

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа»
Министерства здравоохранения Российской Федерации


УДК: 615

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора ФГБУ «НИИ гриппа»
Минздрава России, к.б.н.

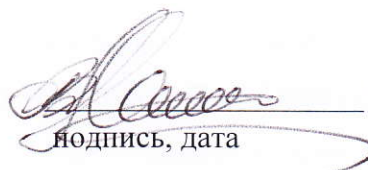


 А.В. Васин
_____ 2016 г.

**Изучение противовирусной активности
биологически активной добавки к пище «Форцис»
в отношении вируса гриппа**

(1 этап)
(промежуточный)

Руководитель
работ канд. биол. наук


подпись, дата

В.В. Зарубаев

Санкт-Петербург 2016

1 Цель исследования

Целью настоящего исследования было оценить противовирусные свойства экстракта ладанника шалфеелистного (основного компонента БАД «Форцис») в отношении вирусов гриппа в опытах *in vitro*.

2 Регулирующие стандарты

Данное исследование проводилось в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ № 708 Н от 23 августа 2010 г., ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 31891-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение Принципов GLP к исследованиям *in vitro*», со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161), Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н.Миронова (2012) [1].

3 Реактивы и приборы

- Культура клеток MDCK, нормальный эпителий почки собаки; женская особь, кокер-спаниель (ATCC; Кат. № CCL-34);
- Вирусы гриппа:
 - штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09, осельтамивир-чувствительный, ремантадин-устойчивый, получен из Центра по контролю за заболеваемостью (CDC, Atlanta, США);
 - штамм A/Aichi/2/68 (H3N2), осельтамивир-чувствительный, ремантадин-чувствительный, получен из вирусной коллекции ФГБУ «НИИ гриппа»;
 - штамм A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), осельтамивир-чувствительный, ремантадин-устойчивый, получен из вирусной коллекции ФГБУ «НИИ гриппа»;
 - Штамм A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), осельтамивир-чувствительный, ремантадин-чувствительный, получен из вирусной коллекции ФГБУ «НИИ гриппа»;
 - штамм A/Vladivostok/02/09 (H1N1), осельтамивир-устойчивый, ремантадин-чувствительный, получен из вирусной коллекции ФГБУ «НИИ гриппа»;
 - штамм B/Lee/40, осельтамивир-чувствительный, ремантадин-устойчивый, получен из вирусной коллекции ФГБУ «НИИ гриппа»;
 - штамм B/Malaysia/2506/04, осельтамивир-чувствительный, ремантадин-устойчивый, получен из вирусной коллекции ФГБУ «НИИ гриппа»;

- штамм В/Florida/04/06, осельтамивир-чувствительный, ремантадин- устойчивый, получен из вирусной коллекции ФГБУ «НИИ гриппа». Характеристики чувствительности или устойчивости использованных вирусов к осельтамивиру и ремантадину были определены в ранее проведенных экспериментах

- Полная среда MEM, содержащая 2 mM L-глутамина, 250 мг/л гентамицина, 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (РАА, Австрия Кат. №E15-825);
- Физиологический раствор (0.9% раствор NaCl в дистиллированной воде, стерильный, Биолот, Санкт-Петербург, Кат. № 1.2.1.3);
- Раствор трипсина 0,1 мг/мл (Sigma. США, T1426);
- 3-(4,5-диметилтиазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромид (ICN Biochemicals Inc., Aurora, Ohio);
- 96-луночные планшеты (Corning, США, Кат. № 3585);
- 24- луночные планшеты (Orange Scientific, Китай, Кат. № 5530300)
- Наконечники для автоматических пипеток 20-200 мкл;
- Дистиллятор ДЭ-10, Электромедоборудование (ЭМО), Санкт-Петербург;
- Ламинарный бокс, второго класса защиты (БОВ-001-АМС, Миасс, Россия);
- CO₂- инкубатор MCO-175 (Sanyo, Япония);
- Термостат суховоздушный ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Смоленск, Россия);
- Весы аналитические PA114 (Ohaus, США).

