

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
2024 г.



ОТЧЕТ ПО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОГЕЛЯ ООО «АРТЕВИР» В
ОТНОШЕНИИ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА И ВИРУСА ПРОСТОГО
ГЕРПЕСА 1 ТИПА

Руководитель НИР,
Зав.лабораторией химиотерапии
вирусных инфекций

А.А. Штро

Подпись, дата

Санкт-Петербург 2024 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

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

ИФА – иммуноферментный анализ

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

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)

ДМСО – диметилсульфоксид

PBS – фосфатно-солевой буфер

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные заболевания представляют собой серьезную угрозу человечеству. Пандемия Covid-19, длящаяся до сих пор, уже унесла жизни более 6 млн человек по всему миру [1] и продолжает вызывать всё новые и новые случаи заражения ежедневно. Грипп хоть и уступает коронавирусной инфекции по абсолютному количеству смертей, однако присутствует в человеческой популяции на протяжении нескольких веков и, благодаря высокой скорости накопления мутаций, легко приобретает устойчивость к вновь разрабатываемым против него лекарственным средствам [2].

Другие респираторные инфекции, хотя и отличаются менее тяжелым течением в большинстве случаев, зато не имеют этиотропных средств лечения и в случае тяжелого течения заболевания пациенты вынуждены прибегать только к симптоматическим средствам.

Таким образом, одной из актуальных задач современной фармакологии и медицины является разработка новых противовирусных лекарственных препаратов, как направленных против конкретных возбудителей ОРВИ, так и средств широкого спектра действия.

Целью данной работы являлась оценка противовирусной активности гидрогеля ООО «Артевир» в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса простого герпеса 1 типа.

В задачи исследования входило:

1. Определение 50% цитотоксической дозы гидрогеля ООО «Артевир» на культурах клеток Vero и HEp2.
2. Тестирование противовирусной активности гидрогеля ООО «Артевир» в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса простого герпеса 1 типа, определение для каждого вируса ЭД₅₀ – 50% эффективную дозу.
3. Определение химиотерапевтического индекса (ХТИ) в отношении вышеперечисленных вирусов и характеристика его с точки зрения наличия противовирусной активности.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Заказчик исследования:

ООО "АРТЕВИР"
197022, Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, ВН. ТЕР. Г. МУНИЦИПАЛЬНЫЙ ОКРУГ
АПТЕКАРСКИЙ ОСТРОВ, УЛ ПРОФЕССОРА ПОПОВА, Д. 23, ЛИТЕРА Д, ПОМЕЩ.
37Н, КОМ. 6 (ОФИС 618)

Исследование проведено в:

ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России
Юридический адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15/17

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 Исследуемые препараты

Исследуемые соединения были предоставлены Заказчиком, список представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Исследуемые соединения и их характеристики

№, п/п	Наименование	Состав	Количество	Серия	Срок годности
1.	гидрогель ООО «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 Нер-2 (клетки эпидермоидной карциномы гортани человека)

- Культура клеток Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки)

1.2.2. Вирусы

- Респираторно-синцитиальный вирус, штамм А2
- Вирус простого герпеса 1 типа, штамм ЕС

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 респираторно-синцитиального вируса

Для оценки противовирусной активности готовили серию из пяти трехкратных разведений препарата в двойной концентрации и семи десятикратных разведений вируса. Из 96-луночных планшетов с клеточной культурой Нер-2 удаляли ростовую среду и промывали один раз поддерживающей средой (DMEM + 1% антибиотика, 2% ФБС), после чего вносили препарат по 100 мкл на лунку и равный объем вируса, далее 1 час инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂. По истечении

необходимого времени планшеты промывали поддерживающей средой, снова вносили препарат по 100 мкл на лунку и равный объем поддерживающей среды. Планшеты инкубировали в течение 6 суток в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂.

По истечении срока инкубации поддерживающую среду из планшетов удаляли с помощью аспиратора и фиксировали планшеты раствором 80% ацетона по 100 мкл на лунку. Наличие вируса в клетках определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для проведения анализа клеточную культуру отмывали от фиксатора с помощью буфера PBS по 200 мкл на лунку. Далее на культуру наносили раствор первичных мышинных антител к белку респираторно-синцитиального вируса по 100 мкл на лунку, после чего инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. Далее клетки снова промывали буфером PBS по 250 мкл на лунку и наносили вторичные антимышьи антитела по 100 мкл на лунку, далее снова инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. Затем антитела отмывали буфером PBS по 200 мкл на лунку и наносили субстрат-хромогенную смесь с тетраметилбензидином (ТМБ) по 100 мкл на лунку. Через 5 минут реакцию останавливали с помощью 0,1М серной кислоты по 50 мкл на лунку и оценивали оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Лунки, в которых значение оптической плотности превышало таковое в лунках с контролем клеток в два и более раза, считались зараженными. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [3] и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД₅₀) на 100 мкл объёма.

1.3.2.2 Определение противовирусной активности препаратов в отношении вируса простого герпеса первого типа

Для оценки противовирусной активности веществ готовили серию пяти трехкратных разведений препарата в двойной концентрации и семи десятикратных разведений вируса на поддерживающей среде (DMEM +1% антибиотика+2% ФБС).

Из 96-луночных планшетов с культурой клеток Vero 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.

После окончания инкубации из 96-луночного планшета удаляли поддерживающую среду и вносили раствор МТТ в концентрации 0,5 мг/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.

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

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:

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

- 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 переносили в таблицы программы GraphPad Prism, после чего трансформировали значения концентраций препаратов с помощью десятичного логарифма, а титр вируса – с помощью возведения в соответствующую степень. Далее проводили нормализацию данных оптических плотностей 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

2.1. Результаты оценки цитотоксичности гидрогеля ООО «Артевир» в отношении клеточных культур Vero, Нер2.

На первом этапе исследования для исследованного соединения определяли цитотоксичность в отношении используемых клеточных культур для подбора рабочей концентрации препарата. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты оценки цитотоксического действия исследуемого препарата

Клеточная культура	Цитотоксичность
Vero	67,2
Нер-2	51,4

2.2 Результаты оценки противовирусной активности гидрогеля ООО «Артевир» в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса простого герпеса 1 типа

Таблица 3 – Результаты оценки противовирусной активности исследуемого препарата

Респираторно-синцитиальный вирус		Вирус герпеса	
ЭД ₅₀	ХТИ	ЭД ₅₀	ХТИ
<0,6	>85,6	0,6	112

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что гидрогель ООО «Артевир» обладает ярко выраженной активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса простого герпеса 1 типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование противовирусной активности гидрогеля ООО «Артевир» в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса герпеса.

Показано, что химиотерапевтический индекс препарата в отношении обоих исследованных вирусов более чем на порядок превышал пороговое значение, что свидетельствует о его высокой противовирусной эффективности при профилактическом применении.

Поскольку оба исследованных вируса эволюционно далеки друг от друга и используют разные стратегии репродукции, представляется возможным предположить, что препарат может обладать противовирусным действием также и в отношении других вирусов.

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 11 листа(ов)

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


Д.М. Даниленко

