

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского

«УТВЕРЖДАЮ»

от «Исполнителя»

Заместитель директора
ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.
Ивановского» Минздрава России, профессор



П.Г. Дерябин

« » _____ 2014 г.

ОТЧЕТ

о выполнении работ по договору

от «20» января 2014 г. №19/2014

«Исследование эффективности аппарата физиотерапевтического МАГ БИО в
отношении экспериментальной герпесвирусной инфекции».

Москва, 2014

Обозначения и сокращения:

аппарат физиотерапевтический МАГ БИО	АФ МАГ БИО
вирус простого герпеса 1 и 2 антигенного типов	ВПГ-1,-2
вируссодержащая жидкость	ВСЖ
герпесвирусная инфекция	ГИ
титры вируса	Ig ТЦД ₅₀ /мл
цитопатическое действие вируса	ЦПД

Наименование темы: «Исследование эффективности аппарата физиотерапевтического МАГ БИО (далее АФ МАГ БИО) в отношении экспериментальной герпесвирусной инфекции».

Исследование эффективности АФ МАГ БИО в отношении экспериментальной герпесвирусной инфекции проведено в лаборатории сравнительной вирусологии ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России.

Актуальность исследования. Проблема герпесвирусных инфекций (ГИ) на протяжении последних лет не теряет своей актуальности. Несмотря на существенные достижения в изучении этиологии, патогенеза и терапии ГИ, последние продолжают оставаться одними из наиболее распространенных инфекционных заболеваний человека [1,4,7,9]. Основными возбудителями ГИ являются представители семейства Herpesviridae – вирусы простого герпеса 1 и 2 антигенного типов (ВПГ-1,-2), которые при определенных условиях могут вызывать различные по локализации и выраженности патологические процессы, характеризующиеся склонностью к персистенции и рецидивам [1].

В настоящее время в качестве противовирусных средств для лечения ГИ применяют химиопрепараты, интерфероны, индукторы интерферона, иммуномодуляторы, а также их комбинации [1,2]. Среди химиопрепаратов наиболее эффективными являются две группы соединений, обладающих избирательным действием на ДНК-полимеразу ВПГ: синтетические ациклические аналоги нуклеозидов и аналоги пирофосфатов. Среди аналогов нуклеозидов широкое применение в терапии ГИ нашли пиримидиновые аналоги нуклеозидов (5-йод-2-дезоксинуридин (ИДУ), Видарабин) и пуриновые аналоги нуклеозидов (Ацикловир, Валацикловир, Фамцикловир, Ганцикловир) [1,7]. Среди синтетических аналогов пирофосфатов высокоэффективными ингибиторами репродукции ВПГ являются фосфонуравьиная и фосфонуксусная кислоты. Однако применение выше перечисленных препаратов не всегда оказывается эффективным [1,8]. Рост резистентных форм ВПГ на фоне применения традиционных методов лечения приводит к тому, что лечение ГИ становится более сложным, диктуя необходимость поиска и внедрения в практику как ингибиторов ВПГ с механизмом действия,

отличающимся от действия аналогов нуклеозидов и пирофосфатов, так и иных методов лечения, в том числе и не медикаментозных.

В связи с этим, изучение не медикаментозных методов терапии герпесвирусной инфекции, в том числе с применением приборов, генерирующих биологически активные частоты, является актуальной задачей.

Целью настоящей работы явилось изучение эффективности аппарата физиотерапевтического МАГ БИО на экспериментальной модели герпесвирусной инфекции *in vitro*.

Материалы и методы.

Вирусы. В исследовании использовали следующие тест-вирусы: ВПГ-1, штамм «Кл», ВПГ-2, штамм «ВН», полученные из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» МЗ РФ. ВПГ-1/2 пассировали и титровали на монослойной культуре клеток VERO. Инфекционные титры вирусов определяли стандартным методом подсчета по Риду и Менчу и выражали в логарифмических единицах ($\lg \text{ТЦД}_{50}/0.1 \text{ мл}$). Исходные титры ВПГ-1 шт. «Кл», ВПГ-2, шт. «ВН» составили – $6.0 \pm 0.5 \lg \text{ТЦД}_{50}/0.1 \text{ мл}$. В опытах использовали ВПГ-1/2 в виде культуральной вирусосодержащей взвеси.

