

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные заболевания и в настоящее время являются одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения и медицинской науки. Среди причин смертности они занимают третье место, унося из жизни ежегодно 14-17 млн. человек. Среди инфекционных заболеваний преобладают болезни, вызываемые вирусами.

Грипп – самое массовое острое инфекционное заболевание человека. Ежегодно грипп является причиной повышения заболеваемости и смертности во всем мире. Например, каждую зиму в результате заражения гриппом в США госпитализируется около 300000 пациентов и 30000-40000 больных умирает. Заболеваемость и смертность от гриппа резко возрастают, когда возникает пандемия (эпидемия, охватывающая весь мир). В 20-м веке было 3 пандемии – пандемия «испанки» 1918 года, вызванная вирусом с антигенной формулой H_1N_1 ; пандемия азиатского гриппа 1957 года, вызванная вирусом с антигенной формулой H_2N_2 ; пандемия 1968 года, вызванная вирусом с антигенной формулой H_3N_2 . Эти пандемии характеризуются заболеваемостью от 30% до 60% населения и сопровождаются резким повышением числа пневмоний и общей смертности. Особенно тяжелой была пандемия «испанки» 1918 года, которая унесла жизни от 1% до 2% всего населения Земли. В настоящее время практически весь мир охватила первая пандемия гриппа третьего тысячелетия, вызванная штаммом A/California/04/2009(H1N1).

Возбудителем гриппа являются РНК-содержащие вирусы, принадлежащие к семейству *Orthomyxoviridae*, включающее в себя два рода – род вирусов А и В и род вирусов гриппа С. Вирусы гриппа А поражают человека, некоторые виды животных (коней, свиней и др.), а также птиц. Вирусы гриппа В и С патогенны только для человека

Вирусы гриппа репродуцируются по законам продуктивной инфекции, не приводят к латентности, неоплазматической индукции и т.д. Возбудитель легко передается воздушно-капельным путем, что приводит к частым заболеваниям с эпидемическим распространением в коллективах. Это заболевание характеризуется различными поражениями верхних дыхательных путей или более глубоких отделов дыхательного тракта, часто сопровождается общей лихорадкой и другими проявлениями инфекционного токсикоза. Экономические потери от гриппа составляют более 400 миллионов гривен в год. Ежегодно по поводу заболеваний гриппом и ОРВИ в Украине в течение первого квартала в медицинские учреждения обращаются до 10 миллионов людей, 52% которых – дети. Следует подчеркнуть, что для детей грипп является достаточно опасным заболеванием, поскольку велика вероятность развития осложнений. Кроме того, современные противогриппозные средства имеют ряд ограничений для применения у детей. Поэтому поиск и создание эффективных противогриппозных средств, а также разработка методов, снижающих заболеваемость гриппом, уменьшающих тяжесть и опасность протекания болезни – крайне актуальные задачи медицинской науки и здравоохранения.

В ГУ «Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова» МЗ Украины (УНИПЧИ) (Одесса) в течение ряда лет проводятся исследования, направленные на разработку средств и методов профилактики и лечения особо-опасных и актуальных инфекций. В частности, сотрудниками института доказана противовирусная активность аминокaproновой кислоты и она внедрена в практику здравоохранения как противогриппозное средство.

Исходя из данных о многофункциональности комплекса «Гринизация», в частности, его активизирующего влияния на иммунную систему, на неспецифическую резистентность, на стабилизацию биомембран клеток можно

было предположить, что его приём благотворным образом скажется на защищённости организма по отношению к гриппозной инфекции.

Известно, что клетки крови, обеспечивающие функции иммунной системы и неспецифической резистентности, относятся к коротко живущим клеткам и нуждаются в постоянном обновлении. Для этого им нужен «строительный» материал и энергия. В норме это дает полноценное питание, которое подразумевает полноценные продукты и полноценное их переваривание и усвоение. К сожалению, качество пищевых продуктов и, особенно их переработка организмом при постоянных стрессах, заболеваниях и старении оставляют желать лучшего. Таким образом, МНФК «Гринизация» обеспечивает и полноценное питание и восстановление клеток защитных систем: иммунной и неспецифической резистентности (обеспечение пластическим материалом и энергией) и снижение угнетающего иммунную систему действия микробных токсинов вследствие дизбактериоза при нарушении переработки пищи.

