

УДК 615.281.8

Гитлин Илья Исаакович

кандидат биологических наук, руководитель проекта,

G&G Health

sevaloo@yahoo.com

Гитлин Исаак Григорьевич

кандидат технических наук, руководитель

научно-исследовательских работ,

ЗАО «НПК ЭХО»

sevaloo@yahoo.com

Лунин Владимир Глебович

доктор биологических наук, профессор, заведующий

лаборатории биологически активных наноструктур,

Научно-исследовательский институт эпидемиологии

и микробиологии имени почетного академика

Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ

sevaloo@yahoo.com

Ilya I. Gitlin

candidate of biological sciences, project manager,

G&G Health

sevaloo@yahoo.com

Isaak G. Gitlin

Candidate of Technical Sciences, Head of Research Works,

JSC NPK ECHO

sevaloo@yahoo.com

Vladimir Gl. Lunin

Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the

Laboratory of Biologically Active Nanostructures,

Federal State Budgetary Institution of the Research Institute

of Epidemiology and Microbiology named after Honorary

Academician N.F. Gamalei of the Ministry of Health

of the Russian Federation

sevaloo@yahoo.com

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ГИТАГАМП РУТИН-ЖЕЛЕЗО»
НА ТЕЧЕНИЕ ГРИППОЗНОЙ ЛЕГОЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У МЫШЕЙ**

**RESEARCH OF THE EFFECTIVENESS OF THE NEW MEDICINAL
PRODUCT «GITAGAMP RUTIN-IRON»
FOR FLU PULMONARY PNEUMONIA IN MICE**

Аннотация. В данной статье представлены результаты исследования эффективности новой фармацевтической субстанции «Гитагамп рутин – железо» при лечении вирусной пневмонии, вызванной вирусом гриппа. На основании проведенного исследования на модели гриппозной легочной пневмонии мышей показана эффективность фармацевтической субстанции «Гитагамп рутин – железо» в отношении вируса гриппа А (H₁N₁) на линейных мышах Black C57/6. На модели гриппозной инфекции у мышей выявлена противовирусная активность препарата «Гитагамп рутин – железо» в дозе 8 мг/кг, которая проявлялась в статистически значимом снижении гибели животных на 20% и увеличении средней продолжительности жизни на 6,2 суток.

Ключевые слова: вирусная пневмония, грипп, «Гитагамп рутин – железо».

Annotation. Studies of the effectiveness of the new pharmaceutical substance «Gitagamp rutin-iron» in the treatment of viral pneumonia caused by the influenza virus. Based on the study conducted on a model of influenza pulmonary pneumonia in mice, the effectiveness of the pharmaceutical substance «Gitagamp rutin-iron» against the influenza A (H1N1) virus in Black C57/6 linear mice was shown. The antiviral activity of «Gitagamp rutin-iron» at a dose of 8 mg/kg was detected in a model of influenza infection in mice, which was manifested in a statistically significant decrease in animal death by 20% and an increase in average life expectancy by 6.2 days.

Key words: viral pneumonia, flu, «Gitagamp rutin-iron».

Введение. Из всех респираторных вирусных заболеваний, гриппозная инфекция является наиболее тяжелой патологией и причиняет наибольший ущерб здоровью людей населения и экономике. Периодически появляющиеся новые пандемические штаммы, к которым отсутствует популяционный иммунитет, превращают грипп в особо опасную инфекцию. Известно, что испанский грипп 1918 года стал причиной смерти от 30 до 50 млн. человек. В настоящее время, по данным Всемирной организации здравоохранения, во время сезонных эпидемий ежегодно во всем мире болеет гриппом до 20% населения, в том числе 5–10% взрослых и 20–30% детей. Тяжелые формы отмечаются в 3–5 млн. случаев, летальные исходы составляют от 250 000 до 500 000 случаев [5; 7; 10]. Экономические потери, вызванные гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), составляют около 77% от ущерба, приходящегося на долю всех инфекционных болезней. Из общего числа случаев временной нетрудоспособности на грипп и ОРВИ приходится 12-14% [8; 10].

