

Протективная активность препарата Ингавирин® при экспериментальной летальной гриппозной инфекции, вызванной пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1)v, у белых мышей

В. В. ЗАРУБАЕВ¹, А. В. ГАРШИННИНА¹, Н. А. КАЛИНИНА¹, А. А. ШТРО¹,
С. В. БЕЛЯЕВСКАЯ¹, В. Е. НЕБОЛЬСИН², О. И. КИСЕЛЕВ¹

¹ НИИ гриппа СЗО РАМН, Санкт-Петербург

² ОАО «Валента Фарм», Москва

Protective Activity of Ingavirin® in Experimental Lethal Influenza Due to Pandemic Influenza Virus A (H1N1)v (Albino Mice)

V. V. ZARUBAEV, A. V. GARSHININA, N. A. KALININA, A. A. SHTRO, S. V. BELYAEVSKAYA, V. E. NEBOLSIN, O. I. KISELEV

Research Institute of Influenza, North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg
JSC Valenta Pharma, Moscow

Несмотря на очевидные успехи в области разработки противогриппозной вакцины и химиотерапии, грипп остаётся плохо контролируемой инфекцией с высокой заболеваемостью и смертностью, ведущей к возникновению новых пандемических вариантов вируса. Нами было проведено на белых мышах изучение защитной активности Ингавирина® в отношении летального заболевания гриппом, вызываемого вирусом А (H1N1) 2009. При пероральном введении Ингавирина® наблюдалось резкое снижение смертности (защитный индекс до 57%), незначительное снижение инфекционного титра вируса в лёгких (до 40-кратного), нормализация динамики массы тела и структуры лёгочной ткани по сравнению с контролем (плацебо). Степень поражения эпителия бронхов также значительно снижалась. Полученные результаты позволяют рассматривать Ингавирин® как эффективное противовирусное средство в отношении циркулирующего в настоящее время вируса гриппа, вызвавшего пандемию.

Ключевые слова: вирус гриппа А (H1N1), белые мыши, Ингавирин®.

Despite obvious success in the vaccine development and chemotherapy of influenza, it remains a poorly controlled infection leading to emergence of new pandemic variants of the virus with high morbidity and mortality. We investigated the protective activity of Ingavirin® against the lethal influenza A(H1N1)2009 virus infection on albino mice. Oral use of Ingavirin® resulted in sharp decreasing of the mortality (index of protection up to 57%), slight decreasing of the infectious titer of the virus in the lungs (up to 40-fold), normalizing of the body weight dynamics and the lung tissue structure vs. the placebo-treated control. The degree of the bronchial epithelium damage was also strongly decreased. The results allow to consider Ingavirin® as an effective antiviral against the current pandemic influenza virus.

Key words: influenza virus A (H1N1), albino mice, Ingavirin®.

Введение

Грипп представляет собой широко распространённую во всем мире респираторную инфекцию. Он вызывает ежегодные эпидемии, быстро распространяющиеся из страны в страну, вовлекая в тяжелых случаях (пандемии) значительную часть человеческой популяции земного шара. Он также является причиной 20 000—40 000 смертельных исходов в США в год [1]. Несмотря на успехи, достигнутые в области химиотерапии, вакцинопрофилактики и иммунологии гриппа, он

остаётся трудно контролируемой инфекцией вследствие высокой генетической изменчивости и различных долговременных осложнений после острой стадии, приводящих к «скрытой», или вторичной, смертности, вызванной не самим вирусом гриппа, но вирусиндуцированными вторичными процессами [2].

Вакцинация против гриппа является эффективным противоэпидемическим средством, однако вследствие постоянной смены антигенных свойств возбудителя требуется постоянный мониторинг и разработка новых вакцинных штаммов, соответствующих циркулирующим в человеческой популяции в каждый конкретный эпидемический сезон.

© Коллектив авторов, 2010

Адрес для корреспонденции: 196376 Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17. НИИ гриппа СЗО РАМН

Новые вирусы гриппа птиц H5N1 и свиней H1N1, появившиеся в человеческой популяции в последние годы, являются опасным патогеном человека. Большинство человеческих изолятов вируса устойчивы к действию наиболее распространённого противогриппозного препарата — римантадина и способны эффективно подавлять интерфероновый ответ организма. Кроме того, серотипы этих вирусов являются новыми для иммунной системы человека, вследствие чего к этим возбудителям отсутствует коллективный иммунитет. Перечисленные свойства делают неэффективными такие способы защиты человека, как химиотерапия римантадином, специфический и неспецифический иммунный ответ.

