

Descriere:

Invenția se referă la virusologia medicală, în special la remediile antiherpetice.

Actualmente în virusologie se utilizează diverse preparate ce manifestă acțiune antiherpetică, posedând un grad divers de activitate.

Este cunoscută utilizarea pavstimului - 3-O-[β-D-xilopiranozil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranozil-(1→2)-O-β-D-glucopiranozil-(1→4)-O-β-D-glucopiranozil-(25R)-furostan-5α-2α, 3β, 22α, 26-tetraol-26-O-β-D-glucopiranozil) în calitate de stimulator al creșterii plantelor (castraveților). Pavstimul, fiind utilizat în doza de 1,6-2,0 g/kg, contribuie la creșterea imunității plantelor la boli virotice, capacității germinative, numărului de flori fertile, roadei timpurii și totale, precum și calității roadei [1].

Problema pe care o rezolvă invenția include lărgirea asortimentului inhibitorilor virusilor herpesului.

Problema se rezolvă prin utilizarea în calitate de inhibitor al virusilor herpetici a soluției de pavstim- 3-O-[β-D-xilopiranozil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranozil-(1→2)-O-β-D-glucopiranozil-(1→4) -O-β-D-glucopiranozil-(25R)-furostan-5α-2α, 3β, 22α, 26-tetraol-26-O-β-D-glucopiranozil) în concentrație finită de ≥0,025%, care s-a dovedit a fi cea mai optimă.

Pavstimul prezintă o substanță în formă de praf cristalin de culoare galben-cafeniu, rezistentă la acțiunea luminii, higroscopică, solubilă în apă, termenul de păstrare în ambalaj ermetic la temperatura camerei constituie 5 ani. Preparatul, fiind un metabolit derivat al plantelor superioare, nu posedă acțiune cito- și fitotoxică. Pavstimul se obține prin extragere din frunze de degețel-roșu (*Digitalis purpurea L.*) cu etanol de 70%. Extractul se usucă bine și se cromatografiază repetat în coloana cu selicogel.

Inactivarea materialului virusologic se efectuează prin adăugarea pavstimului în concentrație finită de 0,025%. Apoi amestecul se menține timp de 1 oră la temperatura de 37,0±0,1°C. Manifestarea acțiunii antivirotice a preparatului se evaluează prin determinarea și aprecierea indicelui de neutralizare a acțiunii infecțioase a virusilor *in vitro* și *in vivo*.

Acțiunea antivirotică a preparatului este demonstrată prin următoarele exemple.

Exemplul 1. Acțiunea antivirotică a substanței *in vitro*.

Virusul. Se folosește tulpina de virus herpetic simplu, tipul 1 (HSV-1), în cantitate de 5,5 lg ECP_{50/ml}.

Inhibitorul. Se folosește soluția de pavstim pregătită cu ser fiziologic ce nu posedă acțiune cito- și fitotoxică în concentrație de 0,1; 0,05; 0,025 și 0,0125%.

Pregătirea culturii celulare continue HEp-2. Preventiv se efectuează examinarea și aprecierea monostratului culturii celulare. Se selectează cultura cu monostratul celular compact, având o morfologie tipică liniei date de celule, cu hotarele clar pronunțate. Celulele se scot de pe pereții de sticlă ai flacoanelor speciale cu tripsină-versen. Pentru aceasta se pregătește un amestec de volume egale de 0,25% tripsină și 0,02% versen, care se încălzește în baie de apă până la 30-35°C. La început din flacoane se înlătură mediul de creștere, iar monostratul se spală de 3 ori cu soluție-tampon de fosfat (pH=7,5) ce nu conține ioni de calciu și magneziu. Apoi amestecul cald de tripsină-versen se aplică pe monostratul culturii celulare în așa mod ca toate sectoarele să fie acoperite de acest amestec. În flacoanele speciale cu volumul de 100,0; 250,0; 1000,0 ml se adaugă câte 10,0; 15,0 și 30,0 ml de amestec de tripsină-versen. Flacoanele se agită ușor și se introduc în termostat (37°C) timp de 15-20 min, până la desprinderea completă a celulelor de pe suprafața sticlei. Conglomeratele de celule mai mari se dispersează pipetând de câteva ori suspensia celulară. Suspensia de celule se centrifughează timp de 10 min la 1000 rot./min, iar amestecul de tripsină-versen se înlătură. Celulele sedimentate prin centrifugare se resuspensionează într-un volum nu prea mare de mediu de creștere 10-20,0 ml, iar numărul de celule se determină în camera Goreaev. Suspensia de celule se controlează la sterilitatea bacteriană și se diluează cu mediu de creștere în așa limită ca 1,0 ml să conțină aproximativ 60 mii de celule.

