



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

5

---

2012

ISSN 0507-4088  
9 770507 408005



издательство  
"МЕДИЦИНА"

---

## ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012  
УДК 615.281.8.03:578.831.9].015.4

В. В. Зарубаев<sup>1</sup>, А. В. Гаршинина<sup>1</sup>, Н. А. Калинина<sup>1</sup>, С. В. Беляевская<sup>1</sup>, А. К. Сироткин<sup>1</sup>, В. Е. Небольсин<sup>2</sup>,  
О. И. Киселев<sup>1</sup>, Д. В. Рейхарт<sup>3</sup>

### Влияние Ингавирина на ультраструктурные особенности морфогенеза парагриппозной инфекции *in vitro* и *in vivo*

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>ОАО «Валента Фармацевтика», Москва;  
<sup>3</sup>Первый Московский ГМУ им. И.М. Сеченова

---

Вирусы парагриппа человека вызывают поражения верхних дыхательных путей у пациентов всех возрастных групп. Основным противовирусным средством является рибавирин, дающий серьезные побочные эффекты и назначаемый по жизненным показаниям. В настоящей работе при помощи электронной микроскопии показана активность препарата Ингавирин против вируса парагриппа человека в культуре клеток и на модели парагриппозной пневмонии у сирийских хомяков. Показано, что применение Ингавирина снижает количество вирионов потомства и проявления цитодеструктивного действия вируса. Эффект Ингавирина был идентичен действию рибавирина или превосходил его. В опытах *in vivo* продемонстрировано, что Ингавирин нормализует морфологическую картину легких, снижая степень деструкции альвеолоцитов, ограничивая почкование вирионов потомства и уменьшая количество воспалительного инфильтрата. Таким образом, сочетание противовирусных, цитопротекторных и противовоспалительных свойств Ингавирина делает его важной составляющей комплексной терапии парагриппозной инфекции человека.

Ключевые слова: Ингавирин, парагрипп, вирусная пневмония, противовирусные препараты

#### The Effect of Ingavirin on the Ultrastructural Properties of Morphogenesis of Parainfluenza *in vitro* and *in vivo*

V. V. Zarubaev<sup>1</sup>, A. V. Garshininina<sup>1</sup>, N. A. Kalinina<sup>1</sup>, S. V. Belyaevskaya<sup>1</sup>, A. K. Sirotkin<sup>1</sup>, V. E. Nebol'sin<sup>2</sup>,  
O. I. Kiselev<sup>1</sup>, and D. V. Reikhart<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup> JSC Valenta Pharmaceuticals, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Human parainfluenza viruses cause damage of upper respiratory tract in patients of all age groups. The main antiviral drug is Ribavirin, which has severe side effects and is prescribed only at life-threatening conditions. The activity of Ingavirin against human parainfluenza virus was demonstrated in this work both in cell culture and in the model of parainfluenza pneumonia in Syrian hamsters using transmission electron microscopy. The application of Ingavirin is shown to reduce the number of progeny virions and cytopathic effect of the virus. The effect of Ingavirin was similar or exceeded that of Ribavirin. In the *in vivo* experiments Ingavirin was shown to normalize the morphological structure of lungs, decreasing thereby the degree of destruction of alveolocytes. It also restricted budding of progeny virions and reduced the amount of inflammatory infiltrate. Thus, the combination of antiviral, cytoprotective, and anti-inflammatory properties makes Ingavirin an important component of comprehensive therapy of human parainfluenza infection.

Key words: Ingavirin, parainfluenza, viral pneumonia, antivirals

---

Контактная информация:

Зарубаев Владимир Викторович, канд. биол. наук, зав. лаб.; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru

## Введение

Вирусы парагриппа человека вызывают поражение верхних дыхательных путей у пациентов всех возрастных групп, при этом наибольшая тяжесть заболевания отмечается у детей в возрасте от полугода до 3 лет [1]. Заражение вирусом парагриппа приводит к развитию ларинготрахеобронхитов, бронхоолитов и в тяжелых случаях пневмоний. Иногда вирусы парагриппа обуславливают развитие острого респираторного дистресс-синдрома, миокардита, цистического фиброза, гепатита и ряда неврологических заболеваний, таких как подострый склерозирующий панэнцефалит и рассеянный склероз [1].

Для пациентов с иммунодефицитами той или иной природы (новорожденных, реципиентов костного мозга и донорских органов, ВИЧ-инфицированных, онкологических пациентов и т. п.) вирусы парагриппа, как и любые другие патогены, представляют особую опасность. В то же время выбор препаратов для лечения этой инфекции весьма скуден. Поэтому разработка как этиотропных препаратов, так и препаратов широкого спектра противовирусной активности является актуальной задачей медицинской науки и практического здравоохранения.

