,71±0,11

По результатам исследований установлено, количество клеток увеличивалось в 2,2-2,5 раз и в контроле, и в опыте. Через четверо суток проводили полную смену среды на бессывороточную. На бессывороточной среде количество клеток увеличивалось в 0,9-2,1 раз.

После 2 пассажа на бессывороточной среде клетки заморозили с ДМСО (10%) и хранили в жидком азоте (банк клеток). Через 2 месяца после криозаморозки на протяжении 6 пассажей провели проверку замороженного банка клеток. Перепассаж проводили через 48 часов, pH поддерживали в пределах 7,0-7,2. Во флаконах (2-3 пассажи) кратность прироста клеточной массы была равна 2,0-2,7. Было определено, что клетки ВНК-21/2-17, выращенные в оптимизированной питательной среде, имели размеры 8-12 мкм, а клетки, выращенные в бессывороточной среде, были крупнее – 15-20 мкм. Затем из флаконов клетки перемещали в КС-6 (4-6 пассажи) и заражали вирусом ящура разных штаммов. Результаты опытов представлены в таблице 6.

**Таблица 6 - Влияние бессывороточной питательной среды «Cellvento» на количество 146S компонента вируса ящура в клетках линии ВНК-21/2-17**

(n=5, M±m, p<0,05)

Среда	Штаммы вируса ящура	Концентрация клеток, млн/см <sup>3</sup>	Количество 146S, мкг/см <sup>3</sup>		Количество поражен. кл., %	Время репродукции вируса, ч
			после инакт. и очистки	146S с 1 млн кл		
Опыт	О№2047/Саудовская Аравия/08	1,40±0,23	1,30± 0,11	0,70± 0,09	78	17
	А№2029/Турция/06	1,10±0,31	1,20± 0,10	0,86± 0,10	89	16,5
	Азия-1 №1946/ Шамир/ 3/89	1,30±0,37	1,14± 0,20	0,88± 0,10	90	16
Конт- роль	О№2047/Саудовская Аравия/08	1,20±0,47	1,20± 0,15	0,76± 0,12	85	16
	А№2029/Турция/06	1,10±0,08	1,04± 0,70	0,86± 0,23	87	16
	Азия-1№1946/ Шамир/ 3/89	1,50±0,13	1,29± 0,13	0,86± 0,11	89	14

В соответствии с данными таблицы 6, при репродукции вируса ящура разных штаммов в клетках, выращенных в контрольной и опытной средах, количество 146S компонента с 1 млн кл/см<sup>3</sup> составило 0,70-0,88 мкг/см<sup>3</sup>. Не было различий ни во времени репродукции вируса (14–17ч), ни в процентах пораженных клеток (78–90%). После инактивации и очистки количество 146S компонента вируса ящура разных штаммов было равно 1,04-1,30 мкг/см<sup>3</sup>.

**Изучение иммуногенной активности эмульсионных вакцин.** Для опытов изготовили 2 образца эмульсионных вакцин из штамма вируса ящура А №2029/Турция/06 с использованием адьюванта Montanide ISA-206 VG: вакцина №1 – на основе антигена, полученного на бессывороточной среде; вакцина №2 – на основе антигена, полученного при культивировании в клетках, выращенных в среде с сывороткой. Для исследования реактогенности двум группам мышей по 10 голов массой 18-20 г в подушечку задней правой лапы вводили вакцины в объеме 0,05 см<sup>3</sup>. Критерием оценки реактогенности служил процент отека лапок. В результате опытов было установлено, что коэффициент реактогенности был в пределах 16,6% при сравнении обеих вакцин.

Для сравнения иммуногенной активности вакцины №1 и №2 вводили свиньям внутримышечно за ухом в цельном виде и в разведении 1/5. Титры антител определяли в реакции нейтрализации (РН). Контрольное заражение проводили на 21 СПВ гомологичным штаммом вируса ящура А №2029/Турция/06 интрадермально в две точки в дозе 10<sup>4</sup> ИД<sub>50</sub>/0,2см<sup>3</sup>. Результаты исследования представлены в таблице 7.