4 Вещества

4.1 Тестируемые образцы

Название: Экстракт ладанника шалфейлистного (серия 7186) в виде коричневого порошка

4.2 Препарат сравнения

Название:	Осельтамивир
Производитель:	La Roche, Швейцария. Предоставлен по запросу для экспериментов <i>in vitro</i>
Химическое рациональное название:	Осельтамивира карбоксилата виннокислая соль
Лекарственная форма:	Порошок
Состав:	Осельтамивира карбоксилата виннокислая соль
Описание:	Белый порошок без запаха

Тестируемое вещество было предоставлено Заказчиком в виде сухого коричневого порошка. Осельтамивир был предоставлен Исполнителем в виде порошка.

Соответствующие навески исследуемых веществ растворяли в среде MEM, фильтровали при помощи фильтров (Биолот, СПб, кат. №5.1.60) и из полученных маточных растворов готовили серию разведений от 600 до 4 мкг/мл, которые в дальнейшем использовали в опытах.

5 Дизайн исследования

Титрование вирусов гриппа в присутствии и отсутствии изучаемых веществ проводили с использованием культуры клеток MDCK. Клетки рассеивали в 96-луночный планшет в количестве 10^4 кл./лунку и объеме 100 мкл/лунку полной среды MEM. Инкубацию проводили в течение суток в CO₂-инкубаторе при 37°C в 5% атмосфере CO₂.

Непосредственно перед экспериментом клетки промывали средой MEM, дальнейшие манипуляции проводили в бессывороточной среде.

Вирусы гриппа культивировали в клетках MDCK и определяли их инфекционный титр, как описано ниже.

6 Заражение культуры клеток, режим введения тестируемых образцов

6.1 Изучение суммарной противовирусной активности образцов (виростатическое действие)

Исследуемые образцы в объеме 100 мкл вносили в лунки планшетов с монослоем клеток MDCK. Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 1 ч. После этого в лунки вносили по 0,1 мл серийных десятикратных разведений соответствующего вируса в среде MEM (10^{-2} – 10^{-7}) и инкубировали в течение 48 часов в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

По завершении экспериментов вирусную продукцию оценивали по реакции гемагглютинации (см. далее).

6.2 Изучение вирулицидной активности образцов.

Исследуемые образцы в объеме 100 мкл смешивали с равным объемом среды для культур клеток, содержащей вирус в дозе 10^6 ИД₅₀. Пробы инкубировали при 37°C в течение 1 часа, после чего определяли инфекционную активность вируса при помощи титрования на культуре клеток MDCK.

6.3 Изучение влияния экстракта на клетки в культуре

Клетки MDCK инкубировали в течение 1 часа при 37°C с раствором исследуемого экстракта (1,0 мл на лунку), после чего клетки промывали и в лунки

вносили вирус в дозе 10^5 ИД₅₀ в объеме 1 мл. Клетки инкубировали 1 час в атмосфере 5% CO₂ при 37°C, несвязавшийся вирус отмывали и инкубировали планшеты 24 часа в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Инфекционную активность вируса в культуральной жидкости определяли при помощи титрования на культуре клеток MDCK в 96-луночных планшетах.

7 Методы оценки эффективности образцов

7.1 Оценка противовирусного действия образцов

Противовирусную активность образцов оценивали по снижению титра вируса в опытных лунках планшетов по сравнению с контрольными (группа контроля вируса). Титр вируса определяли по результатам реакции гемагглютинации (РГА, см. далее). Каждую из концентраций экстракта и препарата сравнения испытывали в двух параллельных лунках.

7.2 Оценка цитопатического действия исследуемых веществ в культуре клеток

Оценка токсичности соединений осуществлялась на основе оценки жизнеспособности клеток при помощи реакции восстановления тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) клетками в культуре, интенсивность которой отражает степень жизнеспособности клеток в результате восстановления красителя митохондриальными и частично цитоплазматическими дегидрогеназами [2]. С этой целью в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (0,5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромид на физиологическом растворе. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч и промывали в течение 5 минут физиологическим раствором. Осадок растворяли в 100 мкл ДМСО на лунку, после чего оптическую плотность измеряли с помощью планшетного анализатора Victor 1420 (Perkin Elmer, Finland) при длине волны 535 нм. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую концентрацию (CC₅₀), т.е. концентрацию соединения, снижающую оптическую плотность в лунках вдвое по сравнению с контрольными клетками без препаратов.

