Сокращения: *ОРВИ - острое респираторное вирусное заболевание; **ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь лёгких; ***ХОБ - хронический обструктивный бронхит; ****ВПЧ - вирус парагриппа человека; *****КНДР - китайская народная демократическая республика,

Санкт-Петербургский государственный университет

ОЦЕНКА ВИРУЛИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТВОРА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖЕВАТЕЛЬНОГО МАРМЕЛАДА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ОРВИ in vitro (на основании отчета НИИ ГРИППа №НИР-ЛХТ-СА-04/2023)

Шаров А.Н.[1], Носова М.А.[2], Привалова К.А.[3], Галочкина А.А.[4], Штро А.А.[4], Михайлова Е.С.[5]

[1]«Стоматологический магазин «РОМАШКА», [2]СамГМУ, [3]ПСПбГМУ, [4]НИИ ГРИППа, [5]СПбГУ

NB *Настоящее исследование приведено для демонстрации возможностей отечественных фитотерапевтических комплексов в различных формах выпуска для применения в стоматологии.*

Аннотация

Р***азработан*** комплекс растительных и химических компонентов в форме жевательного мармелада для профилактики кариеса, нормализации флоры полости рта и лечения и профилактики заболеваний пародонта.

#

Ц***ель работы*** **-** оценка вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении вирусов респираторной группы: ГРИПП типа А и В, респираторно-синцитиального вируса, риновируса, коронавируса и вируса парагриппа в лабораторном исследовании in vitro при белковой нагрузке и без неё.

#

Р***аствор*** для приготовления жевательного мармелада обладает эффективной вирулицидной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и В, респираторно-синцитиального вируса, риновируса, коронавируса, а также вируса парагриппа при исследовании суспензионным методом. На аденовирус комплекс не оказывает влияния.

Введение

1. Респираторные вирусные инфекции представляют острую проблему, вызывая ежегодные эпидемии в масштабах планеты, например, ГРИППом каждый год болеют 5-15% населения Земли, при этом из них от вирусной инфекции умирают не менее 250 000 человек [1].
2. Респираторно-синцитиальный вирус - основная причина развития острых респираторных заболеваний негриппозной этиологии у детей младше 2 лет (**ОРВИ***) [2].
3. Риновирусная инфекция не только ежегодно поражает широкие слои населения, но и является ко-патогеном у многих хронических легочных заболеваний, например **ХОБЛ**** и **ХОБ***** [3].
4. Вирусы парагриппа человека (**ВПЧ******) обычно вызывают заболевания верхних и нижних дыхательных путей у младенцев, маленьких детей, пожилых людей и людей с ослабленной инфекцией иммунной системой [4].
5. Коронавирус **SARS-CoV-2** является причиной пандемии **COVID-19 -** тяжелого инфекционного респираторного заболевания с высокой смертностью. С момента первых сообщений из Уханя (**КНДР*******) об инфицировании случаи заболеваемости были зафиксированы на всех континентах. На сегодня во всем мире зарегистрировано более **500.000.000** подтвержденных случаев **COVID-19** [6].
6. Несмотря на успехи **вакцинопрофилактики**, она не является гарантией защиты потенциального пациента от заболевания в связи с высокой скоростью мутаций циркулирующих в популяции вирусов. Для многих вирусов, вызывающих респираторные заболевания, вакцины нет [7].
Таким образом, возникает необходимость в разработке новых средств **неспецифической профилактики** респираторных инфекций.
Настоящая работа посвящена изучению вирулицидной активности против ОРВИ раствора для приготовления жевательного мармелада суспензионным методом.

Контакты авторов

Алексей Николаевич Шаров
ООО «Стоматологический магазин «РОМАШКА»
hamomilla.rf@gmail.com
hamomilla.ru хамомилла.рф
+7 (812) 642-16-12; +7 (964) 342-16-12

Материалы и методы

Эксперименты по изучению вирулицидной активности in vitro проводили на культурах клеток (препараты по СОП НИИ ГРИППА им. Смородинцева):
1. MDCK (клетки почки собаки),
2. Hep-2 (клетки эпидермоидной карциномы гортани человека),
3. Vero E6 (клетки почки африканской зеленой мартышки).
Пассажный уровень после разморозки не превышал 20 пассажей.
Вирусы:
1. Вирус гриппа типа А, штамм A/Aichi/2/68(H3N2),
2. вирус гриппа типа В, штамм B/Malaysia/2506/04,
3. Респираторно-синцитиальный вирус, штамм А2,
4. Риновирус штамм рино/1а/Ленинград/78,
5. вирус парагриппа 3 типа, штамм III v2932,
6. Коронавирус HCoV-19/Russia/StPetersburg-RII3524VR4/2020 коллекции отдела вирусологии Института Экспериментальной Медицины.
Активность образцов оценивали согласно МУ Роспротребнадзора 3.5.2431-08.
В работе использовали следующие методы:
1. иммуноферментный анализ, **2.** реакция гемагглютинации, **3.** метод визуальной оценки цитопатогенного действия вируса, **4.** метод Мосмана (МТТ-тест), **5.** суспензионный метод оценки вирулицидной активности.