Сегодня основное противовирусное средство — рибавирин, активный в отношении 85% РНК-геномных вирусов человека. Являясь аналогом нуклеозидов, рибавирин приводит к угнетению кроветворения [2]. Помимо этого, опубликованный ВОЗ перечень побочных эффектов рибавирина включает 129 патологий [3], поэтому данный препарат назначают исключительно по жизненным показаниям. В частности, со стороны системы кроветворения отмечено уменьшение содержания гемоглобина вследствие гемолиза; возможно появление слабовыраженной анемии, лейкопении, гранулоцитопении, тромбоцитопении, со стороны эндокринной системы — нарушение функции щитовидной железы (изменение содержания тиреотропного гормона (ТТГ)). Наблюдаются также аллергические реакции: кожная сыпь, крапивница, ангионевротический отек, бронхоспазм, анафилаксия.

Препараты интерферона и его индукторов не могут считаться основным средством терапии при парагриппозной инфекции, поскольку эффективны только при профилактическом применении. Как известно, вирусы парагриппа способны подавлять интерферониндуцированный противовирусный ответ [4, 5], что делает их относительно устойчивыми к влиянию как интерферона, так и его индукторов. В ряде исследований на модели парагриппозной инфекции у животных снижение активности патологического процесса было продемонстрировано при комбинированном применении специфических антител и противовоспалительных кортикостероидов [6].

В опытах *in vitro* [7] и *in vivo* [8] была показана активность препарата Ингавирин — низкомолекулярного аналога пептидоамина, выделенного из моллюска *Aplysia californica*, — в отношении вируса гриппа. Также была продемонстрирована способность Ингавирина снижать продукцию вируса парагриппа в культуре клеток [9] и репродукцию вируса и проявления отека и инфильтрации легких на модели парагриппозной пневмонии у хомячков [10]. Целью настоящего исследования

была оценка противовирусных свойств препарата Ингавирин в отношении вируса парагриппа человека при помощи методов электронной микроскопии.

## Материалы и методы

**Вирусы и клетки.** Для заражения клеток использовали вирус парагриппа человека 3-го типа (hPIV3) из музея вирусов ФГБУ НИИ гриппа, пассированный в клетках МА-104. Клетки МА-104, зараженные вирусом в дозе  $10^2$  ТЦИД<sub>50</sub> на клетку, культивировали на среде DMEM с 2% эмбриональной сыворотки.

**Препараты.** В работе использовали субстанцию препарата Ингавирин в виде белого кристаллического порошка. Аликвоты препарата разводили в среде для клеточных культур Игла MEM («БиолоТ», Санкт-Петербург, кат.# 1.3.3). Из полученного раствора были приготовлены необходимые разведения на среде MEM для экспериментов в культуре клеток.

В опытах по изучению морфогенеза вирусной инфекции в культуре клеток применяли Ингавирин в концентрации 200 мкг/мл. В качестве препарата сравнения использовали рибавирин (Виразол, «ICN Pharmaceuticals», США) в концентрации 20 мкг/мл. В опытах по моделированию парагриппозной инфекции у животных применяли Ингавирин в дозе 30 мг/кг, рибавирин — 50 мг/кг.

**Животные.** Для воспроизведения парагриппозной инфекции у лабораторных животных были использованы 4-недельные сирийские хомяки (*Mesocricetus auratus*). Новорожденных хомячков получали от половозрелых родителей и использовали в опытах через 4 нед после рождения. Животных в группы опыта подбирали методом случайной выборки.

**Экспериментальная парагриппозная инфекция.** Вирус вводили животным интраназально под эфирным наркозом в объеме 0,05 мл и дозе  $5 \cdot 10^4$  ТЦИД<sub>50</sub>. В каждую группу наблюдения брали по 3 хомяка. Препараты вводили перорально в объеме 0,2 мл через 12, 36 и 60 ч после инфицирования. В качестве плацебо животным контрольной группы вводили физиологический раствор (0,15M NaCl). В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы. Через 72 ч после заражения животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали легкие. Участки поражения размером 1×1 мм вырезали, измельчали лезвием в капле холодного 2,5% глутарового

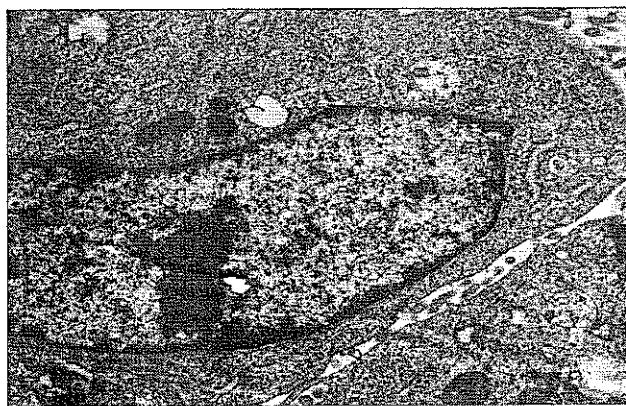


Рис. 1. Клетка интактной культуры МА-104. Ув. 5000.