7.3 Реакция гемагглютинации (РГА)

Для определения наличия вируса в культуральной жидкости проводили реакцию гемагглютинации. Для этого культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали при 20°C в течение

1 ч, после чего визуально проводили учет результатов. За титр вируса принимали наибольшее разведение вирусосодержащего материала, при котором наблюдалась положительная реакция гемагглютинации. Положительным считают результат реакции, при котором эритроциты равномерно покрывали всё дно лунки. При отрицательной реакции эритроциты в виде маленького диска или «пуговки» располагаются в центре дна анализируемой лунки планшета. Титр вируса в присутствии каждой из концентраций экстракта и препарата сравнения определяли по методу Рида и Менча [3].

8 Анализ данных

Расчет значений 50% цитотоксической концентрации (CC_{50}) и 50% эффективной концентрации (IC_{50}) проводили при помощи пакета программ GraphPad [4]. За рабочую модель для анализа принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» – «логарифм ингибитора – ответ»). На основании полученных данных для каждого соединения и каждого вируса рассчитывали индекс селективности (SI) – отношение CC_{50} к IC_{50} .

9 Результаты исследования и обсуждение

На первом этапе исследования для оценки диапазона рабочих концентраций была определена цитотоксичность исследуемого экстракта и препарата сравнения. Результаты приведены в табл. 1.

ТАБЛИЦА 1. Показатели цитотоксичности химических соединений в культуре клеток МДСК

Концентрация, мкг/мл	Оптическая плотность (OD535) при использовании препарата	
	Экстракт ладанника	Осельтамивира карбоксилат*
1000	50±3	Н/Г**
300	214±60	423±11
100	248±59	435±3
30	304±69	428±5
10	359±71	438±9
3	385±75	448±6
0 (контроль)	385±75	437±5

клеток)		
---------	--	--

* Концентрации осельтамивира карбоксилата составили 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 и 1 мкг/мл

** Не тестировали

На основании полученных данных были рассчитаны 50% токсические концентрации для каждого из тестируемых веществ. Для экстракта ладанника эта величина составила 191 мкг/мл (Рис.1), для препарата сравнения, осельтамивира карбоксилата – >1 мкг/мл.