Кроме того, гриппозная инфекция может вызвать скрытый, трудно поддающийся учету ущерб, связанный с тяжелыми клиническими осложнениями со стороны нервной и сердечно-сосудистой систем, а также с обострением хронических заболеваний (сахарный диабет, сердечная недостаточность, хронические обструктивные бронхопневмонии и т.п.), и

стать причиной отсроченной смерти, особенно у детей до двух лет, пожилых людей и лиц с ослабленным здоровьем[12].

Вирус гриппа относится к семейству ортомиксовирусов, которое включает пять родов: грипп А, В, С, D (Thogotovirus) и Isavirus. Геномы вирусов гриппа А и В структурно схожи, они состоят из 8 геномных сегментов РНК негативной полярности, которые кодируют 12 белков и названы по продукту, транслируемому с основной открытой рамки считывания: PB1, PB2, PA, NA, NP, NA, M и NS [14]. Полимеразный комплекс PB2, PB1, PA транскрибирует одну мРНК с каждого геномного фрагмента, транслируемую в одноименный белок. Кроме того, мРНК геномных сегментов M и NS подвергается сплайсингу, кодируя белки M2 и NP в дополнение к белкам M1 и NS1 соответственно. У отдельных штаммов с альтернативной рамки считывания сегмента PB1 транслируется белок PB1-F2[6]. Все белки, за исключением NS1 и PB1-F2, являются структурными компонентами вирусных частиц. Неструктурный белок NS1 накапливается в цитоплазме зараженных клеток и выполняет функцию ингибитора системы интерферона. Предполагается, что белок PB1-F2 функционирует как проапоптотический фактор, который ингибирует функцию иммунокомпетентных клеток [14].

Два основных поверхностных гликопротеина вируса гриппа, гемагглютинин и нейраминидаза отвечают за прикрепление и освобождение вируса от клетки-хозяина и в то же время являются главной мишенью для антител[11]. Вирусы типа А подразделяются на подтипы на основе различных комбинаций восемнадцати вариантов гемагглютинина и одиннадцати вариантов нейраминидазы. Все известные подтипы были подтверждены для диких птиц, которые считаются естественным хозяином для вирусов гриппа А. Только три подтипа, а именно, А (H1N1), А (H2N2) и А (H3N2), известны в человеческой популяции. Эти вирусы вместе с вирусами гриппа В отвечают за ежегодные эпидемии различной степени тяжести. Регулярно появляются штаммы гриппа с «новыми» антигенными свойствами. Если изменение является достаточным, чтобы преодолеть уже существующий иммунитет у населения, вирус способен вызывать эпидемии. В случае, когда человеческая популяция полностью не имеет иммунитета к появившемуся варианту, вирус может легко заражать и передаваться от инфицированных к не инфицированным людям и вызвать пандемию.

Перечисленные особенности определяют трудности создания эффективных противогриппозных препаратов. Известны два класса препаратов, ингибирующих M2 белок или NA вирусов гриппа. Ингибиторы первого класса - производные адамантана (амантадин и римантадин), действуют против гриппа А (но не В). Препараты, ингибирующие NA – занамивир и тамифлю (Осельтамивир). Оба типа препаратов действуют на ранней стадии инфекции и, к сожалению, не влияют на эффективность выделения вируса из верхнего респираторного тракта пациентов.

Иммунная система является одним из основных потребителей энергоресурса организма. Синтез аденозинтрифосфата (АТФ) в митохондриях определяется несколькими факторами: в том числе, концентрацией кислорода, активностью пируват дегидрогеназы, проводимостью между комплексами (I, III и IV), встроенным в мембрану кристы митохондрии. В антивирусном ответе важную роль играют молекулы, которая называется MAVS (mitochondrial antiviral signalling), которые находятся на поверхности митохондрии. Применение нового препарата (НП) приводит к снижению сверх физиологических концентраций перекиси водорода [1; 2].

