

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-107-112

УДК 616.912-085.371

А.В. Овчинников, Г.В. Борисевич, А.И. Терентьев, Ю.И. Пашченко, В.Т. Кротков, В.Н. Марченко, С.В. Борисевич, С.Л. Кузнецов

ОПТИМИЗАЦИЯ НАКОПЛЕНИЯ ВИРУСА ВАКЦИНЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВООСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Российская Федерация

Цель. Оптимизация культивирования вируса вакцины в суспензионной культуре клеток ВНК-21 с целью повышения инфекционной активности вирусосодержащей суспензии как основы для получения противооспенных вакцинных препаратов. **Материалы и методы.** В исследованиях использовали суспензионную культуру переносимой линии клеток ВНК-21 72-часового возраста и питательную среду типа МЕМ в соответствии с инструкцией по ее приготовлению. Для инфицирования клеток ВНК-21 использовали вирус вакцины, штамм Б-51. Вирус адаптирован путем трех последовательных пассажей на хорион-алантоисной оболочке развивающихся куриных эмбрионов коммерческой дермовакцины серии 449а в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Информация о его генетической характеристике отсутствует. Культивирование и осаждение инфицированных клеток ВНК-21 проводили в ферментере с объемом заполнения 1 л при температуре $(36,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и аэрации воздушной смесью с различным содержанием CO_2 . **Результаты и обсуждение.** Повышена интенсивность газового массообмена при одновременном сохранении щадящих гидродинамических условий перемешивания суспензионных культур клеток в ферментере. Увеличена в два раза до $(4,48 \pm 0,63) \cdot 10^9$ кл./л концентрация суспензионной культуры клеток ВНК-21 в конце цикла выращивания. Повышена в 3–5 раз концентрация вируса вакцины с $(8,1 \pm 0,3)$ lg БОЕ/мл до уровня инфекционной активности $(8,8 \pm 0,3)$ lg БОЕ/мл. Удельная множественность инфицирования клеток в пересчете на клетку составила 1–5 БОЕ/кл., а по урожаю вируса – 20–100 БОЕ/кл. Увеличение инфекционной активности вируса в концентрированной суспензии инфицированных клеток ВНК-21 подтверждает перспективность предлагаемых путей совершенствования стадии накопления вируса вакцины при разработке противооспенных препаратов на основе культур клеток.

Ключевые слова: культура клеток ВНК-21, вирус вакцины, ферментер, суспензионное культивирование клеток.

Корреспондирующий автор: Овчинников Александр Викторович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Овчинников А.В., Борисевич Г.В., Терентьев А.И., Пашченко Ю.И., Кротков В.Т., Марченко В.Н., Борисевич С.В., Кузнецов С.Л. Оптимизация накопления вируса вакцины при разработке противооспенных препаратов на основе культур клеток. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 1:107–112. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-107-112

A.V. Ovchinnikov, G.V. Borisevich, A.I. Terent'ev, Yu.I. Pashchenko, V.T. Krotkov, V.N. Marchenko, S.V. Borisevich, S.L. Kuznetsov

Optimization of Vaccine Virus Accumulation in the Development of Smallpox Drugs Based on Cell Cultures

“The 48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

Abstract. Objective. Optimization of vaccine virus cultivation in the suspended cell culture BHK-21 for infectious activity increment of virus-containing suspension as the base material for smallpox vaccine preparations. **Materials and methods.** We used suspended culture line of the cells BHK-21 of 72-hour age and nutrient medium of the MEM type in accordance with the guidelines on preparation in our studies. For challenging of the cells, vaccine virus (strain B-51) was used. The virus was adapted through three consequent passages on horion-allantois shell of developing chicken embryos of commercial dermovaccine series 449a at the premises of the Federal State Budgetary Institution “the 48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Information on its genetic features is absent. Cultivation and precipitation of infected cells BHK-21 was carried out in bioreactor with priming volume of 1 liter at $(36.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ and aeration with air mixture with varying content of CO_2 . **Results and conclusions.** Gas mass-exchange intensity was enhanced alongside simultaneous maintaining of sparing hydrodynamic conditions for mixing suspended cell cultures in bioreactor. Two-fold increase (up to $(4.48 \pm 0.63) \cdot 10^9$ cell/l) in suspended BHK-21 cell culture concentration at the end of reproduction cycle was achieved. Concentration of the vaccine virus was 3–5 times raised, from (8.1 ± 0.3) lg PFU (plaque forming unit)/ml up to the level of infectious activity – (8.8 ± 0.3) lg PFU/ml. Specific multiplicity of cell infection in recalculation per a cell was 1–5 PFU/cell and by virus yield – 20–100 PFU/cell. Enhanced infectious activity of the virus in concentrated suspension of infected BHK-21 cells substantiates the perspectives of the proposed method for improvement of vaccine virus accumulation phase in the development of anti-smallpox preparations based on cell cultures.