Культура клеток. Исследование проводили на перевиваемой культуре клеток почек зеленых мартышек (VERO), полученной из лаборатории культур тканей ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» МЗ РФ. Клетки культивировали в среде роста, представляющей собой среду ИГЛА с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (Sigma, USA) и антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 80 мкг/мл гентамицина). Среда поддержки содержала все указанные выше ингредиенты и 2% ЭТС. Клетки выращивали в 24 - 96-луночных пластиковых панелях, матрасах (фирмы "Costar, США) и инкубировали в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$ во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . В работе использовали однодневный монослой культур клеток.

Приборы. Проведено исследование эффективности изделия медицинского назначения - аппарата физиотерапевтического МАГ БИО по ТУ 9444-001-65178795-2011 (ООО «НПО «Свитозар» (Москва, Зеленоград)). Регистрационное удостоверение на медицинское изделие - аппарат физиотерапевтический МАГ БИО от 20 марта 2012 г. № ФСР 2012/13254 выдано Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (РОСЗДРАВНАДЗОРом). Основой действия аппарата является частотно-резонансный метод. Аппарат генерирует модулированное электромагнитное поле в ультразвуковом диапазоне частот (28000-32000 Герц и амплитудой 5-10 вольт). Воздействие аппарата на объект происходит через пластину-излучатель.

Аппарат использовали в соответствии с рекомендациями разработчиков: режим 4 (максимальная мощность), длительность воздействия 30 минут, расстояние между пластиной-излучателем и объектом - 10-15 см, при +23°C.

Дизайн исследования.

Изучение эффективности АФ МАГ БИО проводили на модели экспериментальной ГИ (ВПГ- 1/-2) по стандартной методике [3].

На первом этапе проводили изучение действия АФ МАГ БИО на интактную культуру клеток по его влиянию на морфологию и жизнеспособность клеток.

Для этого выращенные в матрасах суточные культуры клеток VERO, без освобождения от ростовой среды, подвергали воздействию АФ МАГ БИО. Контролем служили суточные культуры клеток VERO, не подвергавшиеся воздействию аппарата. Далее клетки инкубировали в термостате при +37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 96 часов. Результаты учитывали ежедневно методом световой микроскопии. Также ежедневно в течение 4-х дней определяли количество жизнеспособных клеток методом исключения витального красителя трипанового синего. Для этого клетки снимали смесью трипсина и версена и прижизненно окрашивали 0.4% раствором трипанового синего в течение 5 минут при +37°C. Затем подсчитывали число жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (голубых) клеток. Жизнеспособность клеток в популяции

оценивали по количеству неокрашенных клеток в процентах от общего числа клеток.

Опыты ставили трехкратно для получения статистически достоверных результатов и сопровождали соответствующими контролями.

На втором этапе проводили изучение эффективности АФ МАГ БИО в отношении экспериментальной герпесвирусной инфекции. Эффективность аппарата *in vitro* оценивали по общепринятым критериям: способности предотвращать развитие индуцируемого вирусами цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток; способности ингибировать репродукцию вирусов в культуре клеток, а также по наличию вирулицидного действия на свободные вирионы тест-вирусов [3,5,7].

Изучение эффективности АФ МАГ БИО предусматривало две схемы испытаний.

Схема 1 предусматривала исследование эффективности АФ МАГ БИО при его использовании по лечебной схеме - через 1 час после инфицирования культуры клеток (VERO) тест-вирусами (ВПГ-1/-2).