Таким образом, ситуация, сложившаяся в последние два года в отношении инфицирования человека вирусом гриппа, придает особую актуальность поискам новых эффективных средств профилактики и борьбы с этой инфекцией.

Этиотропные противовирусные химические препараты представлены химическими соединениями двух групп, отличающихся по механизму действия и мишеням в жизненном цикле вируса гриппа. Препараты первой группы — римантадин (α-метил-1-адамантил-метиламина гидрохлорид) и амантадин (1-аминоадамантан) — блокируют белок M2 вируса гриппа, играющий роль ионного канала в вирусной мембране, препятствуя тем самым процессу расщепления гемагглютинина и слияния мембран вируса и лизосомальной вакуоли [3]. Препараты второй группы направлены на ингибирование вирусной нейраминидазы — фермента, необходимого для нормального почкования вирусных частиц и проявления инфекционных свойств вируса гриппа. К этой группе соединений относятся занамивир (5-(ацетиламино)-4-[(аминоиминометил)-амино]-2,6-ангидро-3,4,5-тридезокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-еноновая кислота) и осельтамивир (3R,4R,5S)-4-ацетиламино-5-амино-3-(1-этилпропокси)-циклогексен-1-карбоновой кислоты этиловый эфир, фосфат) [4]. Обе группы соединений имеют свои недостатки. В отношении группы производных адамантана можно отметить сравнительно высокую токсичность, узкий спектр действия (препараты активны против гриппа А, но не против гриппа В) и быстрое формирование устойчивости вируса к препаратам. В отношении ингибиторов нейраминидазы следует упомянуть способность к селекции устойчивых штаммов и высокую стоимость препаратов, что делает эти препараты менее доступными и менее эффективными для широкого использования.

Всё вышесказанное свидетельствует о необходимости поиска и разработки эффективных и доступных противогриппозных препаратов возможно более широкого спектра действия.

Целью настоящего исследования была оценка протривиральной активности препарата Ингавирин® (имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты) в отношении современного пандемического вируса гриппа *in vivo* на белых мышах.

Материал и методы

Препараты. В работе использовали препарат Ингавирин® производства ОАО «Валента Фарм» (Москва). Препарат суспендировали в среде для клеточных культур Игла МЕМ (Medium nutricum Iglu MEM sterilis fluidum, БиолоТ, Санкт-Петербург, кат. # 1.3.3). Из полученного раствора готовили необходимые разведения на среде МЕМ для экспериментов на животных.

В качестве референс-препаратов использовали Арбидол® (Фармстандарт, Россия) и Тамифлю® (F. Hoffmann-La Roche, Ltd., Швейцария). Препараты сравнения использовали по той же схеме, что и Ингавирин®.

Вирусы. В работе был использован адаптированный к мышам вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1)v. Вирус пассировали в аллантоисной полости 10—12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36°C.

Животные. Белых беспородных мышей (самки) массой 16—20 г получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария НИИ гриппа РАМН.

Экспериментальная гриппозная инфекция. Для заражения животных был использован гомогенат лёгочной ткани мышей, предварительно заражённых вирусом, на 3 сут после инфицирования. Из него готовили серию 10-кратных разведений на физиологическом растворе, после чего инфекционную активность вируса в заражающем материале определяли в отдельном эксперименте при помощи титрования по летальности на животных. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча (Am. J. Hyg., 1938, 27: 493—497).

Исследуемые препараты вводили животным перорально через желудочный зонд в объёме 0,2 мл по лечебной схеме (один раз в сутки в течение 5 дней начиная с 24 часов после инфицирования животных). Препараты сравнения применяли перорально по той же схеме. Дозы препаратов составили: Ингавирин® — 30 мг/кг, Арбидол® — 130 мг/кг, Тамифлю® — 20 мг/кг массы животных. Контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных.

Вирусы вводили животным интраназально под эфирным наркозом в дозе 1 и 5 LD₅₀ (средняя летальная доза вируса, необходимая для того, чтобы погибла половина членов испытываемой популяции). В каждую группу наблюдения брали по 30 мышей. На 3 день после заражения 10 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали лёгкие, которые использовали для выделения вируса и гистологического анализа (см. ниже).

Наблюдение за оставшимися животными осуществляли в течение 15 дней. Ежедневно фиксировали массу и смертность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных показателей смертности рассчитывали процент смертности, индекс защиты (отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных из расчёта 14 дней наблюдения.

