

Министерство здравоохранения Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА
ИМЕНИ А.А. СМОРОДИНЦЕВА»
(ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России)

УДК 615.281.8

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по научной
работе



ФГБУ «НИИ гриппа
им. А.А. Смородинцева»
Минздрава России
канд. биол. наук
Д.М.
Даниленко
2023 г.

ОТЧЕТ О
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОГЕЛЯ (УСЛОВНОЕ
НАЗВАНИЕ «АРТЕВИР») В ОТНОШЕНИИ КОРОНАВИРУСА И ВИРУСА ГРИППА

Руководитель НИР,
Зав.лабораторией химиотерапии
вирусных инфекций

Подпись, дата

А.А. Штро

Санкт-Петербург 2023 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями, сокращения и обозначения:

БОЕ – бляшкообразующая единица

ТИД₅₀ – 50 % тканевая инфекционная доза – доза вируса, вызывающая заражение 50 % клеток

ЦТД₅₀ – 50 % цитотоксическая доза – доза препарата, вызывающая гибель 50 % клеток

ЭД₅₀ – 50% эффективная доза – доза препарата, вызывающая снижение инфекционной активности вируса в два раза.

ХТИ – химиотерапевтический индекс

РГА – реакция гемагглютинации

МТТ – желтый водорастворимый тетразолиевый краситель, 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид

МТТ-тест — колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (тест Моссмана)

MDCK – Madin-Darby canine kidney

ДМСО – диметилсульфоксид

ЦПД – цитопатогенное действие

ВВЕДЕНИЕ

Одной из серьезных угроз человечеству являются вирусные инфекции, в первую очередь респираторные. Пандемия Covid-19 унесла жизни более 6 миллионов человек по всему миру [1]. Грипп производит менее опасное впечатление, однако он существует среди человеческой популяции уже много веков и, благодаря высокой скорости мутаций, легко развивает устойчивость к новым противовирусным средствам [2].

Одной из важных задач современной фармакологии и медицины является разработка новых противовирусных препаратов - как узконаправленных в отношении конкретных возбудителей ОРВИ, так и с потенциалом широкого спектра действия.

Целью данного исследования было изучение противовирусной активности гидрогеля с условным названием «Артевир» в отношении вирусов гриппа и коронавируса. В рамках исследования были поставлены следующие задачи:

1. Определение 50% цитотоксической дозы гидрогеля с условным названием «Артевир» на клеточных культурах MDCK и Vero.
2. Оценка противовирусной активности гидрогеля с условным названием «Артевир» в отношении вируса гриппа и коронавируса, с определением для каждого вируса ЭД₅₀ – дозы, обеспечивающей 50% эффективность.
3. Определение химиотерапевтического индекса (ХТИ) для указанных вирусов и оценка его значимости с точки зрения противовирусной активности.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Материалы и методы

Поступление, хранение и учёт препаратов осуществлялись в соответствии со стандартными операционными процедурами лаборатории № ЛХТ-М-001/02-21 «Поступление, идентификация и хранение испытуемых лекарственных средств» и № ЛХТ-М-007/02-21 «Приготовление рабочих растворов».

1.1 Тестируемые препараты

1.1.1 Исследуемый препарат

Исследуемое соединение было получено в рамках инициативной разработки профилактических противовирусных средств, состав указан в Таблице 1.

Таблица 1 – Информация о тестируемом препарате

№, п/п	Наименование	Состав	Количество	Серия	Срок годности
1.	гидрогель (условное название «Артевир»)	- вода дистиллированная 99,55% - акриловый кросс полимер (загуститель) – 0,45%	250 мл	N/a	N/a

Условия хранения: в тёмном месте при температуре +5 °С - +25 °С.

