

Министерство здравоохранения России
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
(ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России)

УДК

578.833.26.083.2



УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора ФГБУ НИИ вирусологии
им. Д.И. Ивановского Минздрава России
д.м.н., профессор

П.Г. Дерябин

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

«Изучение противовирусной активности аппарата физиотерапевтического
МАГ БИО в отношении вируса гриппа А человека на экспериментальной
модели *in vitro* и *in vivo*»

(Отчет)

Ответственный исполнитель:
Ведущий научный сотрудник
Кандидат биологических наук

Исаева Е.И.

Москва, 2014 г

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ведущий научный сотрудник
лаборатории
Иммунологии



подпись, дата

Е.И. Исаева
(1.6; 1.6.1; 1.6.3; 2.2)

Научный сотрудник
лаборатории иммунологии



подпись, дата

Е.Н. Притчина
(1.2; 1.5.2; 1.5.3; 1.5.4;
2.1; 1.6.3)

Лаборант-исследователь
лаборатории иммунологии



подпись, дата

Н.Б. Гаврюшина
(1.2; 1.5.2; 1.5.3; 1.5.4;
2.1)

Информационный лист

Заказчик: ООО «Научное производственное объединение «Свитозар»

Исполнитель: ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Минздрава России

Лаборатория иммунологии аттестована для работы с вирусами как потенциально опасным материалом в отношении патогенов III-IV групп опасности для человека Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Лицензия № 77.МУ.02.000.М.000127.08.11 от 05.08.2011 г.). Лаборатория предназначена для выполнения вирусологических и молекулярно-биологических (ПЦР) исследований материала на наличие возбудителей инфекционных болезней с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.2569-09

Дата начала исследования: 10.03.2014 г.

Дата окончания исследования: 30.06.2014 г.

РЕФЕРАТ

Отчет 18 с., 6 табл.

ВИРУС ГРИППА ЧЕЛОВЕКА А(Н3N2), АППАРАТ ФИЗИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ МАГ БИО ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШАХ.

Объект исследования: аппарат физиотерапевтический МАГ БИО. Цель работы – определение эффективности противовирусного влияния аппарата в отношении вируса гриппа человека А на экспериментальной модели.

Методология работы: титрование жизнеспособного вируса гриппа гриппа человека штамм А/Aichi/ 2/68 на перmissive клеточной культуре, определение инфекционного титра вируса адаптированного к легким мышей при заражении мышей для определения дозы вируса для заражения, определение инфекционных титров вируса после применения аппарата, лечебная схема влияния аппарата с заражением мышей вирусом, статистическая обработка результатов с использованием критерия Стьюдента.

Полученные результаты:

На экспериментальной модели гриппозной инфекции у мышей, инфицированных адаптированным к легким мышей штаммом А/Aichi 2/68, выявлена слабая противовирусная активность аппарата «МАГ БИО» при лечебной схеме воздействия. Аппарат снижал инфекционный титр вируса при исследовании *in vitro* на $0,8 \lg \text{TCID}_{50}$ при показателе вирусного контроля $5,0 \lg \text{TCID}_{50}$. Коэффициент ингибирования составлял 9,0. Аппарат обладал слабыми противовирусными свойствами по отношению к вирусу гриппа при экспозиции 60 минут.

Воздействие аппарата «МАГ БИО» в течение 60 минут ежедневно в течение 4 дней на мышей не влияло на показатели в экспериментальных

группах животных и они статистически достоверно не отличались от группы контроля. При экспозиции в течение 60 минут ежедневно в течение 4 дней после инфицирования мышей гибель от вирусной инфекции снижалась на 10 % и коэффициент защиты составил 12,3.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп является одной из приоритетных задач здравоохранения многих стран мира, имеющей важное медико-социальное значение. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), ежегодно в мире болеет гриппом от 3 до 5 млн. человек (MMWR, 2010). В последние годы число официально регистрируемых случаев гриппа и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в РФ не превышало 30 млн. в год, при этом показатели заболеваемости в зависимости от эпидемического сезона составляли 645,7-5220,3 и 15950,3-29632,1 на 100 тыс. населения соответственно. Доказана роль гриппозной инфекции в обострении хронических соматических заболеваний и развитии осложнений, нередко приводящих к летальному исходу. «Дополнительная» смертность от гриппа в период эпидемий в разных возрастных группах колеблется от десятков до сотен случаев, а в период пандемии показатель может достигать 1000 случаев на 100 тыс. населения (MMWR) [3].