Для этого культуры клеток культивировали в матрасах, как было описано ранее, затем среду роста удаляли, клетки трижды отмывали раствором Хенкса и заражали тест-вирусами (ВПГ-1/-2) в дозе 100 ТЦД₅₀. Далее культуры клеток инкубировали в течение 1 часа в термостате при +37°C, после чего инокулят удаляли, культуры клеток трижды отмывали раствором Хенкса, после чего в матрас добавляли поддерживающую среду и затем подвергали воздействию АФ МАГ.

Схема 1.1. предусматривала исследование эффективности АФ МАГ БИО при его использовании по профилактической схеме - за 1 час до инфицирования культуры клеток (VERO) тест-вирусами (ВПГ-1/-2).

Схема 1.2. предусматривала исследование эффективности АФ МАГ БИО при его использовании по лечебно-профилактической схеме - за 1 час до и через 1 час после инфицирования культуры клеток (VERO) тест-вирусами (ВПГ-1/-2).

Эксперименты, проведенные по схемам 1; 1.1.; 1.2, сопровождали соответствующими контролями. В качестве позитивного контроля использовали

инфицированные тест-вирусами культуры клеток, не подвергавшиеся воздействию АФ МАГ БИО. В качестве негативного контроля использовали не инфицированные культуры клеток, которые подвергали воздействию АФ МАГ БИО; в качестве контроля цитотоксичности - не инфицированные культуры клеток, не подвергавшиеся воздействию АФ МАГ.

Клетки инкубировали в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$ во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 в течение 4-х дней (для ВПГ-1/-2), ежедневно оценивая характер вирусспецифического ЦПД в опытных и контрольных культурах клеток методом световой микроскопии.

Оценка эффективности АФ МАГ БИО включала также изучение инфекционной активности вируса, образовавшегося после воздействия аппарата.

Для этого через 96 часов после инфицирования, когда уровень накопления тест-вирусов в контрольных пробах достигал максимума и отмечалось выраженное (100%) ЦПД, из опытных и контрольных матрасов отбирали соответствующие пробы вируссодержащей жидкости (ВСЖ) и определяли инфекционную активность вирусов на перевиваемых культурах клеток методом титрования [5]. Образцы проб ВСЖ до исследования хранили при -70°C . Непосредственно перед исследованием готовили серийные десятикратные разведения образцов ВСЖ ($10^{-1} - 10^{-8}$) на питательной среде ИГЛА, которыми заражали однодневный монослой культур клеток, после удаления ростовой среды и отмывки раствором Хенкса. Контролями служили: культуры клеток, инфицированные ВПГ (позитивный контроль), и интактные культуры клеток (негативный контроль). Клетки инкубировали в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 4-х дней (для ВПГ-1/-2).

Эффективность воздействия аппарата оценивали по результатам титрования с помощью общепринятых показателей: снижению уровня накопления вируса под воздействием АФ МАГ БИО ($\Delta \lg$) по сравнению с контрольными пробами, не подвергавшимися воздействию аппарата, и коэффициенту ингибирования (КИ) [3,5].

Снижение уровня накопления вируса в диапазоне $-1,0 - 1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}$ - соответствовало низкой степени выраженности противовирусной активности, в

диапазоне 1,5 – 2,0 lg ТЦД₅₀ – умеренной, в диапазоне от 2,0 lg ТЦД₅₀ и выше – выраженной ингибирующей активности в отношении ВПГ.

Схема 2 предусматривала выявление у АФ МАГ вирулицидного эффекта в отношении свободных вирионов ВПГ-1/-2.