În calitate de mediu de creștere a celulelor se folosește mediul Eagle, mediul 199, mediul Eagle - MEM cu adăugarea serului bovin (7,0%) și antibioticelor. Cultura celulară continuă HEp-2 se toarnă în fiecare eprubetă în volum de 1,0 ml. În calitate de mediu de menținere se folosesc aceleași medii menționate mai sus, lipsite de serul bovin.

Determinarea cantitativă a HSV-1 în testul martor (virus + ser fiziologic)

Determinarea cantitativă a HSV-1 se efectuează în cultura celulară HEp-2 prin metoda diluției finite după efectul citopatic ECP și exprimat în lg ECP_{50/ml}. Pentru titrarea virusului la început se pregătesc diluții zecimale de la 10⁻¹ până la 10⁻⁶. În toate eprubetele se adaugă 9,0 ml ser fiziologic steril. Apoi în prima eprubetă se adaugă 1,0 ml material virusologic primar, astfel căpătând prima diluție de 10⁻¹ (1:10). Cu altă pipetă sterilă conținutul primei eprubete se amestecă minuțios, iar 1,0 ml se transferă în eprubeta a doua, căpătând diluția de 10⁻² (1:100) ș. a. m. d. până la 10⁻⁶.

Preventiv până la inocularea cu virus, monostratul celulelor HEp-2 se spală consecutiv de 3 ori cu soluție Henks, în scopul eliminării rămășițelor de ser bovin. La fiecare diluție zecimală de material virusologic se folosesc câte 4 eprubete cu cultură celulară. Materialul virusologic de fiecare diluție, separat în volum de 0,5 ml se amestecă cu 0,5 ml ser fiziologic, se incubează timp de 1 oră la 37°C, apoi se adaugă câte 0,1 ml în fiecare din cele 4 eprubete cu cultură celulară, în care anterior s-a adăugat câte 0,9 ml mediu de menținere. Eprubetele cu monostrat de celule inoculat se introduc în termostat la 37°C.

Starea monostratului culturii celulare inoculate periodic se examinează cu microscopul optic timp de 7 zile. Rezultatul ECP al virusului se apreciază pozitiv numai în cazul când cel puțin jumătate din celule au fost supuse degenerării.

Determinarea cantitativă a HSV-1 în testul experimental conform invenției (virus + pavstim). Tehnologia realizării acestui fragment de lucru este identică cu cea precedentă. Excepție prezintă faptul că virusul în diluții de la 10⁻¹ până la 10⁻⁶ în volum de 0,5 ml separat se amestecă cu 0,5 ml soluție de pavstim în concentrații de 0,1; 0,05; 0,025 și 0,0125%. Fiecare probă se incubează timp de 1 oră la 37°C, după care se adaugă câte 0,1 ml în fiecare din cele 4 eprubete cu monostrat de cultură celulară, în care anterior s-a adăugat mediu de menținere în volum de 0,9 ml. Eprubetele se montează orizontal în containere speciale și se introduc în termostat la 37°C.

Manifestarea acțiunii antivirotice a preparatului se controlează prin lipsa activității infecțioase a virusului herpesului, paralel manifestându-se ECP în cultura celulară HEp-2, admisibilă pentru reproducerea lui.

Determinarea activității antivirotice a pavstimului după cantitatea reziduală a virusului *in vitro*.

Starea culturii celulare inoculate și incubate la 37°C în termostat se examinează periodic cu microscopul optic timp de 7 zile, marcând eprubetele cu degenerare specifică a celulelor.

Gradul de degenerare specifică a monostratului de cultură celulară HEp-2 se apreciază conform sistemului de 4 puncte:

- (4+) - efect citopatic total în monostratul celular;
- (3+) - dezvoltarea efectului citopatic în monostratul celular la nivel de 75,0%;
- (2+) - efect citopatic la nivel de 50,0% al monostratului celular;

- (1+) - dezvoltarea efectului citopatic în monostratul celular la nivel mai jos de 50,0%;
- (-) - lipsa efectului citopatic în cultura de celule.

