

ISSN 0372.9311

ЖУРНАЛ

МИКРОБИОЛОГИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И
ИММУНОБИОЛОГИИ

Издательский
дом

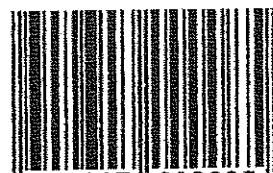


С-ИНФО

2 2011

JOURNAL

OF MICROBIOLOGY
EPIDEMIOLOGY
AND
IMMUNOBIOLOGY



4 602607 000085

Л.Н. Шишкина¹, В.Е. Небольсин²,
А.С. Кабанов¹, М.О. Скарнович¹,
Н.А. Мазуркова¹, А.А. Сергеев¹,
О.А. Серова¹, Е.А. Ставский¹, И.Г. Дроздов¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГАВИРИНА® IN VITRO И IN VIVO В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА A(H1N1/09)V

¹ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская обл.; ²ОАО «Валента Фармацевтика», Москва

Цель. Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1/09)v и штаммов вируса гриппа A(H5N1) и A(H3N2). **Материалы и методы.** В клеточной культуре MDCK оценивали изменение гемагглютинирующей и цитопатической активности штаммов вируса гриппа A(H1N1/09)v, A(H5N1) и A(H3N2) при инкубировании в присутствии Ингавирина® или Ремантадина®. У мышей, инфицированных штаммами вируса гриппа A(H1N1/09)v и A(H3N2), определяли титры вируса в легких при пероральном введении Ингавирина®, Тамифлю® или Ремантадина®. **Результаты.** При инкубировании с Ингавирином® *in vitro* снижалась гемагглютинирующая и цитопатическая активность штаммов вируса гриппа. Ингавирин® эффективно ингибировал размножение штаммов вируса гриппа A(H1N1/09)v и A(H3N2) в легких у инфицированных мышей. Титры этих штаммов в гомогенатах легких понижались при пероральном введении Ингавирина® инфицированным мышам. **Заключение.** Штаммы вируса гриппа A(H1N1/09)v были чувствительными к Ингавирину® и Тамифлю®, но нечувствительными к Ремантадину®. Используемые в работе референс-штаммы A(H5N1) и A(H3N2) были чувствительными к Ингавирину®, Тамифлю® и Ремантадину®.

Журн. микробиол., 2011, № 2, С. 93–96

Ключевые слова: вирус гриппа A(H1N1/09)v, мыши, Ингавирин®, Тамифлю®, Реманталин®, противовирусная активность

Анализ эпидемиологических данных свидетельствует о том, что случаи тяжелого заболевания и смерти во время пандемии гриппа A(H1N1)v в 2009–2010 годах, в основном, наблюдались среди людей в возрасте от 20 до 50 лет. Сообщается, что в смертельных и тяжелых случаях заболевшие люди обращались за медицинской помощью через 5–7 дней после наступления симптомов заболевания [3].

L.N. Shishkina¹, V.E. Nebolsin²,
A.S. Kabanov¹, M.O. Skarnovich¹,
N.A. Mazurkova¹, A.A. Sergeev¹,
O.A. Serova¹, E.A. Stavsky¹, I.G. Drozdov¹

IN VITRO AND IN VIVO EFFICACY OF INGAVIRIN® AGAINST STRAINS OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUS A(H1N1/09)V

¹State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region; ²«Valenta Pharmazevtika», Ltd, Moscow, Russia

