

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОГО ЭФФЕКТА ПЕПТИДОСОДЕРЖАЩЕГО ВЕЩЕСТВА И КРЕМНИЙЦИНКСОДЕРЖАЩЕГО ГЛИЦЕРОГИДРОГЕЛЯ

© 2018 г. О. В. Щипачева¹, И. А. Тузанкина¹, А. С. Симбирцев²,
Т. Г. Хонина³, И. А. Мальчиков⁴

¹ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУН Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН,
Екатеринбург, Россия;

⁴ФБУН Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Екатеринбург, Россия

Поступила: 12.05.2018. Принята: 21.06.2018

В работе освещены результаты экспериментальной оценки воздействия пептидосодержащего вещества и кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля на модели гриппозной инфекции. Объекты исследования, белые беспородные мыши, которые в период заражения, интраназально получали вышеописанные вещества по схеме. В итоге, при анализе выживаемости, на начальном этапе, наилучший результат был обнаружен в группе мышей с пептидосодержащим веществом.

Ключевые слова: вирус гриппа, пептид, кремнийцинксодержащий глицерогидрогель

DOI: 10.31857/S102872210002436-4

Адрес: 620049 Екатеринбург, ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Щипачева Ольга Владимировна.
Тел.: +79220283782, 8(343)3740070.

Е-mail: Shchipacheva@ya.ru

Авторы:

Щипачева О. В., заочный аспирант, ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;
Тузанкина И. А., ЗДН РФ, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Симбирцев А. С., научный руководитель ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, Санкт-Петербург, Россия;

Хонина Т. Г., д.х.н., в.н.с. лаборатории органических материалов, Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Мальчиков И. А., руководитель отдела эпидемиологии вирусных инфекций, д.м.н., профессор, Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Екатеринбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования вызвана поиском лекарственных веществ с лечебно-профилактическим действием, направленным на предотвращение гриппозной инфекции и уменьшение

тяжести клинических проявлений при заражении. Периодически человечество подвергается вспышкам гриппозной инфекции. И, как известно, пандемией 1918–1919 гг. были унесены десятки миллионов человеческих жизней. Последующие эпидемии гриппа тоже не обходились без случаев летальных исходов. В период с 1919 г. и до настоящего времени, для профилактики и лечения гриппа были разработаны как специфические вакцины, так и противовирусные и иммуномодулирующие препараты. Но высокая способность вируса гриппа к мутациям в геноме, перекрестные мутации с вирусами гриппа птиц и свиней, позволяют им сохранять высокую патогенность. Исходя из этого, помимо противогриппозных вакцин, в арсенале защиты и профилактики важно иметь препараты, направленные на усиление собственных иммунных свойств макроорганизма. В настоящее время, исследования и поиск эффективных средств противoinфекционной защиты продолжаются [3, 4].

В нашей работе проведено исследование противовирусной активности пептида «In-58»

и кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля в отношении вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) при интраназальном способе введения лабораторным животным (беспородные белые мыши). Проведенные исследования показали, что анализируемый эффект пептида и кремнийцинксодержащий глицерогидрогель мог расцениваться как отчетливое противовирусное действие в экспериментальном тестировании в отношении вируса гриппа А/H1N1 у лабораторных мышей.

Цель исследования – выявить эффективность и дать сравнительную оценку применения пептида «In-58» и кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля в исследуемых и контрольной группах, в предложенной дозе, при гриппозной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эталонный вирус. В нашем экспериментальном исследовании был использован эталонный штамм вируса гриппа А/H1N1 (штамм А/PR8/34), полученный из Государственного Контрольного Института им. Л. А. Тарасевича, адаптированный к белым мышам. Вирус пассировали на 7–8 дневных куриных эмбрионах. В работе использовали вируссодержащую жидкость с инфекционным титром $7,0 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,2 \text{ мл}$. Гемагглютинирующий титр в реакции гемагглютинации составлял 1:1024.