Поэтому целью исследований по данному договору является изучение противогриппозного действия МНФК «Грин Про I» и МНФК «Грин Микс I» при моделировании экспериментальной инфекции у мышей.

На данном, первом этапе исследований, изучили противогриппозное защитное действие МНФК «Грин Про I» и МНФК «Грин Микс I» при моделировании тяжёлой формы инфекции с помощью высоковирулентного штамма A/PR/8/34 (H1N1).

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы:

- аллантоисный штамм вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1) из музея ГУ «УНИПЧИ», адаптированный к лёгким мышей;
- 11-дневные куриные эмбрионы;
- инбредные белые мыши весом 15 – 18 г.;
- МНФК «Грин Про I» и МНФК «Грин Микс I».

Накопление вирусосодержащего материала проводили после 2-3 пассажей через лёгкие инбредных белых мышей, заражая 11-дневные куриные эмбрионы в аллантоисную полость 0,2 мл вирусной суспензии с последующей инкубацией инфицированных эмбрионов в течение 48 часов при +37°C. Затем на 24 часа куриные эмбрионы помещали в холодильник, после чего в отобранной из каждого эмбриона аллантоисной жидкости определяли титр в реакции агглютинации (РГА) общепринятым методом. Образцы с наиболее высокими титрами стерильно разливаются во флаконы (по 1 мл на флакон), замораживаются и служат в дальнейших экспериментах в качестве заражающего материала.

Заражение белых мышей осуществляли интраназально под лёгким эфирным наркозом.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние «Гринизации» на защищенность животных от гибели при моделировании у них гриппозной инфекции с помощью заражения высоковирулентным штаммом вируса гриппа A/PR/8/34(H1N1) изучали следующим образом. Животным через зонд вводили ежедневно с интервалом в 2 часа суспензии МНФК «Грин Про I» (150 мг на 1 кг веса) и МНФК «Грин Микс I» (в той же дозе) в объеме 0,1 мл. Курс продолжался в течение 7 дней до заражения и 14 дней после него. Животным контрольной группы ежедневно двукратно вводили зондом воду (плацебо). По 4 животных опытной и контрольной групп заражали интраназально под легким эфирным наркозом десятикратными разведениями вирусосодержащей

аллантоисной жидкости от 1×10^{-1} до 1×10^{-7} в объеме 0,05 мл. Гибель животных учитывали в течение 14 дней после заражения. Расчет LD_{50} проводили методом Кербера в модификации Ашмарина по формуле:

$$- \lg LD_{50} = - L - d (S - 0,5),$$

где L – начальное разведение инфицирующей дозы;

d – разница между последовательными разведениями в lg;

S – сумма пропорций тест-объектов, которые дали позитивный результат (т.е. количество погибших животных по отношению к инфицированным одной дозой).

Влияние «Гринизации» на динамику гибели мышей представлены на рисунке в виде кумулятивных $\lg LD_{50}$.

Рис. 1. Защитная эффективность "Гринизации" при моделировании на фоне ее применения летальности.



Анализ данных свидетельствует о том, что гибель животных в обеих группах началась на 2-е сутки после заражения, а, начиная с 3-х суток и до конца наблюдения, имел место выраженный защитный эффект «Гринизации». Так, на 6-8

сутки, когда заканчивается гибель непосредственно от вирусной инфекции, различия кумулятивных $\lg LD_{50}$ между контрольной и опытной группами соответствовали 2,25-2,5 $\lg LD_{50}$, т.е. чтобы вызвать гибель 50% животных к этому сроку в группе животных, получавших «Гринизацию», необходима была заражающая доза в 160-320 раз большая, чем для достижения такого же эффекта в контрольной группе.

В более поздние сроки эти различия несколько уменьшаются, видимо, за счет бактериальных осложнений, характерных для этих стадий инфекционного процесса. При этом можно предположить, что несколько меньшая смертность на этом этапе в контрольной группе связана с тем, что зараженные животные просто не дожили до осложнений, погибнув на более ранних этапах инфекции.