Key words: culture of BHK-21 cells, virus of the vaccine, bioreactor, suspension cultivation of cells.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Alexander V. Ovchinnikov, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Ovchinnikov A.V., Borisevich G.V., Terent'ev A.I., Pashchenko Yu.I., Krotkov V.T., Marchenko V.N., Borisevich S.V., Kuznetsov S.L. Optimization of Vaccine Virus Accumulation in the Development of Smallpox Drugs Based on Cell Cultures. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 1:107–112. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-107-112

Received 08.10.18. Revised 08.11.18. Accepted 08.02.19.

Разработка и производство эффективных иммунобиологических противовирусных лекарственных препаратов, в том числе против вируса натуральной оспы и оспы животных, патогенных для человека, является актуальной задачей и играет важную роль в эпидемиологическом надзоре за опасными инфекционными заболеваниями.

Современные успехи в получении противооспенных препаратов во многом основаны на достижениях в области биотехнологии культур клеток млекопитающих. Накопление вируса вакцины в биосубстрате является основным технологическим звеном в процессе производства противооспенных вакцин. От уровня биологической активности исходной вирусосодержащей суспензии существенно зависит эффективность вакцинного препарата. Выход целевого продукта при использовании культур клеток в биотехнологии зависит от их концентрации, достигаемой в процессе культивирования. Чем выше концентрация клеток млекопитающих перед инфицированием, тем выше выход биомассы антигенных препаратов, получаемых на их основе [1–7].

До недавнего времени наиболее высокие концентрации суспензии клеток – порядка $10,0 \cdot 10^9$ кл./л в конце цикла выращивания достигались при проточном способе культивирования [7]. Однако такой способ в практике вирусологических исследований по получению иммунобиологических лекарственных противовирусных препаратов практически не используется из-за неизбежных потерь биомассы вирусов вследствие вымывания в процессе протока питательной среды.

Предпринимались неоднократные попытки повысить конечную концентрацию суспензионной культуры клеток ВНК-21 в ферментере путем подачи на аэрацию воздушной смеси с различным содержанием кислорода от (5 до 35 %) и изменением концентрации аминокислот, витаминов и сыворотки крови крупного рогатого скота в питательной среде. При увеличении концентрации этих компонентов конечная концентрация клеток в суспензии увеличивалась до $3,0 \cdot 10^9$ кл./л для ВНК-21, в дальнейшем увеличения концентрации клеток не наблюдалось. Возможно, это связано с токсическим действием на клетки высоких концентраций аминокислот, витаминов, сыворотки и продуктов метаболизма [5].

В то же время увеличение концентрации кислорода в аэрирующей газовой смеси до 35 % позволило через 72 ч культивирования достигнуть концентрации клеток до $3,7–3,9 \cdot 10^9$ кл./л. Однако применение для аэрации воздушных смесей с содержанием кислорода выше 21 % является технически более сложным процессом, вследствие чего он не нашел практического применения [5].

Поэтому получение суспензии клеток млекопитающих повышенной концентрации связано с необходимостью интенсификации гидродинамических и массообменных условий культивирования. При этом высокие концентрации клеток в процессе культиви-

рования требуют повышенных значений коэффициентов массообмена по кислороду и углекислому газу в ферментере.

При суспензионном выращивании клеток млекопитающих в качестве основы для получения вирусов необходимо обеспечение клеток растворенными компонентами питательной среды и растворенным кислородом, поступающим из газовой фазы в жидкую и далее к клетке. Кроме того, необходимо отводить газообразные продукты процессов метаболизма, в основном углекислого газа, который выводится из культуральной жидкости в газовую фазу ферментера.