Aim. To study efficacy of Ingavirin® *in vitro* and *in vivo* against strains of pandemic influenza virus A(H1N1/09)v and influenza virus A(H5N1) and A(H3N2). **Materials and methods.** Changes in hemagglutinating and cytopathic activity of influenza virus strains A(H1N1/09)v, A(H5N1) and A(H3N2) during their incubation in the presence of Ingavirin® or Remantadin® on MDCK cell culture were studied. In mice infected by influenza strains A(H1N1/09)v and A(H3N2) and orally treated with Ingavirin®, Tamiflu® or Remantadin® virus titers in lungs were measured. **Results.** There was decrease in hemagglutinating and cytopathic activity of influenza virus strains after incubation with Ingavirin® *in vitro*. Ingavirin® effectively inhibited reproduction of influenza virus strains A(H1N1/09)v and A(H3N2) in lungs of infected mice. Titers of these strains in lung homogenates decreased when Ingavirin® was orally administered to infected mice. **Conclusion.** Strains of influenza virus A(H1N1/09)v were susceptible to Ingavirin® and Tamiflu® but resistant to Remantadin®. Reference strains of A(H5N1) and A(H3N2) were susceptible to Ingavirin®, Tamiflu® and Remantadin®.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2011, No. 2, P. 93–96

Key words: influenza virus A(H1N1/09)v, mice, Ingavirin®, Tamiflu®, Remantadin®, antiviral activity

В январе–феврале 2010 г. активность пандемического гриппа H1N1/2009 в странах Европейского региона сохранялась, несмотря на тенденцию к снижению. Наиболее высокой она оставалась в Грузии, Польше, Сербии и Украине, а также в отдельных регионах РФ [6]. Международный опыт в области лечения пандемического гриппа H1N1/09 показывает, что плохие клинические результаты связаны

с поздним обращением за медицинской помощью и ограниченным доступом к симптоматической терапии [2, 3]. Существуют четыре противовирусных препарата, которые рекомендованы ВОЗ для лечения гриппа: амантадин и ремантадин (ингибиторы вирусного М2), озельтамивир и занамивир (ингибиторы вирусной нейраминидазы). Показано, что вирус гриппа А(H1N1/09)_v, который был выявлен у людей, устойчив к амантадину и ремантадину, но восприимчив к озельтамивиру и занамивиру [7].

Целью настоящего исследования является изучение эффективности отечественного препарата Ингавирин® *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А(H1N1) 2009 г и штаммов вируса гриппа А(H5N1) и А(H3N2).

Использовали штаммы вируса гриппа (ВГ): А/California/04/2009 (H1N1)_v и А/California/07/2009 (H1N1)_v, полученные из CDC (США); А/Moscow/225/2009 (H1N1)_v и А/Moscow/226/2009 (H1N1)_v, выделенные и охарактеризованные в ГНЦ ВБ «Вектор»; А/Chickem/Kurgan/05/2005 (H5N1) и А/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор». Штаммы А/California/07/2009 (H1N1)_v, А/Moscow/226/2009 (H1N1)_v, А/Aichi/2/68 (H3N2) были наработаны на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ); штаммы А/California/04/2009 (H1N1)_v и А/Moscow/225/2009 (H1N1)_v были наработаны в культуре клеток MDCK. Концентрацию вируса в исследуемых образцах определяли путем титрования на РКЭ или клетках MDCK, рассчитывали и выражали в лгЭИД₅₀/мл или в лгТЦД₅₀/мл по методу Спирмана-Кербера. Нарботанные и использованные в работе серии вирусосодержащей аллантоисной и культуральной жидкости хранили при -70°С.

Использовали Ингавирин® производства ОАО «Валента Фармацевтика» (Москва), Тамифлю® («Ф.Хоффманн — Ля Рош Лтд», Швейцария) и Ремантадин® (ООО «Розфарм», Россия). Оценка противовирусной эффективности препаратов осуществлялась по [5]. При проведении исследований *in vitro* препараты вносили в культуральную среду через 1 час после адсорбции вируса на клетках в конечных концентрациях в среде культивирования. Ингавирин® — 200 мкг/мл, Ремантадин® — 10 мкг/мл. При проведении исследований *in vivo* препараты вводили животным перорально в течение 5 сут после заражения вирусом гриппа в следующих дозах и схемах: Ингавирин® — 45 мкг/г массы мыши 1 раз в день, Тамифлю® — по 15 мкг/г массы мыши 2 раза в день, Ремантадин® — по 25 мкг/г массы мыши 2 раза в день.