Эпидемии гриппа наносят огромный ущерб, как отдельным лицам, так и обществу в целом. По данным Минздрава РФ, в 2009 г. экономические потери от гриппа и ОРВИ составили 82,6 млрд. рублей или 86,0% от всего ущерба, наносимого инфекционными болезнями.

В последние годы существенно изменился эпидемический процесс, для которого стали характерными длительная циркуляция антигенно-родственных вариантов вирусов гриппа.

Вакцинация против вирусов гриппа обеспечивает защитный иммунитет узкой направленности и требует ежегодного обновления штаммов входящих в состав вакцины.

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, вызванным таким штаммом, нет, а из противогриппозных препаратов, существующих в настоящее время, ни один полностью не защищает от заболевания.

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

Цель работы - определение эффективности действия аппарата «МАГ БИО» в отношении вируса гриппа А на экспериментальной модели .

Задачи:

1. Определение действия на вирус в культуре клеток
1. Выбор инфицирующей дозы вируса для мышей.
2. Исследование эффективности аппарата по показателю летальности экспериментальных животных от гриппозной инфекции.
3. Анализ противовирусных свойств по подавлению репродукции вируса гриппа в лёгких лабораторных мышей.

Материалы и методы.

Прибор. Аппарат «МАГ БИО» предоставлен ООО «Научное производственное объединение «Свитозар».

Клетки. В исследовании была использована перевиваемая культура клеток почки собаки МДСК полученная из коллекции культур тканей ФГБУ Института вирусологии им. И.Д. Ивановского Минздрава России.

Вирус. В работе использовали вирус гриппа А A/Aichi 1/68 полученный из Государственной Коллекции вирусов ФГБУ Института вирусологии им. И.Д. Ивановского Минздрава России .

вирусов в культуре клеток. Противовирусный эффект аппарата *in vitro* оценивали по показателям: снижение уровня накопления вируса под воздействием прибора в РГА Δlg и коэффициенту ингибирования (КИ).

Снижение уровня накопления вируса определяли по формуле:

$$A = A_k - A_0$$

A_k – уровень накопления вируса при культивировании без воздействия

A_0 – уровень при культивировании с воздействием

КИ рассчитывали по формуле:

$$КИ = 100 - \left(\frac{A}{A_k} * 100\% \right)$$

Статистическая обработка данных. Статистический анализ результатов проведен с применением ПО Microsoft Excel. Использовались непараметрический критерий Фишера, параметрический t-критерий Стьюдента; различия считали достоверными при $p \leq 0,05$, высоко достоверными при $p < 0,001$, недостоверными при $p > 0,05$.

Расчет инфекционных титров вируса проводили по методу Рида и Менча [Reed, Muench 1938]. За титр вируса принимали то наибольшее разведение супернатанта зараженной культуры, в котором идентифицировала вирус. Титр выражали обратным значением разведения вируса, в котором определяли вирус

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Влияние аппарата на жизнеспособность клеток клеточной линии МДСК.

Первым этапом эксперимента была оценка цитотоксичности аппарата МАГ БИО для клеточной линии МДСК, определяемая по влиянию различного времени воздействия аппарата на морфологию клеток. Результаты представлены табл. 1.

Табл. 1 Влияние различных экспозиций прибора на морфологию клеток линии МДСК.

Экспозиция (минуты)	Процент жизнеспособных клеток
---------------------	-------------------------------

30	100
40	100
60	88
120	20

Более токсичной из исследуемых оказалась экспозиция 120 мин, когда воздействие почти полностью разрушало монослой клеточной линии. Аппарат при экспозиции 60 мин вызывал ЦПЭ 22% клеток линии МДСК. На клетки аппарат не оказывал ЦПЭ при экспозициях 30 и 40 мин, он не вызывал видимых цитодеструктивных изменений в исследуемой клеточной линии.