Интенсивность массообменных процессов культивирования характеризуется коэффициентами массопередачи по кислороду и углекислому газу. Их типовые значения при суспензионном способе культивирования в ферментере объемом 1 л составляют 1,3/ч и 1,0/ч соответственно [5]. Для обеспечения дыхательных потребностей клеток при их повышенной концентрации требуется увеличение интенсивности процессов массопередачи при одновременном сохранении щадящих условий перемешивания.

Ранее было предложено характеризовать гидродинамические условия культивирования через параметры, характеризующие суммарную среднюю элементарную работу над клеткой за все время перемешивания ($A_{cp, \Sigma}$) и максимальную элементарную работу над клеткой за единичную встречу ее с концом лопасти мешалки (A_{max}) [1]. Установлено, что при скорости вращения мешалки до 250 об./мин условия перемешивания являются щадящими для клеток, а гидродинамические параметры не превышают предельно допустимых значений: $A_{cp, \Sigma} \leq 126 \cdot 10^{-8}$ Дж/кл. и $A_{max} \leq 13 \cdot 10^{-12}$ Дж/кл. Данные параметры явились основанием для проведения интенсификации суспензионного культивирования.

Целью настоящих исследований явилась оптимизация культивирования вируса вакцины в суспензионной культуре клеток ВНК-21 для повышения инфекционной активности вирусосодержащей суспензии как основы для получения противооспенного вакцинного препарата.

Материалы и методы

В исследованиях для инфицирования клеток использовали вирус вакцины, штамм БИЭМГ (Б-51), полученный из Московского НИИ вирусных препаратов в 1966 г. Вирус адаптирован путем трех последовательных пассажей на хорион-аллантоисной оболочке развивающихся куриных эмбрионов (ХАО РКЭ) коммерческой дермовакцины серии 449а в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Хранится в ампулах под вакуумом при температуре от минус 18 до минус 22 °С. Информация о его генетической характеристике отсутствует.

В качестве субстрата для накопления вируса вакцины использовали суспензионную культуру пе-

ревиваемой линии клеток ВНК-21 72-часового возраста, которую выращивали на модифицированной питательной среде типа МЕМ, обогащенную 10 % сывороткой крупного рогатого скота, глюкозой – 3 г/л, глутамином – 20 мл/л, антибиотиками – пенициллин и стрептомицин по 100 ед./мл каждый.

Клетки ВНК-21 представляют собой клетки почек однодневных новорожденных сирийских (золотистых) хомячков. Посевной материал клеток ВНК-21 получали на 5...10 циклах культивирования после расконсервации эталонной культуры, замороженной и хранящейся в ампулах при температуре минус 196 °С.

Культивирование и осаждение инфицированных клеток ВНК-21 проводили в ферментере цилиндрического типа без отражательных перегородок с внутренним диаметром 130 мм и полукруглым дном с радиусом 65 мм. Перемешивание культуральной жидкости проводили механической мешалкой пропеллерного типа диаметром 80 мм, скорость вращения мешалки варьировалась от 150 до 250 об./мин. Общий объем ферментера составлял 2 л, а объем заполнения 1 л. Температура культивирования (36,5±0,5) °С. Аэрацию газовой фазы ферментера проводили воздушной смесью с различным содержанием CO₂.

Для гравитационного осаждения клеток ферментер помещали в термальную комнату с температурой (36,5±0,5) °С. Подсчет концентрации и доли жизнеспособных клеток проводили под микроскопом в камере Горяева после окраски суспензии реактивами кристаллическим фиолетовым и трипановым синим. Погрешность метода определения концентрации клеток составляла 10 %.

В качестве посевного материала вируса вакцины использовали 20 % раствор гомогената ХАО инфицированных РКЭ в количестве, необходимом для создания оптимальной инфицирующей дозы. Особенность подготовки полученных проб для определения инфекционной активности полученных препаратов заключалась в предварительном разрушении инфицированных клеток осмотическим шоком с целью высвобождения внутриклеточного вируса. Для этого в пробу вируса вводили 0,2 % раствор цитрата натрия в десятикратном объеме и выдерживали в течение 20 мин при температуре 34,5 °С.

Множественность заражения при культивировании вируса вакцины составляла 1–5 БОЕ/кл. (БОЕ – бляшкообразующие единицы).