Результаты и обсуждение

1. Воздействие раствора для приготовления жевательного мармелада на суспензию, содержащую вирус гриппа А и В, респираторно-синцитиальный вирус и вирус парагриппа приводит к снижению титра всех вирусов ниже предела детекции независимо от наличия белковой нагрузки (загрязнения).
2. Существенная вирулицидная активность исследуемого раствора при воздействии на риновирус и коронавирус была зафиксирована только в отсутствии белковой нагрузки. При наличии белковой нагрузки в экспериментах с риновирусом и коронавирусом наблюдали отсутствие репликации вируса как в контрольных, так и в опытных образцах.
3. Таким образом, при обработке вируссодержащих суспензий исследуемым раствором в условиях отсутствия белковой нагрузки в течение 0-60 минут достигается полная инактивация всех исследованных вирусов (вирусов гриппа А и В, парагриппа, респираторно-синцитиального вируса и коронавируса).
4. В экспериментах с аденовирусом раствор для приготовления жевательного мармелада не снижал титр вируса во всех временных точках исследования независимо от наличия белковой нагрузки.

Время воздействия препарата, минут	Белковая нагрузка	Среднее значение титра, $lgТИД_{50}$	Разница по сравнению с контролем	% снижения инфекционной активности по сравнению с контролем
Контроль вируса	Нет	2,83±0,29	–	–
0		0,5±0,0	2,33	99,54
15		0,5±0,0	2,33	99,54
30		0,5±0,0	2,33	99,54
60		0,5±0,0	2,33	99,54

Таблица 1. Результаты исследования вирулицидной активности раствора для приготовления жевательного мармелада в отношении коронавируса суспензионным методом

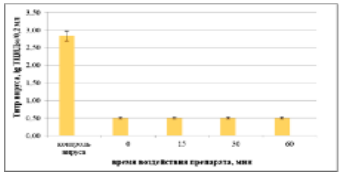

Рисунок 1. Результаты исследования вирулицидной активности исследуемого раствора в отношении коронавируса суспензионным методом без белковой нагрузки

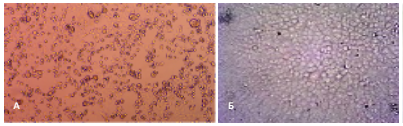

Рисунок 2. Воздействие исследуемого раствора на коронавирус. **А.** Инфицированная клеточная культура Vero E6, 2 сутки после заражения. **Б.** Клеточная культура Vero E6 после инактивации коронавируса исследуемым раствором

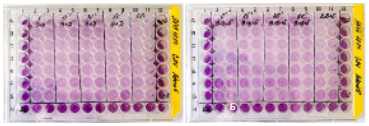

Рисунок 3. Оценка вирулицидной активности в отношении аденовируса 5 типа на культуре клеток А549 методом МТТ. **А.** без белковой нагрузки, **Б.** с белковой нагрузкой

Рисунок 1. Пастилки для жевания, рассасывания, проглатывания размером 2*2*1 см; правильной формы, квадратные и сглаженные с краев, однородные с включениями, темно-зеленого цвета, не прозрачные. Состав композиции жевательного мармелада.

Заключение

Показано, что раствор для приготовления жевательного мармелада обладает выраженной вирулицидной активностью в отношении всех исследуемых вирусов.
В опытах без белковой нагрузки происходила полная инактивация исследуемых вирусов во всех временных точках забора материала (0, 15, 30 и 60 минут).
В опытах с белковой нагрузкой у риновируса и коронавируса наблюдали отсутствие репликации вируса на культуре клеток, как в контрольных лунках, так и в лунках с исследуемым образцом. В связи, с чем невозможно оценить наличие вирулицидных свойств у данных вирусов при белковой нагрузке. В опытах с белковой нагрузкой у аденовируса было показано отсутствие вирулицидной активности у исследуемого раствора.

Библиографический список

1. Gasparini R., Amicizia D., Lai P.L., Bragazzi N.L., Panatto D. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part I: influenza life-cycle and currently available drugs// Journal of preventive medicine and hygiene – 2014 - V55(3) - P.69-85.
2. Карпова Л. С., Смородинцева Е. А., Сысоева Т. И., Столярова Т. П., Поповцева Н. М., Столяров К. А., Даниленко Д. М., Цыбалова Л. М. Распространенность РС-вирусной инфекции и других ОРВИ не гриппозной этиологии у детей и взрослых в регионах России в 2014 – 2016 годах // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика – 2018 - № 2 (99), С.16-26.
3. David A. Jans and Reena Ghildyal (eds.), Rhinoviruses: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1221, DOI 10.1007/978-1-4939-1571-2, © Springer Science+Business Media - New York – 2015.
4. Центр по контролю и профилактике заболеваний: официальный сайт. URL: https://www.cdc.gov/parainfluenza/symptoms.html (дата обращения: 04.05.2023).
5. Центр по контролю и профилактике заболеваний: официальный сайт. URL: https://www.cdc.gov/adenovirus/index.html (дата обращения: 04.05.2023).
6. Электронный ресурс для врачей и пациентов: официальный сайт. URL: https://www.uptodate.com/contents/covid-19-epidemiology-virology-and-prevention(дата обращения: 04.05.2023).
7. Острые респираторные заболевания // Дрейзин Р.С., Астафьева Н.В. – М.:Медицина, 1991. – С.52-67.
8. Reed, L.J. A simple method of estimating fifty percent endpoints // L.J. Reed, H. Muench / American Journal of Epidemiology. – 1938. – V.27. – P. 493-497.
9. Изучение и оценка вирулицидной активности дезинфицирующих средств: Методические указания—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010 – 39 с.