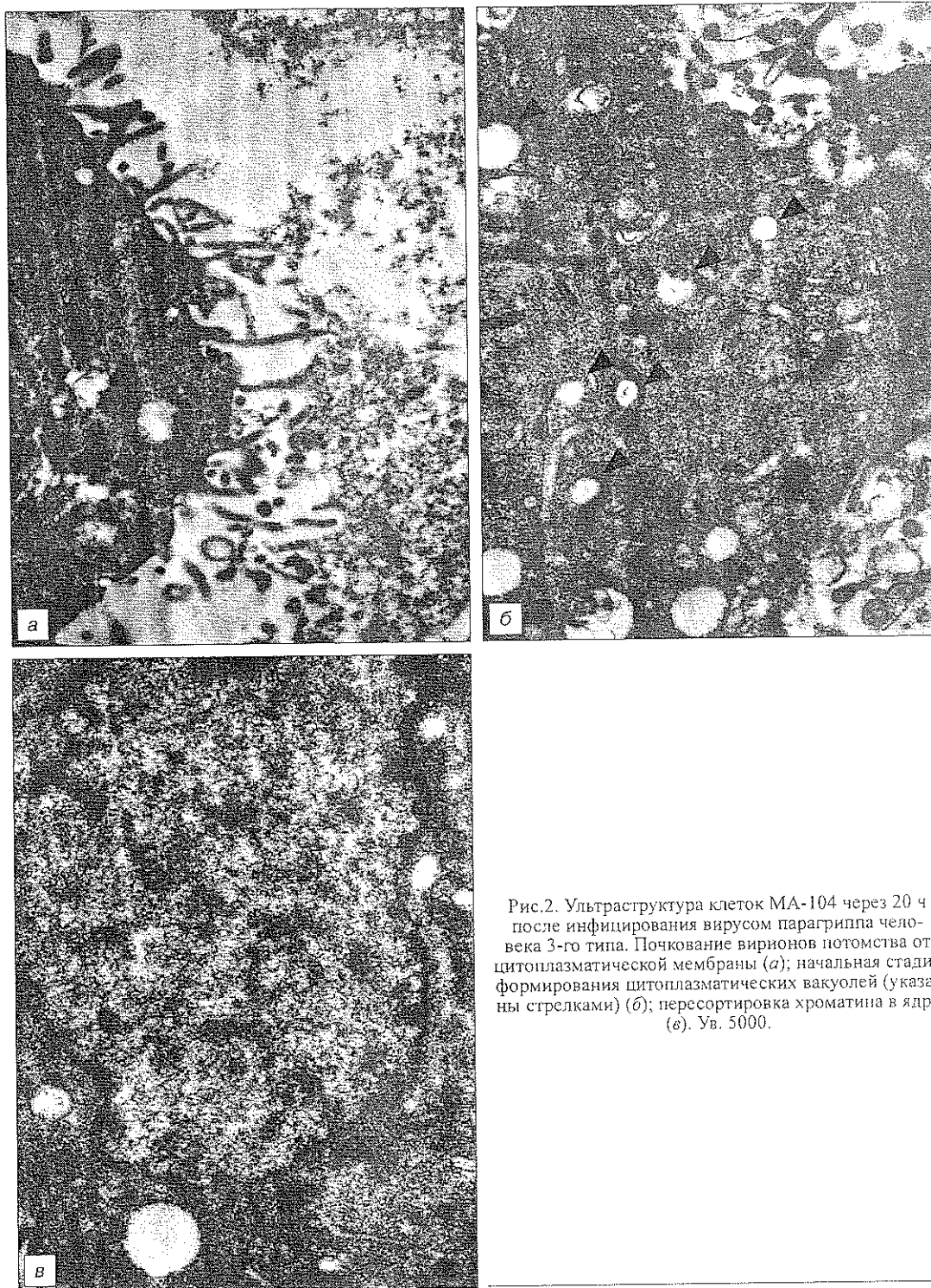


Рис.2. Ультраструктура клеток МА-104 через 20 ч после инфицирования вирусом парагриппа человека 3-го типа. Почкование вирионов потомства от цитоплазматической мембраны (а); начальная стадия формирования цитоплазматических вакуолей (указаны стрелками) (б); пересортировка хроматина в ядре (в). Ув. 5000.

альдегида на какодилатном буфере и хранили при 4°C.

**Электронно-микроскопические исследования.** Клетки МА-104 инкубировали с вирусосодержащим материалом в течение 1 ч при 37°C. Несвязавшийся вирус отмывали 2 раза стерильной средой DMEM и вносили в лунки препараты в необходимых концентрациях. Через 20 или 48 ч после заражения контрольные и опытные культуры клеток фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида на среде DMEM (рН 7,2), центрифугировали 20 мин при 2000 об/мин и фиксировали 2,5% раствором

OsO<sub>4</sub>. Клетки обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut («Reichert», Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S («JEOL», Япония) при инструментальном увеличении 5000—50 000. Фотосъемку производили на пленку ФТ-41МД.

Кусочки ткани легких фиксировали 2,5% раствором OsO<sub>4</sub>, обезвоживали ацетоном в возрастающей концен-

трации и заливали в смесь эпон-аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut («Reichert», Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S («JEOL», Япония) при инструментальном увеличении 5000—8000. Фотосъемку производили на пленку ФТ-41МД.

