

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДЕЛЕЦИОННОГО ПО GE ШТАММА
ВИРУСА БОЛЕЗНИ АЗЕСКИ КМИЭВ-V106A
СУСПЕНЗИОННЫМ СПОСОБОМ В БИОРЕАКТОРЕ**

Чаплыго К.Э., Бабак В.А.

РВП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеславского, г. Минск.

ВВЕДЕНИЕ

В вирусологии для репродукции вирусов используют 3 типа системы-хозяин: культура клеток, развивающиеся куриные эмбрионы, восприимчивые животные. При этом применение культур клеток является более целесообразным, так как позволяет получать количественно неограниченное вирусное сырье высокого качества, легко поддающееся стандартизации и контролю.

Различают два способа культивирования клеток и вирусов: выращивание на поверхности твердой фазы в виде монослоя (стационарный, роллерный), а также глубинное культивирование, при котором клетки размножаются в виде суспензии (суспензионный). При суспензионном способе культивирования, вокруг растущих клеток производится непрерывное обновление питательной среды и газовой смеси, что обеспечивает их полноценное питание и размножение, тем самым создает оптимальные условия для репродукции вируса [2].

Разработка и внедрение суспензионного способа культивирования клеток и вирусов является перспективной, т.к. дает возможность получения стандартных партий высокоактивного вирусологического материала в подупромышленных объемах.

Цель: отработка параметров суспензионного культивирования делеционного по GE штамма вируса болезни Азески КМИЭВ-V106A.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Накопление вирусной биомассы проводили в перевиваемой культуре клеток ВНК-21(с-13). Для проведения опыта использовали лабораторную модель биореактора BioFlo 110.

Культивирование клеток, для первоначальной загрузки биореактора, осуществляли роллерным способом с применением параметров: $t = +37^{\circ}\text{C}$, pH 7,0-7,2, посевная концентрация - 10-15 млн. кл./ролл., питательная среда - ФГМС/ДМЕМ или ГЛА/ГЕМ/ДМЕМ, скорость вращения роллеров - 0,5-0,7 об/мин, цикл роста - 5-7 суток. По окончании цикла культивирования, из роллеров, сливали питательную среду, и производили отстойку клеток от стекла с помощью раствора версен - трипсин (3:1). Отслоившиеся клетки ресуспендировали в свежую питательную среду, с дальнейшим расчетом их концентрации и определением процента жизнеспособности.

Процесс суспензионного культивирования клеток и вируса в биореакторе проводили в периодическом (циклическом) режиме: загрузка суспензии клеток, накопление клеток (без подачи дополнительной порции питательной после посева культуры) до необходимой концентрации с последующим заражением их вирусом, репродукция вируса до появления 70-100% мертвых клеток в суспензии, разгрузка биореактора.

После загрузки в биореактор, выращивание клеток проводили с использованием отработанных нами ранее параметров: $t = +37^{\circ}\text{C}$, pH 6,9-7,3, питательная среда - ФГМС/ДМЕМ, посевная концентрация - 300-700 тыс. кл./мл, рабочий объем - 5л, режим перемешивание - 110-160 об/мин, режим аэрирования - 2,5 л/ч (первые 10 ч), 5,0 л/ч (12 ч), 7,5 л/ч (24-48 ч), 10,0 л/ч (48-72 ч), период культивирования - 48-72 ч [1].

При накоплении вируса в биореакторе, изучали зависимость значения титра, от концентрации клеток перед заражением (1,0-3,0 млн. кл./мл), множественности заражения (доза) (0,1-2,0 ТЦД₅₀/кл.) и периода культивирования (до проявления 70-100% цитопатического действия вируса на клетки (ЦПД)).

Инфекционную активность вируса определяли методом титрации в культуре клеток ВНК – 21(с-13) по общепринятой методике [3]. Конечный учет титрации проводили на 4-5 сутки по наличию или отсутствию цитопатических изменений в клетках. Результаты считали достоверными, при сохранности интактного клеточного монослоя в контроле. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в lg ТЦД₅₀/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных нами исследований установлено, что при инфицировании суспензии клеток ВНК-21 (с-13) делеционным по gE штаммом вируса болезни Ауески в дозе 0,5-1,0 ТЦД₅₀/кл. наблюдается его накопление в титрах инфекционной активности 8,0-8,7 lg ТЦД₅₀/мл ($p < 0,05$). Уменьшение дозы заражения до значения 0,1 ТЦД₅₀/кл. приводит к снижению титра инфекционной активности вируса в среднем на 1,0-1,2 lg ТЦД₅₀/мл ($p < 0,05$) и продлению сроков его культивирования до 48-72 ч. Увеличение заражающей дозы до 2,0 ТЦД₅₀/кл., существенно не влияет на показатель титра и не значительно сокращает период его накопления.

Результаты опыта также показали, что репродукция вируса в высоких титрах происходит при заражении суспензии с плотностью популяции клеток 1,7-2,3 млн. кл./мл. Заражение клеточной суспензии с меньшей концентрацией не дает возможности получения высокоактивного вирусного материала, а при применении больших концентраций клеток наблюдается увеличение процента мертвых клеток за счет их неспецифической гибели.