Титрование вируса в лёгочной ткани. Для определения инфекционного титра вируса гриппа в лёгочной ткани лёгкие мышей, извлечённые на 3 сут после инфицирования гомогенизировали в десятикратном объёме стерильного физиологического фосфатного буфера и готовили из гомогенатов серию десятикратных разведений на том же буфере. Клетки MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells) заражали десятикратными разведениями гомогената от 10⁰ до 10⁻⁶ и инкубиро-

Таблица 1. Протективная активность Ингавирина® при экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А/California/07/09 (H1N1)v, у белых мышей

Препарат	Доза вируса, LD ₅₀	СПЖ, сут	Смертность, %	Индекс защиты, %
Ингавирин®	5	9,8±0,8*	55,0	38,9
	1	12,9±1,0*	25,0	54,5
Арбидол®	5	8,7±0,9	75,0	12,5
	1	10,8±0,7	45,0	21,7
Тамифлю®	5	11,7±0,6*	40,0	55,6
	1	13,6±0,7*	15,0	72,7
Контроль вируса	5	7,3±0,8	85,7	0,0
	1	9,8±1,0	57,5	0,0

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – отличия от контроля вируса достоверны при $p < 0,05$.

вали в течение 48 ч. По окончании срока инкубации уровень репродукции вируса оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% куриных эритроцитов. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса (lg ЭИД₅₀).

Гистологический анализ. Лёгкие фиксировали 10% формалином на фосфатном буфере, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и заключали в балзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Количественную оценку дегенеративных процессов в ткани лёгких проводили при помощи подсчёта клеток, находящихся на разных стадиях вирусиндуцированного патологического процесса. Среди клеток бронхиального эпителия подсчитывали число морфологически интактных клеток, клеток на ранних стадиях вирусного поражения (эозинофильные и базофильные включения в цитоплазме), на поздних стадиях деструкции (кариорексис, интенсивная грануляция цитоплазмы) и клеток, отторгнувшихся от базальной мембраны. Эти показатели выражали в процентах от общего числа подсчитанных клеток. В каждой группе опыта просматривали по 10 полей зрения, каждое из которых включало срез хотя бы одного бронха целиком.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов (расчёт средних значений и стандартных

отклонений) проводили при помощи программы Microsoft Excel. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия между группами, если параметр « p » не превышал 0,05.

Результаты и обсуждение

Протективная активность Ингавирина® в опытах на животных. В ходе опыта по определению протективной активности Ингавирина® на животных не было отмечено неспецифической смертности в контрольной группе интактных животных.

Клинические признаки заболевания были типичными для гриппозной инфекции. Они включали: затрудненное дыхание, атаксию, тремор, а также снижение потребления корма и воды. Данные по динамике смертности животных в контрольных и опытных группах суммированы в табл. 1 и на рис. 1.

Полученные данные показали, что адаптированный к животным вирус гриппа вызывал летальную пневмонию, приводящую к гибели 58–86% животных в зависимости от инфицирующей дозы. Ингавирин®, примененный по лечебной схеме, как и препарат сравнения Тамифлю®, оказали достоверное протективное действие. Это действие выразалось в значительном снижении специфической смертности животных в группах опыта, а также в достоверном увеличении средней продолжительности жизни по сравнению с контрольными животными, не получавшими препаратов. Показатели защиты составили величины до 75% снижения смертности и до 3,1 суток увеличения продолжительности жизни в зависимости от дозы вируса. По продолжительности жизни животных не бы-

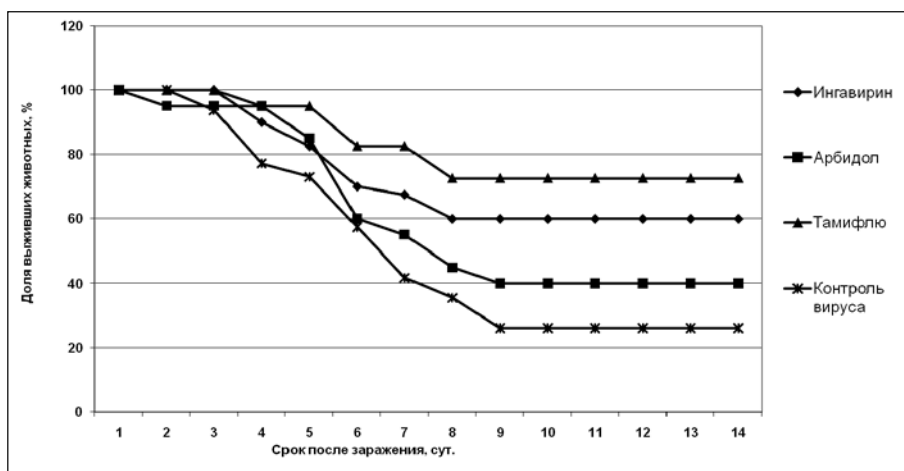


Рис. 1. Протективная активность Ингавирина® при экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А/California/07/09 (H1N1)v, у белых мышей. Приведены данные по сумме двух доз вируса – 1 и 5 LD₅₀.