În calitate de martor se folosesc:

1. Cultura celulară intactă HEp-2 lipsită de pavstim în mediul de menținere;
2. Cultura celulară intactă HEp-2 cu prezența pavstimului în mediul de menținere;
3. Indicele activității infecțioase a HSV-1 nediluat și în diluții de la 10^{-1} până la 10^{-6} în cultura celulară HEp-2.

Efectul citopatic cauzat de virus este apreciat pozitiv numai în cazul când, cel puțin, o jumătate de monostrat celular este supus degenerării specifice. Evidența ECP al virusului se efectuează prin respectarea probelor martor menționate mai sus, anume: lipsa oricăror schimbări citomorfologice sau degenerative în monostratul de cultură celulară HEp-2 în prezența și lipsa în mediul de menținere a pavstimului, prezența virusului infecțios în cultura celulară inoculată cu material virotic nediluat și în diluții de la 10^{-1} până la 10^{-6} .

Cantitatea de virus în doze cu efect citopatic [ECP₅₀] se determină prin metoda probitelor, folosind în acest scop tabele speciale standard. După diferența în titrul virusilor ce s-au reprodus în lipsa și prezența în mediul de menținere a pavstimului se apreciază gradul de activitate antivirotică a substanței testate *in vitro*. Rezultatele investigațiilor experimentale sunt ilustrate în tab. 1, 2.

Exemplul 2. Acțiunea antivirotică a substanței *in vivo*.

Virusul. Se folosește suspensia ce conține virus, pregătită din creierii șoarecilor albi pieriți în urma inoculării lor cu HSV-1. Din creierii șoarecilor cu greutatea de 20,0 g pieriți după inoculare cu virus herpetic se pregătește o suspensie de 10,0% în ser fiziologic. Suspensia se centrifughează 20 min la 2000 rot./min, supernatantul obținut decontaminat de flora bacteriană, se folosește la pregătirea diluțiilor virusului (1:1,5; 1:2,5; 1:4,0; 1:6,5; 1:10,0; 1:100,0; 1:1000,0; 1:10000,0; 1:100000,0) în ser fiziologic.

Inhibitorul. La testare *in vivo* se folosește soluție de pavstim pregătită în ser fiziologic în concentrație de 0,1%, lipsită de efect cito- și fitotoxic.

Determinarea cantitativă a HSV-1 (virus + ser fiziologic și virus + pavstim). Se unesc volume egale de ser fiziologic (martor), 0,1% soluție de pavstim (test conform invenției) cu diluții în creștere ale virusului. Amestecul se agită 2-3 min și se introduce în termostat la 37°C timp de 1 oră. Ulterior, amestecul martor și amestecul experimental se inoculează intracerebral (câte 0,03 ml) șoarecilor albi cu greutatea de 20,0 g. Animalele experimentale infectate se supraveghează timp de 21 zile. În tab. 3, 4 sunt expuse rezultatele determinării cantitative a activității infecțioase a HSV-1.

Analiza rezultatelor: determinarea cantității reziduale de HSV-1 *in vitro*. Experiența (virus + ser fiziologic) demonstrează că această cantitate alcătuiește $4,9 \pm 0,20$ ECP_{50/ml} (tab. 1). Cantitatea de virus rezidual în amestecul de virus herpetic și pavstim a alcătuit 1,5; 1,7; 1,7 și 4,0 lg ECP_{50/ml}, unde diluția finită a pavstimului în mediul de menținere a culturii celulare a constituit 0,1; 0,05; 0,025 și 0,0125, respectiv. Calculele efectuate demonstrează că cantitatea de virus inactivat variază de la 99,9 până la 75,0% în funcție de gradul de diluare a pavstimului. Indicele de neutralizare a activității infecțioase a HSV-1 în cultura celulară HEp-2 de asemenea a variat de la 6,0 până la 1450 unități în funcție de concentrația finită a pavstimului în amestec după expunere. Așadar, investigațiile pentru determinarea activității antivirotice a pavstimului față de HSV-1 în experiențe *in vitro*, demonstrează că concentrația optimă de pavstim capabilă să manifeste acțiune antivirotică constituie $\geq 0,025\%$. De menționat că indicii de neutralizare a activității infecțioase a virusului herpetic a alcătuit 1450 unități.