**Таблица 7 – Исследование иммуногенной активности культуральных инактивированных эмульсионных вакцин против ящура на свиньях**

(M±m, p&lt;0,05)

N вакцины	Разведение вакцин	Прививная доза, см <sup>3</sup>	Титры антител, log <sub>2</sub> SN <sub>50</sub>	Результаты контрольного заражения, голов		ИмД <sub>50</sub> / ПД <sub>50</sub>
				количество зараженных	количество защищенных	
№1 – на бессывороточной среде	цельная	2,0	4,50±0,43	5	5	0,25/8,10
	1:5	2,0	2,75±0,76	5	4	
№2 – на оптимизированной среде	цельная	2,0	4,00±0,54	5	5	0,34/5,87
	1:5	2,0	2,30±0,65	5	3	

**Примечание:** числитель – количество защищенных животных при контрольном заражении; знаменатель – количество животных, использованных в опыте.

Анализ результатов таблицы 7 показал, что обе вакцины без разведения защитили животных от генерализованной формы ящура. Вакцина №1 в разведении 1:5 защищала 4 головы, а вакцина №2 в разведении 1:5 – 3. Иммуногенная активность вакцин №1 и №2 составила 8,10 ПД<sub>50</sub> и 5,87 ПД<sub>50</sub>, соответственно.

### 3 Заключение

#### 3.1 Выводы

1. Определено, что концентрация глюкозы 0,4-0,8% в составе питательной среды является оптимальной для культивирования клеток ВНК-21/2-17 в металлическом и стеклянном культиваторах, что способствует повышению кратности прироста клеток в 4,5 раза.

2. Показано, что использование гидролизата белков крови в концентрации 0,20% в составе питательной среды с добавлением глутамин и аргинина позволяет культивировать клетки с высокой кратностью прироста без внесения дополнительных аминокислот (метионин, цистин, тирозин, триптофан, треонин, изолейцин).

3. Установлено, что использование в составе питательной среды гидролизата белков крови из сырья, заготовленного в летние месяцы, способствует повышению кратности прироста клеток ВНК-21/2-17 в 1,3 раза и увеличению количества 146S компонента в 1,6 раза в результате репродукции вируса ящура.

4. Выявлено, что в клеточном цикле линии ВНК- 21/2-17 преобладала фаза начального роста G<sub>1</sub>. На эту фазу приходилось от 30 до 75% клеток в зависимости от времени культивирования. Фаза S занимала от 2 до 33%, а фаза подготовки к митозу и сам митоз (G<sub>2</sub> + M) – от 2 до 18%. Клетки, находящиеся в

фазе G1, чаще подвергались воздействию вируса ящура по сравнению с клетками, находящимися в других фазах.

5. Определено, что повышение концентрации сыворотки крови крупного рогатого скота от 2,5 до 5,0 % в составе питательной среды для культивирования клеток ВНК-21/2-17 приводило к незначительному увеличению (3-4%) кратности прироста клеток и не оказывало влияния на количество 146S компонента вируса ящура.

6. Показано, что культивирование клеток ВНК-21/2-17 в оптимизированной среде в культиваторе металлическом с автоматическим регулированием pH и разбавление клеточной суспензии с концентрацией клеток  $5,15 \text{ млн/см}^3$  до  $3,65 \text{ млн/см}^3$  перед заражением вирусом ящура, позволило увеличить количество 146S компонента в 1,93 раза.

7. Клетки ВНК-21/2-17 были адаптированы к питательной среде со специализированной добавкой «Sheff-Vax». В результате репродукции вируса ящура в клетках, выращенных в данной среде, было получено в 1,54-2,41 раза больше 146S компонента с 1 млн клеток по сравнению с количеством 146S компонента, полученным в результате репродукции вируса в клетках, выращенных в среде с добавлением сыворотки КРС.