Инфекционную активность оценивали по титрованию на культуре клеток ГМК-АН-1 по методу негативных колоний. Линия клеток ГМК-АН-1 получена из почек африканской зеленой мартышки. В коллекцию ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России поступила в 1980 г. из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского. Культура адаптирована к питательной среде МЕМ стандартного состава. Пробу вируса вакцины в количестве 0,5 мл вносили в монослой клеток ГМК-АН-1 во флаконах емкостью 25 мл.

После периода инкубации при температуре 34,5 °С инокулят удаляли и во флаконы вносили агаровое покрытие, содержащее аминокислотно-витаминный комплекс. После шести дней инкубации при температуре 34,5 °С во флаконы вносили агаровое покрытие, содержащее нейтральный красный. Затем флаконы снова помещали в термостат при температуре 34,5 °С. Через 24 ч проводили учет негативных колоний и рассчитывали инфекционную активность вируса вакцины.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием вычислительной техники по известным уравнениям [8].

Для повышения конечной концентрации клеток в суспензии в ферментере необходимы увеличение или восполнение запаса компонентов питательной среды для пластического и энергетического обмена в клетке, а также интенсификация массообменных и гидродинамических процессов. Запас энергетических и пластических компонентов питательной среды определяет теоретически возможный максимальный конечный уровень накопления клеток. Для питательной среды МЕМ, используемой для выращивания суспензионной культуры клеток ВНК-21 в ферментере, конечный уровень накопления клеток составляет $3,0 \cdot 10^9$ кл./л [5].

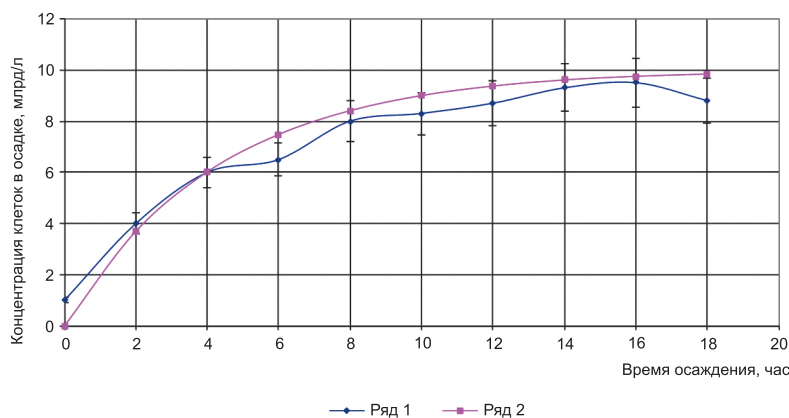
Результаты и обсуждение

Для пополнения запаса компонентов питательной среды применяли гравитационное осаждение клеток в ферментере, из которого удаляли надосадочную жидкость и добавляли свежую питательную среду МЕМ до первоначального уровня. В ходе гравитационного осаждения клеток установлена динамика изменения концентрации клеток ВНК-21 в осадке, представленная на рисунке.

Установлено, что за 4 ч осаждения в осадке накапливается до 70–80 % клеток ВНК-21 от общего количества их биомассы. В дальнейших экспериментах при осаждении клеток использовали именно этот временной период, что позволяло сохранять три четверти биомассы клеток в осадке.

При исследованиях гидродинамических и массообменных условий суспензионного культивирования клеток ВНК-21 при различной интенсивности перемешивания установлено, что в используемом ферментере при скорости вращения мешалки от 150 до 274 об./мин гидродинамические параметры A_{cp} и A_{max} не превышают предельно-допустимых значений, то есть соблюдаются щадящие условия перемешивания клеток ВНК-21. В то же время в диапазоне скоростей вращения мешалки от 275 до 300 об./мин щадящие условия перемешивания не соблюдаются.

В диапазоне скоростей вращения мешалки от 200 до 250 об./мин интенсивность массообменных условий в ферментере достаточна для обеспечения дыхательных потребностей клеток в высокой концентрации. В этом случае коэффициенты массо-



Кинетика накопления клеток ВНК-21 в осадке:
Ряд 1 – экспериментальные значения; Ряд 2 – расчетные значения по экспоненциальной модели накопления клеток в осадке

Kinetics of BHK-21 cell accumulation in the precipitation:

Row 1 – experimental values; Row 2 – calculated values by the exponential model of cell accumulation in the precipitation

обмена по кислороду и углекислому газу в 2 раза превышают минимально рекомендуемые значения – 0,5–1,0 в час при выращивании суспензионных культур клеток с запасом питательных веществ $3,0 \cdot 10^9$ кл./л [5]. Следовательно, условия культивирования при повышенной интенсивности перемешивания 200–250 об./мин будут достаточными для выращивания суспензионных культур клеток млекопитающих до более высокой конечной концентрации. Ожидалось, что она ориентировочно в 2 раза будет превышать получаемые ранее значения при прежней интенсивности перемешивания.