Результаты исследований активности аппарата МАГ БИО в отношении вируса гриппа приведены в таблице 2. Количественные показатели свидетельствуют об ингибирующем действии на репродукцию гриппа при применении аппарата после инфицирования вирусом при экспозиции в течение 60 мин. Гемагглютинирующий титр вируса снижался в 2,1 раз, при применении аппарата, что статистически достоверно. Экспозиции 30 и 40 мин оказались неэффективными, снижая активность вируса в 1,1-1,5 раза, соответственно..

Аппарат МАГ БИО оказывал ингибирующее действие на репродукцию вируса при исследовании методом ИФА. При экспозиции 60 мин уровень подавления размножения вируса на 24,8% достоверно отличался от значений в контроле без использования аппарата.

Табл. 2 Оценка эффективности аппарата МАГ БИО в отношении вируса гриппа *in vitro*

Исследуемые образцы	Время воздействия	РГА	Подавление репродукции вируса в ИФА (%)
Вирус после воздействия аппарата	30	2,5±0,34	10,8±2,9

	40	1,9±0,2	12,3±7,3
	60	1,35±0,2	24,8±2,9
Контроль вируса без воздействия аппарата	-	2,8±0,17	

Табл. 3 Влияние аппарата на инфекционную активность вируса гриппа Aichi 1/68

Исследуемые образцы	Время воздействия	Инфекционный титр вируса		
		Уровень накопления вируса (lg)	Подавление репродукции и вируса (Δ lg*)	КИ** (%)
Вирус после воздействия аппарата	30	6,1±0,4		
	40	5,8±0,7	0,6±0,2	
	60	4,9±1,0	1,5±0,8	23,5
Контроль вируса без воздействия аппарата		6,4±0,3		

Исследование уровня подавления инфекционной активности вируса гриппа показало, что аппарат МАГ БИО при воздействии в течение 60 мин подавлял размножение вируса на 1,5 lg (КИ 23,5).

Таким образом, установлено, что аппарат МАГ БИО обладает слабой противовирусной активностью в отношении вируса гриппа Aichi 1/68 человека. Действие аппарата проявлялось при применении экспозиции 60 минут.

«Изучение противовирусной активности аппарата МАГ БИО в отношении вируса гриппа А человека на экспериментальной модели *in vivo*»

Материалы и методы

Животные

Вид животных:	Белые мыши б/п
Источник получения:	Питомник «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН
Вес животных к началу исследования:	12-14 г
Количество самцов:	30
Количество самок:	0
Ветеринарное свидетельство:	250 № 0404318

Адаптация и отбор животных для исследования

Лабораторные животные до начала исследования содержались 5 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были.

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки.

Идентификация животных

Маркировка клетки кодировала пол животных, породу, дату введения приборов, название группы.

Содержание животных

Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. N 755).

Для кормления животных использовали экструдированные, полнорационные, экологически чистые, сбалансированные по содержанию питательных веществ, изготовленные без применения консервантов и искусственных красителей на основе высококачественного отечественного сырья корма для лабораторных животных по Госту 3 502.58-92 производства ООО «МСТ».

Животные получали стандартный рацион питания и содержались в равноценных условиях клетках фирмы Venex a.s. (Чехия) на стеллажах VeKo 2-120 согласно профессиональному оборудованию в регламентированных условиях по нормативным документам для вивария. Основные правила по уходу за животными выполняли в соответствии с «Санитарными правилами по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), утвержденных приказом МЗСССР №755 от 12.08.77.

Вирус

Для проведения исследований по летальности животных был использован штамм вируса гриппа A /Aichi/2/68 полученный из ГКВ ФГБУ НИИ вирусологии Минздрава России предварительно адаптированный к ткани легких мышей.

