

Министерство здравоохранения Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГРИППА ИМЕНИ
А.А. СМОРОДИНЦЕВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ «НИИ ГРИППА ИМ. А.А. СМОРОДИНЦЕВА» МИНЗДРАВА РОССИИ)

УДК 615.218.8

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по научной работе
ФГБУ «НИИ гриппа
им. А.А. Смородинцева» Минздрава России
канд. биол. наук
Д.М. Даниленко
_____ 2021 г.



ОТЧЕТ ПО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ № НИР-ЛХТ-СА-026/2021

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ
VERO, А ТАКЖЕ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ БАД
«РАДАЛЕЯ» НА КОРОНАВИРУСЕ ОС43 И ВИРУСЕ ГЕРПЕСА

в рамках договора №14122021 с ООО «Северный стиль» от 14.12.2021

Руководитель НИР:
Зав.лаб.химиотерапии вирусных инфекций
канд. биол. наук

_____ А.А.Широ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР,
заведующий лабораторией
химиотерапии вирусных
инфекций, кандидат
биологических наук

А.А. Штро


24.12.2021

подпись, дата

Научный сотрудник

А.В. Гаршин


24.12.2021

подпись, дата

Научный сотрудник

Г.Д. Петухова


24.12.2021

подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 12 с., 1 таблицы, 1 рис., 2 источ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: КОРОНАВИРУС, ВИРУС ГЕРПЕСА, ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ, ТЕСТИРОВАНИЕ *IN VITRO*, КУЛЬТУРА КЛЕТОК

Объектом исследования являлся препарат БАД Радаля, предоставленный Заказчиком.

Целью работы является оценка противовирусной активности препарата БАД Радаля *in vitro* в отношении вируса герпеса и коронавируса ОС-43.

В задачи исследования входит:

1. Провести оценку цитотоксического действия препарата
2. На основании полученных результатов выбрать дозы исследуемого препарата и оценить его противовирусную активность в отношении вируса герпеса и коронавируса ОС43.

В работе использовали следующие методы: оценка цитотоксического действия; МТТ-тест, подсчет 50% ингибирующей концентрации.

В ходе выполнения исследования было установлено, что препарат БАД Радаля проявляет противовирусную активность в отношении исследованных вирусов

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ.....	2
РЕФЕРАТ	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
1. Материалы и методы	7
2. Результаты исследования.....	8
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	10
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	11

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

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

МТТ-тест – микротетразолиевый тест

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

ЦТД₅₀ – 50 % цитотоксичная доза – доза препарата, вызывающая гибель половины клеток

ХТИ – Химиотерапевтический индекс (также селективный индекс) - показатель широты терапевтического действия лекарственного средства либо БАД, указывает на разницу между токсической и эффективной концентрациями. Чем выше значение этого индекса, тем более перспективным противовирусным средством считается препарат.

ЭД₅₀ – средняя эффективная доза – доза препарата, которая уменьшает количество вируса на 50 %

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные заболевания являются острой медико-социальной проблемой, затрагивающей все человечество. В настоящее время наблюдается глобальное распространение инфекции COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Высокая контагиозность данного возбудителя, большое количество летальных исходов, а также отсутствие доступных этиотропных средств терапии говорят о необходимости разработки новых лекарственных препаратов, предназначенных для её лечения.

Работа с вирусом SARS-CoV2 требует специальных условий и возможна не во всех исследовательских лабораториях, вследствие чего первоначальный этап поиска и разработки новых лекарственных средств представляется возможным проводить с использованием так называемого суррогатного вируса – близкородственного к необходимому инфекционному агенту штамма, обладающего более низкой патогенностью для человека. В настоящей работе в качестве такого суррогатного патогена используется коронавирус человека OC43, относящийся к тому же роду *Betacoronavirus*, что и SARS-CoV2.

Помимо коронавируса, в ходе проведения настоящей работы будет изучена противовирусная активность препарата в отношении вируса герпеса – одного из самых распространенных в человеческой популяции инфекционных агентов, затрагивающих до 67% обитателей планеты [1].

Объектом исследования являлся препарат БАД Радалея, предоставленный Заказчиком.

Целью работы является оценка противовирусной активности препарата БАД Радалея *in vitro* в отношении вируса герпеса и коронавируса OC-43.