С целью проверки правильности сделанных предположений проведены эксперименты по интенсивному суспензионному культивированию клеток ВНК-21 в ферментере с объемом заполнения 1 л в течение 2 циклов. При этом вся биомасса клеток, полученная в конце первого цикла, использовалась в качестве посевного материала для ферментера на втором цикле культивирования.

Посевная концентрация клеток первого цикла составляла $0,45 \cdot 10^9$ кл./л, доля жизнеспособных клеток 95–98 %, скорость вращения мешал-

ки – 150 об./мин, температура культивирования – $(37,0 \pm 0,5)$ °С. Значения рН в культуральной жидкости поддерживали аэрацией воздушной смесью с различным процентным содержанием углекислого газа (от 0 до 9 %) с помощью газовой дозирующей станции. По истечении 72 ч культивирования останавливали работу перемешивающего устройства и осаждали клетки ВНК-21 при температуре (4 ± 2) °С в течение 4 ч, после чего из ферментера удаляли надосадочную жидкость, добавляли свежую питательную среду и проводили второй цикл культивирования. При этом в опытном ферментере скорость вращения перемешивающего устройства составляла 250 об./мин, а в контрольном оставалась на прежнем уровне – 150 об./мин.

Результаты культивирования клеток в опытном и контрольном ферментерах, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что при скорости вращения мешалки 250 об./мин через 48–72 ч культивирования максимальная конечная концентрация клеток достигает $(4,48 \pm 0,63) \cdot 10^9$ кл./л.

Достигнутый уровень концентрации клеток в 1,5–2 раза превышает конечную концентрацию

Таблица 1/ Table 1

Результаты интенсивного культивирования неинфицированных клеток ВНК-21 в ферментере
Results of intensive cultivation of non-infected BHK-21 cells in bioreactor

Цикл культивирования	Скорость вращения мешалки, об./мин	Время культивирования, час	Значение показателя качества суспензии клеток, $\bar{X} \pm \sigma$			
			концентрация клеток, $n \cdot 10^9$ кл./л	доля жизнеспособных клеток, процент	величина рН, ед. рН	концентрация бикарбоната натрия, C_{NaCO_3} , г/л
I	150	0	$0,45 \pm 0,02$	98±1	$7,31 \pm 0,02$	$2,50 \pm 0,01$
		24	$0,88 \pm 0,02$	98±1	$7,09 \pm 0,21$	$1,33 \pm 0,12$
		48	$1,75 \pm 0,18$	98±1	$6,66 \pm 0,10$	$0,77 \pm 0,21$
		72	$2,76 \pm 0,23$	97±1	$6,43 \pm 0,16$	$0,38 \pm 0,09$
II	250	0	$2,24 \pm 0,16$	95±1	$7,29 \pm 0,02$	$1,92 \pm 0,13$
		24	$3,37 \pm 0,49$	98±1	$6,67 \pm 0,25$	$0,67 \pm 0,18$
		48	$4,11 \pm 0,11$	93±4	$6,46 \pm 0,24$	$0,34 \pm 0,12$
		72	$4,48 \pm 0,63$	97±1	$6,17 \pm 0,15$	$0,27 \pm 0,11$
III	150 (контроль)	0	$2,28 \pm 0,13$	94±1	$7,32 \pm 0,04$	$1,92 \pm 0,08$
		24	$2,92 \pm 0,12$	95±1	$6,60 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,05$
		48	$3,03 \pm 0,06$	93±3	$6,15 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,06$
		72	$2,96 \pm 0,05$	78±2	$5,90 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,03$

ВНК-21 ($2,3 \pm 0,6$) · 10⁹ кл./л, получаемую при обычных условиях через 72 ч культивирования [1, 5]. Доля жизнеспособных клеток ВНК-21 при интенсивном перемешивании при скорости вращения мешалки ферментера 250 об./мин достигала значения более 95 %, при этом какого-либо существенного пенообразования в ферментере не наблюдалось.