Культура клеток

Исследование инфекционного титра вируса гриппа проводили на перmissiveй клеточной линии MDCK, полученной из Государственной коллекции культур клеток лаборатории культур тканей ФГБУ НИИ вирусологии Минздрава России.

В работе использовали 3-х дневный монослой перевиваемой клеточной линии MDCK выращенный на среде Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), L-глутамина и антибиотиков - 150 ед/мл пенициллина и 150 ед/мл стрептомицина

Дизайн исследования

Для определения эффективности аппарата МАГ БИО в отношении A /Aichi/2/68 на экспериментальной модели *in vivo* вирус предварительно титровали на мышах, затем проводили заражение мышей и облучали аппаратом по лечебной схеме по 60 мин. в течение 4 суток ежедневно. На 3 сутки после инфицирования по 2 мышей из каждой группы забивали и удаляли легкие. В приготовленном гомогенате лёгкого мышей проводили оценку инфекционного титра вируса титрованием легочной суспензии в культуре клеток MDCK. За животными наблюдали в течение 15 дней после

заражения, учитывая гибель мышей от гриппа в группах леченых животных и вирусном контроле (мыши не подвергавшиеся воздействию аппарата).

Приготовление гомогената легочной ткани

Легкое каждой мыши взвешивали, растирали в отдельных фарфоровых ступках со стерильным песком и готовили 10% гомогенат на среде 199. Суспензию легочной ткани центрифугировали при 12000 об/мин 10 мин при 4⁰С на центрифуге «Эппендорф». Надосадочную жидкость пропускали через мембранный фильтр 0,45 мкм и использовали для заражения мышей и определения инфекционного титра.

Определение летальной дозы вируса для заражения животных

Инфекционную активность вируса в заражающем материале определяли в отдельном эксперименте путем титрования летальности на животных при заражении мышей разведениями легочной суспензии $10^{-1} - 10^{-7}$. Летальная доза вируса составила 5,0 lg LD₅₀.

Заражение животных

Животных инфицировали вирусом интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 0,05 мл/мышь. В опыт использовали дозу для заражения 10 LD₅₀, вызывающую 70-80% летальности у мышей.

Изучение противовирусной активности аппарата при экспериментальной гриппозной инфекции у мышей

О способности аппарата оказывать лечебный эффект судили по гибели инфицированных вирусом гриппом мышей в опытных группах по сравнению с группой животных, не облученных аппаратом. По лечебной схеме – через 24 часа после инфицирования мышей.

В качестве плацебо мышам вводили физиологический раствор.

В эксперименте было сформировано 3 группы по 10 мышей в каждой. Животные 1 и 2 групп облучали аппаратом в течение 60 мин ежедневно 4 дня. Мышам группы 3 вводили физиологический раствор (контрольная группа). Мышей групп 1 и 3 заражали вирусом гриппа.

Определение инфекционного титра вируса в легких мышей проводили общепринятым методом путем внесения 10-кратных разведений вирусосодержащей пробы на подготовленный монослой клеток, выращенный на 96-луночных панелях производства Costar (USA). Перед заражением вирусосодержащим материалом клетки культуры МДСК два раза промывали средой без сыворотки для снижения возможной неспецифической реакции. Вирус адсорбировали в течение 1 ч при 35°C, в атмосфере 5% CO₂. Несорбировавшийся вирус отмывали 2 раза по 5 минут средой 199, после чего была добавлена поддерживающая среда с 2% ЭТС. Контроли вируса и культуры клеток культивировали в этой же среде. Далее планшеты инкубировали в термостате с 5% CO₂ в течение 24 часов при 37 °C.

Для каждого разведения изучаемой пробы использовали четыре лунки планшета, для которых вычисляли среднее значение титра вируса. Расчет инфекционного титра вируса проводили по методу Рида и Менча. О способности аппарата оказывать лечебный эффект судили по снижению титра вируса в легких инфицированных вирусом мышей.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов, расчет средних значений и стандартного квадратичного отклонения, проведен с применением ПО Microsoft Excel на персональном компьютере.