Снижение концентрации кислорода в плазме крови при росте концентрации перекисных соединений, приводит [1] к снижению энергоресурса организма и как следствие ослаблению иммунной системы.

В работе Захаровой М.Н. и соавт.[4] проводилось наблюдение применения антиоксиданта у пациентов с диагнозом БАС.

Целью настоящего исследования являлось оценить эффективность препарата Рутин-железо при лечении вирусной пневмонии, вызванной вирусом гриппа.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся препарат «Гитагамп рутин – железо» (рутин-дигидроаскорбиновая кислота, цитрат железа (III), ЗАО «НПК ЭХО», серия: 02.04.2020, форма выпуска: 10% раствор)[3].

Все исследования проведены на 40-ка животных – мышах-самцах Black C57/6, массой тела 12-14 г, полученных из Питомника «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН (№ 4681762791 от 18.03.2020). Маркировка клетки кодировала пол животных, породу, дату введения препаратов, название группы. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки, вес животных не должен отличаться не более чем на 10%.

Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены институтской комиссией по уходу и использованию животных на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными [9].

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

Приготовление раствора «Гитагамп рутин – железо» 4 мг: к 1 мл исходного раствора (концентрация 10%) добавляли 1 мл дистиллированной деионизированной воды. Полученный раствор вводили внутривентрикулярно 1

раз в сутки, в течение 7 дней (первое введение – через 24 часа после инфицирования) в дозе 8 мг\кг массы тела животного.

Приготовление раствора «Гитагамп рутин – железо» 8 мг: к 1 мл исходного раствора (концентрация 10%) добавляли 2 мл дистиллированной деионизированной воды. Полученный раствор вводили внутривентрикулярно 1 раз в сутки в течение 7 дней (первое введение – через 24 часа после инфицирования) в дозе 4 мг\кг массы тела животного.

В качестве препарата сравнения использовали рутин, а группа интактного контроля получала физиологический раствор в эквивалентном количестве.

Для проведения исследований был использован штамм вируса гриппа А Калифорния 04/07 (H₁N₁). Накопление вируса гриппа и титрование его инфекционной активности проводили на 10-ти дневных куриных эмбрионах.

Животных инфицировали вирусом в дозе 3,5 lgЭИД₅₀/мл интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 0,05 мл/мышь.

Оценку противовирусной активности исследуемого препарата осуществляли по изменению массы тела и выживаемости животных в период с 1-ых по 15-ые сутки.

Стандартный статистический анализ выполняли с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. С целью оценки антиоксидантных свойств исследуемого препарата, проведен анализ скорости диссоциации перекиси водорода в среде для культивирования клеток *in vitro* (DMEM) с 10% фетальной бычьей сывороткой. Для этого, в культуральную среду, содержащую перекись водорода (350мкМ), добавляли «Гитагамп рутин – железо» до концентрации 0,375 мкг/мл, затем по окислению люминола определяли содержание перекиси водорода (Рис.1). Представленные результаты показывают, что «Гитагамп рутин – железо», в отличие от контрольного препарата рутина, уже в первые минуты вызывает резкое снижение содержания перекиси водорода в среде и полностью элиминирует перекись водорода уже через 4 часа после добавления. В течение нескольких минут добавления «Гитагамп рутин – железо» уровни перекиси водорода резко снижались, в то время как контрольный антиоксидантный препарат - рутин, практически не проявлял никакого эффекта по сравнению с контрольной группой животных.

