

Изучение эффективности Ингавирина® *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А(Н1N1/09)ν

Л. Н. ШИШКИНА¹, В. Е. НЕБОЛЬСИН², М. О. СКАРНОВИЧ¹, А. С. КАБАНОВ¹, А. А. СЕРГЕЕВ¹,
У. Б. ЭРДЫНЕЕВА¹, О. А. СЕРОВА¹, О. К. ДЕМИНА¹, А. П. АГАФОНОВ¹, Е. А. СТАВСКИЙ¹, И. Г. ДРОЗДОВ¹

¹ ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирская обл.

² ОАО «Валента Фарм», Москва

In vivo Efficacy of Ingavirin® Against Pandemic A(H1N1/09)ν Influenza Virus

L. N. SHISHKINA, V. E. NEBOLSIN, M. O. SKARNOVICH, A. S. KABANOV, A. A. SERGEEV,
U. B. ERDYNEEVA, O. A. SEROVA, O. K. DEMINA, A. P. AGAFONOV, E. A. STAVSKY, I. G. DROZDOV

State Scientific Centre of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Novosibirsk Region
JSC Valenta Pharm, Moscow

Ингавирин® эффективно ингибирует размножение штаммов пандемического вируса гриппа А/California/04/2009 (H1N1)ν, А/California/07/2009 (H1N1)ν, А/Moscow/225/2009 (H1N1)ν и А/Moscow/226/2009 (H1N1)ν, а также штамма вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) в лёгких у инфицированных мышей. Титры этих штаммов вируса гриппа в гомогенатах лёгких понижаются после перорального введения Ингавирина® инфицированным мышам.

Ключевые слова: вирус гриппа А(H1N1/09)ν, мыши, Ингавирин®, противовирусная активность

Ingavirin® was shown to be efficient in inhibition of the pandemic influenza virus strains A/California/04/2009 (H1N1)ν, A/California/07/2009 (H1N1)ν, A/Moscow/225/2009 (H1N1)ν and A/Moscow/226/2009 (H1N1)ν, as well as the influenza virus strain A/Aichi/2/68 (H3N2) in the lungs of the infected mice. After oral administration of Ingavirin® the titers of the influenza virus strains in the lung homogenates lowered.

Key words: influenza virus A(H1N1/09)ν, mice, Ingavirin®, antiviral activity.

Введение

Грипп является одним из тяжёлых заболеваний, которым ежегодно болеют миллионы людей во всём мире. Смертность от гриппа в период эпидемий в разных возрастных группах может достигать от десятков до сотен случаев на 100 тыс. населения, а в период пандемии до 1000 случаев на 100 тыс. населения. Заболевание гриппом, вызванное в 2009 г. новым вариантом вируса, вначале охватило территории Мексики и США, а затем с потоком туристов молниеносно распространилось на территории других государств мира, в связи с чем ВОЗ 29 апреля 2009 года объявила о введении пятого уровня, а 11 июня того же года впервые более чем за 40 лет — о введении шестого, максимального уровня угрозы пандемии [1]. Предварительный анализ эпидемиологических данных свидетельствует о том, что случаи тяжёлого заболевания и смерти, связанные с гриппом А(H1N1/09), в основном, происходят среди ранее

здоровых молодых и среднего возраста людей (от 20 до 50 лет). Сообщается, что в смертельных и тяжёлых случаях заболевшие люди обращались за медицинской помощью через 5—7 дней после наступления симптомов заболевания [2].

Поиск эффективных профилактических и лечебных противогриппозных препаратов существенным образом осложнён уникальными биологическими свойствами вируса гриппа — его высокой генетической и антигенной изменчивостью. Более того, генетическая изменчивость вируса гриппа А может привести к возникновению резистентности к противовирусным препаратам, в частности римантадину [1, 3].

Цель настоящего исследования — изучение эффективности нового отечественного препарата Ингавирин®, а также Ремантадина® и Тамифлю® *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А(H1N1) 2009 г. и штамма вируса гриппа А(H3N2).

Материал и методы

Вирус. В работе использовали следующие штаммы вируса гриппа (ВГ): А/California/04/2009 (H1N1)ν и А/California/07/2009 (H1N1)ν, полученные в мае 2009 г. из CDC (США);

© Коллектив авторов, 2010

Адрес для корреспонденции: 630559 р. п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области. ГНЦ ВБ «Вектор»

A/Moscow/225/2009 (H1N1)v и A/Moscow/226/2009 (H1N1)v, выделенные и охарактеризованные в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» в июне 2009 г., и A/Aichi/2/68 (H3N2), полученный из «Коллекции микроорганизмов» ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». При этом штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) был использован в качестве референс-штамма вируса гриппа, обладающего чувствительностью к Ремантадину®. Штаммы A/California/07/2009 (H1N1)v, A/Moscow/226/2009 (H1N1)v, A/Aichi/2/68 (H3N2) были наработаны на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), штаммы A/California/04/2009 (H1N1)v и A/Moscow/225/2009 (H1N1)v были наработаны в культуре клеток MDCK. Концентрацию вируса в исследуемых образцах определяли путем титрования на клетках MDCK [4], рассчитывали и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в мл) по методу Спирмана-Кербера [5]. Нарботанные и использованные в работе серии вирусной аллантоисной жидкости и культуральной жидкости со штаммами вируса гриппа хранили при -70°C .

