

Изучение противовирусной активности Ингавирина® в отношении возбудителя «мексиканского» пандемического гриппа A/H1N1/2009 *in vitro* и *in vivo*

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. Н. ЩУКИНА¹, М. В. ЛЫКОВ¹, Г. В. БОРИСЕВИЧ¹,
В. П. БОНДАРЕВ¹, В. Е. НЕБОЛЬСИН², О. А. СУТОЧНИКОВА³, А. Г. ЧУЧАЛИН³

¹ Филиал федерального государственного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» – «Вирусологический центр», *Сергиев Посад*

² Открытое акционерное общество «Валента Фармацевтика», *Москва*;

³ Научно-исследовательский институт пульмонологии, *Москва*

Study of Ingavirin® Antiviral Activity against Mexican Pandemic Influenza Virus A/H1N1/2009 *in vitro* and *in vivo*

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. N. SHCHUKINA, M. V. LYKOV, G. V. BORISEVICH,
V. P. BONDAREV, V. E. NEBOLSIN, O. A. SUTOCHNIKOVA, A. G. CHYCHALIN

Virusological Centre, Branch of Central Research Institute No. 48 of the Ministry of Defense of the Russian Federation, *Sergiev Posad*
Valenta Farm, *Moscow*

Research Institute of Pulmonology, *Moscow*

Изучена и доказана высокая противовирусная эффективность Ингавирина® *in vitro* и *in vivo* в сравнении с препаратом контроля Арбидолом® в отношении «мексиканского» пандемического вируса гриппа A/H1N1/2009, штаммы A/California/04/2009(H1N1) и A/California/07/2009(H1N1), при лечебном и профилактическом способе применения.

Ключевые слова: *грипп А (H1N1), Ингавирин®, противовирусная активность.*

High *in vitro* and *in vivo* efficacy of Ingavirin® against the Mexican pandemic influenza virus A/H1N1/2009, strains A/California/04/2009 (H1N1) and A/California/07/2009 (H1N1) vs. the reference drug Arbidol® was studied and verified when used therapeutically and prophylactically.

Key words: *influenza virus A (H1N1), Infavirin®, antiviral activity.*

В августе 2010 года Всемирная организация здравоохранения объявила о завершении пандемии гриппа A/H1N1/2009, в результате которой произошло замещение сезонного вируса гриппа A(H1N1) новым пандемическим возбудителем гриппа A(H1N1)-2009 [1]. Установившаяся циркуляция возбудителя гриппа A(H1N1)-2009 в сезон 2010/2011 гг. наравне с распространением вирусов гриппа A(H3N2) и B [2] обосновывает актуальность изучения эффективности нового отечественного противовирусного препарата Ингавирин® в отношении «мексиканского» пандемического вируса гриппа A/H1N1/09.

К настоящему времени стратегия отбора эффективных неспецифических медицинских средств защиты для многих вирусных инфекций

описана в руководствах по доклинической оценке лекарственных средств [3, 4].

Ранее была показана противовирусная эффективность *in vitro* и *in vivo* нового отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении эпидемически и предпандемически значимых подтипов H3N2, H5N1 вируса гриппа типа А, вируса гриппа В и аденовируса [5–11]. Кроме того, была показана эффективность Ингавирина® в отношении возбудителя пандемического гриппа A/H1N1/09 в культуре клеток MDCK [12]. На втором этапе исследований необходимо было провести оценку эффективности препарата на лабораторных животных и завершить исследование в культуре клеток.

Целью представленной работы являлась оценка эффективности Ингавирина® *in vitro* и *in vivo* в отношении «мексиканского» пандемического вируса гриппа A/H1N1/09.

© Коллектив авторов, 2010

Адрес для корреспонденции: 141306 Московская обл., Сергиев Посад-6. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны

Таблица 1. Подавление цитопатического действия вируса гриппа А/Н1N1/09 препаратами в культуре клеток MDCK (n=3)

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Инфицирующий препарат — вирус гриппа А/Н1N1/09, штамм ...	Частота ЦПД	Коэффициент ингибирования цитопатической активности вируса, $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{X}}$, %
Ингавирин®	200	А/California/07/09	13/30	56,7±3,2
Арбидол®	25		19/30	36,7±3,2
Контроль без препарата			30/30	—
Ингавирин®	200	А/California/04/09	12/30	60,0±0,0
Арбидол®	25		19/30	36,7±3,2
Контроль без препарата			30/30	—