Для этого тест-вирусы ВПГ-1/-2 (титр 6.0 lg ТЦД₅₀/0.1 мл) в виде вирусодержащей жидкости, находящейся в пластиковых матрасах, подвергали воздействию АФ МАГ БИО как было описано ранее. Контролем служили тест-вирусы, инкубирующиеся в аналогичных условиях, но не подвергавшиеся воздействию аппарата. Затем готовили серийные десятикратные разведения тест-вирусов (10^{-1} – 10^{-8}), которые вносили в четырех повторах в предварительно освобожденные от ростовой среды, трижды отмытые раствором Хенкса, культуры клеток и инкубировали в термостате в течение 1 часа при +37°C. Не связавшийся инокулят удаляли, клетки трижды отмывали раствором Хенкса и добавляли среду поддержки с 2% ЭТС. Контролями служили: культура клеток, зараженная ВПГ (позитивный контроль), интактная культура клеток (негативный контроль). Клетки инкубировали в термостате при +37°C в течение 4-х дней (для ВПГ-1/-2), после чего определяли инфекционную активность вирусов методом титрования. Оценку состояния клеточного монослоя проводили ежедневно методом световой микроскопии.

О наличии у аппарата вирулицидного действия судили, если под его воздействием инактивировалось $\geq 90\%$ вирусных частиц по сравнению с контролем.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми для биологических исследований методами с использованием компьютерных прикладных программ анализа данных «Microsoft Excel-5.0» и «Statistika 5.0». Достоверность разности полученных результатов оценивали с помощью критерия t Стьюдента, различия признавали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты.

Результаты изучения АФ МАГ БИО на морфологию и жизнеспособность не инфицированных клеток перевиваемой линии Vero представлены в таблице 1.

Установлено, что АФ МАГ (в данных условиях эксперимента) по данным метода световой микроскопии и по данным теста с трипановым синим, не вызывал цитотоксических изменений в культуре клеток линии Vero в течение всего периода наблюдения. Показатель жизнеспособности клеток линии Vero, подвергшихся воздействию АФ МАГ БИО, практически не отличался от такового у контрольных клеток, не подвергшихся воздействию аппарата.

Таблица 1.

Время после воздействия АФ МАГ, часы	Цитотоксическое действие на клетки, %
24	0.0
48	0.0
72	0.0
96	0.0

Результаты изучения эффективности АФ МАГ БИО в отношении экспериментальной герпесвирусной инфекции, обусловленной ВПГ-1/-2, суммированы в таблице 2.

Из таблицы 2 следует, что АФ МАГ БИО эффективно ингибировал инфекционную активность ВПГ-1, выраженность которой зависела от схемы применения аппарата.

Аппарат предотвращал появление вирусиндуцированного ЦПД у 100% клеток монослоя в среднем в течение 72 часов после инфицирования, в то время как в контрольных инфицированных культурах вирусиндуцированное ЦПД отмечалось в среднем у 50% клеток монослоя уже через 24 часа после инфицирования. Данный эффект не зависел от схемы применения аппарата, однако был нестойким и через 96 часов после инфицирования вирусиндуцированное ЦПД было отмечено у более чем 25% клеток в инфицированной популяции.

Инфекционные титры ВПГ-1, шт. «Кл», в инфицированной культуре клеток, не подвергавшейся воздействию аппаратом, через 96 часов после инфицирования достигали $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$.

Иная картина наблюдалась при использовании аппарата МАГ БИО.

Наиболее выраженный эффект по отношению к ВПГ-1 был выявлен при использовании аппарата по лечебно-профилактической схеме – за 1 час до- и через 1 час после инфицирования и по лечебной схеме – через 1 час после инфицирования.

Так, при использовании аппарата МАГ БИО по лечебно-профилактической схеме инфекционная активность ВПГ-1 была статистически достоверно ниже на $3.0 \lg \text{ТЦД}_{50}$ по сравнению с таковой у вирусов в контроле. Коэффициент ингибирования (КИ) ВПГ-1 составил 50%. При использовании аппарата по лечебной схеме через 1 час после инфицирования инфекционные титры ВПГ-1 были статистически достоверно ниже на $2,58 \lg \text{ТЦД}_{50}$ по сравнению с таковыми у вируса в контроле и составили $3,42 \lg \text{ТЦД}_{50}/0.1 \text{ мл}$. КИ составил 43,0%.

