



Д.И.Ивановский  
1864 - 1920

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ВИРУСОЛОГИИ  
им. Д.И. Ивановского

123098, Москва, ул. Гамален, 16  
ОКПО 01897334  
ОКОНХ 95110  
ИНН 7734008550

Телефон: (095) 190-28-42  
Факс: (095) 190-28-67  
E-mail: info@virology.ru  
www.virology.ru

01.09.2009 № \_\_\_\_\_

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_



Утверждаю:  
Директор ГУ НИИ вирусологии  
им. Д.И.Ивановского РАМН  
Академик РАМН  
Д.К.Львов

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА  
СТЕЛЛАНИНА IN VITRO.

(Отчет)

Ответственный исполнитель:  
Ведущий научный сотрудник  
Кандидат биологических наук

Исаева Е.И.

Москва, 2009 г

Исследование влияния препарата стелланин на вирус герпеса проводилось в лаборатории иммунологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

**Цели и задачи.** -

Изучение противовирусной активности препарата в чувствительных клеточных культурах, инфицированных вирусом герпеса.

**Материалы и методы.**

**Клетки.** В исследовании были использованы перевиваемая культура клеток почки обезьян (VERO), полученная из коллекции культур тканей Института вирусологии им. И.Д. Ивановского РАМН, и диплоидная культура фибробластов легкого эмбриона человека (M-22), полученная из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН.

**Вирус.** Вирус герпеса простого (Herpes simplex virus), тип 1, штамм Л<sub>2</sub>, размноженный в клетках Vero.

**Исследуемый препарат:**

активная субстанция - 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид (Per. № ЛСР-000161/09) производства ООО «Фармпрепарат» в виде водорастворимого комплекса с поливинилпирролидоном (20% 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида + 80% ПВП) - стелланин.

**Исследование противогерпетической активности Стелланина в опытах *in vitro*.**

**Схема проведения исследования**

Для внесения в культуру клеток препарат разводят в культуральной среде для выращивания клеток без добавления сыворотки. Разведение препарата осуществляют НЕПОСРЕДСТВЕННО перед внесением в культуру. Препарат вносят в культуру после адсорбции вируса клетками культуры до конечных концентраций 5,0; 0,5; 0,05 и 0,005 мг комплекса/мл (что соответствует концентрации активного вещества 1,0; 0,1; 0,01 и 0,001 мг/мл).

Длительность инкубирования зараженных клеток с препаратом: 30 мин, 2 часа.

Кратность внесения препарата: 1 -кратно, 5-кратно.

Вычисляется доза препарата, предотвращающая гибель 50% клеток в зараженной популяции (IC50).

В первой серии исследования препарат вносили в культуральную питательную среду на 30 минут после инфицирования клеточного монослоя вирусом герпеса в различных концентрациях с кратностью внесения 1-5. Во второй серии экспериментов в культуральную питательную среду на стадии инфицирования монослоя вносили препараты в

соответствующей концентрации с временем экспозиции 2 часа. Через 120 минут, не удаляя препараты из среды, вновь вносили препарат.

### **Вирус.**

Клетки инфицировали вирусом в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub> или 10 ТЦД<sub>50</sub>- Инфицированные культуры клеток наблюдали в течение 4х суток при инкубировании при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности. О противовирусной активности судили по предотвращению развития в клетках цитодеструктивного эффекта, вызванного размножением вируса герпеса и выражали в % погибших от цитодеструктивного действия вируса клеток.

### **Результаты исследования.**

#### **Влияние различных концентраций исследуемого препарата на репродукцию вируса герпеса простого.**

Препарат вводили в концентрациях от 0,005 до 5,0 мг/мл согласно схеме через 30 мин и 120 минут после внесения вируса в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Активность препарата изучали на модели двух чувствительных к вирусу герпеса тканевых культурах : клетках VERO и диплоидных клетках М-22

Препарат в концентрациях от 0,005 до 0,5 мг/мл не защищал клетки VERO от цитодеструктивного действия вируса герпеса и через 48 часов инкубирования при 37 С наблюдалась 100% гибель клеток, также как и в инфицированном контроле.

При концентрации 5,0 мг/мл препарата отмечалась защита клеток на 40 %. Жизнеспособность инфицированных клеток оставалась на уровне неинфицированного контроля. (Таб. 1).

В диплоидной культуре клеток легкого эмбриона человека (несколько менее чувствительной к вирусу герпеса) защитный эффект обоих препаратов также наблюдали при концентрации 5,0 мг/мл, однако неполная защита клеток от действия вируса герпеса наблюдалась, также как и в клетках VERO, при концентрации в 0,5 мг/мл.

Защитный эффект препарата стелланин изучался при введении препарата после адсорбции вируса ( через 30 минут после внесения вируса в культуральную среду).

При малой множественности инфицирующей дозы вируса ( 10 ТЦИД<sub>30</sub>) в культуре клеток VERO препарат защищал клетки от цитодеструктивного действия вируса герпеса при использованных концентрациях. 5 мг/мл

При стандартной инфицирующей дозе вируса в 100 ТЦД<sub>30</sub> 50% защита клеток была наблюдалась лишь в концентрации 5 мг/мл при однократном и пятикратном внесении препарата в среду и времени экспозиции 30-120 минут. Концентрация препарата 0,5%

обеспечивает защиту лишь 25,0-35,0 % клеток при пятикратной обработке клеток препаратом. Полная защита клеток от действия вируса не наблюдалась.

Таким образом, исследуемый препарат на 50,0% защищал клетки обеих культур от цитодеструктивного действия вируса герпеса простого при концентрации 5,0 мг/мл.

### Заключение

Исследованный препарат Стелланин обладает выраженными противогерпетическими свойствами при использовании двух клеточных культур (клетки VERO и диплоидные клетки легкого эмбриона человека - М-22) и двух схем применения – 30 и 120 минут Экспозиции после инфицирования вирусом.

Табл. 1 Цитотоксическое действие препарата на клетки VERO .

1

Концентрация препарата мг/ мл	Время инкубации в мин	Кратность внесения препарата	Цитотоксическое действие препарата
5,0	30	1	10
	30	5	15
5,0	120	1	10
	120	5	15
0,5	30	1	0
	30	5	0
0,5	120	1	0
	120	5	0
0,05	30	1	0
	30	5	0
0,05	120	1	0
	120	5	0
0,005	30	1	0
	30	5	0
0,005	120	1	0
	120	5	0

Табл.2 Противовирусная активность препарата стелланин.

Концентрация препарата мг/ мл	Время инкубации в мин	Кратность внесения препарата	Процент подавления вирусной активности
5,0	30	1	40
	30	5	50
5,0	120	1	45
	120	5	55
0,5	30	1	15
	30	5	25
0,5	120	1	30
	120	5	35
0,05	30	1	0
	30	5	0
0,05	120	1	0
	120	5	0
0,005	30	1	0
	30	5	0
0,005	120	1	0
	120	5	0