Для определения дозы заражения $DL_{50} = 90$ в предварительный опыт было взяты белые беспородные лабораторные мыши, из них были сформированы 2 группы. Мышам из первой группы ($n=8$) вводили интраназально вирус гриппа в разведении 1:10, мышам из второй ($n=8$) – в разведении 1:100. В эксперименте использовали дозировку вируса 1:100.

Исследуемые фармакологические композиции и тестируемые препараты. Использованы: 1. Жидкая суспензия кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля (КЦГ) [5, 6, 7], с разведением физ. раствором 0,9% в соотношении 1:1, полученная из института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН, в дозе 0,05 мл для каждой мыши. 2. Пептид «In-58», полученный из Санкт Петербургского НИИ особо чистых биопрепаратов, в дозе 200 мкг/мкл для каждой мыши.

Лабораторные животные. Для проведения экспериментальных исследований по оценке наличия противовирусного эффекта в предложенной дозе испытуемых веществ было использовано 30 беспородных белых мышей, которых получа-

ли из питомника-вивария при Екатеринбургском Медицинском Научном Центре профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий г. Екатеринбурга. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария. Перед использованием в эксперименте животные проходили двухнедельный карантин и адаптацию в условиях данного вивария. Все исследования выполнялись в соответствии с правилами проведения работ по использованию экспериментальных животных (GLP), приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.03 г.

Для моделирования гриппозной инфекции были сформированы следующие группы:

– группа А (группа сравнения) ($n=10$), мышей массой 20–22 г, под эфирным наркозом, интраназально инфицировали аллантоисной жидкостью содержащей вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1) по 0,05 мл.

– группа В ($n=10$), мышам массой 20–22 г, под эфирным наркозом, предварительно интраназально вводили КЦГ по 0,05 мл, с разведением физиологическим раствором NaCl 0,9% в соотношении 1:1, на следующие сутки, под эфирным наркозом интраназально инфицировали аллантоисной жидкостью по 0,05 мл, содержащей вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Затем ежедневно в течение 2-х недель, интраназально закапывали КЦГ в той же дозе.

– группа С ($n=10$), мышам массой 20–22 г, интраназально вводили 200 мкг/мкл пептида In-58, на следующие сутки, под эфирным наркозом интраназально инфицировали аллантоисной жидкостью по 0,05 мл, содержащей вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Затем ежедневно в течение 2-х недель, интраназально закапывали In-58 в той же дозе.

Для интраназального введения веществ было применено приспособление для фиксации головы животного, что позволяло достичь более точного попадания растворов на слизистые оболочки носовой полости.

Оценка токсичности и развития клинических проявлений инфекции у лабораторных животных.

Общая продолжительность наблюдения за животными составляла 14 дней. В процессе наблюдения фиксировали общее состояние, особенности поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, частоту и глубину дыхательных движений, потребление корма и воды, изменение массы тела. Регистрировали сроки развития интоксикации и гибели животных.

Таблица. Показатели выживаемости лабораторных животных, инфицированных вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1), в исследуемых группах

Показатель	А группа сравнения	В КЦГ интраназально	С In-58 интраназально
Выживаемость, %	10,0	40,0	60,0
Логранговый критерий S(t) / уровень <i>p</i>		1,449/ 0,147	2,183/ 0,029
Критерий Кокса-Ментела S(t) / уровень <i>p</i>		-1,450/ 0,147	-2,205/ 0,027

Примечание: Логранговый критерий – непараметрический критерий, используемый для сравнения двух кривых выживаемости. Процедура Каплана-Мейера или процедура выживания оценивает функцию выживаемости. *P* – уровень значимости, достоверности отличий анализируемых параметров. КЦГ – кремнийцинксодержащий глицерогидрогель.

Для статистического анализа полученных результатов использовали логранговый критерий в анализе выживаемости с оценкой вероятности летального исхода от времени S(t) [1,2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе сравнения (А), при экспериментальной гриппозной инфекции, выраженную клиническую картину наблюдали на 5-й день в виде нарушения координации движений, потери 1/5 массы тела от первоначального веса, заторможенности движений. Затем у мышей развилось поражение легких, были слышны хрипы, крепитация, в результате с 5 по 14-й день, 90% мышей из этой группы погибло.

