



Д.И.Ивановский
1864 - 1920

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
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

Актуальность.

Разработка и поиск новых химиопрепаратов со специфической активностью к вирусам гриппа представляет актуальное направление в исследованиях ученых многих стран мира. В России спектр таких препаратов представлен ремантадином (блокатором М2-белка вируса гриппа А) и арбидолом (ингибитором слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом), а также препаратами с антинейраминидазной активностью - озельтамивиром (Тамифлю™) и занамивиром (Реленза™) [1,2]. Известным фактом является отсутствие активности ремантадина в отношении вирусов гриппа В, что несколько ограничивает применение препарата в период эпидемической активности этого вируса [4]. . Еще одним недостатком ремантадина является быстрое формирование устойчивости к препарату на фоне проводимой терапии, а также высокой процент циркуляции резистентных к нему мутантов в популяции эпидемических штаммов, достигающий в последние годы в ряде стран 90,0-100% (США, Канада, Китай и др.) [4,5]. В России, в сезоне 2006-2007 гг. этот показатель не превышал 50,0% . Штаммы, устойчивые к арбидолу, удалось получить в экспериментальных условиях путем многократных пассажей в культуре клеток, однако данные о формировании к нему устойчивости эпидемических штаммов в естественных условиях или на фоне проводимой терапии отсутствуют [2]. Озельтамивир и занамивир не получили широкого применения в нашей стране по причине высокой стоимости проводимого курса профилактики и лечения гриппозной инфекции. Однако эксперты ВОЗ определили их особое значение при лечении и профилактике инфекции, вызванной высокопатогенными штаммами вируса гриппа птиц А(Н5N1) [2,5,6]. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения, в ближайшие годы возможно появление нового варианта вируса гриппа, к которому у людей не будет иммунитета, что может привести к развитию пандемии. Вакцины против инфекции, вызванной таким штаммом, нет, а из противогриппозных препаратов, существующих в настоящее время, ни один не производится в России.

В этой связи, возникает настоятельная необходимость в создании новых средств лечения и профилактики гриппа.

Материалы и методы:

Вирус: В исследовании использовали эталонный вирус гриппа человека - А(Н3N2) А/Аichi/2/68.

Изучаемый 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.

Определение противовирусной активности стелланина.

Определение противовирусной активности препарата в культуре клеток МДСК в отношении вируса гриппа А/Аichi/2/68 проведено с использованием двух методов: по снижению титра

вируса в культуральной жидкости, выявляемого в РГА, и снижению экспрессии вирусных антигенов, выявляемой методом иммуноферментного анализа (ИФА).

При использовании обоих методов клетки МДСК выращивали в 96-луночных планшетах до полного монослоя и перед добавлением препарата 2 раза промывали средой MEM с двойным набором аминокислот без сыворотки для снижения возможной неспецифической реакции. Стелланин добавляли к клеткам в 100 мкл среды MEM.

Разведение препарата осуществляли НЕПОСРЕДСТВЕННО перед внесением в культуру. Препарат вносили 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.

Для изучения действия стелланина на инфекционный титр вируса добавляли десятикратные разведения вируса с учетом разведения препаратом (1:5, 1:50, 1:500 и т.д.) в объеме 100 мкл с добавлением трипсина (TPCK treated, Sigma) в конечной концентрации 2 мкг/мл. Панели инкубировали 24 часа при 37°C с последующим учетом развития цитопатического действия и титрованием в реакции гемагглютинации, в которой использовали 1,0% взвесь эритроцитов человека 0(1) группы крови. Расчет инфекционных титров проводили по методу Рида и Менча [3]. Достоверными различиями считали разницу между инфекционными титрами вируса и вируса с препаратом не менее чем на 2 lg.

При определении действия стелланина на экспрессию вирусных антигенов к клеткам, исключая клеточный контроль, добавляли по 100 мкл вируса на среде MEM. Множественность заражения составляла 0,1 ТЦИД₅₀ на клетку. Все процедуры проводили на среде MEM с добавлением трипсина (TPCK treated, Sigma) в концентрации 2 мкг/мл. Планшеты инкубировали в термостате с CO₂ в течение 24 часов при 37°C. После инкубации клетки исследовали под инвертированным микроскопом, чтобы зарегистрировать отсутствие в них цитотоксических и цитопатических изменений. Среду удаляли и клетки фиксировали 80% ацетоном в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 15 минут, хорошо высушивали и затем отмывали 3 раза раствором (PBS с 0,05% Tween-20). Эти и все дальнейшие процедуры отмывки проводили указанным раствором. Затем к клеткам добавляли по 100 мкл раствора PBS с 1% фетальной сывороткой и 0,05% Tween-20, инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После удаления раствора, к клеткам добавляли по 100 мкл поликлональных антител к вирусу гриппа А в рабочем разведении. После инкубации с антителами в течение 1 часа при 37°C в лунки вносили по 100 мкл IgG козы против IgG кролика, меченные пероксидазой хрена, в рабочем разведении. После 4-х кратной отмывки лигированную пероксидазу выявляли добавлением в лунки 100 мкл субстрата