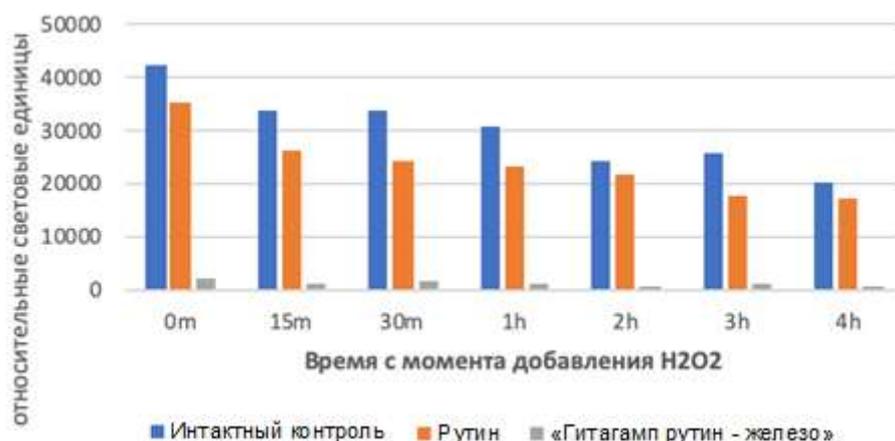


Рисунок 1. - Динамика диссоциации перекиси водорода.

Поскольку «Гитагамп рутин – железо» проявил высокую антиоксидантную эффективность, было предположено его возможное влияние на увеличение выживаемости культуральных клеток в условиях оксидативного стресса. Клетки НСТ-116 рассеивали на 96-луночный планшет в количестве 2×10^4 на лунку. Через сутки клетки обрабатывали «Гитагамп рутин – железо» (0,15 мг, 0,7 мг и 0,01 мг на лунку) в течение 2 часов и вносили перекись в количестве 150 мкМ, 350 мкМ, 700 мкМ. Результат регистрировали через 20 часов (Рис 2.).

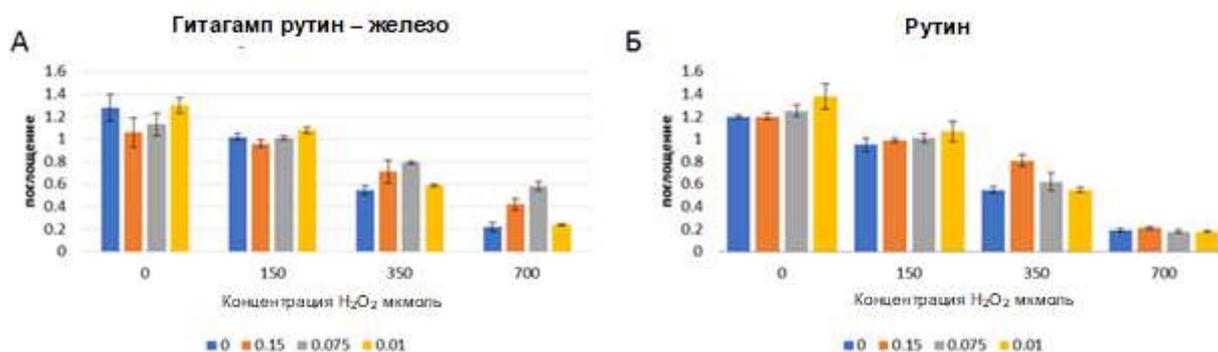


Рисунок 2. – Влияние на выживаемость культуральных клеток в условиях оксидативного стресса.

А) «Гитагамп рутин-железо»; Б) Рутин

В результате была продемонстрирована повышенная выживаемость клеток, обработанных увеличивающимися концентрациями перекиси водорода, предварительно обработанных комплексом «Гитагамп рутин-железо». Контрольный препарат рутин в данном эксперименте оказался менее эффективным в предотвращении гибели клеток с повышением концентрации перекиси водорода.

Сравнивая антиоксидантные свойства комплекса «Гитагамп рутин-железо» с контрольным препаратом Рутин, мы можем ясно видеть более эффективный продукт, особенно когда уровни окислительного стресса выше, то есть повышенная концентрация перекиси водорода.