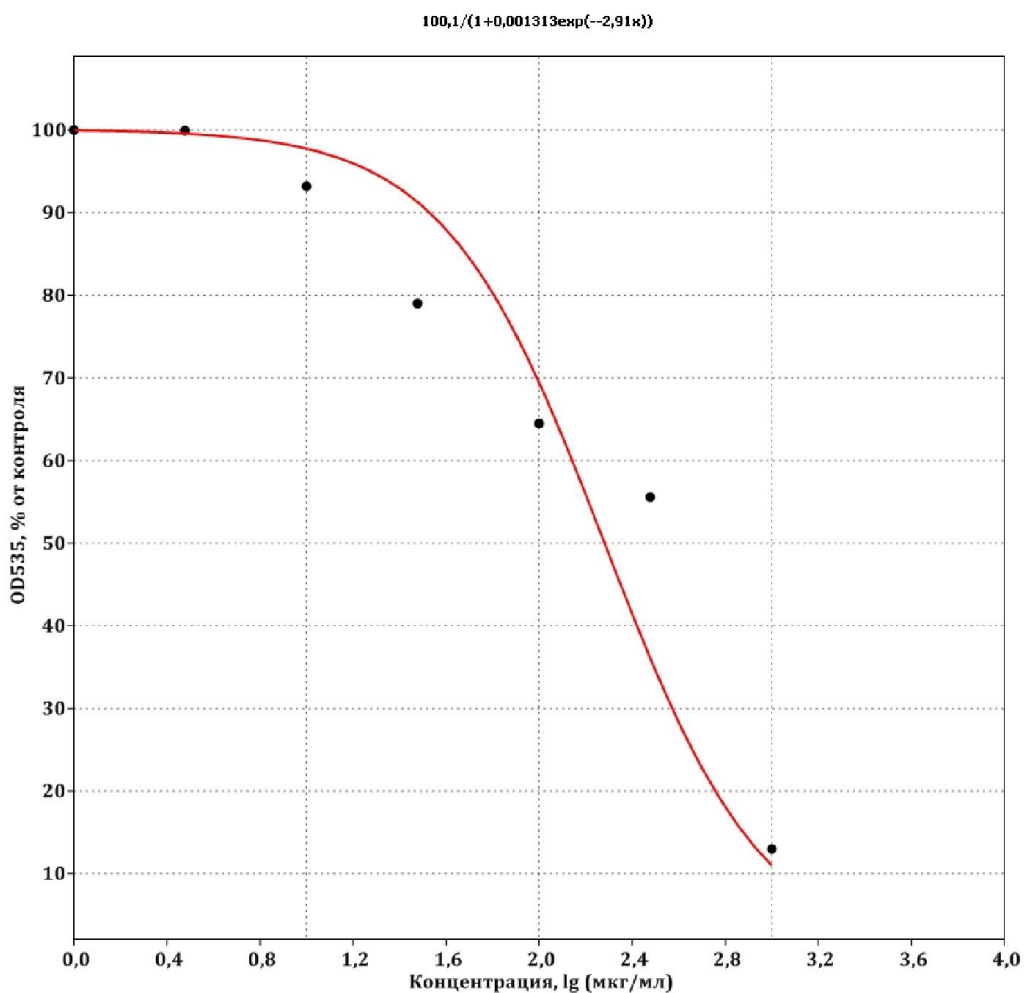


Рис.1. Цитотоксические свойства экстракта ладанника в культуре клеток MDCK.

Результаты изучения противовирусной активности экстракта ладанника в отношении разных типов и подтипов вирусов гриппа суммированы в табл.2 и для наглядности представлены на рис.2.

ТАБЛИЦА 2. Показатели противовирусной активности химических соединений в культуре клеток MDCK

Вирус	Титр вируса (lg ID ₅₀ /0.2 mL) при концентрации экстракта, мкг/мл					IC ₅₀ , мкг/мл	SI
	0	3	10	30	100		
A/California/07/09 (H1N1)pdm09	6,5±0,0	5,0±0,5	4,0±0,5	3,0±0,5	2,0±0,5	0,5	382
A/Aichi/2/68 (H3N2)	6,0±0,5	4,0±0,0	2,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,6	318
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	7,5±0,5	6,5±0,0	5,5±0,0	4,5±0,0	2,5±0,0	1,0	191
A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	6,5±0,0	5,0±0,5	4,0±0,5	2,5±0,0	2,5±0,0	0,5	382
A/Vladivostok/02/09 (H1N1)	6,0±0,5	5,0±0,5	4,5±0,0	2,5±0,0	2,5±0,0	0,4	478
B/Lee/40	4,0±0,5	4,0±0,5	4,0±0,5	3,0±0,5	1,5±0,0	27,3	7
B/Malaysia/2506/04	6,5±0,0	6,5±0,0	6,0±0,5	5,0±0,5	4,0±0,5	8,4	23
B/Florida/04/06	5,0±0,5	5,0±0,5	4,0±0,5	3,5±0,0	2,5±0,0	7,5	25

Как следует из представленных результатов, изучаемый экстракт в той или иной степени ингибировал все использованные вирусы. Наиболее чувствительными к нему оказались вирусы A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Для них значения IC_{50} составили 0,5; 0,5 и 0,4 мкг/мл, а индексы селективности – 382, 382 и 478 соответственно, что характерно для препаратов с высокой противовирусной активностью. Вирусы гриппа типа В оказались менее чувствительны к действию экстракта. При этом эпидемически актуальные вирусы B/Malaysia/2506/04 и B/Florida/04/06 демонстрировали несколько более высокую чувствительность ($SI=23$ и 25 соответственно). Наименьшей чувствительностью к экстракту обладал вирус гриппа B/Lee/40 ($IC_{50}=27.3$ мкг/мл, $SI=7$).