На полученных фотографиях оценивали степень деструкции альвеолоцитов, наличие или отсутствие клеток воспалительного инфильтрата, а также почкующихся вирионов.

### Результаты

**Морфогенез парагриппозной инфекции *in vitro*.** Как было показано в ходе ультраструктурных исследований, клетки интактной культуры МА-104 имели округлую или овальную форму и содержали крупное центрально расположенное ядро. В цитоплазме находились многочисленные округлые или овальные митохондрии, вакуоли гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети. В вакуолях определялись рыхлые округлые тела умеренной электронной плотности. Аппарат Гольджи был представлен скоплениями уплощенных цистерн, вакуолями и микропузырьками.

Ядерный хроматин в нуклеоплазме в виде конденсатов располагался по всему объему ядра или был частично смещен к периферии. В центре каждого ядра обнаруживались крупные ядрышки (рис. 1).

Клетки контрольной культуры, инфицированные hP1V3, через 20 ч после инфицирования несли первичные признаки цитопатогенного действия вируса. Клеточные органеллы в цитоплазме выглядели интактными. В самой цитоплазме начинались процессы вакуолизации, типичные для цитодеструктивного действия вируса парагриппа и других родственных вирусов семейства Paramyxoviridae (рис. 2, а). На поверхности клеточной мембраны отмечалось почкование многочисленных плейоморфных вирионов, имеющих характерную структуру (рис. 2, б). В ядрах инфицированных клеток наблюдалась патологическая пересортировка хроматина от периферии к центру (рис. 2, в).

Через 48 ч после инфицирования процессы вакуолизации клеток еще более усиливались. В цитоплазме клеток происходило формирование большого количества характерных цитопатических вакуолей размером 0,5—1 мкм с гетерогенным содержимым. Как и в предыдущий срок исследования, на плазматической мембране продолжалось формирование вирионов парагриппа (рис. 3).

Применение Ингавирина существенно ограничивало морфологические проявления как вирусной репликации, так и вирусиндуцированной цитопатологии. Так, в оба срока исследования (через 20 и 48 ч после инфицирования) количество почкующихся от клеточной поверхности вирионов было существенно меньше, чем в контрольных культурах. Такие признаки цитопатогенного действия вируса, как формирование цитопатических вакуолей, дегградация клеточных органелл, патологическое перераспределение хроматина в ядре, были также выражены в существенно меньшей степени по сравнению с контрольными клетками, куль-

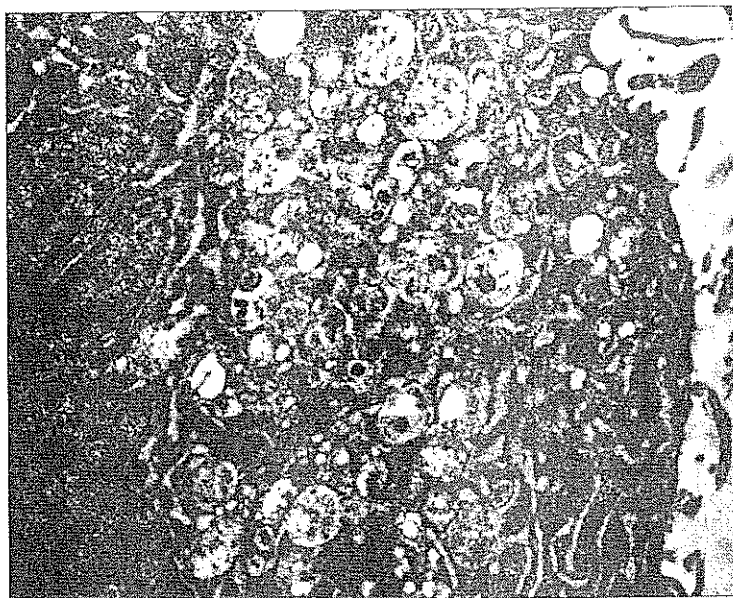


Рис.3. Ультраструктура клеток МА-104 через 48 ч после инфицирования вирусом парагриппа человека 3-го типа. Расширенные полости комплекса Гольджи и формирование многочисленных цитопатических вакуолей в цитоплазме клеток. Ув. 5000.

тивировавшимися без химиопрепаратов (рис.4, а, б).

Сходное влияние на морфогенез парагриппозной инфекции оказал препарат сравнения рибавирин. Как и Ингавирин, он приводил к снижению вирусной продукции и уменьшению проявлений цитопатогенности, в частности вакуолизации цитоплазмы. Ингибирующее действие рибавирина на цитодеструктивные процессы в цитоплазме проявлялось в равной или меньшей степени по сравнению с активностью Ингавирина (рис.5).

### Экспериментальная парагриппозная инфекция у животных.

В ходе опыта по определению протективной активности Ингавирина на животных неспецифическая смертность не зафиксирована ни в одной из групп животных.