Таблица 2. Инфекционная активность вируса гриппа в ткани лёгких белых мышей в условиях применения химиопрепаратов

Препарат	Инфекционный титр вируса ($\log_{10}EID_{50}/20$ мг ткани) при дозе вируса (LD_{50})	
	5 LD_{50}	1 LD_{50}
Ингавирин®	4,40±0,17*	3,80±0,23*
Тамифлю®	3,50±0,14*	3,00±0,14*
Арбидол®	4,70±0,23*	4,40±0,17*
Контроль вируса	5,70±0,16	5,35±0,16

ло отмечено достоверной разницы между группами Ингавирина® и Тамифлю®. Продолжительность жизни животных, получавших Арбидол®, достоверно не отличалась от продолжительности жизни в группе плацебо.

Полученные результаты были подтверждены при анализе динамики весовых показателей животных в ходе развития гриппозной инфекции в условиях применения Ингавирина®. В целом, данные по динамике веса соответствовали результатам, полученным при анализе смертности животных. Так, инфицирование патогенным вирусом гриппа приводило к снижению потребления животными корма, что вызывало резкое снижение веса. Минимальных значений масса тела животных достигала на 9 сутки после заражения и составляла к этому сроку 67—69% от исходной массы. При применении Ингавирина® отмечалась дозозависимая нормализация весовых показателей у мышей. Получавшие препарат животные теряли вес медленнее и в значительно меньшей степени по сравнению с контрольной группой. Активность Ингавирина® превосходила при этом активность Арбидола® и была статистически идентична активности препарата сравнения — Тамифлю®.

Влияние Ингавирина® на репродукцию вирусов гриппа в организме животных. На следующем этапе исследования было изучено влияние Ингавирина® на репликативную активность вирусов гриппа в ткани лёгких инфицированных животных. С этой целью из лёгких животных на 3 сутки после заражения были приготовлены гомогенаты, в которых затем определяли инфекционный титр вируса в культуре клеток MDCK.

Данные об уровне репликации модельного вируса гриппа в организме животных приведены в табл. 2.

Как следует из представленных данных, модельный вирус размножался в лёгочной ткани мышей до титров 5,4—5,7 $\log_{10}EID_{50}/20$ мг ткани в зависимости от использованной инфицирующей дозы. Как Ингавирин®, так и препараты сравнения достоверно снижали инфекционные титры вируса в ткани лёгких.

Влияние Ингавирина® на морфогенез экспериментальной летальной гриппозной инфекции у белых мышей. На следующем этапе исследований были изучены особенности морфогенеза гриппозной инфекции в организме животных в условиях

применения Ингавирина®. Как было показано при гистологическом исследовании, лёгкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, клетки его выглядели интактными — в них не отмечалось признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических включений. В просветах бронхов не отмечалось экссудата и клеточного детрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели воздушными, альвеолярные стенки не были утолщены, из клеток инфильтрата в лёгочной паренхиме отмечались отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаруживалось.

У заражённых животных, не получавших лечения, морфологические изменения лёгочной ткани на 3 сут после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением поражённых клеток в просвет бронха, интенсивного серозного интерстициального отека, очагов геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширением сосудов и спадением альвеол (рис. 2, а). Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии, и степень их выраженности может служить критерием для оценки тяжести процесса.

При использовании Ингавирина® основное отличие от группы животных, не получавших лечения, заключалось в резком ограничении признаков вирусспецифического поражения ткани лёгких в острой стадии гриппозной пневмонии. Так, на 3-и сутки после инфицирования клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными (рис. 2, б), в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных животных. Ткань лёгких животных, получавших препарат, характеризовалась меньшей степенью поражения клеток как проводящих, так и респираторных отделов. Сами очаги воспаления занимали меньшую по сравнению с

