

Министерство здравоохранения России
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
" Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени
почетного академика Н.Ф. Гамалеи"
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России)

УДК
578.833.26.083.2

№ государственной регистрации
Инв. №

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по научной работе
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России
Д.б.н., профессор
А.В. Пронин
« 18 » декабря 2020 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Противовирусные и иммуномодулирующие свойства препаратов ИР-2 и ИР-3 на
экспериментальной модели in vitro

Ответственный исполнитель:
Ведущий научный сотрудник
кандидат биологических наук



Исаева Е.И.

Москва, 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы

Ведущий научный
сотрудник лаборатории
иммунологии, к.б.н.

Исаева

Е. И. Исаева

подпись, дата
18.12.20

Исполнители

Научный сотрудник

Ветрова 18.12.2020

Е.Н. Ветрова

подпись, дата

Лаборант-исследователь

Чернышова 18.12.2020

А.И. Чернышова

подпись, дата

Информационный лист

Исполнитель исследования: ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи"
Минздрава России.

Юридический адрес и фактический адрес: Российская Федерация
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18.

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 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», разработанных ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ВВЕДЕНИЕ

Многие проявления инфекции, вызванные с продукцией интерферонов ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ , ИФН- λ и провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и др. В результате их действия в противовирусный ответ активно вовлекаются Т-лимфоциты, нейтрофилы и другие иммунокомпетентные клетки. В защите организма имеет особое изучение особенностей синтеза цитокинов при экспериментальных инфекциях, которое позволяет получить информацию о воздействии вируса на синтез белков, определяющих защитные функции в условиях организма. Синтез цитокинов, как и других белков, осуществляется в несколько этапов: транскрипция, процессинг мРНК, трансляция процессинг белка и секреция белка. Каждый этап может регулироваться, поэтому важно знать не только уровень продукции цитокина, но и на каком этапе происходит ингибирование или активация его синтеза. Одними из методов определения экспрессии генов цитокинов по уровню их мРНК являются обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). При помощи ОТ-ПЦР возможно подробно изучить альтернативный сплайсинг цитокинов.

Лекарственные препараты с потенциальным иммуномоделирующим воздействием играют важную роль в отношении всех вирусных инфекций.

Целью настоящего исследования была оценка потенциального влияния ИР-2 и ИР-3 на экспрессию генов основных регуляторных цитокинов клеточного иммунитета и определение их противовирусных свойств в отношении бета-коронавируса ОС43.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и оборудование

Оборудование

- Ламинарный бокс биологической безопасности для работы с вирусным материалом II-го класса защиты тип А2 производства фирмы «ESCO», Ю. Корея.
- Термостат-инкубатор CO₂ производства «Sanyo», (Япония).
- Бытовой холодильник «Минск -131», (Беларусь).
- Морозильная камера (-70⁰С) «Sanyo», (Япония).
- Центрифуги типа CM-50 со скоростью вращения ротора 13000 об/мин производства фирмы «Elmi», Латвийская республика г., Рига и Мини центрифуга-вортекс FVL-2400 «НПФ «Biosan», Латвийская республика, г. Рига.
- Ридер «Antos» для учета результатов иммуноферментного анализа методом МТТ.
- ПЦР-ламинар, предназначенный для подготовки реакционных смесей для проведения амплификации, производства «Ламинарные системы», (Россия).
- Программируемый амплификатор для гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации планшетного типа ДТ-32, ДТ-lite производства ЗАО «НПО ДНК-технология», (Россия).
- Программируемый многоканальный амплификатор «Терцик» для проведения ОТ-ПЦР производства ЗАО «НПО ДНК-технология», (Россия).
- Программируемый твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 250С до 100 0С производства ЗАО «НПО ДНК-технология», (Россия).
- Центрифуги типа CM-50 со скоростью вращения ротора 13000 об/мин производства фирмы «Elmi», Латвийская республика г., Рига и Мини центрифуга-вортекс FVL-2400 «НПФ «Biosan», Латвийская республика, г. Рига.

Исследуемые препараты

- ИР-2;

- ИР-3.

Клетки

С целью определения противовирусной активности использовали перевиваемую клеточную линию человека HT-29 (карцинома толстой кишки), T-1387 (Т лимфоциты костного мозга человека) и Molt-4 (Т лейкоциты больного лимфобластической лейкопенией) полученные из Государственной коллекции культур клеток ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" (п/р НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского) Минздрава России.

Вирус

Для проведения исследований был использован авторский штамм коронавируса Cov ГКВ № 2431 (Государственная коллекция вирусов ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" (п/р НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского) Минздрава России.

Вирусосодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из зараженных перевиваемых клеток почки обезьяны Vero. В работе использовали 3-дневный монослой перевиваемой клеточной линии, выращенный на соответствующей среде с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), L-глутамина и антибиотиков - 150 ед/мл пенициллина и 150 ед/мл стрептомицина. Заражение монослоя культур клеток проводили по методике, описанной в работе Davies H.W. с соавт. Множественность инфицирования (МИ) клеточного монослоя составляла 0,1 TCID₅₀/клетку.

