

## ВРЕМЯ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

*Стрилец О.П.<sup>1</sup>, Щетинина М.В.<sup>1,2</sup>, Варяница В.В.<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

<sup>2</sup>ПАО «ФАРМСТАНДАРТ-БИОЛЕК», г. Харьков, Украина

<sup>3</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

### **Введение**

Единственным методом борьбы с бешенством является профилактика: предэкспозиционная (вакцинация антирабическими вакцинами лиц, которые находятся в потенциальном риске инфицирования) и постэкспозиционная (комплексное применение антирабического иммуноглобулина и вакцины после укуса инфицированного животного) [1].

Критической стадией производства антирабических вакцин является инактивация вируса бешенства, так как от этого этапа зависят ключевые свойства препарата – одновременная авирulentность, антигенност и иммуногенность [2].

При производстве различных инактивированных вакцин широко используют бета-пропиолактон, преимуществом применения которого перед другими веществами и методами является селективный механизм действия и отсутствие токсических соединений в готовом препарате [3]. Согласно литературе, время инактивации вируса бешенства и других вирусов, имеющих суперкапсид, варьирует от 8 до 24 часов [4, 5].

**Целью** данного исследования было изучить влияние времени инактивации вируса бешенства на авирulentность и антигенност полученного продукта.

### **Методы исследования**

В работе использовался фиксированный штамм вируса бешенства L. Pasteur. Для культивирования вируса использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21/C13. Культуру клеток накапливали в пристеночном монослое. Для заражения использовали вирус с инфекционной активностью 5,24 lgCCID<sub>50</sub>. Вирус культивировали в течении 4 суток после заражения, используя поддерживающую среду на основе DMEM с добавлением 0,1% фетальной бычьей сыворотки (v/v) в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора при 33°C и 5% CO<sub>2</sub>. Собранный вирус центрифугировали 20 минут в рефрижераторной центрифуге (4500 об/мин) при 4°C. После чего к вирусной суспензии добавляли сахарозу в конечной концентрации 5 % (v/v), расфасовывали в стерильные пластиковые флаконы и помещали на хранение при – 80°C.

Предварительно размороженную на водяной бане (20°C) вирусную суспензию инактивировали бета-пропиолактоном в разведении 1:4000 в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 30 ч при 4°C. Гидролиз бета-пропиолактона проводили в течение 2 часов после окончания инактивации на водяной бане при 37°C, после чего из каждого образца отбирали пробы для определения полноты инактивации и антигенной активности. Полноту инактивации вируса

определяли в культуре клеток ВНК-21/C13 по отсутствию фокусов флуоресценции через 48 часов после внесения в нее инактивированных образцов. Антигенную активность исследовали методом двойной нейтрализации на модели культуры клеток ВНК-21/C13 с использованием флуоресцирующих антител. Результаты рассчитывали по формуле Спермена-Кербера и выражали с пересчетом на референтный стандарт вакцины в МЕ/мл. Учет тестов проводили с помощью лабораторного микроскопа (100×) с флуоресцентной насадкой.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартных пакетов компьютерных программ «Excel» и «Statistica 10». Определяли значимость различий между средними значениями и оценивали значимость влияния времени инактивации на изменчивость признака.

### **Основные результаты**

В ходе данного исследования были получены результаты по влиянию продолжительности воздействия бета-пропиолактона на авирулентность и антигенную активность после инактивации 6-ти образцов вируса бешенства. При учете тестов по определению полноты инактивации ( $n=3$ ) во всех препаратах отсутствовали фокусы флуоресценции в монослое культуры клеток, что свидетельствует об авирулентности полученного антигена вируса бешенства всех вариантов.

Полученные результаты по антигенной активности образцов в соответствии с временем инактивации представлены в таблице 1.

Таблица 1

#### **Антигенная активность**

№ варианта	Время инактивации, ч	Среднее значение антигенной активности образцов, МЕ/мл
1	5	1,96±0,18
2	10	1,98±0,35
3	15	1,85±0,22
4	20	2,09±0,31
5	25	1,87±0,32
6	30	1,97±0,25

$n=3$

Данные по антигенной активности образцов антигена вируса бешенства в зависимости от времени инактивации значимо не отличались. Это свидетельствует о том, что время воздействия бета-пробиолактона на вирус бешенства в исследованном диапазоне времени (5-30 ч) не влияет на способность антигена связываться с антирабическими антителами в условиях *in vitro*.

### **Выводы**

Таким образом, при воздействии бета-пропиолактоном на вирус бешенства штамма L. Pasteur при температуре 4°C в течении 5-30 ч происходит инактивация вируса, о чем свидетельствует авирулентность полученных образцов. Антигенная активность при этом не зависит от времени инактивации. Однако данная тема требует дальнейшего исследования относительно влияния

времени инактивации непосредственно на структуру вириона, а также на иммуногенную активность в условиях *in vivo*.

### **Список литературы**

1. Антирабические вакцины Документ по позиции ВОЗ. // World Health Organization. – 2007. – №49. – С. 12.
2. S. Jagannathan. Kinetics Analysis of Beta-propiolactone with Tangential Flow Filtration (TFF) Concentrated Vero Cell Derived Rabies Viral Protein / S. Jagannathan, P. Rahul Gandhi, R. Vijayakumar. // Journal of Biological Sciences. – 2013. – №13. – С. 521–527.
3. Reactions of β-propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides and peptides.. // The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. – 2011. – С. 1–29.
4. Chen Fan. Beta-propiolactone inactivation of coxsackievirus induces structural alteration and surface modification of viral capsids / Chen Fan, Xiaohua Ye, Zhiqiang Ku. // Journal of virology. – 2017. – С. 1–36.
5. Theone C. Kon. Influenza Vaccine Manufacturing: Effect of Inactivation, Splitting and Site of Manufacturing. Comparison of Influenza Vaccine Production Processes / Theone C. Kon, Adrian Onu, Laurentiu Berbecila. // PLOS ONE. – 2016. – С. 1–19.

УДК 615.21:615.31:615.011.4:615.453.6

### **ВИВЧЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ТА ТЕХНОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОРОШКУ ХОЛІНУ АЛЬФОСЦЕРАТУ ГІДРАТУ**

**Строгий В.В., Січкар А.А., Гладух Є.В.**

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

**Вступ.** У наш час відбувається ріст користування населення України різними транспортними засобами, залишається високий рівень поганих звичок, соціально-психологічна напруга в суспільстві, спостерігається недовиконана робота комунальними службами у зимовий період, що сприяє поширенню травматизму. Одне з перших місць серед травм займає черепно-мозкова травма, яка супроводжується травматичною хворобою мозку. Подальше життя пацієнта після перенесеної травми у великий мірі залежить від комплексу лікувальних заходів.

Лікарським препаратом, який впливає на швидку нормалізацію свідомості при травматичній хворобі мозку, є холіну альфосцерат. Синтетичний препарат холіну альфосцерат відноситься до групи нейрометаболічних стимуляторів і має нейропротекторну дію. Холіноміметик з переважною дією на холінові рецептори в центральній нервовій системі позитивно впливає на пізнавальні і поведінкові реакції, підвищую концентрацію уваги, запам'ятовування і відтворення інформації. Препарат сприяє усуненню роздратованості і апатії, що є характерним для осіб похилого віку. Використання холіну альфосцерату є також доцільним у складі базисної терапії пацієнтів із гострим ішемічним інсультом [1, 3, 4].

В Україні зареєстровані і випускаються з субстанцією холіну альфосцерат