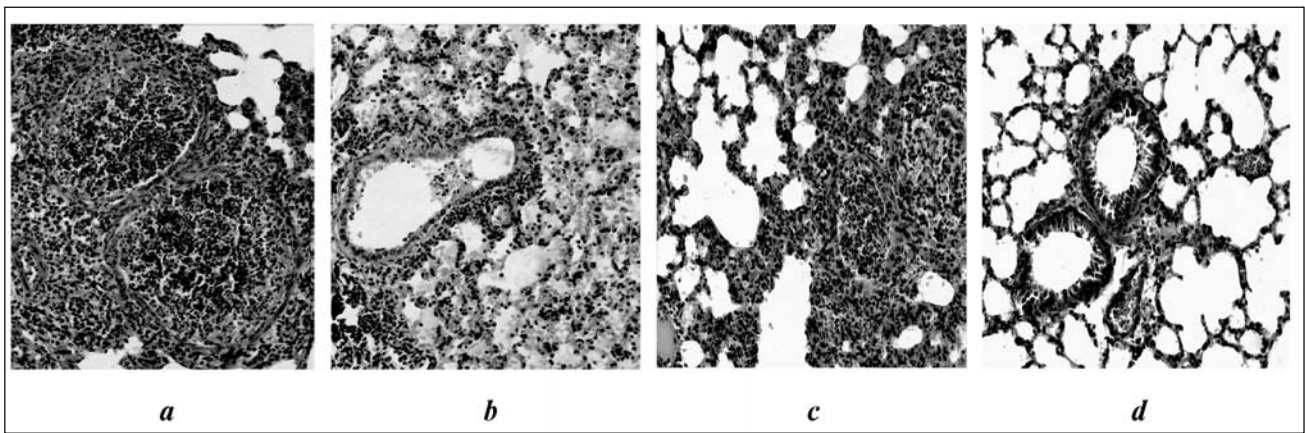


Рис. 2. Очаги острой гриппозной пневмонии в лёгких мыши на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)v.

a — без применения препаратов: деструкция клеток бронхиального эпителия и интенсивный клеточный инфильтрат в просвете бронха, периваскулярном и перибронхиальном пространстве; *b* — в условиях лечебного применения Ингавирина®: интактные клетки эпителия, умеренный инфильтрат и умеренный геморрагический отек в респираторных отделах; *c* — на фоне лечебного применения Арбидола®: большинство клеток эпителия интактны, интенсивный инфильтрат в просвете бронха и периваскулярная клеточная инфильтрация. Перибронхиальная инфильтрация и отек межальвеолярных перегородок; *d* — на фоне применения Тамифлю®. Гематоксилин-эозин, $\times 200$.

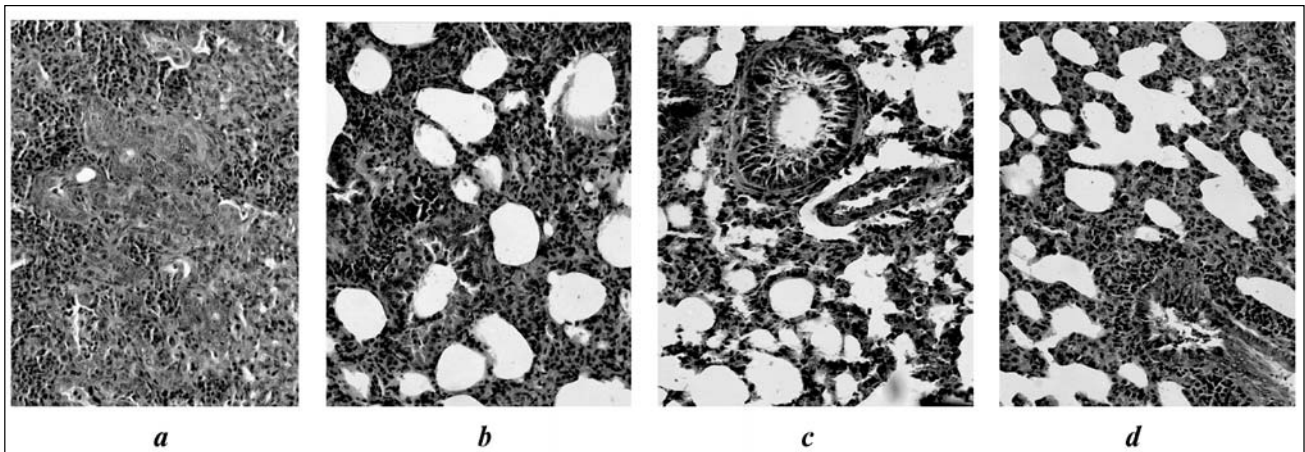


Рис. 3. Метаплазия бронхиального эпителия и респираторные отделы лёгкого мыши на 15-е сутки после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)v.

a — без применения препаратов: интенсивный клеточный инфильтрат в респираторных отделах. Эпителий крупного бронха гиперплазирован; *b* — в условиях лечебного применения Ингавирина®: умеренная гиперплазия бронхиального эпителия и клеточный инфильтрат в респираторных отделах; *c* — в условиях лечебного применения Арбидола®; *d* — в условиях применения Тамифлю®. Гематоксилин-эозин, $\times 200$.