В конце наблюдения различия составили 1,5 $\lg LD_{50}$, т.е. для достижения одинакового эффекта (гибель 50% животных), в группе, получавшей до заражения и после инфицирования комплекс «Гринизация», необходимо в 32 раза больше вируса, чем в контрольной группе. Если сравнить летальность в этих группах, то среди животных, получавших комплекс «Гринизация», погибло на 21,4% мышей меньше, чем в контроле. Экстраполируя эти результаты на людей, можно ожидать, что те, кто принимает комплекс «Гринизация» в эпидемический по гриппу период, будут в достаточно высокой степени более защищены от заболевания гриппом в тяжёлой форме. Особенно важно это знать лицам из групп риска: медработникам, преподавателям, работникам торговли и транспорта, лицам старше 65 лет.

На 11-е и 18-е сутки после заражения (п/з) были взяты в опыт кровопусканием под эфирным наркозом мыши: 2 интактные; 5 из контрольной (I) группы (1 из 1×10^{-5} , 2 из 1×10^{-6} , 11-е сутки п/з; 1 из 1×10^{-6} , 1 из 1×10^{-7} , 18-е сутки п/з); 6 из группы (II), получавшей «Гринизацию» (1 из 1×10^{-5} , 2 из 1×10^{-6} , 11-е сутки п/з; 1 из 1×10^{-6} , 2 из 1×10^{-7} , 18-е сутки п/з). При проведении эксперимента придерживались требований Европейской конвенции о защите позвоночных

животных, используемых для исследовательских и других научных целей (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

Внутренние органы указанных животных были зафиксированы в 10%-ном формалине и переданы для патоморфологических исследований в Национальный институт хирургии и трансплантологии им. А.А.Шалимова доктору медицинских наук профессору И.В.Гомоляко.

Представленный профессором И.В.Гомоляко патоморфологический анализ препаратов органов изложен ниже в таблице.

КОНТРОЛЬНАЯ ГРУППА	ГРУППА «ГРИНИЗАЦИЯ»
<i>Макроскопически</i> (после фиксации) у животных I гр. наблюдались выраженные изменения со стороны легких – множественные сливные безвоздушные геморрагические участки, количество которых уменьшалось при снижении дозы заражения. Геморрагические очаги чередовались с небольшими участками воздушной паренхимы. Селезенка увеличена. Печень без особенностей. Наблюдались крупные кровоизлияния в перикард . Со стороны других органов существенные изменения не наблюдались. Выраженность изменений зависела от дозы инфекта.	<i>Макроскопически</i> (после фиксации) у животных II гр. наблюдались менее выраженные изменения со стороны легких , увеличение количества и размеров участков воздушной паренхимы. Селезенка увеличена. Печень без особенностей. Наблюдались менее выраженные кровоизлияния в перикард . Со стороны других органов существенные изменения не наблюдались.

<p>В контрольной группе мышей (I гр., 1×10^{-5}, 1×10^{-6}, 1×10^{-7}) <i>микроскопически</i> изменения, в целом, идентичны, однако отмечена очевидная зависимость от дозы вируса. В легких инфицированных животных наблюдаются крупные кровоизлияния, очаги альтерации, крупные сливные очаги пневмонии, дистелектазы, эмфизема, очаговый отек легкого или отек интерстициальной ткани с резким расширением межальвеолярных перегородок. Бронхи сближены, что свидетельствует об уменьшении объема альвеолярной паренхимы. В просветах альвеол содержится фибринозный выпот, десквамированный альвеолярный эпителий, в небольшом количестве альвеолярные макрофаги, имеются очаги острого воспаления и гнойного расплавления ткани. Наблюдается расширение бронхов и гиперплазия бронхиального эпителия.</p>	<p>Использование для лечения гриппа “Гринизации” при разведении вируса 1×10^{-5} привело к умеренному уменьшению объема поражения легких.</p> <p>Использование для лечения гриппа “Гринизации” при заражении вирусом в разведении 1×10^{-6} привело к некоторым изменениям в характере поражения легких. Очаги воспаления имеют более четкие контуры и граничат с участками отежной и интактной ткани легкого. Строение пневмонических очагов неоднородное, имеются включения воздушной паренхимы. В целом</p>
<p>При заражении вирусом в разведении 1×10^{-5} преобладают альтеративные изменения и сливной, диффузный без четкой границы характер пневмонических очагов, высокая плотность клеточного инфильтрата. Имеются множественные очаги кровоизлияний. По аналогии с человеком такую пневмонию можно расценить условно как крупозную.</p>	<p>особенностью этой группы животных является уменьшение размеров и плотности воспалительных очагов, уменьшение количества и размеров кровоизлияний, более четкая демаркация очагов.</p> <p>Характер пневмонии условно –</p>
<p>При заражении вирусом в разведении 1×10^{-6} изменения в целом такие же, но альтерация выражена незначительно, очаги воспаления имеют более четкие контуры и граничат с участками интактной ткани легкого. В целом особенностью этой группы животных является более четкая демаркация очагов поражения при сохранении размеров и интенсивности поражения, плотности клеточного инфильтрата. Условно – <i>очаги крупозной и очаги фибринозно-серозной пневмонии.</i></p>	<p><i>фибринозная, серозно-фибринозная, хотя сохранияются и единичные мелкие очаги деструкции.</i></p> <p>Использование для лечения гриппа “Гринизации” при заражении вирусом в разведении 1×10^{-7} привело к более выраженным изменениям в характере поражения легких по отношению к контрольным животным и животным с большей дозой заражения, получавшим “Гринизацию”. Количество очагов пневмонии значительно уменьшено, уменьшены их размеры. Они имеют более четкие</p>
<p>При заражении вирусом в разведении 1×10^{-7} выявленные в легких изменения отличаются меньшим объемом поражения - меньший объем очагов пневмонии и кровоизлияний; улучшена демаркация, отмечено снижение плотности клеточного инфильтрата. В очагах пневмонии парад</p>	<p>размеры. Они имеют более четкие</p>