Таблица 2. Подавление образования специфического гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1/09 препаратами в культуре клеток MDCK (n=3)

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Инфицирующий препарат — вирус гриппа А/Н1N1/09, штамм ...	Уровень гемагглютинина, ГА, ед., $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{X}}$	Коэффициент ингибирования гемагглютинирующей активности вируса, $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{X}}$, %
Ингавирин®	200	А/California/07/09	13,3±2,7	58,3±8,3
Арбидол®	25		16,0±0,0	50,0±0,0
Контроль без препарата			32,0±0,0	—
Ингавирин®	200	А/California/04/09	2,7±0,7	66,7±8,3
Арбидол®	25		4,0±0,0	50,0±0,0
Контроль без препарата			8,0±0,0	—

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус гриппа, штаммы А/California/04/2009(Н1N1) и А/California/07/2009(Н1N1), полученные из ФГУ «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Все штаммы хранятся в Специализированной коллекции Филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ».

Культура клеток. Использована постоянная культура клеток почек собаки — MDCK. В качестве ростовой среды и среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Хенкса, содержащую 7,5 и 2% фетальной сыворотки теленка, соответственно.

Монослой клеток MDCK инфицировали вирусом гриппа А при температуре 37°C в течение 60 мин в дозе 0,001 ЦПД₅₀. Оценку цитопатической активности вируса в присутствии и отсутствии химиопрепаратов проводили с использованием светового микроскопа. Исследуемый препарат вносили спустя 1 час после инфицирования монослоя.

Лабораторные животные. Для моделирования экспериментальной формы гриппа А использовали белых мышей массой 10—12 г, полученных из вивария филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ».

Исследуемый препарат. Ингавирин® производства ОАО «Валента Фарм», Россия.

Препарат сравнения. Арбидол® производства ЗАО «Фармстандарт», Россия.

Титрование возбудителя гриппа А. Биологическую активность оценивали титрованием вирусосодержащей суспензии в РКЭ (lg ЭИД₅₀/мл) и по ЦПД в культуре клеток MDCK.

Оценка противовирусной эффективности Ингавирина® осуществлена в соответствии с официальными требованиями [4]. Изучение активности Ингавирина® в отношении вируса гриппа А проводили на белых мышях, инфицированных интраназально в дозе 1,1×10³ ИД₅₀. Препарат вводили по профилактической (за 5 суток до инфицирования, ежедневно однократно в дозе 5 мг/кг) и лечебной (через 24 ч после инфицирования и далее в течение 5 суток однократно в дозе 15 мг/кг) схемам.

Препарат контроля Арбидол® вводили в дозах и схемах в соответствии с Инструкцией по его медицинскому применению с учётом равноэквивалентности доз для человека.

Основными критериями оценки эффективности *in vitro* являлись:

- коэффициент ингибирования гемагглютинирующей активности (Ки, %);
- коэффициент подавления цитопатической активности вируса (%).

Основным критерием оценки эффективности препаратов *in vivo* являются показатели уровня ингибирования формирования специфического гемагглютинина и уровня накопления вируса в легких белых мышей на 5 и 7 сутки после инфицирования (Ки, % и Δ, lg).

Результаты и обсуждение

Результаты изучения эффективности лекарственных препаратов в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа, штаммы А/California/04/2009(Н1N1) и А/California/07/2009(Н1N1), по подавлению цитопатической активности вируса свидетельствуют, что Ингавирин® эффективно ингибирует размножение вируса в культуре клеток (табл. 1). Коэффициент подавления цитопатической активности вируса гриппа А (Н1N1) составил 60,0 и 56,7% для штаммов А/California/04/2009 и А/California/07/2009 соответственно. Арбидол® также ингибирует размножение вируса в культуре клеток, но в меньшей степени. Коэффициент подавления цитопатической активности составил 36,7% для обоих штаммов. Сравнительный анализ полученных данных установил, что препарат Ингавирин® статистически более эффективно (с вероятностью 0,95) подавляет цитопатическую активность обоих штаммов вируса гриппа А (Н1N1), чем Арбидол®. Важно отметить, что эффективность Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении нового подтипа Н1N1 вируса гриппа А по подавлению цитопатической активности сопоставима с таковыми показателями в отношении «сезонного» возбудителя гриппа А, подтип Н3N2 [10].