контролем площадь (рис. 2, *b—d*). Аналогичные эффекты наблюдались при применении Тамифлю и в меньшей степени — Арбидола®. В последнем случае очаги поражения, степень деструкции бронхиального эпителия и инфильтрации лёгочной паренхимы были более выражены по сравнению с соответствующими показателями в группах Тамифлю® и Ингавирина®.

У выживших животных, не получавших лечения, к 15-м суткам развития инфекции серозный экссудат замещался клеточным, состоящим из нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов. Структура лёгочной ткани претерпевала качественные изменения по сравнению с острой стадией ин-

фекции и по сравнению с тканью лёгких интактных животных. Поражённый слой бронхиального эпителия восстанавливался, образуя характерные структуры гиперплазированных клеток. Избыточные пролиферативные и репаративные процессы в ткани лёгких приводили к бронхиолярной метоплазии альвеолярного эпителия, образующего аденоматозные структуры, окруженные массивными инфильтратами лимфоидно-макрофагальных элементов, что приводило к карнификации обширных отделов лёгких. Эпителий крупных бронхов был гиперплазирован. Просветы бронхов были заполнены экссудатом, состоящим из нейтрофилов, круглоклеточных

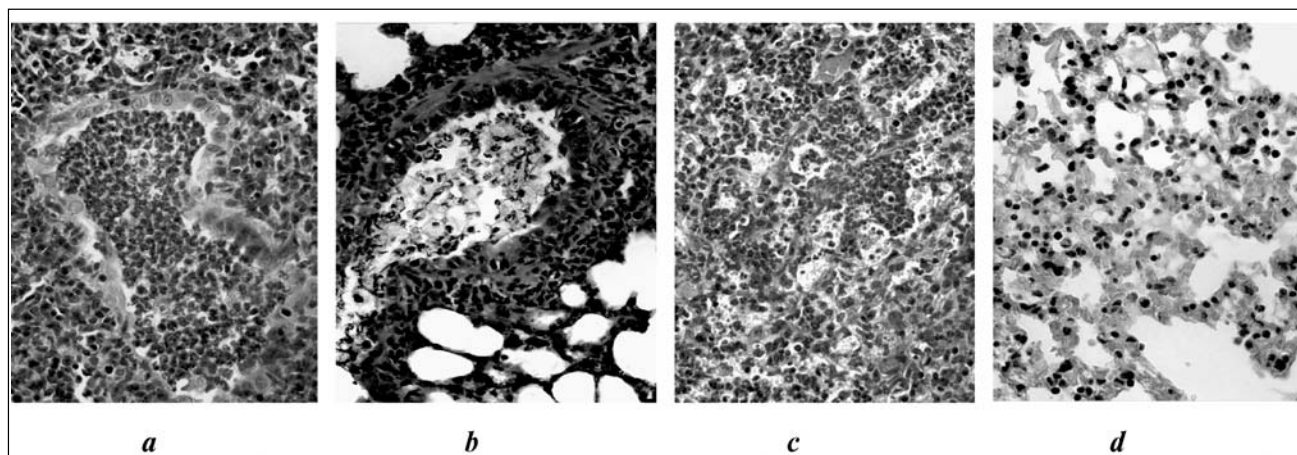


Рис. 4. Воспалительный инфильтрат в бронхах (*a, b*) и респираторных отделах (*c, d*) лёгкого мыши на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)v.

a, c — без применения препаратов: интенсивный полиморфноядерный инфильтрат и участки клеточного распада; *b, d* — в условиях применения Ингавирина®: клетки инфильтрата представлены исключительно круглоклеточными элементами (лимфоцитами и макрофагами). Гематоксилин-эозин, $\times 400$.

элементов и клеточного детрита. В просветах ателектазированных альвеол в респираторных отделах отмечалась мощная клеточная воспалительная реакция и большое количество клеточного детрита (рис. 3, *a*).