Статистическую обработку результатов эффективности прибора в отношении вируса гриппа проводили используя общепринятые методы. Достоверность различий по методу Стьюдента определяли по величине p , сравнивая опытные и контрольные группы мышей; различия считали достоверными при $p \leq 0,05$, высоко достоверными при $p < 0,001$, недостоверными при $p > 0,05$.

Продолжительность жизни опытных и контрольных животных рассчитывали по медико-статистической модели, соответствующей распределению Пуассона с поправкой С. Гарда.

Индекс защиты рассчитывали по формуле:

$$\text{ИЗ \%} = \frac{\text{КЗ}-1}{\text{КЗ}} \times 100 \quad (1)$$

КЗ - кратность защиты

$$\text{КЗ} = \frac{\% \text{ павших в контроле}}{\% \text{ павших в опытной группе}} \quad (2)$$

Ошибку процента рассчитывали по формуле

$$\text{Sp\%} = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}} \quad (3)$$

p –доля вариантов, обладающая данным признаком;

n-объем выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Защитная эффективность при гриппозной вирусной инфекции.

В ходе опыта по определению эффективности аппарата при гриппозной вирусной инфекции у животных случаев неспецифической смертности в контрольной группе интактных животных не зарегистрировано. Проведенные исследования показали, что динамика выживаемости мышей при применении аппарата была аналогичной вирусному контролю. Результаты динамики смертности мышей в опытной и контрольной группах представлены в таблице 4.

Таблица 4. Летальность мышей зараженных вирусом гриппа в процессе эксперимента

Схема действия прибора относительно заражения вирусом	Время экспозиции (мин)	Всего погибло животных в группе (n)	летальность (сутки после заражения/ n)													
			5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
Через 24 часа в течение 4 дней	60	7/10	2	3		2										
мыши зараженные вирусом не подвергавшиеся обработке аппаратом		8/10	2	5	1											

Результаты изучения защитных свойств аппарата приведены в таблице 5.

Таблица 5. Защитная эффективность МАГ БИО в отношении A/Aichi/2/68

Схема действия аппарата относительно заражения вирусом	Время экспозиции (мин)	Всего животных в группе (n)	Общая летальность %	Средняя продолжительность жизни (сутки)	Удлинение срока жизни по сравнению контролем	Индекс защиты (%)
Через 24 часа в течение 4 дней	60	10	70	8,7	+1,4	12,3±1,22
мыши зараженные вирусом не подвергавшиеся обработке аппаратом		10	80	7,3		

В группе мышей, зараженных вирусом гриппа без воздействия прибором, гибель началась на 5 день после заражения, до 8 дня включительно погибло 80,0 % мышей. Средняя продолжительность жизни в группе контроля вируса составила 7,3 суток.

Аппарат МАГ БИО оказывал защитное действие в отношении экспериментальной гриппозной инфекции при лечебной схеме воздействия аппаратом через 24 часа после инфицирования и экспозиции 60 мин. Выживаемость инфицированных мышей при использовании аппарата составила 70,0%. Средняя продолжительность жизни мышей, увеличилась до 8,7 дней, по сравнению с контролем на 1,4 дня, а индекс защиты составил 12,3%. Результаты определения инфекционной активности вируса гриппа в суспензии легких мышей после применения аппарата представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Репродукция вируса гриппа A/Aichi/2/68 в легких мышей.

Схема действия аппарата относительно заражения вирусом	Время воздействия	Инфекционный титр в легких (lg TCID ₅₀)
Через 24 часа в течение 4 дней	60	3,0±0,2
Мыши зараженные вирусом без воздействия аппаратом		3,8±0,4

Инфекционная активность вируса гриппа снижалась на 0,8 lg TCID₅₀ под воздействием прибора на 3-ий день после инфицирования вирусом гриппа. Наивысший инфекционный титр вируса выявлялся у всех мышей в контрольной группе, где аппарат не применялся.

Таким образом, на основании проведенных исследований *in vivo* противовирусные свойства по отношению к вирусу гриппа обнаружены для аппарата МАГ БИО при применении по лечебной схеме и экспозиции 60 мин. Ежедневно в течении 4 дней.