Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
(ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА)

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора
_____ Р.А. Максютов
«_15_» _марта_ 2021 г.

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по теме:

«Оценка противовирусного действия препарата Мезофульвик»

(Договор от 01.12.2020 №04/01/21)

Заместитель генерального директора
по научной работе, д.б.н. _____ А.П. Агафонов

Кольцово 2021 г.

Список исполнителей

В. н. с. отд. молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, к.б.н. _____ В.А. Святченко

Зав. лабораторией отд. профилактики и лечения особо опасных инфекций _____ Н.И. Бормотов

Исследование противовирусной активности предоставленных образцов экстракций и соединений (группа Мезофульвик) против вируса гриппа А и вируса Sars-CoV-2 *in vitro*

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали:

- вирус гриппа штамм A/California/07/2009 (H1N1), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора;
- вирус SARS-CoV-2, выделенный в 2020 году в ГНЦ ВБ «Вектор» из клинического образца инфицированного новым коронавирусом пациента. Культуральный штамм вируса SARS-CoV-2 был получен в результате инфицирования высоко чувствительной к коронавирусам клеточной культуры Vero E6 [1].

Подлинность используемых вирусных штаммов вирусов гриппа и SARS-CoV-2 были подтверждены ПЦР-анализом и полногенмным секвенированием. Вируссодержащие культуральные жидкости очищали и концентрировали центрифугированием в ячейке с отсекающим фильтром VivaSpin-20 centrifugal filter unit (100 кДа) (Sartorius, США).

Клеточные культуры. Для культивирования вируса гриппа и вируса SARS-CoV-2 использовали культуру клеток MDCK (клетки почки собаки) и Vero E6 (клетки почки зеленой мартышки), полученные из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки культивировали в 96-луночных культуральных планшетах до формирования полного монослоя в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телят, 40 ед./мл гентамицина сульфата и 2,5 ед./мл амфотерицина В. Суспензии клеток MDCK и Vero E6 вносили в лунки 96-луночных планшетов в объёме 100 мкл с концентрацией 10^5 кл./мл среды. После получения монослоя клеток питательную среду из лунок планшетов удаляли

и заменяли на равное количество поддерживающей среды без сыворотки, с добавлением 2,5 % BSA и 10 мкг/мл ТРСК трипсина.

Проведение исследования и результаты. С целью определения антивирусной активности исследуемых препаратов монослои клеток MDCK и Vero E6, выращенные на 96-луночных планшетах, инокулировали 3-кратными разведениями исследуемых образцов экстракций и соединений (группа Мезофульвик) в диапазоне концентраций 200 - 0,27 мкг/мл в культуральной среде. Были проведены 2 независимых эксперимента, в первой постановке образцы исходно растворяли в культуральной поддерживающей среде – была отмечена неполная растворимость некоторых образцов, во второй в DMSO; 20 мг/мл. Непосредственно после чего соответствующие клетки инфицировали одинаковой дозой вируса гриппа А, либо SARS-CoV-2 (из расфасованного замороженного стока) 10^3 $ТЦД_{50}$/лунку (кроме контроля клеток и клеточных монослоев для определения возможной цитотоксичности образцов) по 3 лунки на одно разведение исследуемого образца экстракций и соединений (группа Мезофульвик). В скрининге противовирусной активности препаратов использовали вирусы гриппа и SARS-CoV-2 в дозах, вызывающих 100%-ный цитопатический эффект в лунках с монослоем клеток. Вирусы культивировали на монослое клеток в присутствии испытуемых соединений в течение 3 суток. По истечении этого срока в питательную среду добавляли раствор витального красителя (в тестах активности против вируса гриппа нейтральный красный [2, 3], в тестах активности против SARS-CoV-2 – МТТ [4, 5]).

После окрашивания клеток питательную среду удаляли из лунок планшетов и лунки двукратно промывали физиологическим раствором для удаления непоглощённых красителей. В промытые лунки вносили лизирующий раствор: 0,01 М однозамещённый фосфорнокислый аммоний pH 3,5 (50 %) и этиловый спирт (50 %) при окрашивании нейтральным красным [2, 3] или ДМСО [5] – при окрашивании МТТ. По интенсивности

полученной окраски – оптической плотности (ОП) судили о количестве жизнеспособных клеток в лунке, которое позволяет оценить токсичность и противовирусную активность испытуемых соединений. Измерение ОП производили на планшетном ридере E-max фирмы Molecular Devices (США) при длине волны 490 нм (при тестировании активности в отношении вируса гриппа) и 540 нм (при тестировании активности в отношении вируса SARS-CoV-2). При помощи компьютерной программы SoftMaxPro-4.0 по показателям ОП рассчитывали 50%-ную цитоксическую концентрацию (CC_{50}, в мкг/мл) и 50%-ную ингибирующую концентрацию (IC_{50}, в мкг/мл) испытуемых соединений. Показатель CC_{50} – это концентрация исследуемого вещества в питательной среде, при которой разрушаются (теряют жизнеспособность) 50 % клеток в неинфицированном монослое. Показатель IC_{50} – это концентрация исследуемого вещества из экстракций или соединений (группа Мезофульвик) в питательной среде, при которой не разрушаются (остаются жизнеспособными) 50 % клеток инфицированного вирусом монослоя.