Как было показано в ходе ультраструктурных исследований, легкие интактных животных имели типичную тканевую организацию, характерную для нормальных легких. Аэрогематический барьер выглядел интактным, в сосудах отмечались электронноплотные эритроциты, в альвеолах клеточные элементы отсутствовали. Эпителиальные клетки не содержали признаков цитопатогенности (рис.6).

Заражение вирусом парагриппа приводило к резким изменениям морфологической картины легких. Так, через 72 ч после инфицирования животных, как и в опытах в культуре клеток, в ядрах клеток наблюдались пересортировка хроматина и развитие многочисленных оформленных(фибрилярных) и диффузных ядерных включений различной плотности. В их составе были хорошо различимы типичные спиральные структуры, представляющие собой новосинтезированные рибонуклеопротеиды, еще не покрытые оболочкой. От поверхности клеток почковались многочисленные вирионы потомства. Кроме того, отмечались выраженная вакуолизация инфицированных клеток и скопление серозной жидкости и клеточного детрита в просветах альвеол.

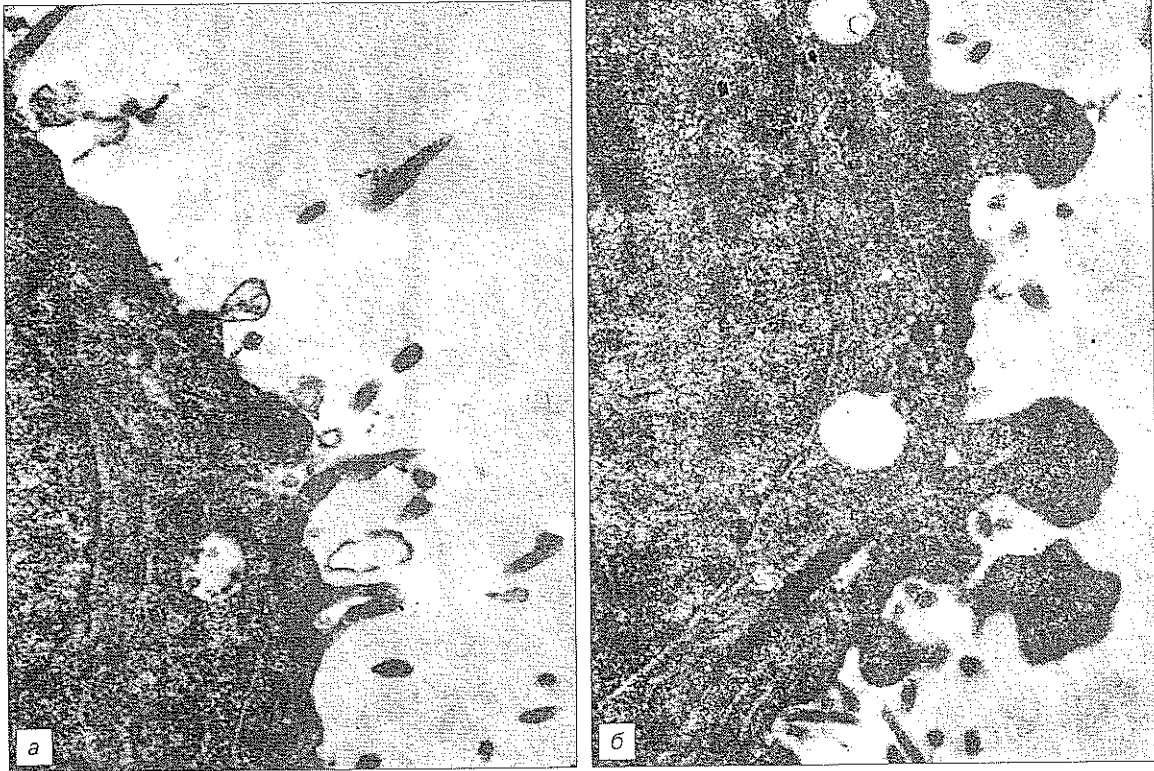


Рис. 4. Ультраструктура клеток МА-104 через 20 ч после инфицирования вирусом парагриппа 3-го типа в условиях применения Ингавирина. Почкование немногочисленных вирионов от клеточной поверхности (а); интактная структура цитоплазмы клеток (б). Ув. 5000.

Наблюдали реактивные процессы в виде многочисленных клеточных элементов в просветах альвеол (рис. 7).

**Применение Ингавирина** и препарата сравнения рибавирина оказывало сходное влияние на ультраструктурные особенности вирусной инфекции. Прежде всего оба препарата значительно нормализовали морфологическую картину легких по сравнению с наблюдаемой у контрольных животных.

Так, клетки альвеолярного эпителия выглядели интактными, вирусспецифическая пересортировка хроматина не отмечалась, почкование вирионов было ограниченным (рис. 8).