8. Клетки ВНК-21/2-17 были адаптированы к бессывороточной питательной среде «Cellvento» и имели морфологические различия в размерах (15-20 мкм) по сравнению с клетками, выращенными в среде с сывороткой (8-12 мкм), и после криоконсервирования не теряли своей жизнеспособности.

9. Определено, что эмульсионные противоящурные вакцины, изготовленные на основе антигенов, полученных на оптимизированной и бессывороточной питательных средах, обладали слабой реактогенностью (16,6%), были авирулентными и безвредными. Иммуногенная активность вакцин составила 8,10 ПД<sub>50</sub> и 5,87 ПД<sub>50</sub>, соответственно.

### 3.2 Практические предложения

Разработаны и внедрены в лабораторную практику: «Методические рекомендации по определению биологической активности гидролизата белков крови»; «Методические рекомендации по получению матрового вируса ящура в монослойной клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17)». Полученные результаты вошли в СТО 00495527-0143-2018 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)», СТО 00495527-0065-2020 «Вакцина против ящура культуральная инактивированная эмульсионная «АРРИАХ-ВАК». Получены патенты: № 2650768 «Штамм О №2212/Приморский/2014 вируса ящура *Arphtaerizooticae* типа О для контроля антигенной и иммуногенной активности

противоящурных вакцин и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа О»; № 2751664 «Способ получения иммуногенных компонентов культурального вируса ящура типов А, О, Азия-1 с применением бессывороточной среды «Cellvento™ ВНК-200» для изготовления противоящурных вакцин»; № 2722671 «ВНК-21/SUSP/ARRIAN - перевиваемая суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3, болезни Ауески при производстве противовирусных вакцин, а также для изготовления диагностических и профилактических ветеринарных биопрепаратов».

### 3.3 Перспектива дальнейшей разработки темы

Результаты данной работы могут быть использованы для повышения эффективности питательной среды при выращивании линии клеток ВНК-21 и репродукции вируса ящура для производства противоящурных вакцин.

### 4 Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Изучение изменений аминокислотного состава питательных сред в процессе культивирования клеток ВНК-21/2-17/ Гусева, М.Н.; Лозовой, Д.А.; Кузнецова, Е.Г.; **Шевченко, М.А.**; Большаков, Д.С.// Ветеринария сегодня. - 2014. - № 3. - С. 35-42.
2. Метаболизм глюкозы при культивировании вируса ящура в суспензии клеток ВНК-21/2-17/ Гусева, М.Н.; Кузнецова, Е.Г.; Лозовой, Д.А.; Михалишин, Д.В.; **Шевченко, М.А.** //Актуальные вопр. вет. биологии. - 2015. - № 2. - С. 11-16.
3. Исследование некоторых биохимических параметров культуры клеток ВНК-21/2-17 после криоконсервирования и кратковременного хранения при температуре 4-8°C/ Лозовой, Д.А.; Гусева, М.Н.; Манин, Б.Л.; Михалишин, Д.В.; Кузнецова, Е.Г.; **Шевченко, М.А.** // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. - 2015. - Т. 13. - С. 145-163.
4. Влияние концентрации клеток ВНК-21/2-17 на количество иммуногенных компонентов вируса ящура/ Гусева, М.Н.; Манин, Б.Л.; Кузнецова, Е.Г.; Михалишин, Д.В.; **Шевченко, М.А.**//Рос. вет. журн. С.-х. животные. - 2015. - № 3. - С. 19-21.
5. Влияние концентрации сыворотки крови в питательной ростовой среде на репродукцию клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура/ Шевченко, М.А.; Доронин, М.И.; Клюкина, Н.Д.; Шишкова, А.А.; Лозовой, Д.А.; Михалишин, Д.В.// Ветеринария сегодня. - 2017. - № 1 - С. 50-54.
6. Исследование клеточного цикла линии ВНК-21/2-17 методом проточной цитометрии/ **Шевченко, М.А.**; Гусева, М.Н.; Михалишин, Д.В.; Манин, Б.Л.; Шишкова, А.А. // Ветеринария сегодня. - 2017. - № 4. - С. 58-62.