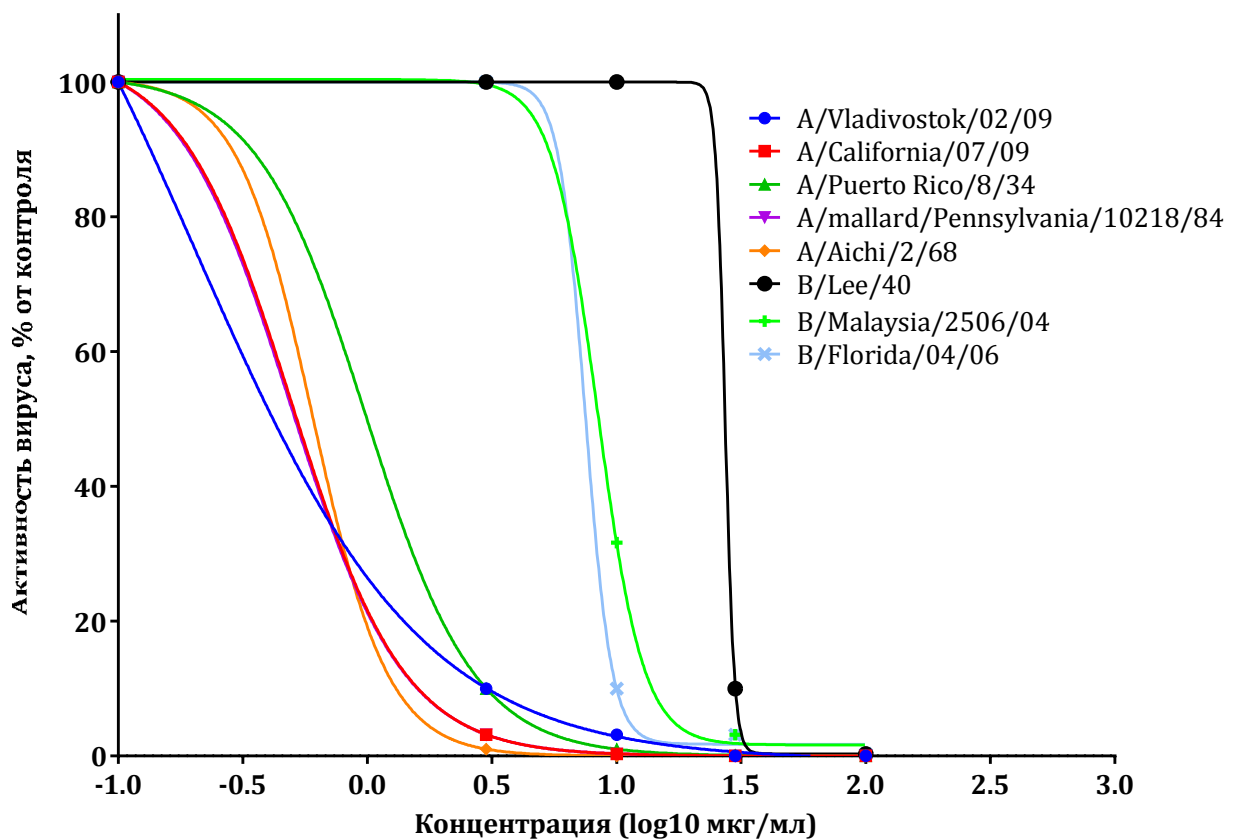


Рис.2. Влияние экстракта ладанника на репродукцию вирусов гриппа в культуре клеток MDCK.

Для сравнительной характеристики спектра и уровня противовирусной активности исследуемого экстракта его показатели были сравнены с соответствующими показателями препарата сравнения – осельтамивира. Данные по активности осельтамивира суммированы в табл.3.

Таблица 3. Показатели противовирусной активности осельтамивира в культуре клеток MDCK.

Вирус	Титр вируса (lg ID ₅₀ /0.2 mL) при концентрации осельтамивира, мкг/мл					IC ₅₀ , мкг/мл	SI
	0	0,01	0,03	0,1	0,3		
A/California/07/09 (H1N1)pdm09	7,5±0,0	7,5±0,0	6,5±0,0	4,0±0,5	2,5±0,0	0,008	>125
A/Aichi/2/68 (H3N2)	6,0±0,5	6,0±0,5	5,5±0,0	3,5±0,0	2,0±0,5	0,013	>77
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	7,5±0,0	7,5±0,0	7,0±0,5	5,0±0,5	3,0±0,5	0,003	>333
A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	7,0±0,5	6,0±0,5	5,5±0,0	4,5±0,0	3,0±0,5	0,012	>83
A/Vladivostok/02/09 (H1N1)	6,5±0,0	6,0±0,5	6,5±0,0	6,5±0,0	6,0±0,5	>0,3	>3
B/Lee/40	5,5±0,0	5,5±0,0	5,5±0,0	4,5±0,0	3,0±0,5	0,091	>11
B/Malaysia/2506/04	6,5±0,5	6,5±0,0	6,0±0,5	5,0±0,5	3,5±0,0	0,026	>38
B/Florida/04/06	5,0±0,0	5,0±0,5	5,0±0,5	3,5±0,0	2,0±0,5	0,086	>12

Как видно из представленных результатов, препарат сравнения – осельтамивира карбоксилат эффективно ингибировал репродукцию всех изученных вирусов за исключением вируса A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Эти данные согласуются с ранее полученными результатами, свидетельствующими об осельтамивир-устойчивости этого штамма и осельтамивир-чувствительности всех остальных использованных вирусов.