В задачи исследования входит:

1. Провести оценку цитотоксического действия препарата
2. На основании полученных результатов выбрать дозы исследуемого препарата и оценить его противовирусную активность в отношении вируса герпеса и коронавируса OC43.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Материалы и методы

Эксперименты по изучению специфической фармакологической активности препарата БАД Радалея *in vitro* проводили согласно Техническому заданию Договора № 14122021 от 14.12.2021 г.

1.1.Исследуемые препараты.

Препарат БАД Радалея был предоставлен Заказчиком в виде лиофилизированного порошка. После получения хранился при температуре +4°C.

1.2.Вирусы.

Сезонный коронавирус (вариант ОС-43, штамм 1902) получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Накоплен на культуре клеток Vero, далее из вирусосодержащей культуральной жидкости готовили серию аликвот. Полученные аликвоты хранились при температуре -80°C.

Вирус герпеса человека 1 типа, штамм ЕС, получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Накоплен на культуре клеток Vero, далее из вирусосодержащей культуральной жидкости готовили серию аликвот. Полученные аликвоты хранились при температуре -80°C.

Культуры клеток. В настоящей работе была использована клеточная культура Vero (почечный эпителий зеленой мартышки), полученная из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций.

Определение цитотоксичности *in vitro*. Готовили серию 2-х кратных разведений препарата в поддерживающей среде, начиная с 833 у.ед., далее в лунки вносили растворы исследуемого соединения. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5%CO₂ в течение 4 суток. По окончании срока инкубации клетки отмывали от супернатанта физиологическим раствором (по 100 мкл/лунку).

Далее готовили раствор 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) 0,5 мг/мл растворяли в физиологическом растворе. Полученный раствор вносили в лунки в объеме 100 мкл/лунку. Далее планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 1,5-2 часа, чтобы произошло восстановление соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана. Затем жидкость удаляли, добавляли в лунки по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид) и осуществляли измерение оптической плотности при длине волны 535 нм. На основании полученных значений оптической плотности вычисляли ЦТД₅₀ (50% цитотоксическая доза) соединения – дозу вещества в лунке, при которой наблюдается 50% деструкция клеточного монослоя.

Оценка противовирусной активности исследуемых соединений.

Противовирусную активность исследуемого препарата, а также препаратов сравнения оценивали по **лечебно-профилактической схеме**.

Готовили серию трехкратных разведений препарата на поддерживающей среде, после чего наносили на суточный монослой клеточной культуры, после чего инкубировали в течение часа в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5 % CO₂. Далее готовили серию 10-кратных разведений вируса и наносили на клеточный монослой, после чего инкубировали необходимое для каждого вируса время (4-10 суток) при 37⁰C в атмосфере 5% CO₂.

По окончании срока инкубации инфекционную активность вируса оценивали с помощью МТТ теста, как описано выше (в разделе «Определение цитотоксичности»).

Титр вирусов рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД₅₀) на 100 мкл объёма [2].

На основании полученных результатов рассчитывали EC₅₀ препарата (50% эффективную концентрацию) и ХТИ (отношение ЦТД₅₀ к EC₅₀). Препарат считался эффективным в случае, если значение ХТИ превышало 10. Вторым показателем активности соединений служила разница в титрах в максимально переносимой концентрации, препарат считался эффективным в случае, если она составляла более 2 lg ТИД₅₀.

Статистическая обработка. Статистический анализ полученных данных проводили в программах Microsoft Office и GraphPad Prism.

2. Результаты исследования

Цитотоксичность соединений не была выявлена ни в одной из исследованных концентраций, вследствие чего для проведения расчетов в качестве ЦТД₅₀ использовали значение >833.

Результаты исследования противовирусной активности препарата представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1. Результаты исследования противовирусной активности компонентов БАД Радаля в отношении вирусов герпеса и коронавируса ОС43 *in vitro*.