Таблица 3. Подавление накопления вируса гриппа, штамм А/California/07/2009, в лёгких интраназально инфицированных белых мышей при профилактическом и лечебном применении препаратов

Препарат	Схема введения	Доза препарата,	5 сутки после заражения		7 сутки после заражения	
			Уровень гемагглютинина, ГА, ед., $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{X}}$	Коэффициент ингибирования формирования специфического гемагглютинина в лёгких, $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{X}}$, процент	Уровень гемагглютинина, ГА, ед., $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{X}}$	Коэффициент ингибирования формирования специфического гемагглютинина в лёгких, $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{X}}$, процент
Ингавирин®	Профилактическая	5	6,7±1,3	89,6±2,1	4,0±0,0	83,4±4,2
Арбидол®		30	16,0±0,0	75,0±0,0	5,3±1,3	79,2±4,1
Контроль без препарата	—	—	64,0±0,0	—	26,7±5,3	—
Ингавирин®	Лечебная	15	5,3±1,3	89,6±2,1	4,0±0,0	83,4±4,2
Арбидол®		130	21,3±5,3	58,3±8,3	5,3±1,2	79,2±4,1
Контроль без препарата	—	—	53,3±10,6	—	26,7±5,3	—

При изучении способности Ингавирина® подавлять гемагглютинирующую активность штаммов А/California/04/2009(H1N1) и А/California/07/2009(H1N1) вируса гриппа в культуре клеток МДСК установлено, что исследуемый препарат подавляет формирование специфического гемагглютинина возбудителя на 66,7 и 58,3% соответственно (табл. 2). Показатель подавления формирования специфического гемагглютинина вируса гриппа для препарата Арбидол® составил 50,0% для обоих штаммов. Ингавирин® более эффективно ингибирует размножение вируса гриппа А(H1N1), штаммы А/California/04/2009 и А/California/07/2009 в культуре клеток МДСК, чем препарат сравнения Арбидол®.

Результаты изучения эффективности Ингавирина® в отношении экспериментальной гриппозной инфекции А/Н1N1/09 у белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм А/California/07/2009, в дозе $1,1 \times 10^3$ ИД₅₀ свидетельствуют о том, что препарат эффективно подавляет накопление вируса в лёгких животных (табл. 3) на 5 и 7 сутки после инфицирования (по уровню формирования специфического гемагглютинина). При применении Ингавирина® по схеме профилактики в дозе 5 мг/кг препарат подавляет образование специфического гемагглютинина в лёгких инфицированных белых мышей на 5 сутки после заражения животных на 89,6%; на 7 сутки — на 83,4%. Уровень накопления гемагглютинина при этом составил 6,7 и 4,0 ед. соответственно. Препарат сравнения Арбидол® менее эффективно, чем Ингавирин®, ингибирует формирование специфического гемагглютинина в лёгких белых мышей на протяжении всего срока наблюдения после инфицирования. На 5 и 7 сутки после заражения животных Арбидол® подавляет формирование специфического гемагглютинина вируса гриппа в органе-мишени при использовании его в качестве профилактичес-

кого средства на 75,0 и 79,2%, уровень накопления гемагглютинина при этом составил 16,0 и 5,3 ед. соответственно. Уровень гемагглютинина на вируса гриппа в лёгких инфицированных белых мышей, не получавших лекарственных препараты, составил на 5 сутки 64 ед., на 7 сутки — 26,7 ед. (см. табл. 3).

Таким образом, на 5 сутки после инфицирования изученные препараты, применяемые по профилактической схеме, достоверно эффективно (с вероятностью 0,95) подавляют формирование специфического гемагглютинина вируса гриппа А в лёгких интраназально инфицированных белых мышей, уровень накопления которого статистически достоверно ниже такового показателя в контрольной группе. При этом Ингавирин® более эффективно подавляет формирование специфического гемагглютинина в лёгких белых мышей, чем Арбидол® с уровнем значимости $p \leq 0,05$. На более поздних сроках наблюдения (7 сутки после инфицирования) только Ингавирин® достоверно с вероятностью 95% эффективно подавляет формирование специфического гемагглютинина в лёгких, уровень накопления которого статистически достоверно отличается от такового показателя в контрольной группе. Уровень формирования гемагглютинина при использовании Арбидола® значимо не отличается от контроля, т. е. достоверные отличия отсутствуют (см. табл. 3). При пероральном введении Ингавирина® по лечебной схеме в дозе 15 мг/кг препарат подавляет образование специфического гемагглютинина на 5 сутки после заражения животных на 89,6%; на 7 сутки — на 83,4% (см. табл. 3). Уровень накопления гемагглютинина при этом составил 5,3 и 4,0 ед. соответственно. Препарат сравнения Арбидол® при применении по лечебной схеме подавлял формирование специфического гемагглютинина на 5 сутки после заражения животных на 58,3%, на 7 сутки — на 79,2%. Уровень накопления гемагглютинина при