Минимальный достоверный эффект был выявлен при использовании аппарата по профилактической схеме: инфекционная активность ВПГ-1 была статистически достоверно ниже на $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}$ по сравнению с таковой у вирусов в контроле ($p < 0.05$). Коэффициент ингибирования (КИ) ВПГ-1 составил 25%.

Изучение активности АФ МАГ БИО по отношению к свободным вирионам ВПГ-1 показало, что аппарат не обладает вирулицидным действием в отношении вирионов ВПГ-1. Установлено, что воздействие АФ МАГ БИО на свободные вирионы ВПГ-1, не снижает способность последних к репродукции в клеточных культурах. Инфекционные титры ВПГ-1 под воздействием АФ МАГ БИО статистически достоверно не отличались от аналогичных титров вируса в контроле и составили $5,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/0.1 \text{ мл}$ и $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0.1 \text{ мл}$, соответственно. КИ составил 4.2%.

Таким образом, использование аппарата МАГ БИО показало, что в зависимости от схемы применения аппарата подавление репродукции ВПГ-1, шт. «Кл», составило $1,5-3,0 \lg \text{ТЦД}_{50}$, КИ - 25-50%.

Следует отметить, что аппарат МАГ БИО одинаково эффективно подавлял репродукцию не только ВПГ-1 (шт. «Кл»), но и ВПГ-2 в культуре клеток.

При использовании АФ МАГ БИО появление вирусиндуцированного ЦПД в инфицированной ВПГ-2 культуре клеток было отмечено только через 48 часов после

инфицирования, в то время как в контрольных инфицированных культурах – уже через 24 часа после инфицирования, что в свою очередь подтверждалось данными изучения инфекционной активности вируса. Инфекционные титры ВПГ-2, не подвергавшегося воздействию аппарата, через 96 часов после инфицирования достигали $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0.1 \text{ мл}$.

Результаты, представленные в табл.2, свидетельствуют о том, что аппарат способен существенно снижать репродукцию ВПГ-2 в культуре клеток VERO. На фоне воздействия аппарата инфекционные титры ВПГ-2 были на $1,0 - 2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}$ достоверно ниже аналогичных титров у вируса в контрольных пробах, ($p < 0.05$). КИ составлял $16,7 - 41,7\%$.

Наиболее выраженный эффект по отношению к ВПГ-2, также как и в исследованиях с ВПГ-1, был выявлен при использовании аппарата по лечебно-профилактической схеме – за 1 час до- и через 1 час после инфицирования и по лечебной схеме – через 1 час после инфицирования.

Изучение активности АФ МАГ БИО по отношению к свободным вирионам ВПГ-2 показало, что аппарат вирулицидным действием не обладал.

Таким образом, на фоне применения аппарата МАГ БИО подавление репродукции ВПГ-2, шт. «ВН», составило $1,0-2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}$, КИ - $16,7 - 41,7\%$.

Заключение. Аппарат физиотерапевтический МАГ БИО способен уменьшать вирусиндуцированное ЦПД, ингибировать репродукцию тест-вирусов (ВПГ-1/-2), что приводит к статистически значимому снижению их инфекционной активности. Подавление инфекционной активности тест-вирусов зависит от схемы применения аппарата. Показано, что АФ МАГ БИО наиболее эффективно подавляет репродукцию тест-вирусов при использовании по лечебной-профилактической и лечебной схемам применения. Результаты исследований показали, что исследуемый аппарат обладает значимым воздействием в отношении экспериментальной герпесвирусной инфекции, обусловленной ВПГ-1/-2, и может быть использован в медицинской практике – в комплексной терапии вызываемых ими заболеваний.

Таблица 2 – Эффективность аппарата физиотерапевтического МАГ БИО на модели экспериментальной герпесвирусной инфекции, обусловленной ВПГ-1 (штамм «Кл»), ВПГ-2 (штамм «ВН»).