#### Обсуждение

Проведено исследование активности Ингавирина на модели парагриппозной инфекции в культуре

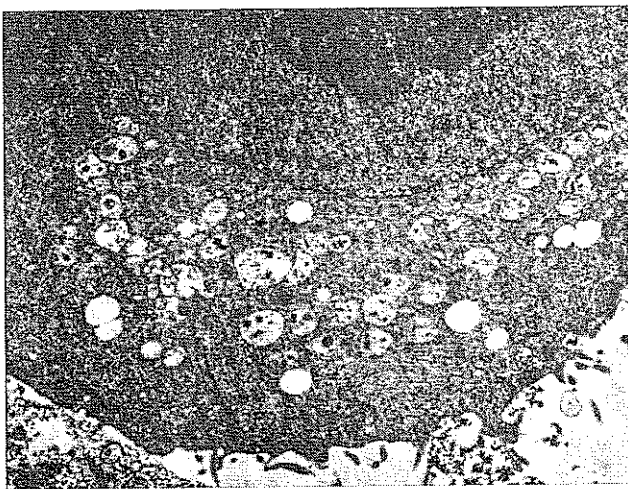


Рис. 5. Ультраструктура клеток МА-104 через 48 ч после инфицирования вирусом парагриппа 3-го типа в условиях применения рибавирина. Немногочисленные вирионы, почкующиеся от плазматической мембраны, умеренное количество цитопатогенных вакуолей в цитоплазме. Ув. 5000.

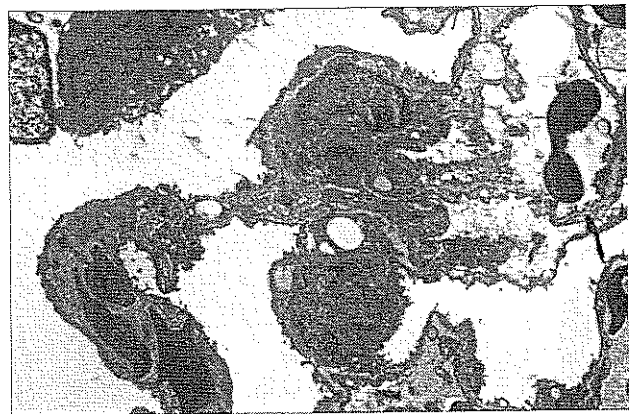


Рис. 6. Респираторные отделы легких интактного сирийского хомяка. Интактный аэрогематический барьер, слабая вакуолизация клеток, эритроциты в просветах сосудов. Альвеолярные полости воздушны. Ув. 2500.

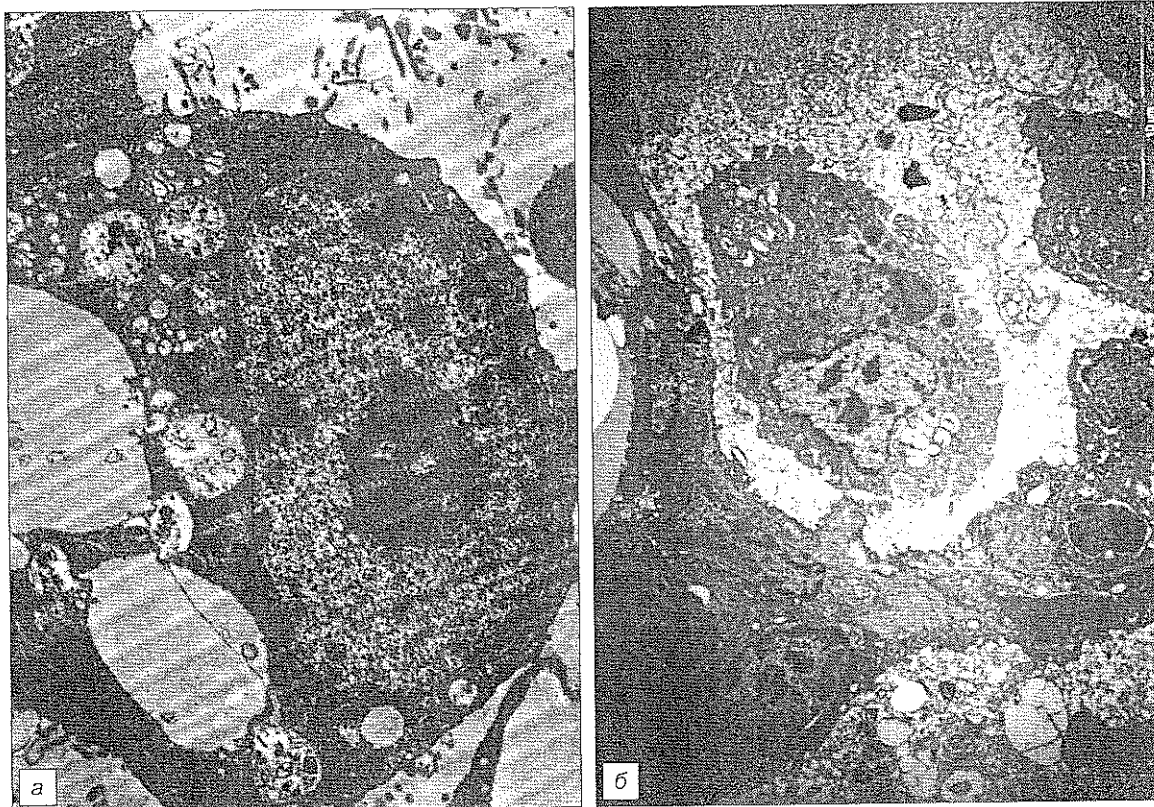


Рис 7. Морфогенез парагриппозной инфекции в легких сирийских хомяков через 72 ч после инфицирования вирусом парагриппа 3-го типа. Почкование вирионов потомства и выраженная вакуолизация цитоплазмы альвеолоцита (а); скопление серозной жидкости и воспалительного инфильтрата в альвеолярной полости легкого (б). Ув. 4000 (а), 6000 (б).