Вирус	Дозировка препарата, усл.ед.	Титр вируса, lg ТИД ₅₀	% снижения титров вируса по сравнению с контролем	EC ₅₀ (мкг/мл)	ХТИ
-------	------------------------------	-----------------------------------	---	---------------------------	-----

Вирус герпеса	0	4,17±0,58	-	48,8	>17
	10	4,33±0,29	-46,78		
	31	4,00±0,50	31,87		
	93	3,83±0,29	53,584		
	277	3,00±0,50	93,19		
	833	2,17±0,29	99,00		
Коронавирус ОС-43	0	5,00±0,00	-	14,5	>57,4
	10	4,83±0,29	31,87		
	31	3,83±0,29	93,19		
	93	3,33±0,29	97,85		
	277	1,17±0,58	99,99		
	833	0,50±0,00	99,997		

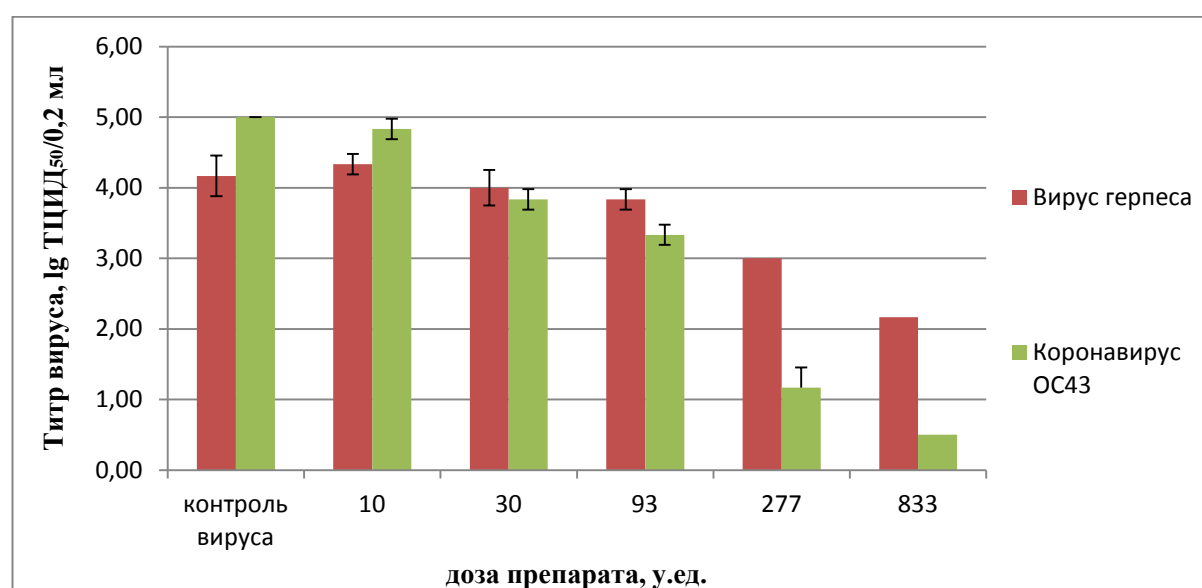


Рисунок 1. Результаты исследования противовирусной активности компонентов БАД Радалея в отношении вирусов герпеса и коронавируса ОС43 *in vitro*.

Из данных, представленных в таблице, следует, что расчетный показатель ХТИ (химиотерапевтический индекс) превышает пороговое значение 10 в отношении обоих исследованных вирусов, при этом активность в отношении коронавируса ОС43 проявлена сильнее, чем в отношении вируса герпеса.

По второму показателю противовирусной активности (снижению титра вируса) значение 2 lg ТИД₅₀ достигается в случае вируса герпеса только в максимальной использованной дозировке - 833 усл.ед., а в случае коронавируса ОС43 – в дозировках 277 и 833 усл.ед.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» было проведено исследование противовирусной активности препарата БАД Радаля *in vitro* в отношении вируса герпеса и коронавируса человека ОС43.

По результатам исследования показано, что значения химиотерапевтического индекса препарата превышают 17 и 57,4 для вирусов герпеса и коронавируса ОС43, соответственно, что существенно выше порогового значения 10.

Таким образом, показано наличие противовирусной активности препарата в отношении обоих изученных в настоящей работе вирусов при использовании по лечебно-профилактической схеме в экспериментах *in vitro* на культуре клеток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1- Всемирная организация здравоохранения/Вирус простого герпеса. Электронный ресурс, [URL:https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus) (дата обращения 23.12.2021).
- 2- Reed, L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints // L.J. Reed, H. Muench / American Journal of Epidemiology. – 1938. – V.27. – P. 493-497.