Для тестирования противовирусной ак-

тивности препаратов использовали культуру клеток MDCK (клетки почки собаки). По 100 мкл суспензии клеток MDCK с концентрацией $1,0 - 1,5 \times 10^5$ кл./мл вносили в лунки 96-луночных планшетов. Планшеты с клетками помещали в термостат при 37°С, 5% CO₂ и 100% влажности на 1 — 2 сут до образования сплошного клеточного монослоя.

Готовили с 1 по 7 разведения вируса гриппа с десятикратным шагом в среде MDCK StemAlpha (Франция), содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK («Sigma», США). По 50 мкл разведений вируса вносили в лунки с клетками MDCK (по 6 лунок на каждое разведение). Через 1 ч адсорбции вируса в каждую лунку вносили исследуемые препараты в объеме 20 мкл и по 50 мкл питательной среды MDCK StemAlpha с 2 мкг/мл трипсина TPCK. В контрольные лунки вместо препаратов вносили по 100 мкл питательной среды MDCK StemAlpha с 2 мкг/мл трипсина TPCK.

Через 4 сут инкубирования клеток при 37°С в атмосфере 5% CO₂ в каждой лунке регистрировали наличие вируса по РГА с 0,5% эритроцитами кур. Определяли титры вируса в лгТЦД₅₀/мл в контроле (ИД₅₀ *in vitro* без препарата) и в опыте (ИД₅₀ *in vitro* с препаратом) и высчитывали индекс нейтрализации (ИН) вируса под влиянием препарата: ИН = ИД₅₀ контроль — ИД₅₀ опыт (лг). С целью определения, могут ли препараты оказывать влияние на репродукцию и инфекционную активность вируса гриппа, собирали культуральную жидкость из одного или двух рядов лунок с клетками, инфицированными одной или двумя наименьшими дозами вируса. Оценивали продукцию вируса в объединенных пробах из лунок каждого ряда по гемагглютинирующей (титр в РГА) и инфекционной (титр в лгТЦД₅₀/мл) активности, затем рассчитывали индекс подавления его продукции *in vitro* на основании разницы между титрами вируса в лунках с препаратами и без препаратов. Между контрольными и опытными образцами инфицированных клеток MDCK оценивали достоверность различий ($p=0,05$) по ИД₅₀ штамма вируса гриппа *in vitro* и по показателям репродукции вируса гриппа.

Использовали мышей BALB/c массой 15 — 17 г (ГНЦ ВБ «Вектор»). Проведение исследований и содержание животных осуществлялось в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и с [4].

Интраназальное инфицирование мышей проводили под легким эфирным наркозом, в обе ноздри мыши вносили соответствующее разведение вирусосодержащей жидкости в объеме 40 мкл. Для определения ИД₅₀ штаммов вируса гриппа по 6 мышей интраназально заражали 5 разведениями для каждого из

штаммов ВГ: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} . Через 5 сут получали гомогенаты легких и определяли в них наличие или отсутствие вируса после инфицирования РКЭ и детекции в них через 2 сут ВГ по РГА с 0,5% эритроцитами петуха. ИД₅₀ рассчитывали по методу Спирмана-Кербера в IgЭИД₅₀/голову. Далее в нижеописанных экспериментах использовали дозу, равную 10 ИД₅₀ для каждого штамма, применение которой приводило к инфицированию вирусом гриппа 100% мышей.

По 5 животных, получавших Ингавирин®, Тамифлю® или Ремантадин®, интраназально инфицировали вирусом гриппа в дозе 10 ИД₅₀ для контрольных животных. Через 5 сут после заражения определяли концентрацию ВГ в легких при титровании объединенных гомогенатов легких для мышей каждой группы на культуре клеток MDCK, рассчитывали по методу Спирмана-Кербера и выражали в ИД₅₀/мл. По разнице между титрами вируса в гомогенатах легких у мышей в контроле и опыте оценивали индекс подавления продукции вируса под влиянием препарата in vivo. Между контрольными и опытными группами инфицированных животных оценивали достоверность различий ($p=0,05$) по ИД₅₀ in vivo штаммов вируса гриппа и по величине титров вируса гриппа в легких у инфицированных животных.