Установив эффективность комплекса «Гитагамп рутин-железо» как мощного медиатора окислительного стресса *in vitro*, было целесообразно оценить эффективность данного комплекса *in vivo*.

Результаты противовирусной активности комплекса «Гитагамп рутин-железо» на модели летальной гриппозной инфекции на линейных мышах Black C57/6 проводили путем сравнения массы тела опытных и контрольных групп мышей в течение 15 дней после инфицирования вирусом гриппа H₁N₁. Результаты представлены на рисунке 3.

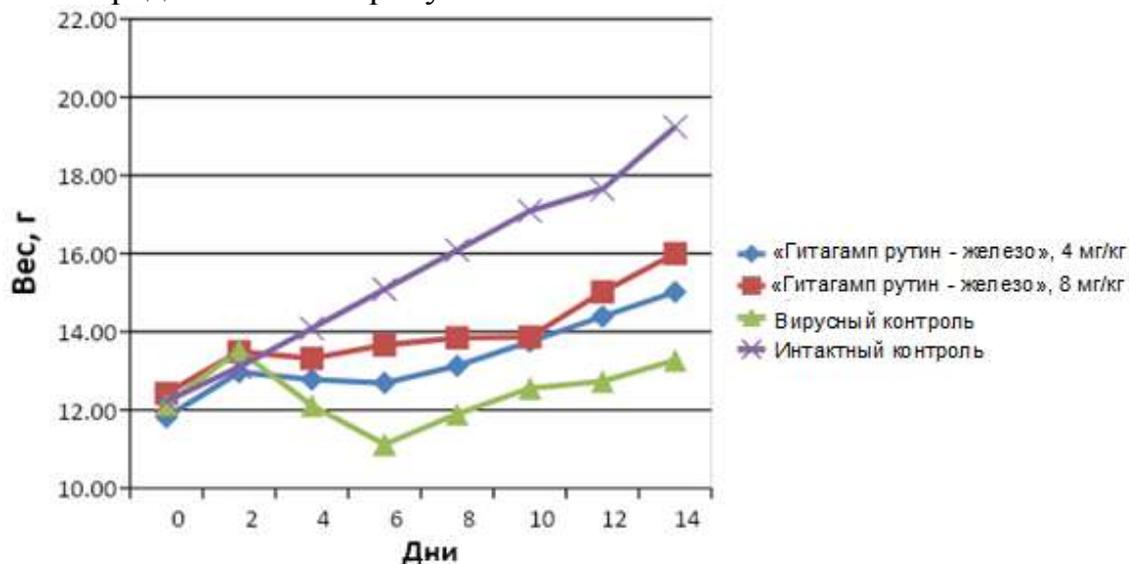


Рисунок 3. Масса тела мышей после инфицирования вирусом гриппа (H₁N₁) (M±SD).

В группе вирусного контроля масса тела животных была статистически значимо ($p < 0,05$) ниже массы тела в группе интактных животных. Масса тела мышей, получавших препарат «Гитагамп рутин-железо» (4 мг/кг и 8 мг/кг), достоверно не отличалась по массе тела животных между собой, в то же время было отмечено достоверное снижение массы тела животных в группе вирусного контроля.

В процессе эксперимента по определению эффективности препарата «Гитагамп рутин-железо» при гриппозной инфекции случаи неспецифической смертности в группе интактных животных не отмечено. Результаты изучения динамики гибели мышей в опытных и контрольных группах представлены на рисунке 4.