7. Влияние изменений аминокислотного состава гидролизата белков крови на продуктивность клеточной линии ВНК-21/2-17 и количество иммуногенных компонентов вируса ящура/ **Шевченко, М.А.**; Гусева, М.Н.; Лозовой, Д.А.; Доронин, М.И.; Михалишин, Д.В.; Михалишин, В.В. // Ветеринария сегодня. - 2018. - № 1. - С. 55-59.

8. Изменение аминокислотного состава гидролизата белков крови в зависимости от сезона заготовки сырья/ Гусева, М.Н.; **Шевченко, М.А.**; Большаков, Д.С.; Доронин, М.И.; Михалишин, Д.В.; Шишкова, А.А.; Михалишин, В.В. // Ветеринария сегодня. - 2018. - № 2. - С. 47-52.

9. Влияние концентрации сыворотки крови в питательной ростовой среде на репродукцию клеток линии ВНК-21/2-17 и вируса ящура / **М. А. Шевченко**, М. И. Доронин, Н. Д. Клюкина, А.А.Шишкова, Д.А. Лозовой, Д.В. Михалишин // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику: материалы IV Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, 06 декабря 2016 года. – Владимир: Федеральное государственное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных", 2016. – С. 55.

10. Сравнение химической и биологической активности серий гидролизата белков крови, полученных в 2017–2018 и 2018–2019 гг / **М. А. Шевченко**, М. Н. Гусева, М. И. Доронин, О. Е. Федорова// Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику : Материалы V Международной научной конференции, Владимир, 05–06 декабря 2019 года. – Владимир: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных", 2019. – С. 39-47.

11. Патент № 2650768 Российская Федерация, МПК С12N 7/00 (2006.01). Штамм О № 2212/Приморский/2014 вируса ящура *Aphtaepizooticae* типа О для контроля антигенной и иммуногенной активности противоящурных вакцин и для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ящура типа О / Д.А. Лозовой, А.В. Мищенко, Д.В. Михалишин, А.В. Константинов, А.Вал. Борисов, С.Н. Фомина, С.Р. Кременчугская, А.В. Щербаков, Т.К. Майорова, **М.А. Шевченко**; ФГБУ «ВНИИЗЖ».-№ 2016140459; заявл. 14.10.2016; опубл. 17.04.2018, бюл. № 11. - введ. с 14.10.2016 по 14.10.2036.

12. Патент № 2722671 Российская Федерация, МПК С12N 5/10. ВНК-21/SUSP/ARRIAN - перевиваемая суспензионная сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка, предназначенная для репродукции вирусов ящура, бешенства, парагриппа-3, болезни Ауески при производстве противовирусных вакцин, а также для изготовления диагностических и профилактических ветеринарных биопрепаратов: № 2019131190: заявл. 01.10.2019:

опубл. 02.06.2020 / Д. А. Лозовой, М. Н. Гусева, Д. В. Михалишин, М.И. Доронин, Б.Л. Манин, А.А. Шишкова, В.А. Стариков, **М.А. Шевченко**, А.В. Борисов; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ").

13. Патент № 2751664 Российская Федерация МПК C12N5/07C12N7/00 A61K39/135 Способ получения иммуногенных компонентов культурального вируса ящура типов А, О, Азия-1 с применением бессывороточной среды «Cellvento тм ВНК-200» для изготовления противоящурных вакцин: № 2020128797: заявл. 15.07.2021 / М.И. Доронин, Д.В. Михалишин, М.Н. Гусева, В.А. Стариков, А.В. Борисов, **М.А. Шевченко**; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ").

Подписано в печать 16.07.2024 г.  
Формат 60x90 1/16. Усл. печ. л. 1 Тираж 80 экз.  
Отпечатано на полиграфической базе  
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»