<p>Со стороны миокарда у животных I гр. наблюдались резкое полнокровие сосудов, диффузно-очаговые дистрофические изменения, единичные мелкие очаги фибриноидной дистрофии и некроза, мелкоочаговая воспалительная инфильтрация, явления перикардита и массивные кровоизлияния в перикард. В целом выраженность и наличие этих изменений индивидуально, хотя больше они выражены у животных, заражённых вирусом в разведении 1×10^{-6}.</p>	<p>У животных II гр. (“Тринизация”) описанные в контрольной группе изменения были выражены слабо (при разведении вируса 1×10^{-5}) либо вовсе не наблюдались. Сохранялось лишь полнокровие сосудов.</p>
<p>Со стороны печени у животных I гр. наблюдались сближение портальных трактов, увеличение количества ядер гепатоцитов на единицу площади, конденсация ядерного хроматина (мелкие темные ядра), очаговые дистрофические изменения. Непостоянно выявлялась незначительная перипортальная или интралобулярная воспалительная инфильтрация.</p>	<p>У животных II гр. (МНТК “Тринизация”) структура печени приближалась к норме.</p>
<p>В селезенке у животных обеих групп резко выражены застойные изменения с отложениями гемосидерина.</p>	

Дополнение к отчету

Печень

Для регистрации выявленных в печени изменений была использована шкала R.G. Knodell и соавт. [1981], для оценки фиброза шкала Desmet V.J. и соавт., [1994], а также шкала METAVIR.

У животных I гр. наблюдались умеренно выраженные изменения.

Перипортальные и септальные некрозы не определялись (Б0).

Дистрофические изменения представлены очагами белково-гидропической дистрофии. Непостоянно выявлялись небольшие очаги интралобулярной воспалительной инфильтрации (Б2). Кроме того, очагово наблюдалось сближение портальных трактов, увеличение количества гепатоцитов и соответственно увеличение количества ядер гепатоцитов на единицу площади;

конденсация ядерного хроматина (мелкие темные ядра), что характерно для гипоксии органа, для выраженной интоксикации.

У всех животных этой групп наблюдалась неравномерная непостоянная незначительная перипортальная воспалительная инфильтрация (Б1).

Фиброз отсутствовал (Б0).

Общий балл поражения по шкале Кноделя Б3; фиброз – Б0.

Общий балл поражения по шкала METAVIR – А1F0.

У животных 2 гр. описанные выше изменения либо не определялись либо были непостоянными и минимальными.

Перипортальные и септальные некрозы не определялись (Б0).

Дистрофические изменения в виде белково-гидропической дистрофии выражены очень слабо. Интралобулярная воспалительная инфильтрация отсутствует (Б0).

НЕ наблюдалось сближение портальных трактов, количество гепатоцитов и соответственно количество ядер гепатоцитов на единицу площади соответствует контрольной группе; структура ядерного хроматина в пределах нормы.