При использовании Ингавирина® на поздних стадиях патологического процесса прослеживались те же тенденции, что и на стадии острой пневмонии. Очаги поражения лёгких были значительно ограничены в размерах по сравнению с контрольными животными, при морфологическом исследовании выявлялась умеренная метаплазия эпителия и клеточная инфильтрация лёгочного интерстиция (рис. 3, *b—d*). Инфильтративные процессы были выражены в гораздо меньшей степени, чем у контрольных животных. Межалвеолярные перегородки при этом были хорошо различимы, воздухоносные полости выражены и содержали повышенное количество альвеолярных макрофагов. Все перечисленные признаки резко отличали этих животных от мышей из группы, не получавших лечения. При сравнении терапевтического действия Ингавирина® и Арбидола® между собой было отмечено более выраженное протективное действие Ингавирина® (рис. 3, *b, c*). При использовании Ингавирина® и Тамифлю® очаги постгриппозной пневмонии, степень метаплазии эпителия и инфильтрации ткани клеточными элементами были менее выражены, чем при применении Арбидола®.

Помимо описанных количественных различий между контрольными животными и группой, получавшей Ингавирин®, обращала на себя внимание качественная разница в морфологии очагов гриппозной пневмонии, в частности, на поздних стадиях инфекции. У контрольных животных вследствие интенсивных деструктивных

процессов в респираторных зонах лёгкого формировались очаги клеточной инфильтрации. Клеточный компонент экссудата был представлен преимущественно нейтрофилами в стадии распада (рис. 4, *a, c*). Благодаря процессам бронхолегочного клиренса эти нейтрофилы концентрировались в бронхах, заполняя их просветы (рис. 4, *a*). В то же время при применении Ингавирина® нейтрофилы практически отсутствовали в зонах воспаления, и клетки экссудата были представлены в подавляющем большинстве макрофагами и лимфоцитами (рис. 4, *b, d*). Бронхи не содержали в просвете экссудата вообще, либо содержали исключительно крупные макрофаги с гранулированной цитоплазмой (рис. 4, *b*).

Наблюдаемые качественные различия между контрольными животными и животными, получавшими химиопрепараты, были подтверждены при количественном анализе клеточного состава бронхиального эпителия на ранних стадиях инфекции (3 сутки после инфицирования). Клетки, составляющие внутреннюю выстилку бронхов, были разделены на четыре группы на основании стадии развития в них вирусспецифических поражений. Первую группу составили морфологически интактные клетки с нормальной структурой ядра и гомогенной цитоплазмой, прикрепленные к базальной мембране. Клетки второй группы содержали в ядре и цитоплазме эозинофильные и базофильные включения, соответствующие сайту накопления вирусных белков и нуклеопротеидов, соответственно. Третья группа была представлена клетками с хорошо развитыми вирусными включениями и признаками начинающегося апоптоза — гиперхромным ядром, интенсивно эозинофильной или вакуолизированной цитоплазмой и кариорексисом. Четвертую группу составили

Таблица 3. Действие химиопрепаратов на клеточный состав бронхиального эпителия в лёгких белых мышей в острой стадии гриппозной пневмонии

Препарат	Интактные клетки	Начало поражения	Развитые включения	Отсутствуют
Ингавирин®	55,3±4,2**,#,*	13,1±2,5#	23,7±4,9#,*	7,9±2,5**,#,*
Тамифлю®	70,0±4,1**,#,*	8,2±2,3#	17,9±5,8#,*	3,8±2,4**,#,*
Арбидол®	16,8±4,7#,#	13,9±3,2#	40,5±4,1#,#	28,8±5,4**,#,#
Контроль вируса	6,1±2,8#	7,7±1,5#	26,4±8,0#	59,8±9,8#
Интактные животные	97,6±1,2	0,9±0,5	0,5±0,3	1,0±0,9

Примечание. * – отличия от группы Арбидола® достоверны при $p < 0,05$; ** – отличия от группы плацебо достоверны при $p < 0,05$; # – отличия от группы интактных животных достоверны при $p < 0,05$; ## – отличия от группы Тамифлю® достоверны при $p < 0,05$.

мертвые клетки, отторгшиеся от базальной мембраны в просвет бронха и подвергшиеся распаду.

Результаты подсчёта перечисленных клеток на срезах лёгочной ткани мышей из контрольных и опытных групп суммированы в табл. 3.

Как видно из представленных результатов, в группе незаражённых животных практически все клетки бронхиального эпителия были интакты. Несколько клеток, несущих признаки вирусных включений, апоптоза, или отсутствующие в слое, могут быть отнесены на счёт артефактов при приготовлении гистологических препаратов или естественных процессов обновления клеток выстилки бронхов.

Заражение патогенным вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)v приводило к снижению доли интактных клеток с 98 до 6% и одновременно повышению доли клеток трёх других групп, несущих признаки вирусного поражения на той или иной стадии. При этом доля мертвых клеток составила к 3 суткам эксперимента 60%, т.е. более половины клеток бронхиального эпителия на этой стадии отсутствовало.