Результаты изучения влияния экстракта ладанника на репродукцию вируса гриппа при использовании по профилактической схеме суммированы в табл.4.

Таблица 4. Показатели противовирусной активности экстракта ладанника на репродукцию вируса гриппа при использовании по профилактической схеме.

Вирус	Титр вируса (lg ID ₅₀) при концентрации экстракта ладанника, мкг/мл					
	0	3	10	30	100	300
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	7,5±0,0	7,5±0,0	7,0±0,5	7,0±0,5	7,0±0,5	6,5±0,0

Как следует из представленных данных, предварительная (до инфицирования вирусом) обработка клеток экстрактом ладанника не влияла на репродукцию вируса гриппа. Снижение инфекционного титра вируса на порядок отмечалось лишь при максимальной использованной концентрации экстракта (300 мкг/мл). Таким образом, изучаемый экстракт не оказывает влияния на клеточные рецепторы и не вызывает формирования в клетке антивирусного статуса.

Результаты исследования вирулицидных свойств экстракта ладанника на примере вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) суммированы в табл.5.

Таблица 5. Показатели вирулицидной активности экстракта ладанника на репродукцию вируса гриппа.

Вирус	Титр вируса (lg ID ₅₀) при концентрации экстракта ладанника, мкг/мл					
	0	3	10	30	100	300
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	7,5±0,0	7,5±0,0	7,0±0,5	7,5±0,0	7,0±0,5	7,0±0,5

Как следует из представленных данных, инкубация вируса гриппа с экстрактом ладанника не влияла на инфекционные свойства вирионов вплоть до максимальной концентрации. Таким образом, изучаемый экстракт не обладает вирулицидными свойствами.

10 Выводы

1. Проведена оценка цитотоксических, вирулицидных и вирусингибирующих свойств экстракта ладанника шалфеелистного на модели гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа разных типов и подтипов в культуре клеток MDCK.

2. Показано, что изученный экстракт ингибировал репродукцию всех использованных вирусов. Наиболее чувствительными к нему оказались вирусы A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Для них значения IC_{50} составили 0,5; 0,5 и 0,4 мкг/мл, а индексы селективности – 382, 382 и 478 соответственно, что характерно для препаратов с высокой противовирусной активностью. Вирусы гриппа типа В были менее чувствительны к экстракту. Наименьшей чувствительностью к экстракту обладал вирус гриппа B/Lee/40 ($IC_{50}=27.3$ мкг/мл, $SI=7$). Ингибирующая активность экстракта не зависела от чувствительности или устойчивости вирусов к используемым противогриппозным препаратам – осельтамивиру и ремантадину.

3. Показано, что экстракт ладанника не обладает вирулицидной активностью в бесклеточной системе.

4. Показано, что инкубация клеток с экстрактом ладанника не влияет на способность вируса к репродукции в них вируса. Таким образом, изучаемый экстракт не оказывает влияния на клеточные рецепторы и не вызывает формирования в клетке антивирусного статуса.

11 Список литературы

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // Под ред. А.Н. Миронова. - М.: ЗАО «Гриф и К». - 2012. - Часть первая. – 944 с.
2. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. – 1983. – V. 65, N. 1–2. – P. 55–63.
3. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Am. J. Hyg. – 1938. – V. 27. – P. 493–497.

4. Guan H., Nuth M., Zhukovskaya N., Saw Y.L., Bell E., Isaacs S.N., Ricciardi R.P. A novel target and approach for identifying antivirals against molluscum contagiosum virus// *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. V. 58, N. 12. – P.7383-7389. doi: 10.1128/AAC.03660-14.

Протинуровано, пронумеровано
и скреплено печатью /4
листа (ов)

И.о. директора ФГБУ «НИИ Ерипта» Минздрова Россия