Таблица 4. Накопление вируса гриппа, штамм А/California/07/2009, в лёгких интраназально инфицированных белых мышей при профилактическом применении препаратов

Препарат	Доза препарата, мг/кг	Изучение биопроб на ... сутки после заражения	Уровень накопления вируса в лёгких, lgЭИД ₅₀ /мл, $X \pm \sigma_x$	Снижение уровня накопления вируса, Δ , lg, $X \pm \sigma_x$	Коэффициент ингибирования накопления вируса, %, $X \pm \sigma_x$
Ингавирин®	5	5	3,6±0,1	3,0±0,1	99,9±0,0
Арбидол®	30		4,8±0,1	1,9±0,1	98,6±0,2
Контроль без препарата	—		6,6±0,1	—	—
Ингавирин®	5	7	3,6±0,1	2,8±0,1	99,8±0,1
Арбидол®	30		5,0±0,2	1,4±0,2	95,5±2,8
Контроль без препарата	—		6,4±0,1	—	—

этом составил 21,3 и 5,3 ед. соответственно. Уровень гемагглютинаина вируса гриппа в лёгких инфицированных белых мышей, не получавших лекарственных препараты, составил на 5 сутки 53,3 ед., на 7 сутки — 26,7 ед. (табл. 3). Анализ полученных данных свидетельствует о том, что на 5 и 7 сутки после инфицирования Ингавирин®, применяемый по лечебной схеме, достоверно эффективно (с вероятностью 95%) подавляет формирование специфического гемагглютинаина в лёгких, уровень накопления которого статистически достоверно отличается от такового показателя в контрольной группе.

При изучении влияния Ингавирина® на репродукцию вируса гриппа, штамм А/California/07/2009, в лёгких интраназально инфицированных белых мышей было установлено, что при применении по схеме профилактики препарат на 5 сутки после заражения снижает уровень накопления вируса на 3,0 lg, при этом коэффициент ингибирования составил 99,9%. На 7 сутки после заражения Ингавирин® также высокоэффективно ингибировал накопление вируса в органе-мишени. Уровень снижения вируса в лёгких составил 2,8 lg, коэффициент ингибирования — 99,8% (табл. 4). Препарат сравнения Арбидол® при применении по схеме профилактики снижал накопление вируса на 5 и 7 сутки после заражения на 1,9 и 1,4 lg, при этом коэффициент ингибирования составил 98,6 и 95,5% соответственно. Анализ полученных результатов выявил, что на 5 сутки после инфицирования оба препарата, применяемые по профилактической схеме, достоверно (с вероятностью 95%) эффективно подавляют накопление вируса в лёгких, уровень накопления которого статистически достоверно ниже такового показателя в контрольной группе. Вместе с тем эффективность Ингавирина® по подавлению накопления вируса в лёгких белых мышей, выше эффективности Арбидола® с уровнем значимости $p \leq 0,05$. На 7 сутки после инфицирования изученные препараты достоверно (с вероятностью 95%) эффективно подавляют накопление вируса в лёгких, уровень накопления

которого статистически достоверно отличается от такового показателя в контрольной группе. Ингавирин® более эффективно подавляет накопление вируса в лёгких белых мышей, чем Арбидол® с уровнем значимости $p \leq 0,05$ (см. табл. 4).