В работе использовали 3-дневный монослой перевиваемой клеточной линии, выращенный на соответствующей среде с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), L-глутамина и антибиотиков - 150 ед/мл пенициллина и 150 ед/мл стрептомицина. Заражение монослоя культур клеток проводили по методике, описанной в работе Davies H.W. с соавт.

Определение инфекционного титра вируса

Определение инфекционного титра вируса проводили путем внесения 10-кратных разведений вирусосодержащей пробы (супернатант культуры клеток) на подготовленный монослой клеток, выращенный на 96-луночных панелях производства Costar (USA). Перед заражением вирусосодержащим материалом клетки культуры два раза промывали средой без сыворотки для снижения возможной неспецифической реакции. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Несорбированный вирус отмывали 2 раза по 5 минут средой 199, после чего добавляли поддерживающую среду. Контроли вируса и культуры клеток культивировали в этой же среде. Далее планшеты инкубировали в термостате с 5% CO₂ в течение 48 часов при 37°C.

Титр вируса выражали в lg TCID₅₀/мл. Для каждого разведения изучаемой пробы использовали четыре лунки планшета. Расчет инфекционного титра вируса проводили по методу Рида и Менча.

Определение противовирусной активности препаратов

О способности препаратов оказывать противовирусный эффект судили по снижению титра вируса в зараженных вирусом клетках

Схема применения препаратов – терапевтическая (лечебная) модельная схема. Система оценки противовирусного действия состояла в количественном выражении подавления репродукции вируса, определяемом на клеточной линии.

В качестве критерия противовирусной активности препаратов представлена разница в титрах вируса в контрольной и опытной группах, выраженная в логарифмах - $\Delta \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

В вирусологических исследованиях принято считать удовлетворительным противовирусный эффект при действии лекарственных средств, если $\Delta \lg \text{TCID}_{50} \geq 2,0$

Противовирусный эффект исследуемых лекарственных средств *in vitro* оценивали по показателям:

1. Снижение уровня накопления вируса под воздействием препарата:

$\Delta \lg \text{TCID}_{50}$

Снижение уровня накопления вируса определяли по формуле:

$$A = A_k - A_o$$

где A_k – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду изучаемого препарата ($\lg \text{TCID}_{50}$)

A_o – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду и изучаемого препарата ($\lg \text{TCID}_{50}$)

2. Коэффициент ингибирования (КИ):

Индекс защиты или коэффициент ингибирования в процентах определяли по стандартной формуле:

$$\text{КИ} = [(A_k - A_o) / A_k] \times 100$$

В соответствии с Рекомендациями Фармакологического комитета РФ снижение инфекционного титра вируса на 2,0 lg и КИ 50% - концентрация препарата, при которой защищено 50% клеток от действия вируса (препарат может быть использован для дальнейшей разработки и доклинического исследования на животных, а также возможности его использования в комбинации с другими).

КИ 95 - 100 % соответствует концентрации, вызывающей полную защиту клеток культуры от действия вируса.

Оценка цитотоксичности для используемых клеточных линий

Токсичность исследуемых субстанций оценивали по снижению жизнеспособности клеток исследуемых культур в МТТ-тесте.

Монослой клеток культивировали в присутствии исследуемых субстанций, добавленных в концентрациях, указанных в таблице в течение 72 часов при 37°C. Для каждой субстанции по 4 пробы на каждое. Затем клетки 2 раза промывали соответствующей средой, не содержащей сыворотки, окрашивали добавлением раствора МТТ. После инкубирования в течение 4 часов при 37°C раствор удаляли и экстрагировали из живых окрашенных клеток ДМСО. Оптическую плотность (ОП) определяли при длине волны 595/620 нм. Концентрацию субстанций, при которой оптическая плотность (ОП) была в 2 раза меньше ОП для контрольных клеток при отсутствии

исследуемых субстанций принимали за 50 % цитотоксическую концентрацию (CC₅₀).

Оценка экспрессии мРНК ИНФ α , ИНФ β , ИНФ γ , ИНФ λ , МХа, IL-4, IL-6, IL-8.

Для исследования экспрессии генов ИНФ α , ИНФ β , ИНФ γ , ИНФ λ , МХа, IL-4, IL-6, IL-8 исследования выделены суммарные РНК из клеток с применением набора «Рибо-Сорб» («АмплиСенс», Москва), проведена обратная транскрипция (ОТ) с использованием набора “Reverta-L” (“АмплиСенс”, Москва) с последующей ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) со специфическими праймерами и флуоресцентными зондами, выбранными на основании множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей мРНК указанных цитокинов из базы GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с использованием программного обеспечения VectorNTI, DNASStar и анализа выбранных праймеров с применением комплекса программ www.idtdna.com. Проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени проводили на приборах ДТ-32 и ДТ-48 («ДНК-Технология», Москва). Ct – наблюдаемый пороговый цикл флуоресценции, меньше 40 – положительный результат.