Перипортальная воспалительная инфильтрация отсутствует (Б0).

Фиброз отсутствовал (Б0).

Общий балл поражения по шкале Кноделя Б0; фиброз – Б0.

Общий балл поражения по шкала METAVIR – А0F0.

Таким образом, патоморфологическими исследованиями, проведенными в Национальном институте хирургии и трансплантологии им. А.А.Шалимова доктором медицинских наук профессором И.В.Гомоляко, установлено, что у животных, получавших «Гринизацию» и заражённых вирусом А/PR/8/34(H1N1),

пневмония протекает в намного более лёгкой форме, поражения миокарда, перикарда и печени значительно менее выражены, чем у мышей контрольной группы.

3. ВЫВОДЫ

- Установлено, что при моделировании у белых мышей смертельной формы гриппозной инфекции путём заражения их штаммом A/PR/8/34(H1N1), для достижения одинакового эффекта (гибель 50% животных), в группе, получавшей до заражения и после инфицирования комплекс «Гринизация», **необходимо в десятки, а в некоторые сроки даже в сотни раз больше заражающего вируса, чем в контрольной группе.**

- Результаты патоморфологических исследований, свидетельствуют, что у животных, получавших «Гринизацию» и заражённых вирусом A/PR/8/34(H1N1), пневмония протекает в намного более лёгкой форме, поражения миокарда, перикарда и печени значительно менее выражены, чем у мышей, контрольной группы, не получавших «Гринизацию».

- Экстраполируя эти результаты на людей, можно ожидать, что те, кто принимает комплекс «Гринизация» в эпидемический по гриппу период, в достаточно высокой степени более защищены (по крайней мере в десятки раз) от заболевания гриппом в тяжёлой форме. Особенно важно это знать лицам из групп риска: медработникам, преподавателям, работникам торговли и транспорта, лицам старше 65 лет.

- Для выявления возможных механизмов защитного противогриппозного действия «Гринизации» необходимо исследовать влияние её курса на динамику накопления вируса в лёгких, бактериологические и патоморфологические показатели при моделировании несмертельной формы экспериментального гриппа у мышей.

- Целесообразно провести изучение противогриппозного действия МНФК «Грин Про I» и МНФК «Грин Микс I» при моделировании экспериментальной инфекции у мышей с помощью штамма с антигенной формулой H3N2.

”УТВЕРЖДАЮ”

Директор ГУ «Украинский научно-исследовательский

противочумный институт имени И.И.Мечникова» МЗ Украины (ГУ «УНИПЧИ»)

С.В.Поздняков
2009г.



ОТЧЕТ

по договору № 28/н от 21 сентября 2009 года между ГУ «УНИПЧИ» (Исполнитель) и Институтом здоровья нации (Заказчик)

о выполнении научно-исследовательской работы

“Изучение противогриппозного действия МНФК «Грин Про I» и МНФК «Грин Микс I» при моделировании экспериментальной инфекции у мышей»

Этап 1: “Изучение противогриппозного действия МНФК «Грин Про I» и МНФК «Грин Микс I» при моделировании тяжёлой формы инфекции с помощью высоковирулентного штамма A/PR/8/34(H1N1)»

Руководитель темы:

Зам.директора по научной работе
к.м.н., с.н.с.

В.П.Лозицкий
В.П.Лозицкий

" 10 " XII 2009 г.

Ответственный исполнитель:

Зав.лабораторией иммуно-биологических и химио-терапевтических препаратов
к.б.н., с.н.с.

А.С.Федчук
А.С.Федчук

" _____ " _____ 2009 г.

Одесса – 2009

ИСПОЛНИТЕЛИ

Руководитель
исследований

Лозицкий В.П., к.м.н., с.н.с.
Зам. директора ГУ «УНИПЧ»
по научной раб

Ответственный
исполнитель

Федчук А.С., к.б.н., с.н.с
Зав. лабораторией
иммунобиологических и
химиотерапевтических
препаратов

Исполнитель

Мудрик Л.М. Науч. сотр. той
лаборатории

Исполнитель

Сочесло Л.В. Ст. лаб. той же
лаборатории

Исполнитель

Гридина Т.Л., к.б.н. Ст. науч
сотр. той же лаборатории

Консультант

Поздняков С.В., к.м.н.
Директор ГУ «УНИПЧИ»