При изучении влияния Ингавирина® на накопление вируса гриппа, штамм А/California/07/2009, в лёгких интраназально инфицированных белых мышей при применении по лечебной схеме было установлено, что препарат снижает уровень накопления вируса на 5 сутки после заражения на 2,5 lg, при этом коэффициент ингибирования составил 99,6%. На 7 сутки после заражения уровень накопления вируса снизился на 2,1 lg, коэффициент ингибирования составил 99,1% (табл. 5). Препарат сравнения Арбидол® подавляет размножение вируса гриппа А/Н1N1/09 в лёгких в течение 5 суток после инфицирования животных, о чем свидетельствует уровень накопления вируса — 2,6 lg и коэффициент ингибирования — 99,8%. На 7 сутки после инфицирования снижение репродукции вируса в лёгких белых мышей на фоне приёма Арбидола® составило всего 1,0 lg, коэффициент ингибирования — 90,4%. Сравнительный анализ результатов исследования эффективности препаратов в отношении вируса гриппа А/Н1N1/09 выявил, что на 5 сутки после инфицирования Ингавирин® и Арбидол®, применяемые по лечебной схеме, достоверно эффективно (с вероятностью 95%) подавляют накопление вируса в лёгких, уровень накопления которого статистически достоверно отличается от такового показателя в контрольной группе. На 7 сутки после инфицирования оба препарата достоверно эффективно (с вероятностью 95%) подавляют накопление вируса в лёгких, уровень накопления которого статистически достоверно меньше такового показателя в контрольной группе. При этом следует отметить, что Ингавирин® более эффективен, чем Арбидол® с уровнем значимости $p \leq 0,05$ (табл. 5).

Таким образом, результаты изучения эффективности Ингавирина® по подавлению ре-

Таблица 5. Накопление вируса гриппа, штамм А/California/07/2009, в лёгких интраназально инфицированных белых мышей при лечебном применении препаратов

Препарат	Доза препарата, мг/кг	Изучение биопроб на ... сутки после заражения	Уровень накопления вируса в лёгких, IgЭИД ₅₀ /мл, $X \pm \sigma_x$	Снижение уровня накопления вируса, $\Delta, \lg, X \pm \sigma_x$	Коэффициент ингибирования накопления вируса, %, $X \pm \sigma_x$
Ингавирин®	15	5	6,1±0,2	2,5±0,1	99,6±0,2
Арбидол®	130		6,0±0,1	2,6±0,1	99,8±0,0
Контроль без препарата	—		8,6±0,1	—	—
Ингавирин®	15	7	5,3±0,2	2,1±0,02	99,1±0,1
Арбидол®	130		6,4±0,1	1,0±0,1	90,4±1,8
Контроль без препарата	—		7,4±0,1	—	—

продукции вируса в лёгких белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм А/Калифорния/07/2009 (H1N1), выявили, что препарат эффективно подавляет накоп-

ление возбудителя в органе-мишени на 5 и 7 сутки после инфицирования при использовании его как по схеме профилактики, так и по схеме лечения [5, 6, 8, 9, 13].

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.who.int/>
2. www.en.wikipedia.org/wiki/2010_flu/
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2000.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005.
5. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др. Изучение лечебной эффективности нового отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2). Антибиотики и химиотер 2008; 7—8: 27—30.
6. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др. Изучение профилактической эффективности нового отечественного препарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2). Там же 2008; 11—12: 19—21.
7. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др. Изучение эффективности Ингавирин® *in vitro* в отношении возбудителя аденовирусной инфекции. Там же 2009; 7—8: 16—18.
8. Колобухина Л. В., Малышев Н. А., Меркулова Л. Н. и др. Изучение эффективности и безопасности нового противовирусного препарата Ингавирин® при лечении больных гриппом. Русс мед журн 2008; 22: 1—5.
9. Колобухина Л. В., Малышев Н. А., Меркулова Л. Н. и др. Эффективность Ингавирин® в лечении гриппа у взрослых. Тер архив 2009; 3: 54—57.
10. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др. Изучение противовирусной активности Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2) *in vitro*. Антибиотики и химиотер 2009; 9—10: 23—26.
11. Галегов Г. А., Андреева В. Л., Небольсин В. Е. Изучение противовирусной активности Ингавирин® в отношении сезонного вируса гриппа А (H1N1) в культуре клеток MDCK. Там же 2010; 9—10: 19—22.
12. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Лыков М. В. и др. Изучение эффективности Ингавирин® *in vitro* в отношении «мексиканского» пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А, штаммы А/California/04/2009 и штаммы А/California/07/2009. Там же 2009; 3—4: 15—17.
13. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Шкляева О. М. и др. Изучение профилактической и терапевтической эффективности нового отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H5N1). Там же 2010; 7—8: 10—12.