

**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека**

УДК: 61.615.035.1- 001.891.57

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера

А.А. Тотолян

«05» *ноября* 2020 г.

М. П.

*Изучение бактерицидной и вирулицидной активности
ион-металлических ионных композитов*

Отчет о НИР

Руководитель
исследований, д.б.н.

В.В. Зарубаев
В.В. Зарубаев

подпись, дата

Санкт-Петербург
2020

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	3
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	4
2.1. Исследуемые препараты	4
2.2. Вирусы	4
2.3. Дизайн исследования и регулирующие стандарты.	4
2.4. Животные	4
2.4.1. Содержание животных	5
2.4.2. Карантин	6
2.4.3. Эвтаназия	6
2.5. Оценка протективной активности аэрозоля ион-металлических композитов в опытах <i>in vivo</i>	6
2.6. Статистическая обработка результатов.	7
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	8
3.1. Изучение динамики веса животных в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии	8
3.2. Изучение влияния ион-металлических композитов на развитие постгриппозных поражений легких у животных	9
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	10

1. ВВЕДЕНИЕ

Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности применения, постоянно действующего непрерывно генерируемого и поддерживаемого в ходе эксперимента защитного аэрозольного облака на базе водных ион-металлических композитов как средства профилактики и лечения гриппозной инфекции у лабораторных животных. В задачи работы входило моделирование нелетальной гриппозной инфекции у белых мышей, а также оценка протективной активности разработанных ООО «Нью-Лайн» г. Санкт-Петербург патопротекторов на основе ион-металлических композитов при аэрозольном применении методом формирования в контролируемом объеме постоянно действующих защитных облаков, допускающих длительное безопасное пребывание, на модели гриппозной пневмонии у животных.

Также оценивалась переносимость животными максимально допустимых по технологии доз препаратов и производилась оценка переносимости сверхвысоких экспериментальных доз.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исследуемые препараты.

В работе использовали растворы ион-металлических композитов ВАХ-50, разработанных компанией ООО «Нью Лайн», г. Санкт-Петербург и предоставленные Заказчиком. Растворы распыляли при помощи небулайзеров, предоставленных Заказчиком, согласно рекомендованным им методикам применения, дозировкам и технологическим режимам.

2.2. Вирусы.

В исследовании использовали вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера:

Вирус накапливали в аллантоисной полости 8-10-дневных куриных эмбрионов и использовали в дальнейших экспериментах.

2.3. Дизайн исследования и регулирующие стандарты.

Исследования выполняли в соответствии со следующими документами «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010 г.) и «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» Часть первая//под ред. А.Н. Миронова (2012). Исследования осуществляли согласно техническому заданию, утвержденному в договоре. Дизайн и организация исследования были направлены на решение поставленной цели и базировались на общих принципах проведения исследований по оценке противовирусной активности лекарственных препаратов.

2.4. Животные.

Белых половозрелых мышей (самки) линии Balb/c массой 16-18 г (возраст 5-6 недель) общим числом 150 особей получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская область, Россия).

Информация о группе эксперимента была размещена на передней поверхности клеток и включала дату начала эксперимента, дату инфицирования, название и режим введения изучаемого препарата.

2.4.1. Содержание животных

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

В период акклиматизации (5 дней) и эксперимента мыши были размещены в поликарбонатных клетках (BENEX а.с., Чешская республика, тип ТЗА, S=1200 см²) барьера открытого типа группами по 15 особей, на подстиле из опилок. Клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Площадь пола в клетке содержания для одного животного составила 80 см² (минимально допустимая площадь 40 см²).

Корм для содержания лабораторных животных, рецепт № ПК-120-2_173000 «Лабораторкорм» (Москва), приготовленный по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г., давали *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Животные получали воду, очищенную и нормированную по органолептическим свойствам, по показателям pH, сухого остатка, восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов и нитритов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов на основании ГОСТ 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества». Вода в стандартных поилках со стальными крышками-носиками, давалась *ad libitum*. В качестве подстилки использовали древесные гранулы (ООО «ИП Кострюкова», Москва, Россия).

Микробиологический контроль подстилки и воды не проводился.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (согласно СанПину 20-26°C и относительной влажности воздуха 50-70%). Устанавливался режим вытяжной вентиляции, обеспечивающий около

15 объемов помещения в час. Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Мыши содержались в условиях естественного освещения. Никаких существенных отклонений указанных параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не произошло.