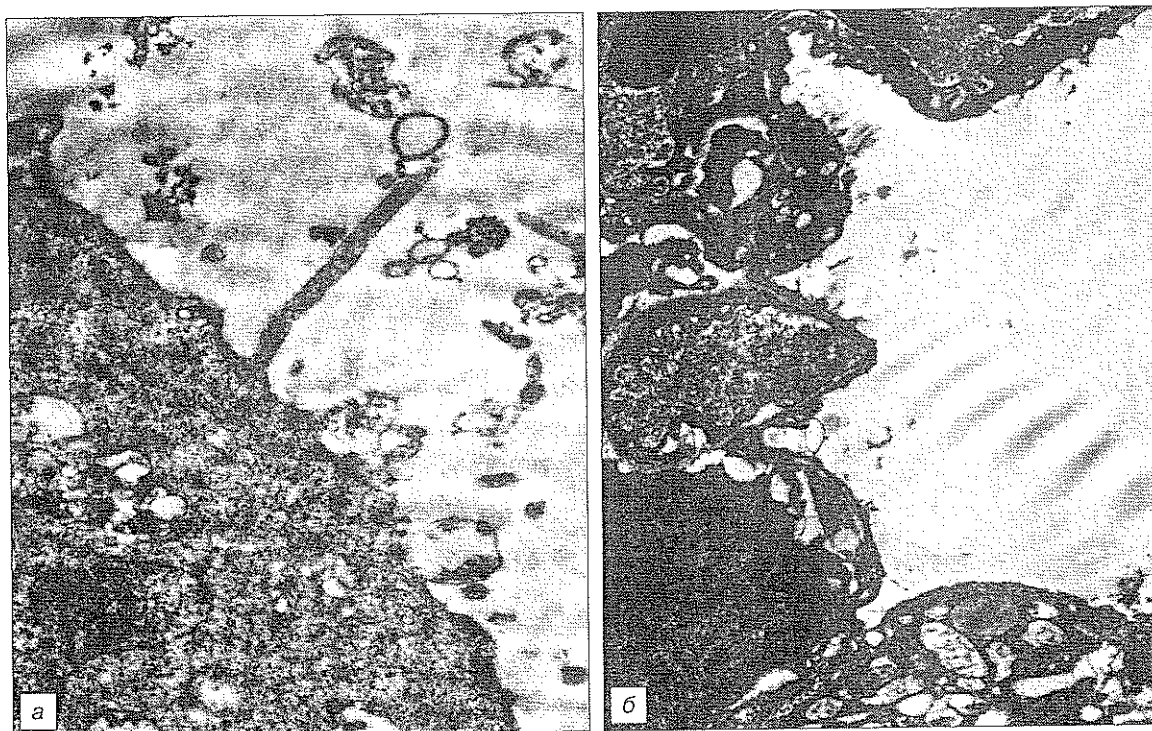


Рис 8. Морфогенез экспериментальной парагриппозной инфекции в легких сирийских хомяков на 3-и сутки после инфицирования вирусом парагриппа 3-го типа в условиях применения Ингавирина. Ограниченное почкование вирионов от поверхности альвеолоцита (а); структура альвеол. Альвеолоциты интактны или слабо вакуолизированы, в просвете альвеолы отсутствуют серозная жидкость и компоненты воспалительного инфильтрата (б). Ув. 10 000 (а), 5 000 (б).

клеток и в легких хомяков с помощью электронно-микроскопического анализа.

Сопоставление морфогенеза процессов в клетках, протекающих при инфицировании вирусом парагриппа, с литературными данными показало, что ультраструктурная картина парагриппозной инфекции, наблюдаемая в наших экспериментах, в целом согласовывалась с результатами аналогичных исследований, проведенных на вирусе парагриппа [11] и других парамиксовирусах — вирусе краснухи [12], кори [13] и бычьего парагриппа [14]. Показано, что применение Ингавирина снижает количество почкующихся вирионов потомства, а также существенно нормализует ультраструктуру цитоплазмы, снижая проявления цитодеструктивного действия вируса. В этом отношении эффект Ингавирина оказывался идентичным действию препарата сравнения рибавирина или превосходил его.

