

## Отчет о лабораторных испытаниях иммуностимулирующей и противовирусной активности препарата ГМДП1 (GM-Ala-D-Glu-NH<sub>2</sub>) в отношении экспериментальной гриппозной инфекции.



Комиссия в составе: руководителя отдела биотехнологии д.м.н. профессора Носкова Ф.С., руководителя лаборатории респираторных вирусных инфекций д.м.н. профессора Фридман Э.А. и к.м.н. ст.н.с. Брянцева Е.А. проверили результаты биологических испытаний препарата под лабораторным шифром ГМДП, которые были проведены сотрудниками Ленинградского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.

Исследования проводили на модели экспериментальной гриппозной инфекции с использованием аллантаоисной культуры вируса штамм **А/Ленинград/399/76 (H3N2)**. Лабораторные животные – мыши линии СВА, С57BL/6 и беспородные белые мыши.

### Определение иммуностимулирующего действия.

Животных, по 10 особей в каждой группе, иммунизировали внутрибрюшинно, однократно или двукратно инактивированной вирионной хроматографической гриппозной вакциной (ИГВ) из штамма **А/Ленинград/399/76 (H3N2)** или **А/385/80(H3N2)**). Дозу антигена (вакцины) выражали через содержание в ней гемагглютинина. Содержание весового количества гемагглютинина (ГА) в вакцине определяли методом иммунодиффузии в геле агарозы. Критерием эффективности служило увеличение титра антител в крови мышей к вакцинному штамму вируса гриппа, регистрируемое в реакции торможения реакции гемагглютинации. Реакция торможения гемагглютинации ставили общепринятым методом. Сыворотки крови мышей до постановки РТГА не обрабатывали. Антитела определяли в РНГА с соответствующими диагностикумами. Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики, данные по группам сравнивали с использованием *t* критерия Стьюдента.

Исследования, проведенные ранее, показали, что ГМДП обладал иммуностимулирующей активностью в отношении инактивированной хроматографической гриппозной вакцины. Иммуностимулирующее действие зависело не только от дозы препарата, но в значительной степени и от дозы антигена. При оптимальной дозе препарата использование очень высоких доз антигена (9 мкг ГА на мыш), равно как и малых доз (0,9 мкг ГА на мыш) приводило к незначительному увеличению среднего геометрического титра антител (1,2–1,3 раза), в то время как введение антигена в дозе 4,5–8,0

мкг на мышь обуславливало нарастание титра антител в 1,8—2,5 раза ( $p < 0,01$ ).

Апликация иммуностимулятора при повторной вакцинации позволяла получить двукратный прирост антител при дозе препарата 1—2 мкг на мышь и при использовании вакцины 0,9 мкг ГА.

Зафиксированное нарастание титра антител под действием препарата способствовало защите животных от инфицирования. Заражение вирусом гриппа типа А однократно вакцинированных мышей, получавших и не получавших препарат, подтвердило выявленную ранее зависимость развития инфекционного процесса от уровня антиагглютининов. Созданный малой дозой антигена (0,9 мкг ГА/мышь) иммунитет не смог защитить мышь от инфицирования 1000ИД<sub>50</sub> вируса, однако, в отличие от невакцинированных, титр вируса в легких мышей этой группы был более чем на 2 порядка ниже. **Мыши, получившие одновременно ГМДП, были почти полностью защищены от инфицирования указанной выше дозой вируса на фоне двукратного увеличения титра гуморальных антител.** Средний геометрический титр вируса в легких мышей контрольной, иммунной и получившей ГМДП групп составлял соответственно — 3,4; 1,0; 0,3 lg.

Сравнительное изучение различных способов введения препарата показало, что наряду с внутривенным и внутрибрюшинным методами может быть использован и пероральный способ его апликации. Средний геометрический титр антител при двух последних способах составлял соответственно 362 и 388 при 208 в контроле.

Изучение возможности иммуностимуляции на разные сроки по отношению к введению антигена показало, что упомянутый препарат обладает довольно широким диапазоном действия во времени.

Введение его животным за 7 суток до вакцинации стимулировало двукратное нарастание титра антител по отношению к контролю (средний геометрический титр 1560 и 632 соответственно), не сколько меньшая активность получена при введении ГМДП на 1—4 сутки спустя после вакцинации.

### Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ).