Животные. В работе использовали линейных мышей Balb/c, полученных из питомника ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», в количестве 180 голов (самки массой 15–17 г на начало исследований). Животные содержались в клетках в специально оборудованном помещении вивария ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», на которое выдано разрешение для проведения исследований с вирусом гриппа. Мыши содержались при естественном освещении, стандартном рационе питания и свободном доступе к воде. Проведение исследования и содержание животных осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755] и Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [6].

Используемые препараты. В работе использовали Ингавирин® производства Открытого Акционерного Общества «Валента Фармацевтика» (Россия), Тамифлю® (Ф. Хоффманн — Ля Рош Лтд., Швейцария) и Ремантадин® (ООО «Розфарм», Россия).

При проведении исследований 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.

Интраназальное заражение мышей вирусом гриппа. Интраназальное (и/н) инфицирование мышей проводили при относительной влажности 50–70% и температуре 24°C . Инфицирование мышей вирусом гриппа производили интраназальным способом под лёгким эфирным наркозом. При этом с помощью автоматической пипетки с наконечником суммарно в обе ноздри мыши вносили соответствующее разведение вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) в объёме 40 мкл. Биологическую концентрацию вируса в исходной вирусосодержащей суспензии определяли по результатам титрования на клетках MDCK, и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в мл) по методу Спирмана-Кербера [4, 5].

Определение ИД₅₀ и ИД₁₀₀ вируса гриппа для мышей. Для определения 50% инфицирующей дозы (ИД₅₀) штаммов вируса гриппа по 6 мышей интраназально заражали пятью разведениями для каждого из штаммов ВГ: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} в объёме 40 мкл. Через 4 сут животных забивали, получали гомогенаты лёгких и определяли в них наличие или отсутствие вируса посредством инфицирования РКЭ, в которых через 2 сут регистрировали наличие или отсутствие ВГ в реакции геммагглютинации (РГА) с 0,5% эритроцитов пегуха. ИД₅₀ рассчитывали по методу Спирмана-Кербера в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{голову}$ [4, 5], используя значения вводимых доз ВГ (в ТЦД_{50}) и показатели наличия ВГ в лёгких у инфицированных животных. Аналогичным образом определяли ИД₅₀ вируса в группах животных, которые получали противовирусные препараты в

соответствующих дозах. На основании этих показателей высчитывали индекс нейтрализации (ИН) вируса под влиянием препарата *in vivo*: $\text{ИН} = \text{ИД}_{50\text{опыт}} - \text{ИД}_{50\text{контроль}} (\lg)$. Кроме того, после определения ИД₅₀ вируса гриппа, для инфицирования мышей использовали дозу 10 ИД₅₀ для каждого штамма, что соответствовало ИД₁₀₀, применение которой приводило к инфицированию вирусом гриппа 100% животных.

Определение концентрации вируса гриппа в лёгких мышей.

При проведении исследований по изучению противовирусной активности препаратов по 5 животных, получавших Ингавирин®, Тамифлю® или Ремантадин®, интраназально инфицировали вирусом гриппа в дозе ИД₁₀₀ для контрольных животных. Определение концентраций ВГ в лёгких проводили через 5 сут после заражения при титровании объединённых гомогенатов лёгких для мышей каждой группы в культуре клеток MDCK, рассчитывали по методу Спирмана-Кербера [4, 5] и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ (\lg 50% тканевых цитопатических доз на мл). На основании разницы между титрами вируса в гомогенатах лёгких у мышей в контроле и в опыте рассчитывали индекс подавления продукции вируса под влиянием препарата *in vivo*.

Оценка противовирусной эффективности препаратов осуществлялась в соответствии с рекомендациями Фармакологического государственного комитета РФ [7]. 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 лёгких у инфицированных животных.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение данных проводили общепринятыми методами для биологических исследований [5] с помощью компьютерной программы методом Спирмана-Кербера с оценкой достоверности отличий ($p=0,05$) для 95% доверительного уровня (I_{95}).