В группе В, которой вводили интраназально КЦГ, выраженную клиническую картину заболевания, типичную для гриппозной инфекции, регистрировали на 7-й день. Отмечали появление

вялости и пассивности в поведении, развитие поражения легких. С 9-го дня наблюдения и до 14 дня, 60% из этой группы мышей погибло.

В группе С, которой вводили пептид In-58 интраназально, активный образ жизни мышей сохранялся до 7-го дня наблюдения. Затем у пяти мышей на 8-й день наступило ухудшение состояния здоровья и две погибли, на следующий день погибли еще две. Таким образом, с 9-го по 14-й день, летальность в этой группе составила 40% (Рис. 1).

Статистический анализ выживаемости лабораторных мышей с использованием статистического логрангового критерия и критерия Кокса-Ментела, при сопоставлении групп животных В и С (получавших препараты) с группой сравнения, не выявил явных статистически значимых отличий выживаемости животных в этих группах. Однако, следует отметить, что уровень значимости *p* группы С (применение пептида In-58) наиболее близок к критическому уровню значимости $p_{\text{крит}}$. (0,027 и 0,029 соответственно). Очевидно, ежедневное применение пептида In-58 приводило к значительному повышению выживаемости мышей после заражения вирусом гриппа.

ВЫВОДЫ

Таким образом, по результатам проведенных экспериментальных исследований, можно сделать вывод о том, что пептид «In58», обладал более выраженным защитным действием по сравнению с группой кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля в отношении вируса гриппа. В то же время защитное действие КЦГ также было отмечено, что требует проведения дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УРО РАН (тема № АААА-А18–118020590108–7).