На основании полученных данных было установлено, что накопление вируса необходимо осуществлять до появления 70-80% мертвых клеток в суспензии, что соответствует периоду культивирования 24-36 ч. Продление времени культивирования вируса до появления 90-100% лишь незначительно увеличивает титр вируса, зато удлиняет сроки его репродукции на 8-12 ч.

Полученные серии вирусной биомассы были однородны. Титр инфекционной активности вируса оставался на высоком уровне при проведении дальнейшего пассирования в культуре клеток ВНК-21(с-13) в течение 4-5 пассажей (срок наблюдения).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подобраны параметры культивирования делеционного по gE штамма вируса болезни Ауески КМИЭВ-V106А суспензионным способом в биореакторе. Установлено, что накопление вируса в титрах инфекционной активности 8,0-8,7 lg ТЦД₅₀/мл наблюдается при заражении суспензии клеток ВНК-21(с-13) в концентрации 1,7-2,3 млн. кл./мл дозой вируса 0,5-1,0 ТЦД₅₀/кл., с последующим культивированием в течение 24-36 ч., до появления 70-80% мертвых клеток с суспензии. Данный способ культивирования позволяет получить однородные партии высокоактивного вирусного материала в больших объемах и в короткие сроки и может быть использован при производстве биопрепаратов.

Список литературы

1. Бабак, В.А. Культивирование суспензионной линии клеток ВНК-21 (с-13)/ В.А. Бабак, К.Э. Чаплыго, Т.П. Кураш// Молодежь в науке 2009: тез. докл. материалов

Междунар. науч. конф. молодых ученых, г. Минск, 21-24 апреля, 2009г.-Минск: Беларуская навука, 2010.-Ч.3.- С. 295-300.

2. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)/Под. ред. проф. Дьяконова Л.И., проф. Ситькова В.И. -М.: Компания Спутник+, 2000.-400 с.

3. Сюрин, В.Н. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных/ В.Н. Сюрин [и др.]-М.: Агропромиздат, 1986.-351 с.

УДК 621.316.99+621.319.1

СПОСОБ УМЕНЬШЕНИЯ ТЕРМОУПРУГИХ НАПРЯЖЕНИЙ В ПТКС-ТЕРМОРЕЗИСТОРАХ, ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ ИХ ФОРМЫ

Гаврилов А. В.

ГНУ«Институт технической акустики НАН Беларуси», г. Витебск

Введение. В электротехнике и радиоэлектронике широко применяются терморезисторы с положительным температурным коэффициентом сопротивления (ПТКС) на основе керамики титаната бария, легированной редкоземельными элементами (ПТКС-терморезисторы (позисторы) используются в силовых цепях в качестве нагревательных, пусковых элементов, в схемах защиты и др.) [1]. При этом, в результате воздействий больших токовых нагрузок, терморезисторы могут разрушаться (наблюдается эффект «расслоения») [2]. Причина данного явления заключается в возникновении значительных температурных напряжений 50-80 МПа [3], что соизмеримо с пределом прочности полупроводниковой керамики на основе титаната бария 50-100 МПа [4]. Поэтому важной задачей является повышение устойчивости позисторов к тепловому удару в процессе нагрева электрическим током. При этом решение данной проблемы путем улучшения механических (прочностных) свойств керамики $BaTiO_3$ без влияния на её электрические характеристики является трудно выполнимой задачей. Другим способом решения данной задачи является коррекция тепловых полей и снижения термоупругих напряжений в ПТКС терморезисторах. Данный способ может быть реализован путем коррекции формы терморезистора или конфигурации электродов.

Теоретическая модель. Распределение температуры в позисторных элементах рассчитывалось путем совместного решения уравнений теплопроводности и электропроводности [10]. Коэффициент теплоотдачи поверхности принимался равным $50 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$, температура окружающей среды $25 \text{ }^\circ\text{C}$, приложенное электрическое напряжение 220 В. Для расчетов температурных напряжений решалась квазистатическая задача термоупругости [3]. Удельное сопротивление позисторной керамики ρ зависит от состава материала, технологических режимов его изготовления, температуры образца и напряженности электрического поля E (варисторный эффект) [1]. Зависимости удельного сопротивления от температуры и напряженности электрического поля были получены экспериментально (рис. 1). Учитывая симметрию позисторных элементов цилиндрической формы (рис. 2), решение задачи находилось в координатах z , т. (случай осевой симметрии) причем, только для положительных значений координаты z , поскольку результаты для отрицательных значений z могут быть получены зеркальным отражением (для сечения $OMAB$ рис. 2 и 3). Расчеты были проведены на основании исследований защитных терморезисторов, производства ОАО «Витебский завод радиодеталей «МОНОЛИТ»» (температура переключения $T_c = 87^\circ\text{C}$, удельное сопротивление при 25°C $\rho_{25} = 0.31 \text{ Ом}\cdot\text{м}$). Полученные данные аппроксимировались математическими выражениями.

Позисторы, как правило, являются элементами защиты от перегрузок по току и мощности, которые включаются в электрические схемы последовательно с некоторым нагрузочным сопротивлением R_d . При этом добавочное сопротивление способствует