- ОФ/ (ортофенилендиамин). Реакцию учитывали по оптической плотности при 492 нм на спектрофотометре «Униплан». Каждое разведения вируса исследовали в 3-> повторах, для которых вычисляли среднее значение ОП-492. Процент ингибирования определяли, как отношение (ОП-492 опыта минус ОП-492 клеточного контроля / ОП-492 вирусного контроля минус ОП-492 клеточного контроля) умноженного на 100%. Достоверными различиями считали разницу ОП по снижению вирусной репродукции в культуре клеток МДСК между опытом и контролем не менее чем на 50%[1].

Результаты

Результаты исследования цитотоксического действия препарата стелланина в отношении вируса гриппа А/Aichi/2/68 в культуре клеток МДСК представлены в таблице 1.

Концентрация препарата мг/ мл	Время инкубации в мин	Кратность внесения препарата	Цитотоксическое действие препарата
5,0	30	1	50
	30	5	70
5,0	120	1	60
	120	5	80
4,0	30	1	40
	30	5	60
4,0	120	1	15
	120	5	65
0,5	30	1	5
	30	5	15
0,5	120	1	15
	120	5	30
0,05	30	1	0
	30	5	10
0,05	120	1	5
	120	5	15
0,005	30	1	0
	30	5	0
0,005	120	1	0
	120	5	0

Изучение цитотоксического действия стелланина проведено в культуре клеток МДСК

При визуальной оценке состояния контрольных, неинфицированных клеток, и культивируемых с испытуемым препаратом в течение 72 часов установлено, что 50% доза для стеланина составляет 5 мг/мл. Результаты цитотоксического действия препарата стеланина при использовании окраски клеток нейтральротом показали, что препарат ингибирует значение ОП-525 на 50% по сравнению с клеточным контролем при концентрации препарата стеланина 5 мг/мл при однократном воздействии, в условиях пятикратного внесения препарата при всех концентрациях негативное воздействие возрастает.

Результаты исследования эффективности препарата стеланина в отношении вируса гриппа А/Aichi/2/68 по подавлению репродукции вируса в культуре клеток МДСК представлены в таблице 2.

Концентрация препарата мг/ мл	Время инкубации в мин	Кратность внесения препарата	Процент подавления вирусной активности	Снижение инфекционного титра вируса в lg
5,0	30	1	ЦПД	
	30	5	ЦПД	
5,0	120	1	ЦПД	
	120	5	ЦПД	
4,0	30	1	80	4,0
	30	5	ЦПД	
4,0	120	1	95	
	120	5	ЦПД	
0,5	30	1	30	0,5
	30	5	40	1,0
0,5	120	1	40	1,0
	120	5	45	1,5
0,05	30	1	20	0,5
	30	5	28	0,5
0,05	120	1	25	0,5
	120	5	35	0,75
0,005	30	1	5	0
	30	5	10	0
0,005	120	1	10	0
	120	5	15	0
Инфекционный титр вируса				5,0

Примечание: ЦПД – цитопатогенное действие препарата

Результаты определения влияния различных концентраций стелланина на репродукцию вируса гриппа A/Aichi/2/68 показали, что присутствие препарата в среде после инфицирования клеток МДСК вирусом снижало инфекционный титр вируса на 0,5-1,5 lg ТЦИД_{50/кл} в зависимости от концентрации препарата.

Изучено действие стелланина на репродукцию вируса гриппа А человека с использованием метода иммуоферментного анализа модифицированного для определения противовирусной активности соединений в культуре клеток МДСК.

Проведенные эксперименты показали, что препарат в исследуемых концентрациях и режиме воздействия ингибирует репродукцию вируса гриппа на 5-45 % в зависимости от концентрации препарата и кратности его внесения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

При экспериментальном изучении противовирусной активности препарата стелланин были получены следующие результаты:

Цитотоксическая доза стелланина в культуре клеток МДСК составила 5,0 мг/мл.

Стелланин в концентрации 0,5 мг /мл ингибировал репликацию вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) в культуре клеток МДСК, снижая инфекционный титр вируса на 1,0-1,5 lg при времени экспозиции 120 минут и соответствующей кратности внесения препарата.

Препарат стелланин может быть рекомендован для дальнейшего исследования в качестве фармакологического средства для предотвращения гриппозной инфекции.