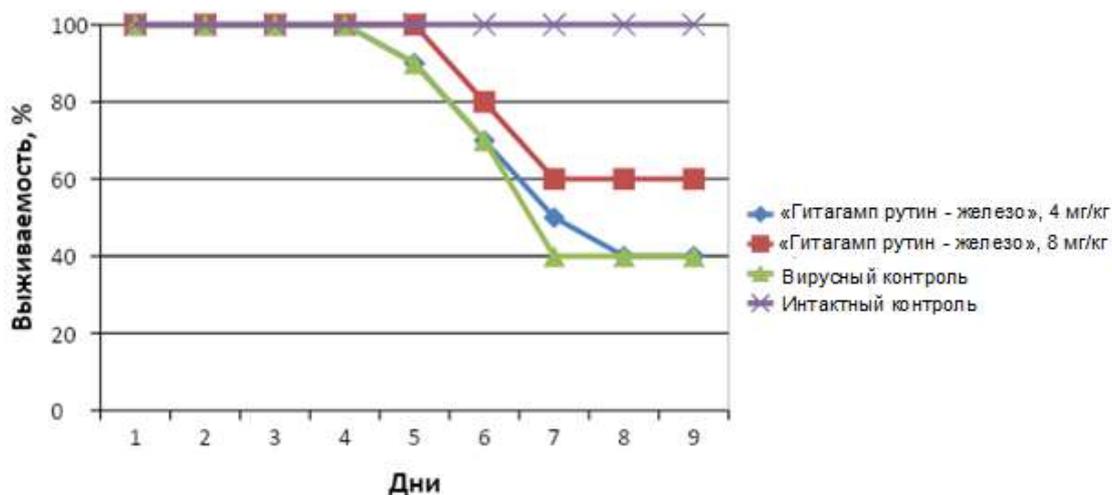


Рисунок 4. Выживаемость мышей, инфицированных вирусом гриппа (H_1N_1).

Препарат «Гитагамп рутин-железо» проявил статистически значимое ($p < 0,05$) противовирусное действие в отношении экспериментальной модели вируса гриппа, в дозе 8 мг/кг предотвращая гибель животных в 33,3%. В дозе 4 мг/кг гибель мышей была, как и в группе вирусного контроля - 60%.

Продолжительность жизни в группе вирусного контроля составила 10,4 дня. В группе получавшей препарат «Гитагамп рутин-железо» в дозе 4 мг/кг средняя продолжительность жизни не отличалась от группы вирусного контроля. На фоне приема препарата «Гитагамп рутин-железо» в дозе 8 мг/кг гибель животных составила 40%, а продолжительность жизни увеличилась на 6,2 суток.

Таким образом, исследуемый препарат «Гитагамп рутин-железо» в концентрации 8 мг/кг в экспериментальных условиях гриппозной инфекции эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа, обеспечивая защиту с способствует выживанию инфицированных мышей от гибели с коэффициентом защиты 33,3%. Результаты о действии препарата «Гитагамп рутин-железо», полученные на экспериментальной вирусной пневмонии, вызванной вирусом гриппа *in vivo*, указывают на целесообразность проведения дальнейших исследований препарата.

Выводы. Проведено экспериментальное исследование по изучению эффективности фармацевтической субстанции «Гитагамп рутин-железо» в отношении вируса гриппа А (H_1N_1) на линейных мышах Black C57/6. На модели гриппозной инфекции у мышей выявлена противовирусная активность препарата «Гитагамп рутин-железо» в дозе 8 мг/кг, которая проявлялась в статистически значимом снижении гибели животных на 20% и увеличении средней продолжительности жизни на 6,2 суток.

Авторы статьи выражают глубокую признательность коллективу Лаборатории иммунологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» под руководством Исаевой Е.И.