Результаты исследования противовирусной активности испытуемых образцов *in vitro* в отношении вируса гриппа А и SARS-CoV-2, а также определения их возможной цитотоксичности представлены в таблице. Как видно из представленных результатов ряд образцов проявил достаточно выраженную активность против вируса гриппа А. Эти образцы ингибируют репликацию вируса *in vitro* в концентрациях нескольких микрограмм на миллилитр; IC_{50} для образцов F-3, Род-1, F-5 и 31 составили 2,10±0,75, 4.97±1,43, 4.17±1,25 и 8.43±2,78 мкг/мл, соответственно. Индексы селективности (отношение CC_{50}к IC_{50}) составляют >50, >20, >23 и >10, соответственно. Несколько образцов экстракций и соединений (группа Мезофульвик) показали меньшую активность в отношении вируса гриппа А, так IC_{50} для В-1, Л-1 и Экр равнялись 24,19, 31,65 и 22,36 мкг/мл, соответственно.

Отобранные на первом этапе 13 из 29 образцов, которые включали все наиболее активные против вируса гриппа А соединения, были тестированы на потенциальную противовирусную активность в отношении вируса SARS-CoV-2. Для 4 из них показана способность ингибировать репликацию SARS-CoV-2 в клеточной культуре Vero E6. Значение IC_{50} для образцов экстракций и соединений (группа Мезофульвик) F-3, F-5, B-1 и Ч-1 показали противовирусную активность в отношении вируса SARS-CoV-2, однако абсолютные значения были не столь высоки как для вируса гриппа А и находились в диапозоне 24,32 – 50,78; 33,02 – 67,28; 56,86 – 109,72 и 62,67 – 124,17 мкг/мл, соответственно. Следует отметить, что образцы F-3 и Ч-1 токсичны для клеток Vero E6 в концентрации 200 мкг/мл. Это свидетельствует о том, что данные соединения способны проявлять определенный уровень противовирусной активности в отношении SARS-CoV-2 лишь в концентрациях близких к цитотоксическим.

Таблица

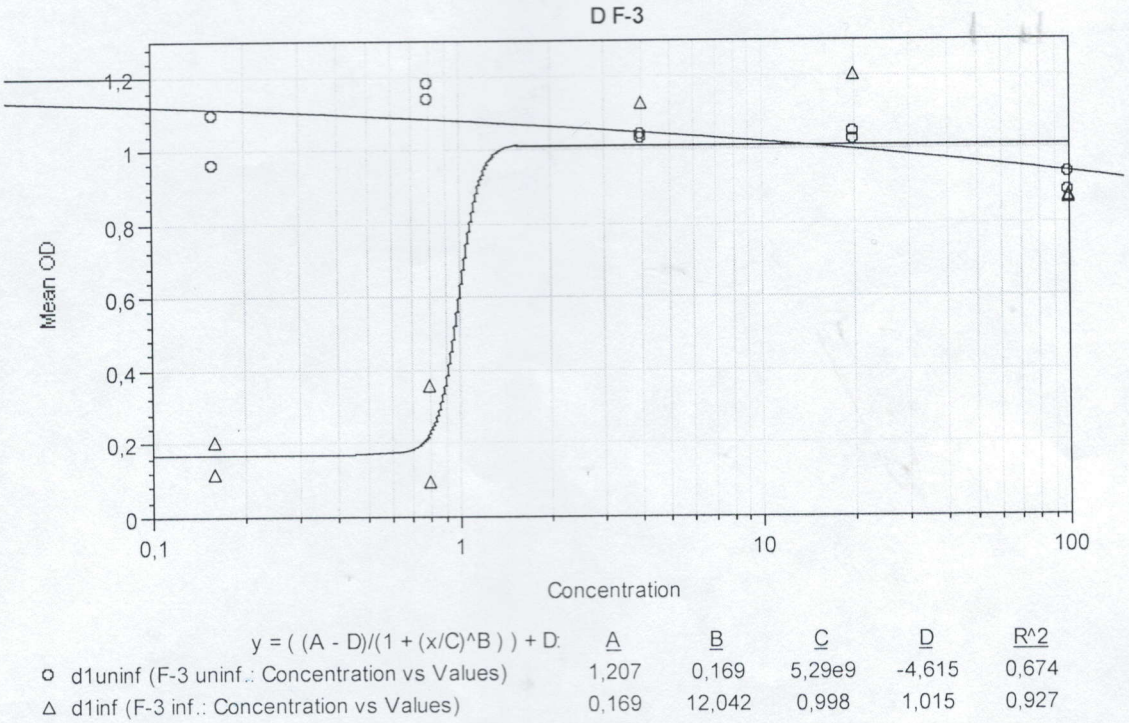
Противовирусная активность по результатам скрининга препаратов против вируса гриппа AH1N1 и SARS-CoV-2 на культурах клеток MDCK иVeroE6, соответственно