Применение Ингавирина® приводило к выраженной нормализации клеточного состава внутренней выстилки бронхов. Доля клеток с вирусными включениями или несущих признаки апоптоза снижалась, одновременно более чем до 55% повышалась доля интактных клеток. Ингавирин®, приводил к достоверному снижению доли поражённых клеток по сравнению с контрольной группой животных без лечения. При этом эффект Ингавирина® статистически превосходил эффект Арбидола® и не отличался от эффекта Тамифлю®.

В последнее время многие исследователи проявляют интерес к вирусному белку NP как мишени для направленной противовирусной химиотерапии. Так, в недавней работе Wang et al. (2009) продемонстрировали взаимодействие клеточного ядерного белка NF90 с вирусным белком NP. Показано, что на ранних стадиях инфекции в ядре инфицированных клеток NF90 взаимодействует с NP и угнетает вирусную продукцию, нарушая связывание между молекулами NP в процессе его олигомеризации. Другим примером вирус-клеточного взаимодействия может слу-

жить клеточный белок RBL2, который угнетает репликацию вируса гриппа. Механизм его противовирусной активности также заключается в связывании с вирусным белком NP. Это связывание приводит к нарушению взаимодействия между молекулами NP в ходе его олигомеризации, что, в свою очередь, ведет к снижению уровня вирусной репликации [5]. По недавно полученным данным [6], Ингавирин® также обладает способностью угнетать олигомеризацию NP-белка вируса гриппа. Такая активность также может вносить вклад в противовирусные свойства этого препарата. Тем не менее, в экспериментах *in vitro* были получены относительно высокие эффективные концентрации Ингавирина®, что говорит о наличии дополнительных механизмов активности, реализуемых *in vivo*, но не в гомогенной клеточной культуре.

Известно, что для эффективной репликации вирус гриппа, помимо собственно вирусных компонентов, использует метаболические и сигнальные пути клетки хозяина [7]. В частности, показано, что вирус гриппа способен использовать для собственной репликации компоненты воспалительного сигнального пути NF-κB [8]. Таким образом, на репликацию вируса гриппа, помимо препаратов, направленных непосредственно на вирусспецифическую мишень, могут влиять также соединения, угнетающие провирусные или активирующие противовирусные клеточные метаболические пути.

На ход патологического процесса при гриппе могут также влиять соединения, оказывающие протективное действие путем снижения уровня провоспалительных и повышения — противовоспалительных цитокинов, что уменьшает степень поражения ткани в очагах воспаления свободными радикалами, токсическое действие вируса и других факторов патогенеза гриппозной инфекции [9]. Для полного понимания механизма противовирусной активности Ингавирина® необходимы дополнительные исследования.

Суммируя полученные результаты, можно говорить об Ингавирине® как о перспективном средстве терапии гриппозной инфекции, в том числе вызванной пандемическими штаммами вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ghendon Y.* Influenza — its impact and control. *World Health Statistic Q* 1992; 45: 306—311.
2. *Zambon M. C.* Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: Suppl B: 3—9.
3. *Scholtissek C., Quack G., Klenk H. D., Webster R. G.* *Antiviral Res* 1998; 37: 83.
4. *Woodhead M., Lavanchy D., Johnston S. et al.* Neuraminidase inhibitors: progress in the management of influenza. *Int J Clin Pract* 2000 Nov; 54: 9: 604—610.
5. *Kakugawa S., Shimajima M., Neumann G. et al.* RuvB-like protein 2 is a suppressor of influenza A virus polymerases. *J Virol* 2009 Jul; 83: 13: 6429—6434.
6. *Семенова Н. П., Прокудина Е. Н., Львов Д. К., Небольсин В. Е.* Влияние противовирусного препарата Ингавирин® на внутриклеточные преобразования и импорт в ядро нуклеокапсидного белка (NP) вируса гриппа. *Вопросы вирусол* 2010 (в печати).
7. *Ludwig S., Planz O., Pleschka S., Wolff T.* Influenza-virus-induced signalling cascades: targets for antiviral therapy? *Trends in Molecular Medicine* 2003; 9: 46—52.
8. *Naveen Kumar, Zhong-tao Xin, Yuhong Liang et al.* Signalling differentially regulates influenza virus RNA synthesis. *J Virol* 2008; 82: 20: 9880—9889.
9. *David S. Fedson.* Confronting the next influenza pandemic with anti-inflammatory and immunomodulatory agents: why they are needed and how they might work. *Influenza and other Respiratory Viruses* 3: 129—142.