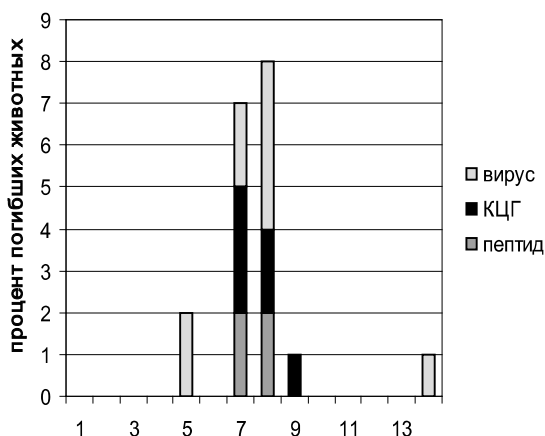


Рис. 1. Динамика гибели экспериментальных животных после инфицирования вирусом гриппа в процентах. КЦГ – группа с кремнийцинксодержащим глицерогидрогелем, пептид – группа с пептидом In-58. Вирус – группа сравнения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Гланс С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1999, 459. [*Glans S. Medical and biological statistics. M., Practice, 1999, 459, Russian*].
2. Гржибовский А. Н. Анализ трех и более независимых групп количественных данных. Экология человека, 2008, 3, 50–58. [*Grgibovsky A. N. Analysis of three or more independent groups of quantitative data. Human ecology, 2008, 3, 50–58, Russian*].
3. Д. Х. Хунафина, А. Т. Галиева, Л. Р. Шайхуллина. Грипп типа А/Н1N1 (свиной грипп). Обзор литературы. Медицинский вестник Башкартостана, 2009, Т. 4 (4), 71–74. [*D. H. Hunafina, A. T. Galieva, L. R. Shaikhullina. Influenza type A/H1N1 (swine flu). Literature review. Medical Bulletin of Bashkortostan, 2009, Vol. 4 (4), 71–74, Russian*].
4. Тузанкина И. А., К вопросу диагностики иммунопатологии. Лекция для врачей. Медицинская иммунология, 2010, Т. 12, № 6, 485–496. [*Tuzankina I. A. Diagnosis of immune pathologies. Lecture for doctors, Medical immunology, 2010, Vol. 12, № 6, 485–496, Russian*].
5. Штанько И. Н., Хонина Т. Г., Бондарев А. Н. и др. Кремнийцинксодержащий глицерогидрогель, обладающий ранозаживляющей, регенерирующей и антибактериальной активностью, Пат. РФ № 2520969, 2014, Бюл. № 18. [*Shtanko N. I., Khonina T. G., Bondarev A. N. etc. Silicon-zinc-glycerol hydrogel having wound healing, regenerative and antibacterial activity, Pat. RF № 2520969, 2014, Byul. No. 18, Russian*].
6. Штанько И. Н., Ваневская Е. А., Мандра Ю. В. и др. Кремнийцинксодержащий глицерогидрогель – потенциальный иммуотропный препарат топического применения. Российский иммунологический журнал, 2015, 9(18), 2(1), 514–516. [*Shtanko N. I., Vaneska E. A., Mandra Yu. V. etc. Silicon-zinc-glycerol hydrogel potential immunotropic drug is topical application. Russian journal of immunology, 2015, 9(18), 2(1), 514–516, Russia*].
7. Хонина Т. Г., Иваненко М. В., Чупахин О. Н., Сафронов А. П., Богданов Е. А., Карабаналов М. С., Пермикин В. В., Ларонов Л. П., Дроздова Л. И. Кремнийцинксодержащий глицерогидрогель, потенциальный иммуотропный препарат для топического применения, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 107, 197–202.

**EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF THE ANTIVIRAL EFFECT PEPTIDE
OF THE CONTAINING SUBSTANCE WITH SILICON ZINC
GLITSEROGIDROGEL'S MAINTENANCES**

© 2018 O. V. Shchipacheva¹, I. A. Tuzankina¹, A. S. Simbirtsev²,
T. G. Honina³, I. A. Malchikov⁴

¹*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russia;*

²*Federal state unitary enterprise "State research Institute of high-purity biological products" of the Federal medical biological Agency, St. Petersburg, Russia;*

³*Federal state budgetary institution of science Institute of organic synthesis of I. Ya. Postovskogo URO RAS, Yekaterinburg, Russia;*

⁴*Federal budgetary institution of science Ekaterinburg scientific research institute of viral infections of Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, Yekaterinburg, Russia*

Received: 12.05.2018. **Accepted:** 21.06.2018

In work results of an experimental assessment of influence of peptid the containing substance and silicium and tsink the containing glicerogel on model of an influenzal infection are covered. Objects of research, white not purebred mice who in the period of infection, intranasalno received the above described substances according to the scheme. As a result, in the analysis of survival, at the initial stage, the best result was found in group of mice with peptid the containing substance.

Key words: flu virus, peptide, silicium and tsink the containing glicerogel

Authors:

Shchipacheva O. V., ✉ correspondence graduate student, Institute of Immunology and Physiology URO RAS, Yekaterinburg, Russia; 620049 Yekaterinburg, Institute of Immunology and Physiology URO RAS. Phone: +79220283782. **E-mail:** Shchipacheva@ya.ru;

Tuzankina I. A., ZDN Russian Federation, MD, professor, chief researcher Institute of Immunology and Physiology URO RAS, Yekaterinburg, Russia;

Simbircev A. S., research supervisor of Federal state unitary enterprise "State research Institute of high-purity biological products" of the Federal medical biological Agency of Russia, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, MD, professor, St. Petersburg, Russia;

Honina T. G., Doctor of Chemical Sciences, Lead Research Associate laboratoriya of organic materials, Institute of organic synthesis of I. Ya. Postovskogo URO RASN, Yekaterinburg, Russia;

Malchikov I. A., head of department of epidemiology of viral infections, MD, professor, Ekaterinburg scientific research institute of viral infections of Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, Yekaterinburg, Russia.