Результаты и обсуждение

В результате интраназального (и/н) заражения вирусом гриппа A(H1N1)v инфекционный процесс начинается в верхних дыхательных путях, но уже через 3–4 сут охватывает лёгкие. Определение ИД₅₀ использованных в работе штаммов вируса гриппа для мышей массой 15–17 г, инфицированных и/н разными дозами вируса гриппа, проводили через 4 сут после заражения по показателям наличия или отсутствия вируса в гомогенатах лёгких. По результатам экспериментов при и/н заражении контрольных мышей (без введения препаратов) различными разведениями вирусного материала для каждого штамма были оценены ИД₅₀, которые представлены в таблице 1 в $\lg \text{ТЦД}_{50}$ на животное.

При определении влияния Ингавирина® на инфекционность штаммов вируса гриппа A(H1N1)v и A(H3N2) *in vivo* было обнаружено, что ИД₅₀ всех исследованных штаммов при инфицировании мышей достоверно увеличивались по сравнению с контролем (табл. 1). При этом диапазон индексов нейтрализации составлял 0,8–1,5 \lg с достижением максимального значения для штамма вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2).

Инфекционность штаммов вируса гриппа A(H1N1)v и A(H3N2) *in vivo* под влиянием Тамифлю® также достоверно уменьшалась, поскольку ИД₅₀ всех исследованных штаммов были более

Таблица 1. Инфекционность (50% инфицирующая доза — ИД₅₀) штаммов вируса гриппа А(Н1N1)v *in vivo* при пероральном введении Ингавирина®, Тамифлю®, Ремантадина® и в контроле и через 4 сут после заражения

Штаммы вируса гриппа	ИД ₅₀ штаммов <i>in vivo</i> в контроле (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	ИД ₅₀ и индекс нейтрализации штамма <i>in vivo</i> при введении Ингавирина®		ИД ₅₀ и индекс нейтрализации штамма <i>in vivo</i> при введении Тамифлю®		ИД ₅₀ и индекс нейтрализации штамма <i>in vivo</i> при введении Ремантадина®	
		ИД ₅₀ (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	Индекс нейтрализации (в lg)	ИД ₅₀ (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	Индекс нейтрализации (в lg)	ИД ₅₀ (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	Индекс нейтрализации (в lg)
		А/California/04/2009 (H1N1)v	1,0±0,3	2,0±0,3*	1,0*	2,3±0,3*	1,3*
А/California/07/2009 (H1N1)v	0,0±0,3	1,0±0,3*	1,0*	1,3±0,3*	1,3*	0,2±0,3	0,2
А/Moscow/225/09 (H1N1)v	0,6±0,3	1,4±0,3*	0,8*	1,6±0,3*	1,0*	0,9±0,3	0,3
А/Moscow/226/09 (H1N1)v	-0,5±0,3	0,3±0,3*	0,8*	0,8±0,3*	1,3*	-0,5±0,3	0,0
А/Aichi/2/68 (H3N2)	0,8±0,5	2,3±0,5*	1,5*	2,1±0,5*	1,3*	1,6±0,5*	0,8*

Примечание. * — отличия от контроля по ИД₅₀ при $p=0,05$.

Таблица 2. Титры штаммов вируса гриппа А(Н1N1)v в легких инфицированных мышей при пероральном введении Ингавирина®, Тамифлю®, Ремантадина® и в контроле и через 5 сут после заражения

Штаммы вируса гриппа	Доза заражения ИД ₁₀₀ (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	Титры вируса в лёгких мышей в контроле (в lgТЦД ₅₀ /мл, ±I ₉₅)	Титры и индексы подавления продукции вируса в лёгких мышей при введении Ингавирина®		Титры и индексы подавления продукции вируса в лёгких мышей при введении Тамифлю®		Титры и индексы подавления продукции вируса в лёгких мышей при введении Ремантадина®	
			Титры вируса (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	Индексы подавления продукции вируса (в lg)	Титры вируса (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	Индексы подавления продукции вируса (в lg)	Титры вируса (в lgТЦД ₅₀ /гол., ±I ₉₅)	Индексы подавления продукции вируса (в lg)
			А/California/04/2009 (H1N1)v	2,0±0,3	3,7±0,4	2,5±0,7*	1,2*	1,8±0,6*
А/California/07/2009 (H1N1)v	1,0±0,3	3,5±0,4	2,2±0,7*	1,3*	1,8±0,6*	1,7*	3,1±0,5	0,4
А/Moscow/225/09 (H1N1)v	1,6±0,3	2,7±0,4	1,4±0,6*	1,3*	1,0±0,4*	1,7*	2,7±0,7	0,0
А/Moscow/226/09 (H1N1)v	0,5±0,3	3,5±0,4	2,1±0,7*	1,4*	1,5±0,6*	2,0*	3,2±0,5	0,3
А/Aichi/2/68 (H3N2)	1,8±0,5	3,9±0,3	2,4±0,6*	1,5*	1,7±0,4*	2,2*	3,0±0,4*	0,9

Примечание. * — отличия от контроля по титрам вируса в лёгких при $p=0,05$.