No	**Препарат**	**Вирус гриппа А H1N1** (токсичность препарата для клеток MDCK – CC_{50} и противовирусная активность – IC_{50})		**Коронавирус SARS-CoV-2** (токсичность препарата для клеток VeroE6 – CC_{50} и противовирусная активность – IC_{50})	
		CC_{50} мкг/мл	**IC_{50} мкг/мл**	**CC_{50} мкг/мл**	**IC_{50} мкг/мл**
1	F-3	>100	2,10±0,75	200±55	37,55±13,23
2	Род-1	>100	4.97±1,43	200±55	NA
3	Ш-1	>100	70,8±25,13	200±55	NA
4	Век	>100	75,92±26,57	>100	NA
5	Р-1	>100	NA	NT	NT
6	Ло-1	>100	NA	NT	NT
7	П-1	>100	NA	NT	NT
8	Х-1	8.68±3,13	NA	NT	NT
9	Т-1	>100	NA	NT	NT

10	Э-1	>100	NA	200±55	NA
11	М-1	17.86±4,55	NA	66,62±22,16	NA
12	Од-1	>100	NA	NT	NT
13	Б-1	>100	NA	NT	NT
14	О-1	90	NA	NT	NT
15	43	>100	NA	NT	NT
16	F-5	>100	4.17±1,25	>100	50,15±17,13
17	8	>100	NA	NT	NT
18	31	>100	8.43±2,78	NT	NT
19	М-2	>100	NA	NT	NT
20	Ней	>100	NA	NT	NT
21	Ос-1	>100	67,08±22,15	NT	NT
22	В-1	>100	24,19±7,05	>200	83,30±26,45
23	Л-1	>100	31,65±9,55	>200	NA
24	Г-1	>100	NA	NT	NT
25	F-4	>100	75,15±24,23	>100	NA
26	Экр	>100	22,36±6,83	>100	NA
27	Сирт	>100	NA	NT	NT
28	Д1	NT	NT	>100	NA
29	Ч-1	NT	NT	200±55	93,42±30,75

Примечания: NA – отсутствие активности в концентрации 100 мкг/мл и меньших (для образцов обладающих цитотоксичностью - отсутствие активности в концентрации в 3 раза меньшей чем цитотоксическая); NT – не тестировано.

Для соединения F3 из образцов экстракций и соединений (группа Мезофульвик), показавшего лучший результат по активности в отношении вируса гриппа А, был более точно определен показатель IC_{50}, он составил 0,998 мкг/мл, а индекс селективности превысил значение 100 (см. Рис).



y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D	A	B	C	D	R^2
○ d1uninf (F-3 uninf.: Concentration vs Values)	1,207	0,169	5,29e9	-4,615	0,674
△ d1inf (F-3 inf.: Concentration vs Values)	0,169	12,042	0,998	1,015	0,927

Рис. Определение активности образца F3 в отношении вируса гриппа А

Заключение. При исследовании противовирусной активности испытуемых образцов в отношении вируса гриппа А показано, что соединения F-3, Род-1, F-5, 31 достаточно эффективно ингибируют репликацию вируса в инфицированных клетках (IC_{50} – 2,10±0,75, 4,97±1,43, 4,17±1,25, 8,43±2,78 мкг/мл, соответственно). Тестирование образцов в отношении вируса SARS-CoV-2 выявило менее высокую чем для вируса гриппа А вирусингибирующую активность соединений F-3, F-5, В-1 и Ч-1 (IC_{50} – 37,55±13,23, 50,15±17,13, 83,30±26,45 и 93,42±30,75 мкг/мл, соответственно).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. SvyatchenkoV.A., Nikonov S.D., Mayorov A.P. et al. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 33, (2021), 102112, (1-5) https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102112
2. Методические указания МУК 4.2.2136 – 06. Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высоковирулентными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей.
3. WHO. Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2002
4. Кирилюк И.А., Святченко В.А., Морозов Д.А. и соавт. Цитотоксичность нитроксильных радикалов в отношении опухолевых и диплоидных клеток человека in vitro и оценка их противовирусной активности. Антибиотики и химиотерапия, 2012, т. 57, №1-2, с. 3-12.
5. Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. J Immunol Methods. 1990, 130:149-151.