1.2. Тест-системы

1.2.1. Культуры клеток

Для проведения исследования было использовано несколько клеточных культур, выбранных на этапе предварительного тестирования эффективности размножения вируса. Для этого исследования были использованы следующие культуры:

- Культура клеток MDCK (клетки почки собаки)
- Культура клеток Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки)

1.2.2. Вирусы

- Референс-штамм вируса гриппа типа А, штамм A/Aichi/2/68(H3N2), получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций
- Коронавирус SARS-CoV2 hCoV-19/Russia/StPetersburg-RII3524VR4/2020, полученный из материала больного коронавирусной инфекцией методом выделения в культуре клеток Vero, на седьмом пассаже в культуре клеток Vero. Образец вируса

предоставлен вирусологическим лабораторным комплексом ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

1.3. Дизайн исследования

Исследование состояло из двух этапов – определение цитотоксичности препаратов в отношении каждой культуры клеток и определение противовирусной эффективности препаратов.

1.3.1. Определение цитотоксичности препаратов

Цитотоксичность препаратов оценивалась при помощи микротетразолиевого теста (МТТ-тест). Из 96-луночного планшета с клеточной культурой удаляли ростовую среду, вносили серию 2-кратных разведений препаратов на поддерживающей среде (стартовая концентрация 2000 мкг/мл), а в ряд клеточного контроля вносили среду без препарата. Далее 96-луночный планшет с разведениями препарата инкубировали в течение 3-7 дней (точное время инкубации зависело от времени роста исследуемого вируса).

После окончания инкубации из 96-луночного планшета удаляли поддерживающую среду и вносили раствор МТТ в концентрации 0,5 мкг/мл, после чего инкубировали в течение 1,5 часов при температуре 37 °С и 5% CO₂. По окончании срока инкубации раствор МТТ удаляли, растворяли осадок в растворе ДМСО и определяли оптическую плотность раствора при длине волны 570 нм.

На основании полученных данных с помощью программного обеспечения GraphPad Prism определяли ЦТД₅₀ (концентрация препарата, вызывающая гибель 50% клеток).

1.3.2. Определение противовирусной активности препаратов

1.3.2.1. Определение противовирусной активности препаратов в отношении вируса гриппа

Для оценки противовирусной активности веществ готовили серию пяти трехкратных разведений препарата в двойной концентрации и семи десятикратных разведений вируса на поддерживающей среде (Игла MEM с солями Хенкса, двойным набором аминокислот и витаминов +2 mM L-глутамин+1% антибиотика+8 мкг/мл трипсина).

Из 96-луночных планшетов с культурой клеток MDCK удаляли ростовую среду и однократно промывали поддерживающей средой, вносили препарат по 100 мкл на лунку и равный объем вируса, после чего 1 час инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С. По истечении срока инкубации планшеты промывали поддерживающей средой и снова

вносили препарат и равный объем среды. Планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

По истечении срока инкубации титр вируса определяли с помощью реакции гемагглютинации (РГА). Для этого из лунок 96-луночного планшета с MDCK отбирали по 50-100 мкл содержимого, переносили в круглодонный планшет и добавляли аналогичный объем 1% раствора куриных эритроцитов. Планшет инкубировали в течение 15-30 минут при комнатной температуре.

Титр вирусов рассчитывали по методу Рида и Менча [3] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД₅₀) на 200 мкл объёма.

1.3.2.2 Определение противовирусной активности препаратов в отношении коронавируса

Работы с вирусом SARS-CoV-2 проводились в боксе биологической безопасности 3 класса защиты в условиях BSL-3 на территории вирусологического лабораторного комплекса ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Титрование вируса на культуре клеток Vero E6 перед постановкой эксперимента проводили на 6-луночных культуральных планшетах. Из образца вирусосодержащей суспензии готовили серию 10-кратных последовательных разведений, каждое разведение наносили на клеточный монослой и инкубировали в течение 2 часов. Далее, вирусосодержащую жидкость удаляли, после чего наносили покровную среду с 0,9% агаром и инкубировали в течение 3 суток.