Расчеты 50% инфицирующих доз и титров вируса гриппа в биологических образцах производили с помощью компьютерной программы по методу Спирмана-Кербера с оценкой достоверности отличий для 95% доверительного уровня (I_{95}).

При внесении Ингавирина® в клеточную культуру MDCK, инфицированную штаммом вируса гриппа, было показано, что инфекционность всех исследованных штаммов под его влиянием достоверно уменьшалась. Наблюдаемый диапазон индексов нейтрализации исследованных штаммов находился в пределах от 0,5 до 1,7 Ig. При этом наиболее высокий индекс нейтрализации достигался при инкубировании Ингавирина® со штаммом вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

При внесении Ремантадина® в клеточную культуру MDCK, инфицированную штаммом вируса гриппа, было показано, что под его влиянием достоверно уменьшалась инфекционность только двух исследованных штаммов: A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) при достижении соответствующих индексов нейтрализации 2,2 и 2,0 Ig. Штаммы вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1)v, A/California/07/2009 (H1N1) и A/Moscow/225/09 (H1N1)v и A/Moscow/226/09 (H1N1)v не изменяли своей инфекционности в клеточной культуре MDCK при инкубировании с Ремантадином®.

После оценки ИН на основании результатов РГА определяли продукцию каждого штамма вируса гриппа в лунках с клетками, инфицированными наиболее низкими дозами вируса, при которых наблюдалась РГА в $\leq 100\%$ лунок. Было обнаружено, что при инкубировании инфицированных клеток MDCK с Ингавирином® продукция исследованных штаммов вируса гриппа достоверно уменьшалась по показателям их инфекционности при титровании на клетках MDCK. Индексы подавления продукции штаммов вируса гриппа под влиянием Ингавирина® in vitro колебались в диапазоне от 0,7 до 3,2 Ig. При этом наиболее высокое значение индекса подавления продукции вируса in vitro наблюдалось при инкубировании Ингавирина® со штаммом вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

В то же время, продукция штаммов вируса гриппа A(H1N1)v в клетках MDCK под влиянием Ремантадина® не уменьшалась. При этом накопление штаммов вируса гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) достоверно снижалось под воздействием Ремантадина®; при инкубировании инфицированных клеток MDCK с Ремантадином® индексы подавления продукции штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) достигали значений 1,5 и 1,7 Ig при соответствующих дозах заражения 3,0 и 2,0 IgТЦД₅₀/50 мкл, а индексы подавления продукции штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) были равны 1,2 и 0,9 Ig при дозах заражения 2,3 и 1,3 IgТЦД₅₀/50 мкл соответственно.

Согласно данным литературы 100% инфицирование мышей при интраназальном заражении ВГ может наблюдаться в очень широком диапазоне доз от 5 до 50 ИД₅₀ [7]. В данной работе при проведении экспериментов по оценке противовирусной эффективности препаратов для 100% заражения мышей ВГ были использованы дозы, рассчитанные для контрольных мышей (без введения препаратов) с помощью пробит-метода, приблизительно равные 10 ИД₅₀ (далее ИД₁₀₀) для каждого штамма.

Было показано, что через 5 сут после заражения мышей дозами ВГ, равными ИД₁₀₀, титры вируса гриппа в легких мышей, получавших Ингавирин®, были достоверно ниже соответствующих контрольных величин. Индексы подавления продукции вируса под воздействием Ингавирина® для всех исследованных штаммов вируса гриппа были практически одинаковыми и находились в диапазоне 1,2 – 1,5 Ig.

Также было показано, что через 5 сут после заражения мышей дозами ВГ, равными ИД₁₀₀, титры всех штаммов вируса гриппа в легких мышей, получавших Тамифлю®, значительно

понижались по сравнению с соответствующими контрольными значениями. Индексы подавления продукции вируса под воздействием Тамифлю® для всех исследованных штаммов вируса гриппа были практически одинаковыми и изменялись в диапазоне 1,7 — 2,2 lg.