Схема исследования аппарата МАГ БИО	Инфекционные титры вируса					
	ВПГ-1, шт. «Кл»			ВПГ-2, шт. «ВН»		
	Уровень накопления вируса, lg ТЦД ₅₀ /0.1 мл	Подавление репродукции вируса, Δ lg ТЦД ₅₀ ¹	КИ ² , %	Уровень накопления вируса, lg ТЦД ₅₀ /0.1 мл	Подавление репродукции вируса, Δ lg ТЦД ₅₀	КИ, %
-1ч +1ч	3.0±0.2 ⁴	3.0 ³	50.0	3.5±0.2 ⁴	2.5 ³	41.7
+1 ч	3.42±0.2 ⁴	2.58 ³	43.0	4.0±0.2 ⁴	2.0 ³	33.3
-1 ч	4.5±0.3 ⁴	1.5 ³	25.0	5.0±0.4 ⁴	1.0 ³	16.7
Вирулицидное действие	5.75±0.4 ⁴	0.25	4.2	5.5±0.5 ⁴	0.5	8.3
Контроль вируса	6.0±0.5 ⁴	-	-	6.0±0.5 ⁴	-	-

¹ Разность между уровнем накопления вируса в контрольных культурах и в культурах клеток под воздействием аппарата.

² Коэффициент ингибирования. ³ Достоверность по отношению к контролю вируса, p<0.05. ⁴ Средние значения (M±m) по результатам трех независимых опытов.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов *in vitro* по оценке эффективности изделия медицинского назначения- аппарата физиотерапевтического МАГ БИО (ООО «НПО «Свитозар») позволяют сделать следующие выводы:

1. АФ МАГ БИО обладает эффективностью в отношении герпесвирусной инфекции, обусловленной ВПГ-1/-2, *in vitro*.

2. АФ МАГ БИО проявляет более выраженное воздействие в отношении ВПГ-1/-2 при использовании по лечебно-профилактической и лечебной схемам применения.

3. АФ МАГ БИО не обладает вирулицидным действием в отношении свободных вирионов ВПГ-1/-2.

4. АФ МАГ БИО не оказывает цитодеструктивного воздействия на интактные клетки.

5. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения эффективности АФ МАГ БИО.

Литература

- 1 Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей» [под ред. Исакова В.А.]. СПб: СпецЛит. 2013. 256 с.
- 2 Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / [под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова]. М. 2002. 384 с.
- 3 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / [под ред. Р.Ю. Хабриева]. 2-изд., перераб. и доп. М.: «Медицина». 2005. С. 547-549.
- 4 Bacon T.H., Levin M.J., Leary J.J., Sarisky R.T. and Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy / Clinical Microbiology Reviews. 2003. V. 16, N 1. P. 114–128.
- 5 De Clerg E., Descamhs J., Verhelst G. , Walker R.T., Jones A.S., Torrence P.F., Shugar D. Comparitive efficiency of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus / J. Inf. Dis. 1980. V. 141, N 5. P. 563–574.
- 6 Kleymann G. Agents and strategies in development for improved management of herpes simplex virus infection and disease / Expert Opinion on Investigational Drugs. 2005. V. 14, N 2. P. 135–161.
- 7 Kruppenbacher J.P., Klass R. and Eggers H.J. A rapid and reliable assay for testing acyclovir sensitivity of clinical herpes simplex virus isolates independent of virus dose and reading time / Antiviral Res. 1994. V. 23. P. 11–22.
- 8 Neyts J, Snoeck R.,Schols D., Himpens B., De Clercq E. Sensitive, reproducible and convenient fluometric assay for the in vitro evaluation of anti-cytomegalovitus agents / J. virol. methods. 1991. V. 35. P. 27-38.

Зав. лабораторией сравнительной
вирусологии, д.м.н., профессор



И.Ф. Баринский

Ответственный исполнитель:

В.н.с. лаборатории
сравнительной вирусологии, к.м.н.,
доцент



Л.М. Алимбарова