В опытах *in vivo* на модели экспериментальной парагриппозной пневмонии у сирийских хомяков продемонстрировано, что Ингавирин, как и препарат сравнения рибавирин, значительно нормализует морфологическую картину легких по сравнению с наблюдаемой у контрольных животных. Эта нормализация проявляется снижением степени деструкции альвеолоцитов, а также ограничением почкования вирионов потомства и отсутствием в альвеолярных полостях клеточных и серозных компонентов воспалительного инфильтрата, что свидетельствует также о противовоспалительных свойствах препарата. Если учесть гораздо более низкую токсичность Ингавирина по сравнению с рибавирином и приближенно одинаковое их влияние на интенсивность формирования вирионов потомства, есть основания говорить о преимуществах Ингавирина перед использованным препаратом сравнения.

Результаты, полученные в нашем исследовании, затрагивают лишь морфологическую сторону парагриппозной инфекции в клетках и у лабораторных животных. В то же время они хорошо согласуются с ранее полученными данными о способности Ингавирина снижать инфекционные титры этого вируса

в культуре клеток и ткани легких лабораторных животных. В связи с этим следует отметить, что сочетание в одном препарате противовирусных, цитопротекторных и противовоспалительных свойств делает его важной составляющей комплексной терапии парагриппозной инфекции человека.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Henrickson K. J.* Parainfluenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003; 16: 242—264.
2. *De Franceschi L., Fattovich G., Turrini F.* et al. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology* 2000; 31: 997—1004.
3. <http://www.fda-reports.com/ribavirin-ribavirin.html>
4. *Boonyaratankornkit J., Bartlett E., Schomacker H.* et al. The C proteins of human parainfluenza virus type 1 limit double-stranded RNA accumulation that would otherwise trigger activation of MDA5 and protein kinase R. *J. Virol.* 2011; 85 (4): 1495—1506.
5. *Saladino R., Ciambecchini U., Nencioni L., Palamara A. T.* Recent advances in the chemistry of parainfluenza-1 (Sendai) virus inhibitors. *Med. Res. Rev.* 2003; 23: 427—455.
6. *Prince G. A., Porter D. D.* Treatment of parainfluenza virus type 3 bronchiolitis and pneumonia in a cotton rat model using topical antibody and glucocorticosteroid. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 598—608.
7. *Логонова С. Я., Борисевич С. В., Лыков М. В.* и др. Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении «мексиканского» пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А, штаммы A/California/04/2009 и A/California/07/2009. *Антибиотики и химиотер.* 2009; 3—4: 15—17.
8. *Логонова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А.* и др. Изучение терапевтической эффективности нового отечественного препарата Ингавирин в отношении возбудителя гриппа А (H3N2). *Антибиотики и химиотер.* 2008; 53 (11—12): 27—30.
9. *Зарубаев В. В., Кривицкая В. З., Небольсин В. Е., Киселев О. И.* Экспериментальное исследование противовирусной активности Ингавирина против вируса парагриппа человека. *Антибиотики и химиотер.* 2010; 55 (7—8): 13—16.
10. *Зарубаев В. В., Гаришина А. В., Калинин Н. А.* и др. Лечение экспериментальной парагриппозной пневмонии у сирийских хомяков при помощи Ингавирина®. *Вопр. вирусол.* 2012.
11. *Hoglund S., Morein B. A.* Morphological study of unfolded and released parainfluenza type 3 virus. *J. Gen. Virol.* 1973; 21: 359—369.
12. *Risco C., Carrascosa J. L., Frey T. K.* Structural maturation of rubella virus in the Golgi complex. *Virology* 2003; 312: 261—269.
13. *Nakai M., Imagawa D. T.* Electron microscopy of measles virus replication. *J. Virol.* 1969; 3: 187—197.
14. *McLean A. M., Doane F. W.* The morphogenesis and cytopathology of bovine parainfluenza type 3 virus. *J. Gen. Virol.* 1971; 2: 271—279.

Поступила 30.05.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012  
УДК 578.828.3.083.2:577.21.08

*В. А. Плотников<sup>1</sup>, Т. В. Гребенникова<sup>1</sup>, А. Г. Южаков<sup>1</sup>, Е. К. Дудникова<sup>1</sup>, С. Н. Норкина<sup>1</sup>,  
А. Д. Забережский<sup>1</sup>, Т. И. Алипер<sup>1</sup>, А. М. Faddy<sup>2</sup>*

## Молекулярно-генетический анализ полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих на территории Российской Федерации

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва; <sup>2</sup>USDA-ARS Лаборатория онкологических заболеваний птиц (ADOL), Ист-Лансинг, США

Приведены результаты мониторинга вируса лейкоза птиц различных генотипов в коммерческих птицеводческих хозяйствах 14 регионов Российской Федерации. Только в трех областях вирус лейкоза птиц не был обнаружен. В остальных 11 областях вирус выявляли в 46—64% случаев. Проведен филогенетический анализ генома 12 полевых изолятов вируса лейкоза птиц, циркулирующих в коммерческих птицеводческих хозяйствах различных регионов РФ. Выделенные изоляты относятся к различным подтипам вируса и формируют 2 обширные группы. Геномные различия между российскими и зарубежными изолятами внутри соответствующих групп составляют от 5 до 10%.

Ключевые слова: вирус лейкоза птиц, ретровирусы, полимеразная цепная реакция