В ходе исследований отмечали снижение рН культуральной среды до 6,17 ед. рН в конце второго цикла культивирования, когда достигаемая концентрация клеток ВНК-21 в суспензии превышала $4,0 \cdot 10^9$ кл./л. Данное обстоятельство требует дробного добавления бикарбоната натрия для коррекции значений рН в сторону увеличения до 6,7–7,3 ед. рН.

В контрольном ферментере при скорости вращения мешалки 150 об./мин интенсивность массообменных условий культивирования на втором цикле выращивания была недостаточной для обеспечения роста клеток выше $3 \cdot 10^9$ кл./л, что приводило к закислению среды и к практическому прекращению роста клеток после 24 ч культивирования на этом уровне.

В дальнейшем представлялось значимым оценить перспективность использования суспензии с увеличенной концентрацией клеток для репродукции вируса вакцины с целью повышения его биологической активности. Увеличение концентрации клеток ВНК-21, инфицированных вирусом вакцины, достигалось при использовании метода гравитационного осаждения.

Для увеличения биомассы вируса вакцины проведена экспериментальная оценка возможности концентрирования инфицированных вирусом вакцины клеток ВНК-21 в ферментере при температуре ($22,5 \pm 2,5$) °С. Продолжительность осаждения инфицированных клеток составляла 4 ч. После чего весь объем надосадочной культуральной жидкости удаляли и определяли инфекционную активность осадка. Отбор проб проводили в начале эксперимента, а также после осаждения клеток. Результаты концентрирования инфицированных вирусом вакцины клеток ВНК-21, представленные в табл. 2, свидетельствуют

о том, что после удаления надосадочной жидкости концентрация инфицированных клеток в осадке увеличилась в 4,5 раза, а инфекционная активность вируса вакцины в осадке инфицированных клеток ВНК-21 – более, чем в 3 раза.

Проведенная оценка удельной множественности инфицирования клеток в пересчете на клетку составила 1–5 БОЕ/кл., а по урожаю вируса – 20–100 БОЕ/кл. Сравнение полученных результатов с аналогичными данными из других источников не представлялось возможным в связи отсутствием таковых в доступной литературе.

Необходимо отметить, что в результате интенсивного культивирования получали сопоставимую концентрацию неинфицированных клеток равную $(4,48 \pm 0,63) \cdot 10^9$ кл./л (табл. 1).

Таким образом, исследования по интенсивному суспензионному культивированию клеток ВНК-21 в ферментере позволили установить, что при скорости вращения мешалки 250 об./мин не происходит разрушения клеток, то есть в этих гидродинамических условиях соблюдается щадящий режим перемешивания.

Интенсивность процессов массообмена при перемешивании с данной скоростью вращения мешалки в целом достаточна для обеспечения роста суспензии неинфицированных клеток в течение 48–72 ч до концентрации $(4,48 \pm 0,63) \cdot 10^9$ кл./л, что в 1,5–2 раза превышает показатели при обычном способе культивирования.

Гравитационное осаждение клеток ВНК-21 в ферментере в течение 4 ч при температуре (4 ± 2) °С позволяет использовать до 80 % накопленной при первом цикле биомассы в качестве посевного материала во втором цикле выращивания. Замена надосадочной жидкости на свежую питательную среду позволила продолжить накопление клеток ВНК-21 во втором цикле выращивания, что эквивалентно восполнению запаса питательных веществ.

Увеличение инфекционной активности вируса в концентрированной суспензии инфицированных клеток ВНК-21 подтверждает перспективность оптимизации накопления вируса вакцины при разработке противооспенных препаратов на основе культур клеток.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Овчинников А.В., Пашенко Ю.И., Блатов В.А., Ручко С.В., Чуркин И.А., Марков В.И., Бондарев В.П., Хамитов Р.А., Осин В.В., Тонеев В.В., Лебедев Р.П., Степанов А.А. Моделирование гидродинамических условий культивирования животных клеток. *Биотехнология*. 2010; 1:85–95.
2. Войнов В.А., Жукова О.П., Лукачева О.Н. Массоотдача в проточном газожидкостном биореакторе. *Биотехнология*. 2014; 1:62–6.
3. Иванов А.К., Иванов Д.А., Руденко А.П. Массообмен в газожидкостных биореакторах с роторами геликоидного типа. *Биотехнология*. 2014; 2:69–73.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева И.М., Жулидов И.М., Свинцов Р.А. Крупномасштабное культивирование фик-