высокими, чем в контроле (см. табл. 1). При этом диапазон индексов нейтрализации исследованных штаммов вируса гриппа под воздействием Тамифлю® был 1,0—1,3 lg, то есть практически таким же, как и при введении Ингавирина® (см. табл. 1).

При введении Ремантадина® мышам, и/н инфицированным разными штаммами вируса гриппа, было продемонстрировано отсутствие его влияния на показатели ИД₅₀ всех исследованных штаммов вируса гриппа А(Н1N1)v и достоверное увеличение ИД₅₀ штамма вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) с индексом нейтрализации 0,8 lg (см. табл. 1).

Согласно нашим эмпирическим и литературным данным 100% инфицирование мышей при интраназальном заражении ВГ может наблюдаться в очень широком диапазоне доз от 5 ИД₅₀ до 50 ИД₅₀ [8, 9]. 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 [10], приблизительно

равные 10 ИД₅₀ (далее ИД₁₀₀) для каждого штамма. Использованные в работе ИД₁₀₀ каждого штамма вируса гриппа, рассчитанные в lgТЦД₅₀ на животное, представлены в таблице 2.

Было показано, что через 5 сут после заражения мышей дозами ВГ, равными ИД₁₀₀, то есть дозами, при применении которых наблюдается 100% инфицирование контрольных животных, титры вируса гриппа в лёгких мышей, получавших Ингавирин®, были достоверно ниже соответствующих контрольных величин (см. табл. 2). Из данных, приведенных в таблице 2, видно, что индексы подавления продукции вируса под воздействием Ингавирина® для всех исследованных штаммов вируса гриппа были практически одинаковыми, и находились в диапазоне 1,2—1,5 lg.

Также было показано, что через 5 сут после заражения мышей дозами ВГ, равными ИД₁₀₀, титры всех штаммов вируса гриппа в лёгких мышей, получавших Тамифлю®, значительно понижались по сравнению с соответствующими контрольными значениями (см. табл. 2). Индексы

подавления продукции вируса под воздействием Тамифлю® для всех исследованных штаммов вируса гриппа были практически одинаковыми, и изменялись в диапазоне 1,7—2,2 (см. табл. 2).

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

Обнаруженное нами подавление продукции вируса гриппа А под влиянием Ингавирина®, действующим веществом которого является имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты, в экспериментах *in vivo* 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 [11, 12].

Заключение

Таким образом, при изучении эффективности Ингавирина®, Тамифлю® и Ремантадина® в экспериментах на мышах, интраназально 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 Ингавирину® и Тамифлю® и отсутствие их чувствительности к Ремантадину®. При этом использованный в работе референс-штамм вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) был чувствительным к Ингавирину®, Тамифлю® и Ремантадину®.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пандемия гриппа (H1N1) — 2009: обзор ситуации в Европейском регионе ВОЗ // http://www.euro.who.int/influenza/AH1N1/20091026_1?language=Russian.
2. Пандемический грипп (H1N1) — 2009, Украина // http://www.who.int/csr/don/2009_11_01/ru/index.html.
3. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. WHO/CDS/CSR/DRS/2001/2 // http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_Russian.pdf.
4. Вирусология. Методы / Пер. с англ. Мейхи Б. М.: 1988; 344.
5. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976; 598.
6. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Washington, D.C.: National Academy Press: 1996; 138.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Хабриева Р. У. М.: 2005; 832.
8. Сергеев А. Н., Жуков В. А., Порываев В. Д. и др. Разработка простого метода прямой оценки наличия инфекционного процесса у мышей и крыс, аэрогенно инфицированных вирусом гриппа. *Вопр вирусол* 2002; 4: 44—46.
9. Шишкина Л. Н., Сергеев А. Н., Пьянкова О. Г. и др. Изменение устойчивости мышей к вирусу гриппа (А/Aichi/2/68) под влиянием глюкокортикоидного иммунодепрессанта кеналага. *Там же* 1999; 44: 6: 272—275.
10. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962; 161.
11. Небольсин В. Е., Новиков Ф. Н., Строганов О. Л. и др. Поиск терапевтических мишеней и исследование механизма противогриппозной активности нового препарата Ингавирин. Тезисы докладов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды», Казань, 23—27 июня 2009; 103.
12. 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. *Вопр вирусол* 2010 (в печати).