Опыт проведен на мышах С57В16 с массой 16—18 гр. ИГВ из штамма А/Техас/77(Н3Н2) с активностью 6 мкг в 0,2 мл. Вакцину вводили внутрибрюшинно, двукратно. При второй иммунизации одновременно с вакциной введен ГМДП в дозе 100 мкг, кг. На 7 и 14 сутки определяли динамику накопления антител в РТГА и антигениндуцированную реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). В качестве антигена использовали очищенный методом адсорбции элюции и инактивированный ультрафиолетовым облучением вирус гриппа А/Техас/77 (Н3Н2) в дозе 128 ГЕ/0,1 мл. Объединенный от 4—5 животных пул спленоцитов культивировали в среде 199 с рядом добавок в 3 х параллелях.

Введение препарата при повторной иммунизации приводило к достоверному усилению ( $p < 0,001$ ) пролиферации спленоцитов под воздействием вирусного антигена *in vitro*. Индекс стимуляции в группе мышей, получавших препарат, превышал данный показатель для мышей контрольной группы в 2,9 раз. Различия в формировании гуморального титра антител в опытной и контрольной группах составляла соответственно 891 и 632 ( $p > 0,05$ ).

### Определение антиинфекционного действия ГМДП.

Для заражения мышей применяли аллантаоисную культуру вируса гриппа штамм А/Ленинград/399/76 (Н3Н2). Животных заражали интраназально, под легким эфирным наркозом, 1—10 ИД<sub>50</sub>.

Для определения антиинфекционного действия соединений на мышах часть животных получала препарат в разные сроки. На вторые сутки после заражения мышей вскрывали, извлекали легкие. Приготовленную из легких суспензию титровали на культуре переживающей хориоаллантаоисной оболочки (ХАО). О наличии антиинфекционного действия препарата судили по снижению вируса в легких мышей опытной группы по сравнению с контрольной. По изучению антитоксического действия препаратов критерием эффективности явилось различие в частоте гибели животных, получавших и не получавших препарат.

Влияние ГМДП на накопление вируса в легких инфицированных мышей изучали в зависимости от дозы и времени его введения. Дозы в количестве 5 и 10 мкг на мышь выбраны на основании полученных данных, как максимальные, но еще не оказывающие иммунодепрессивного действия.

Введение препарата в дозе 10 мкг/мышь на разные сроки по отношению к заражению показало, что оптимальным по эффективности является время 24 часа спустя после заражения. В этом случае зафиксировано снижение вируса в легких на 1 lg и более во всех опытах.

Введение препарата за 4 часа до инфицирования позволяло зарегистрировать снижение титра вируса в двух третях опытов.

Уменьшение дозы препарата до 5 мкг/мышь влекло за собой получение менее постоянных результатов независимо от сроков его введения. Путь введения препаратов не имел значения.

Сравнение антивирусной активности ГМДП с известным в экспериментальной практике антивирусным препаратом виразолом (рибавирином) выявило идентичную противовирусную активность обоих препаратов при использовании 1 заражающей дозы вируса.

Снижение содержания вируса в легких под влиянием перечисленных препаратов на 2 и 4 сутки с момента заражения мышей составляло 1,6—2,0 lg. Кроме того, поставлен эксперимент по изучению влияния ГМДП на характеристику инфекционного процесса, т.е. не только накопление вируса в легких, но и распространение его в организме за пределами дыхательного тракта. Также показано, что ГМДП, не сокращая частоту вирусемии, уменьшал накопление вируса в печени каждой отдельной мыши.

Таким образом, установлены иммуностимулирующие свойства ГМДП в отношении вирионной хроматографической гриппозной вакцины. Адъювантное действие ГМДП обнаружено как на уровне формирования клона антигенреактивных клеток, так и при определении содержания антител. Необходимым условием для проявления адъювантных свойств является подбор оптимальной дозы антигена. Действие ГМДП не зависело от способа его введения.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о способности исследуемого соединения влиять на накопление вируса в легких. **Снижение содержания вируса в легких**, как можно предположить, не обусловлено его непосредственным антивирусным действием, т.к. **при использовании ГМДП in vitro**, на культуре переживающей хориоаллантоисной оболочки, не обнаружено снижение титра вируса под действием препарата.

На основании выше изложенного показано, что соединение ГМДП обладает иммуностимулирующей активностью в отношении вирионной инактивированной хроматографической вакцины. Иммуностимулирующее действие препарата выявлено на уровне антигенреактивных клеток и гуморальных антител.

Наряду с иммуностимулирующим эффектом ГМДП обладает выраженной антиинфекционной активностью в отношении экспериментальной гриппозной инфекции.

Зав. отделом биотехнологии, профессор

Носков Ф.С.

Зав. Лабораторией респираторных вирусных инфекций, профессор

Фридман Э.А.

Ст. научн. сотрудник к.м.н.

Брянцева Е.А.