Таблица 2/Table 2

Накопление вируса вакцины в клетках ВНК-21 при культивировании в ферментере

Accumulation of vaccine virus in ВНК-21 cells during cultivation in bioreactor

Наименование показателя, размерность	Величина показателя, $\bar{X} \pm \sigma$		
	в культуральной жидкости на момент начала осаждения	в осадке инфицированных клеток после осаждения в течение 4 ч	в надосадочной культуральной жидкости
Инфекционная активность вируса вакцины, lg БОЕ/мл	8,1±0,3	8,8±0,3	7,4 ±0,2
Концентрация клеток в исходной суспензии, n · 10 ⁹ кл./л	1,0±0,2	4,5±0,2	0,18±0,2

сированного вируса бешенства штамма Москва 3253 на перевиваемой линии клеток *Vero* (B): методы и сравнительный анализ. *Биотехнология*. 2014; 5:38–43.

5. Васильев Н.Н., Амбросов В.А., Складнев А.А. Моделирование процессов микробиологического синтеза. М: Лесная промышленность; 1975. 341 с.

6. Пашченко Ю.И., Прохор В.Ф., Хамитов Р.А., Максимов В.А. Кинетические закономерности и особенности размножения лимфобластоидных клеток *Raji* в суспензии. *Биотехнология*. 2006; 5:88–90.

7. Сирица И.И., Лымарь В.Т., Лобанова Т.Н. Проточно-фильтрационный способ культивирования клеток млекопитающих. *Цитология*. 1996; 38(2):247–8.

8. Зверев А.А., Зефирова Т.Л. Статистические методы в биологии: Учебно-методическое пособие. Казань: КФУ; 2013. 42 с.

References

1. Ovchinnikov A.V., Pashchenko Yu.I., Blatov V.A., Ruchko S.V., Churkin I.A., Markov V.I., Bondarev V.P., Khamitov R.A., Osin V.V., Toneev V.V., Lebedev R.P., Stepanov A.A. [Modeling of hydrodynamic conditions of animal cell cultivation]. *Biotechnologia*. 2010; 1:85–95.

2. Voinov V.A., Zhukova O.P., Lukacheva O.N. [Mass-output in flow gas-liquid bioreactor]. *Biotechnologia*. 2014; 1:62–6.

3. Ivanov A.K., Ivanov D.A., Rudenko A.P. Mass-transfer in gas-liquid bioreactors with rotors of helicoids type]. *Biotechnologia*. 2014; 2:69–73.

4. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva I.M., Zhulidov I.M., Svintsov R.A. [Large-scale cultivation of fixed rabies virus,

strain Moscow 3253 on finite cell line *Vero* (B): methods and comparative analysis]. *Biotechnologia*. 2014; 5:38–43.

5. Vasil'ev N.N., Ambrosov V.A., Skladnev A.A. [Modeling of the Processes of Microbiological Synthesis] M: Forest Industry; 1975. 341 p.

6. Pashchenko Yu.I., Prokhor V.F., Khamitov R.A., Maksimov V.A. [Kinetic regularities and peculiarities of lymphoblastoid *Raji* cell proliferation in the suspension]. *Biotechnologia*. 2006; 5:88–90.

7. Siritsa I.I., Lymar' V.T., Lobanova T.N. [Flow-filtration culture technique for mammal cells]. *Tsitologiya*. 1996; 38(2):247–8.

8. Zverev A.A., Zefirov T.L. [Statistical Methods in Biology: Study Guide]. Kazan: Kazan Federal university; 2013. 42 p.

Authors:

Ovchinnikov A.V., Borisevich G.V., Terent'ev A.I., Pashchenko Yu.I., Krotkov V.T., Marchenko V.N., Borisevich S.V., Kuznetsov S.L. The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Sergiev Possad, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Об авторах:

Овчинников А.В., Борисевич Г.В., Терентьев А.И., Пашченко Ю.И., Кротков В.Т., Марченко В.Н., Борисевич С.В., Кузнецов С.Л. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Поступила 08.10.18.

Отправлена на доработку 08.11.18.

Принята к публ. 08.02.19.