2.4.2. Карантин

Мыши были адаптированы в виварии в отдельной комнате в течение 5 дней до начала эксперимента. Во время этого периода осуществлялся ежедневный осмотр внешнего состояния животных и клинический осмотр до рандомизации.

В ходе осмотра не было обнаружено животных с отклонениями, не позволяющими включить их в эксперимент.

2.4.3. Эвтаназия

Эвтаназия (безболезненное умерщвление животного) производилось ответственным лицом в соответствии с требованиями, принятыми в институте, путем цервикальной дислокации. Эвтаназия осуществлялась своевременно по окончании экспериментов, без причинения страданий, в помещении, где не содержатся другие животные. Уборка трупов мышей производилась только после того, как смерть была констатирована ответственным лицом.

В случае преждевременной гибели животных производился их визуальный осмотр с определением возможных причин гибели.

2.5. Оценка протективной активности аэрозоля ион-металлических композитов в опытах *in vivo*.

Лабораторных животных (белые мыши линии Balb/c, самки, возраст 6-8 недель) разделяли на 4 группы по 15 животных в группе. Животных содержали в атмосфере изучаемого аэрозоля в минимальной дозе соответствующей предполагаемой номинальной профилактической дозе при практической реализации технологии (группа 1), средней, соответствующей максимально возможной технологической, дозе (группа 2) и максимальной дозе, соответствующей сверхвысокой экспериментальной для целей определения граничных условий применимости метода (группа 3). Животные

контрольной группы (группа 0) содержались в стандартной атмосфере, без аэрозоля.

Через 2 суток после начала обработки непрерывно генерируемом небулайзерами аэрозолем мышей в группах 0, 1 и 3 заражали интраназально под легким эфирным наркозом вирусом в дозе 3×10^2 TCID₅₀ на мышь в объеме 30 мкл. Обработку аэрозолем продолжали в течение 5 суток после инфицирования. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали вес и смертность животных в каждой группе опыта. На 15 сутки после заражения животных умерщвляли при помощи цервикальной дислокации, вскрывали и изолировали легкие. Визуально оценивали размер очагов постгриппозной пневмонии, который выражали в процентах от общей поверхности легких.

2.6. Статистическая обработка результатов.

Полученные данные обрабатывали при помощи программы Microsoft Excel. Результаты представляли в виде $M \pm SD$. Сравнения между группами проводили при помощи критерия Стьюдента. Достоверными считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Изучение динамики веса животных в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии

Для оценки влияния аэрозоля ион-металлических композитов на динамику веса животных в ходе гриппозной инфекции был проведен мониторинг массы тела животных в течение 8 суток после инфицирования. Результаты суммированы на рис.1.