По окончании срока инкубации клетки фиксировали и окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового в 10%-ном растворе формальдегида, после чего в каждой лунке подсчитывали количество образовавшихся бляшек (наименьшее тестируемое количество вируса, приводящее к образованию одной бляшки (зоны лизиса) принимается за инфекционную единицу (бляшкообразующую единицу, БОЕ).

1.4. Обработка полученных данных

Для определения значения ЦТД₅₀ исследуемых препаратов исходные данные оптической плотности переносили в таблицы программы GraphPad Prism, после чего трансформировали значения концентраций препаратов с помощью десятичного логарифма. Далее проводили нормализацию данных оптических плотностей в %, принимая за 100 % значения контрольных лунок с контролем клеток, т.е. клеток без добавления исследуемых веществ.

Далее проводили расчёт значений ЦТД₅₀ с помощью асимметричного нелинейного регрессионного анализа, используя формулу 1:

$$Y=A+(B-A)/(1+10^{((\text{Log}ЭД_{50}-X)\times C)}), \quad (1)$$

где X – концентрация исследуемых объектов;
Y – жизнеспособность клеток, % от контроля;
B – «верхнее плато», 100 %;
A – «нижнее плато», 0 %;
C – коэффициент наклона кривой.
ЭД₅₀ – искомая концентрация

В программе GraphPad Prism расчет значений с использованием данной формулы проводился согласно подпрограмме Nonlinear regression/Dose-response - Inhibition/ log(inhibitor) vs response - Variable slope (four parameters).

Для определения ЭД₅₀ исследуемых веществ исходные данные о титрах вируса или БОЕ переносили в таблицы программы GraphPad Prism, после чего трансформировали значения концентраций препаратов с помощью десятичного логарифма (в случае БОЕ трансформация не проводилась), а титр вируса – с помощью возведения в соответствующую степень. Далее проводили нормализацию данных в %, принимая за 100% значения контроля вируса, т.е. клеток без добавления исследуемых веществ.

Далее проводили расчёт значений ЭД₅₀ с помощью асимметричного нелинейного регрессионного анализа, используя формулу 1 (см.выше).

На основе полученных данных подсчитывали ХТИ (химиотерапевтический индекс), представляющий собой отношение ЦТД₅₀ к ЭД₅₀.

Согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» критерием противовирусной активности служит ХТИ, пороговое значение которого составляет 8 [4].

2. Результаты

Результаты оценки цитотоксичности и противовирусной активности гидрогеля представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты оценки цитотоксичности и противовирусной активности исследуемого препарата в отношении вируса гриппа и коронавируса

ЦТД ₅₀		ЭД ₅₀		ХТИ	
MDCK	Vero	Вирус гриппа	Коронавирус	Вирус гриппа	Коронавирус
85,6	67,2	6,9	3,7	12,4	18,2

Из данных, представленных в таблице, видно, что исследуемый препарат обладает химиотерапевтическим индексом 12,4 и 18,2 для вируса гриппа и коронавируса, соответственно. Оба этих значения превышают пороговое, что свидетельствует о наличии противовирусной активности препарата в отношении обоих вирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование противовирусной активности гидрогеля (условное название «Артевир») в отношении вируса гриппа и коронавируса.

При исследовании противовирусной активности препаратов в отношении коронавируса SARS-CoV2 препарат продемонстрировал достаточную противовирусную эффективность,

В отношении вируса гриппа также отмечено наличие противовирусной активности, значение ХТИ препарата превышало пороговое.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Коронавирус. [Электронный ресурс]. URL: <https://coronavirus-monitor.info> (дата обращения: 23.03.2023).
2. Дрейзин Р.С., Астафьева Н.В. Острые респираторные заболевания. – М.: Медицина, 1991. – 136 с.
3. L.J. Reed, H. Muench. A simple method of estimating fifty percent endpoints // American Journal of Epidemiology. – 1938. – V.27. – P. 493-497.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Прошито, пронумеровано и скреплено
печатью 10 листа(ов)

Заместитель Директора по научной работе
ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»
Минздрава России


Д.М. Даниленко