Литература

1. Гитлин И.Г., Гольдберг Е.З. Неврология, психиатрия и оксидативный стресс. Защитные свойства «Гитагамп – Рутин Железо (GRuI)» // Журнал Международной медицины, 2013. - № 2 (3). – С. 101-106.
2. Гитлин И.Г. Нейродегенеративные заболевания. Опыт лечения амиотрофического склероза // Дневник казанской медицинской школы, 2015. – Т.1. – Вып. VII. – С. 72-76.
3. Гитлин И.Г. Патент РФ 2309740, Евразийский патент 0166466, патент Китай ZL80033434.X, СА2659914 Канада США.
4. Захарова М.Н., Народитский Б.С., Логунов Д.Ю., Гитлин И.Г. Изучение роли антиоксидантов в патогенезе бокового амиотрофического склероза // «Практическая медицина», 2012. - № 1(56). – С. 186-187.
5. Bhat N, Wright JG, Broder KR, et al. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004. // *N Engl J Med*, 2005. - № 353. - P. 2559-67.
6. Buehler J, Navi D, Lorusso A, et al. Influenza A virus PB1-F2 protein expression is regulated in a strain-specific manner by sequences located downstream of the PB1-F2 initiation codon. // *J Virol*, 2013. - № 87. - P. 10687-99.
7. Estimates of deaths associated with seasonal influenza - United States, 1976-2007. // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2010. - № 59. - P.1057-62.
8. Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, et al. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. // *Vaccine*, 2005. - № 23. - P.5708-24.
9. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. - 2010. - 326 p.
10. Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. // *Vaccine*, 2007. - № 25. - P.5086-96.
11. Romanova J. The fight against new types of influenza virus. // *Biotechnol J.* –2006 Dec; –1(12):P. –1381-92.
12. Shah NS, Greenberg JA, McNulty MC, et al. Severe Influenza in 33 US Hospitals, 2013-2014: Complications and Risk Factors for Death in 507 Patients. // *Infect Control HospEpidemiol*, - 2015. – № 36. - P.1251-60.
13. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, et al. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1 // *PLoSPathog*, - 2005. - 1, e4.
14. Zheng W, Tao YJ. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. // *FEBS Lett*, - 2013. - № 587. - P.1206-14.

References:

1. Gitlin IG, Goldberg EZ Neurology, psychiatry and oxidative stress. Protective properties of "Gitagamp - Rutin Iron (GRuI)" // *Journal of International Medicine*, 2013. - № 2 (3). - С. 101-106.

2. Gitlin IG *Neurodegenerative diseases. Experience in the treatment of amyotrophic sclerosis // Diary of the Kazan Medical School, 2015. - Vol.1. - Issue. VII. - C. 72-76.*
3. Gitlin IG *RF Patent 2309740, Eurasian Patent 0166466, Patent China ZL80033434.X, CA2659914 Canada USA.*
4. Zakharova MN, Naroditsky BS, Logunov DY, Gitlin IG *Study of the role of antioxidants in the pathogenesis of lateral amyotrophic sclerosis // "Practical Medicine", 2012. - № 1 (56). - C. 186-187.*
5. Bhat N, Wright JG, Broder KR, et al. *Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004. // N Engl J Med, 2005. - № 353. - P. 2559-67.*
6. Buehler J, Navi D, Lorusso A, et al. *Influenza A virus PB1-F2 protein expression is regulated in a strain-specific manner by sequences located downstream of the PB1-F2 initiation codon. // J Virol, 2013. - № 87. - P. 10687-99.*
7. *Estimates of deaths associated with seasonal influenza - United States, 1976-2007. // MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2010. - № 59. - P.1057-62.*
8. Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, et al. *A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. // Vaccine, 2005. - № 23. - P.5708-24.*
9. *Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. - 2010. - 326 p.*
10. Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, et al. *The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. // Vaccine, 2007. - № 25. - P.5086-96.*
11. Romanova J. *The fight against new types of influenza virus // Biotechnol J. -2006 Dec; -1(12):P. -1381-92.*
12. Shah NS, Greenberg JA, McNulty MC, et al. *Severe Influenza in 33 US Hospitals, 2013-2014: Complications and Risk Factors for Death in 507 Patients. // Infect Control HospEpidemiol, - 2015. - № 36. - P.1251-60.*
13. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, et al. *Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1 // PLoSPathog, - 2005. - 1, e4.*
14. Zheng W, Tao YJ. *Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. // FEBS Lett, - 2013. - № 587. - P.1206-14.*