Статистический анализ результатов

Статистический анализ проведен с применением ПО Microsoft Excel.

Расчет инфекционных титров вируса проводили по методу Рида и Менча. Для всех проб считали средние арифметические значения (M) и стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние препарата на цитотоксичность клеток.

Изучение цитотоксичности препаратов было исследовано на 3-х перевиваемых онкогенных линиях человека. В таблице 1 представлены

результаты разведения препаратов, при которых 50% клеток подавляется. Эти разведения будут использоваться в дальнейшей работе.

Таблица 1. Цитотоксичность препаратов для клеточных культур.

Клеточная культура	ИР-2	ИР-3
Т-1387	80	64
Molt-4	40	64
НТ-29	40	64

*примечание – цифры, обратные разведения препаратов.

Противовирусные свойства препаратов.

Исследование возможности препаратов подавлять инфекционную активность бета-коронавируса ОС 43 было проведено на клеточных линиях Т-1387, НТ-29 (таблица 2).

Таблица 2. Противовирусный эффект препаратов в отношении бета-коронавируса.

Клеточная культура	ИР-2			ИР-3		
	lg	Δ lg	КИ, %	lg	Δ lg	КИ, %
Т-1387	2,5	1,5	37,5	4,0	0,0	0,0
НТ-29	2,5	1,5	37,5	4,0	0,0	0,0

На клеточных культурах Т-1387, НТ-29 ИР-2 обладает противовирусной активностью, снижая инфекционный титр бета коронавируса при коэффициенте ингибирования равном 37,5%.

Экспрессия генов цитокинов.

Было исследовано влияние препаратов на продукцию ИНФ α , ИНФ β , ИНФ γ , ИНФ λ , характеризующих Th1 иммунного ответа и МХ α , IL-6, IL-8, являющиеся маркерами для Th2 (таблица 3).

Таблица 3. Экспрессия генов цитокинов на культуре клеток НТ -29.

Экспрессия генов	ИР-2	ИР-3
ИНФ α	25,0	26,0

ИНФβ	25,3	25,9
ИНФγ	-	-
ИНФλ	25,4	-
МХа	26,2	-
IL-4	-	-
IL-6	-	-
IL-8	-	-

Препараты ИР-2, ИР-3 способствуют выработке цитокинов ИНФ α и ИНФ β .

Экспрессия генов ИНФ γ , IL-4, IL-6 и IL-8 цитокинам не выявлена.

Активность препаратов ИР-2 проявлялась в отношении ИНФ λ , МХа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты эксперимента показали, что протестированные образцы ИР-2 и ИР-3 малотоксичны.

Учитывая тот факт, что препарат ИР-2 вызывает экспрессию генов ИНФ α , ИНФ β и ИНФ λ , имеющих важную роль в защите организма от вирусной инфекции (ограничение проникновения инфекции через слизистые покровы, гематоэнцефалический и плацентарный барьеры, нарушение синтеза РНК в клетке), можно сказать, что препараты обладают иммуномодулирующим действием, что безусловно оказывает влияние на поддержание гомеостаза в организме.

Список используемой литературы

Davies H.W., Appleyard G., Cunningham P., et al. The use of continuous cell line for the isolation of influenza virus. Bull/ Wbd. Hlth. JRG 1978, v.56, p.1991-19935.

Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50 % endpoints // Amer. J. Hygiene. – 1938. – V. 27. – P. 493–497.

Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Meth. – 1983. – Vol. 65. – P. 55-63.

Приложение А

- ИР-2 (Цивилин) в 100мл содержится гомо- и гетерогликанов (до 0,05%-0,76%), жирное масло, состоящее из пальмитиновой и стеариновой кислот (до 0,3%), а также ситостерин и стигмостерин (до 0,3%), инулин (до 2%), дубильные и горькие вещества, минеральные соли, витамины групп А, В, Е, аскорбиновая кислота, микроэлементы: калий, (до 5%), фосфор (до 5%), медь, цинк и др., а также заменимые и незаменимые аминокислоты (до 3%), бетаин, аргинин, триптофан, тирозин, лейцин, аспарагин, холин, гемицеллюлоза.

- ИР-3 (Медцивилин) в 100мл содержится гомо- и гетерогликанов (до 0,03%-0,5%), кальциевая и калиевая соли глицирризиновой кислоты (до 10%), флаваноиды (до 4%): кверцитин, рутин, квинквилозит, гиперин, витексин, и др.; эфирные масла (0,04-0,022%), простые сахара (до 12,5%): арабиноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, манноза, рамноза, фруктоза; олигосахариды (сахароза), полисахариды (крахмал, целлюлоза, инулин, пектин(до 2%)); рутин, глицин, витамины (В-1, В-2, Р и РР, К), аскорбиновая кислота, микроэлементы: калий, (до 5%), фосфор (до 5%), медь, цинк и др., а также заменимые и незаменимые аминокислоты, каротиноиды, органические кислоты (яблочная, пентадициновая), дубильные и горькие вещества, этиловый спирт (37%).