Rezultate analoge s-au obținut și în urma realizării studiului de relevare a activității antivirotice a pavstimului *in vivo*. Este semnificativ faptul că cantitatea de HSV-1 rezidual infecțios în experiențele cu virus și ser fiziologic a constituit 4,1 DL_{50/0,03ml} (test martor), iar în probele experimentale (virus + pavstim) - 0,6 DL_{50/0,03 ml}, la concentrația finită a pavstimului de 0,025%. Indicele de neutralizare a activității infecțioase a HSV-1 *in vivo* a alcătuit 3,5 lg DL_{50/0,03 ml}, în unități antilogaritmice egal cu 3200, adică evident pozitiv.

Astfel, rezultatele căpătate demonstrează că pavstimul - un glicozid steroid de origine vegetală, manifestă o acțiune antiherpetică semnificativă *in vivo* și *in vitro*.

Tabelul 1

Rezultatele aprecierii cantitative a activității infecțioase a HSV-1 în prezența și lipsa pavstimului în mediul de menținere a culturii celulare HEp-2

Cantitatea de HSV-1, lg ECP _{50/ml}	Concentrația a finită a pavstimului în mediul de menținere a celulelor, %	Diluția suspensiei de virus herpetic și pavstim						Titrul virusului, lg ECP _{50/ml}	Indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului, log
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		
5,5	0,1	++++	+---	----	----	----	----	1,5±0,23	3,4
5,5	0,05	++++	----	----	----	----	----	1,7±0,23	3,2
5,5	0,025	++++	+---	----	----	----	----	1,7±0,23	3,2
5,5	0,0125	++++	++++	++--	+---	----	----	4,0±0,20	0,9
5,5	virus+ser fiziologic	++++	++++	++++	++--	----	----	4,9±0,23	0

Tabelul 2

Evaluarea comparativă a activității antivirotice a diferitelor doze de pavstim față de virusul herpetic HSV-1

Concentrația finită a pavstimului în mediul de menținere, %	Indicele de neutralizare a activității infecțioase a virusului introdus în apă / cantitatea de virus infecțios în suspensia de virus tratată cu pavstim, ECP _{50/ml} *
---	---

0,2	3/99,9 = 1450*
0,1	3/99,9 = 1450*
0,05	3/99,9 = 1450*
0,025	5,4/75,0 = 6*

- procentul inactivării virusului HSV-1;

* - este indicată cantitatea de virus în lg ECP_{50/ml} în suspensia de virus, după o oră de expunere la 37° cu pavstim.

Tabelul 3

Determinarea și aprecierea cantitativă a HSV-1 în amestecul de virus și ser fiziologic

Diluția finită a virusului	Numărul de animale supuse investigației				% letalității
	La fiecare diluție		Datele cumulative		
	au supraviețuit	au pierit	au supraviețuit	au pierit	
1:1,6	0	4	0	30	100,0
1:2,5	0	4	0	26	100,0
1:4,0	0	4	0	22	100,0
1:6,5	0	4	0	18	100,0
1:10,0	0	4	0	14	100,0
1:100,0	0	4	0	10	100,0
1:1000,0	1	3	1	6	85,7
1:10000,0	2	2	3	3	50,0
1:100000,0	3	1	6	1	14,3

Titul virusului în lg = 4,1 DL_{50/0,03 ml}.

Tabelul 4

Determinarea și aprecierea cantitativă a HSV-1 în amestecul de virus și pavstim

Diluția finită a virusului	Numărul de animale supuse investigației				% letalității
	La fiecare diluție		Datele cumulative		
	au supraviețuit	au pierit	au supraviețuit	au pierit	
1:1,6	1	3	1	12	92,3
1:2,5	1	3	2	9	81,8
1:4,0	3	1	5	6	54,5
1:6,5	2	2	7	5	41,7
1:10,0	2	2	9	3	25,0
1:100,0	4	0	13	1	7,1
1:1000,0	4	0	17	1	5,6
1:10000,0	3	1	20	1	4,8
1:100000,0	4	0	24	0	0

Titul virusului în lg = 0,6 DL_{50/0,03 ml}.