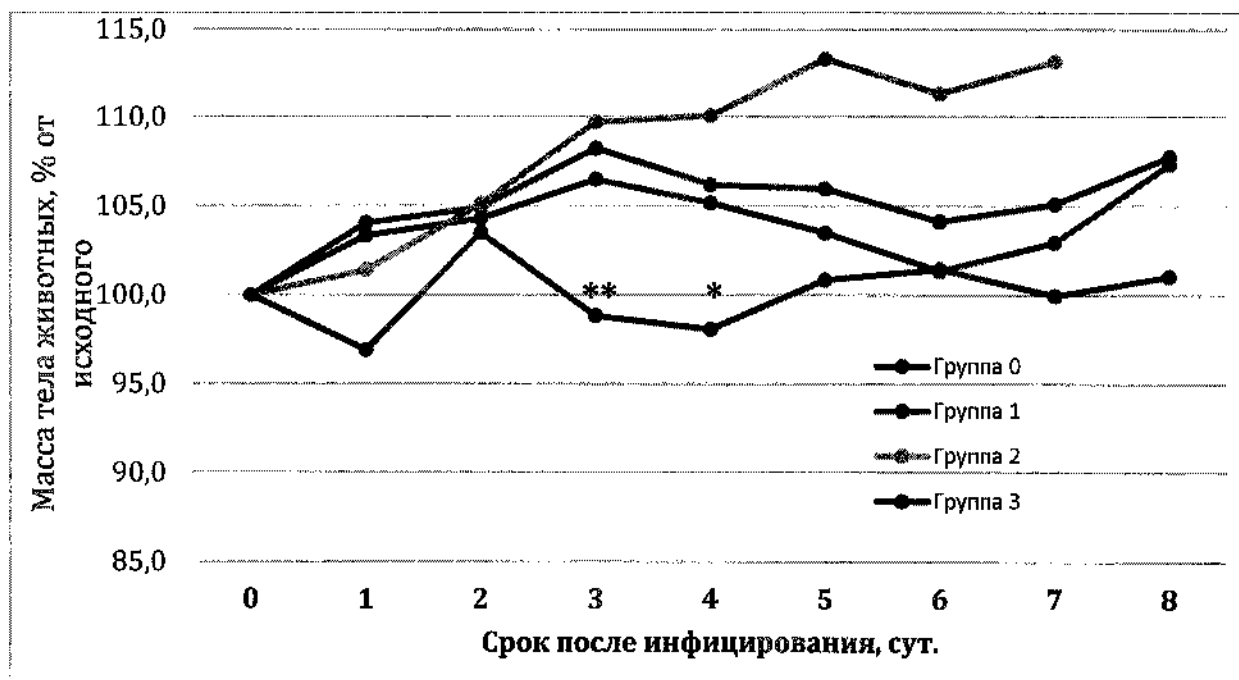


Рис.1. Динамика массы тела белых мышей в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии в условиях применения ион-металлических композитов. * $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$

Как следует из представленных данных, находившиеся в аэрозольной атмосфере средней интенсивности интактные животные (группа 2) демонстрировали устойчивое нарастание массы тела в период 0-8 сутки после инфицирования. Заражение животных групп 0, 1, 3 вирусом гриппа в использованной дозе приводило к снижению весовых показателей, хотя отличия от контрольной группы не достигали достоверных величин. Постоянная обработка животных аэрозолями ион-металлических композитов не приводила к изменениям динамики массы, тогда как применение этого

Группа опыта	Условия эксперимента	Средний размер очагов пневмонии, %	p
0	Зараженные животные без обработки аэрозодем	28,3±5,1	1,000
1	Зараженные животные, минимальная доза (предполагаемая базовая технологическая) обработки аэрозодем	10,0±2,5	0,005
2	Незараженные (интактные) животные, средняя (максимально достижимая технологическая) доза обработки аэрозодем	0,0±0,0	<0,0001
3	Зараженные животные, максимальная (сверхвысокая исследовательская) доза обработки аэрозодем	24,2±7,6	0,667

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Проведено исследование протективных свойств аэрозоля ион-металлических композитов в экспериментах *in vivo* на модели экспериментальной гриппозной пневмонии у белых мышей, а также общая оценка граничных условий применения метода в области больших и сверхбольших концентраций аэрозоля.

Показано, что при средней (максимальной технологической) дозе аэрозоля в легких интактных животных не формируется визуальных патологических очагов поражений вызываемых аэрозодем, а динамика изменения веса животных не имеет отклонений от типовой динамики

изменения веса здоровых животных в нормальных условиях содержания. Побочных эффектов в рамках чувствительности методики эксперимента не выявлено

Показано, что использование большой (экспериментальной сверхвысокой) дозы аэрозоля приводящей к существенным изменением параметров среды обитания животных (постоянная влажность 100%), приводит к отягощению гриппозной инфекции. Это проявилось в гибели животных, достоверному снижению массы тела, а также отсутствию достоверных различий в степени поражения легких между этой группой и группой контроля.

В то же время установлено, что применение минимальной (предполагаемой базовой технологической) дозы аэрозоля приводит к достоверному снижению (в 2,8 раза) размеров очагов хронической постгриппозной пневмонии.

В целом, полученные в эксперименте данные позволяют сделать следующие выводы на качественном уровне о предложенной к определению технологии:

- Она обладает протективным действием при гриппозной пневмонии в т.ч. на уровне нижних отделов дыхательной системы.

- Она безопасна (не приводит к потере веса и визуально определяемых изменениям в лёгких) при длительном применении при соблюдении рекомендуемых дозировок.

Руководитель
исследований, д.б.н.



В.В. Зарубаев

Директор ФБУН НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера



акад. А.А. Тотолян