Под влиянием Ремантадина® через 5 сут после заражения мышей ИД₁₀₀ ВГ значения титров всех исследованных штаммов вируса гриппа А(Н1N1)_v в гомогенатах легких не изменялись относительно соответствующих контрольных показателей, тогда как концентрация штамма вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) в легких у мышей, получавших Ремантадин®, достоверно снижалась, при этом индекс подавления продукции вируса составлял 0,9 lg.

Полученные экспериментальные данные согласуются с ранее описанными результатами по противовирусной активности Ингавирина® [1]. Так, авторами было обнаружено подавление гемагглютинирующей активности штаммов А/California/04/2009 (H1N1)_v и А/California/07/2009 (H1N1)_v под влиянием Ингавирина®. Причем, показатель эффективности Ингавирина® по подавлению гемагглютинирующей активности этих штаммов был сопоставим с таковым в отношении штамма вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2). Изучение эффективности Ингавирина® в культуре клеток MDCK по подавлению цитопатической активности штаммов вируса гриппа А/California/04/2009 (H1N1)_v и А/California/07/2009 (H1N1)_v также свидетельствовало о том, что Ингавирин® эффективно ингибировал размножение вируса *in vitro*. При этом эффективность Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении подтипов вируса гриппа А(Н1N1) по подавлению цитопатической активности была сопоставима с таковыми показателями в отношении штаммов вируса гриппа А/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и А/Aichi/2/68 (H3N2) [1].

Обнаруженное нами снижение гемагглютинирующей и цитопатической активности вируса гриппа А в экспериментах *in vitro*, а также подавление его продукции в легких мышей под влиянием Ингавирина®, действующим веществом которого является имидазолпиретанамид пентандиовой кислоты, может осуществляться благодаря его прямому противовирусному действию, которое основано на подавлении репродукции вируса

гриппа на этапе ядерной фазы, задержке миграции нового синтезированного нуклеопротеина вируса из цитоплазмы в ядро.

Таким образом, при изучении эффективности Ингавирина® и Ремантадина® в культуре клеток MDCK, а также эффективности Ингавирина®, Тамифлю® и Ремантадина® в экспериментах на мышях, инфицированных штаммами пандемического вируса гриппа А/California/04/2009 (H1N1)_v, А/California/07/2009 (H1N1)_v, А/Moscow/225/09 (H1N1)_v, А/Moscow/226/09 (H1N1)_v, было показано наличие чувствительности этих штаммов к Ингавирина®, Тамифлю® и отсутствию чувствительности к Ремантадину®. При этом использованные в работе референс-штаммы вируса гриппа А/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и А/Aichi/2/68 (H3N2) были чувствительными к Ингавирина®, Тамифлю® и Ремантадину®.

ЛИТЕРАТУРА

1. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Лыков М.Э. и др. Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении «мексиканского» пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А, штаммы А/California/04/2009 и А/California/07/2009. Антибиот. химиотерап. 2009, 54 (3-4): 15-17.
2. Пандемия гриппа (H1N1) — 2009: обзор ситуации в Европейском регионе ВОЗ. <http://www.euro.who.int/influenza/AH1N1/2009>.
3. Пандемический грипп (H1N1) — 2009 Украина. http://www.who.int/csr/don/2009_11_01/ru/index.html.
4. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Washington D.C., National Academy Press, 1996.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Р.У.Хабриев (ред.), М. Медицина, 2005.
6. Снижение уровня пандемического гриппа в Европе 01-07 февраля 2010. <http://www.euro.who.int/influenza/AH1N1/2010>.
7. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses 20 August 2009. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf.

Поступила 10.08.10

Контактная информация: Шишкина Лариса Николаевна,
630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово, ГНЦ ВБ «Вектор», р.т. (383)363-47-68