

Эффективность Ингавирина® *in vitro* в отношении возбудителя аденовирусной инфекции

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. А. МАКСИМОВ¹, В. П. БОНДАРЕВ¹, В. Е. НЕБОЛЬСИН²

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*

In vitro Ingavirin® Efficacy Against Adenoviral Infection Pathogen

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. A. MAKSIMOV, V. P. BONDAREV, V. E. NEBOLSIN

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

Экспериментальное изучение противовирусной эффективности Ингавирина® свидетельствует, что в концентрациях 200 и 100 мкг/мл препарат полностью защищает клетки от цитопатического действия вируса при внесении его до заражения культуры клеток HeLa. При 10-кратном снижении инфицирующей дозы вируса до 0,001 ЦПД₅₀/клетку подавление цитопатического эффекта вируса Ингавирином® составило 100% во всех изученных концентрациях (в том числе и низких) как при внесении препарата до, так и после инфицирования. Ингавирин® эффективно подавляет репродукцию аденовируса 5 типа в культуре клеток HeLa.

Ключевые слова: Ингавирин®, аденовирус, культура клеток, противовирусная эффективность.

The experimental investigation of the Ingavirin® antiviral effect showed that in concentrations of 200 and 100 mcg/ml it totally protected the cells from the cytopathic action of the virus, when added before the inoculation of the HeLa cell culture. After a tenfold decrease of the infective dose (up to 0.001 CPD₅₀/cell), the inhibition of the virus cytopathic effect by Ingavirin® amounted to 100% in all the tested concentrations (including the low ones) added either before or after the culture contamination. Ingavirin® was efficient in inhibition of the adenovirus type 5 reproduction in the HeLa cell culture.

Key words: Ingavirin®, adenovirus, cell culture, antiviral effect.

Изучение острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в последние годы свидетельствует, что в их этиологии, помимо вируса гриппа, важную роль играют аденовирусы человека. Они относятся к роду Mastadenovirus, который разделен на шесть групп А, В, С, D, Е и F, включающие 51 серотип [1].

Аденовирусные заболевания распространены повсеместно и регистрируются в течение всего года с сезонным подъёмом в зимне-весенний период. Известны крупные вспышки фарингоконъюнктивальной лихорадки в летнее время при передаче возбудителя через воду. Причём болеют преимущественно дети и лица молодого возраста, особенно военнослужащие. Спорадические случаи, нозокомиальные и локальные вспышки часто наблюдаются в закрытых коллективах детей и взрослых. Механизм заражения в закрытых коллективах — воздушно-капельный и/или алиментарный.

Для аденовирусной инфекции характерны медленное развитие эпидемического процесса и высокий процент латентных форм, которые определяются серотипом вируса. В детских коллективах, где восприимчивость к инфекции наиболее высокая, чаще наблюдаются вспышки фарингоконъюнктивальной лихорадки (серотипы 3, 7, 14), у детей младшего возраста — острый фарингит (серотипы 1, 2, 3, 5, 6, 7). У детей раннего возраста 5-й серотип аденовируса вызывает коклюшеподобный синдром. В развитии тяжёлых пневмоний, бронхитов и бронхиолитов у больных с хроническими заболеваниями и иммунодефицитным состоянием играют серотипы 1, 2 и 5 [2].

В настоящее время доказана эффективность ганцикловира, цидофирма и рибавирина в отношении аденовирусной инфекции *in vitro* [3, 4]. Однако их применение ограничивается токсичностью, в том числе нефротоксичностью. В этой связи актуальным является поиск эффективных и нетоксичных химиопрепаратов в отношении

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117105, Москва, Нагатинская ул., 3а.
Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

Таблица 1. Эффективность Ингавирина® в отношении аденовируса 5-го типа в монослойной культуре клеток HeLa

Схема внесения препарата	Доза препарата, мкг/мл	Частота обнаружения ЦПД	Подавление цитопатического действия, %
За 24 ч до инфицирования	200,0	0/10	100,0
	100,0	0/10	100,0
	22,4	4/10	60,0
Через 2 ч после инфицирования	200,0	3/10	70,0
	100,0	4/10	60,0
	22,4	6/10	40,0
Контроль (без препарата)	—	10/10	—
Контроль среды	—	0/10	—
Контроль препарата	200,0	0/10	—

Примечание. Инфицирующая доза — 0,01 ЦПД₅₀/клетку.

Таблица 2. Эффективность Ингавирина® в отношении аденовируса 5-го типа в монослойной культуре клеток HeLa

Схема внесения препарата	Доза препарата, мкг/мл	Частота обнаружения ЦПД	Подавление цитопатического действия, %
За 2 ч до инфицирования	200,0	0/10	100,0
	100,0	0/10	100,0
	22,4	2/10	80,0
Через 2 ч после инфицирования	200,0	0/10	100,0
	100,0	0/10	100,0
	22,4	0/10	100,0
Контроль (без препарата)	—	10/10	—
Контроль среды	—	0/5	—

Примечание. Инфицирующая доза — 0,001 ЦПД₅₀/клетку. Срок наблюдения после инфицирования — 96 ч.

эпидемически значимого возбудителя аденовирусной инфекции.

Целью настоящей работы было изучение противовирусной эффективности нового отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении аденовируса 5-го типа.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали аденовирус 5-го типа, полученный в 1998 году из НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского и хранящийся в Специализированной коллекции филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ».

Культура клеток. Использована постоянная культура клеток карциномы шейки матки — HeLa с плотностью 200–250 тыс./мл. В качестве ростовой среды и среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Хенкса, содержащую 7,5 и 2% сыворотки крупного рогатого скота соответственно.

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

Приготовление инфицирующего препарата. Двухсуточный монослой культуры клеток HeLa инфицировали аденовирусом 5-го типа в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку. Затем монослой культуры клеток инкубировали при (37±0,5)°С в течение 96 ч. По окончании инкубации проводили криодеструкцию клеток, вирусосодержащую суспензию осветляли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Противовирусную эффективность препарата оценивали по подавлению цитопатической активности вируса в культуре клеток HeLa. Оценка эффективности препарата в отношении аденовируса проводили при внесении его на сформированный монослой и в суспензию культуры клеток HeLa.

Критериями эффективности исследуемого препарата являлись: подавление ЦПД вируса и коэффициент ингибирования (Ки, %).

Коэффициент ингибирования рассчитывали по формуле:

$$Ки = 100 \times (C_k - C_0) / C_k,$$

где C_k и C_0 — инфекционный титр вируса в контрольной и опытной пробе соответственно [5, 6].

Результаты и обсуждение

При внесении Ингавирина® за 24 ч до заражения монослоя клеток аденовирусом в дозе 0,01 ЦПД₅₀ на клетку в концентрациях 200 и 100 мкг/мл препарат полностью защищал клетки от цитопатического действия патогена (табл. 1). В концентрации 22,4 мкг/мл защитная эффективность препарата составила 60,0%. При внесении Ингавирина® в поддерживающую среду за 2 ч до инфицирования монослоя вирусом в дозе 0,001 ЦПД₅₀ на клетку защитная эффективность Ингавирина® увеличилась на 20% (табл. 2).

Показатели подавления цитопатического действия при применении Ингавирина® в концентрациях 200, 100 и 22,4 мкг/мл после инфицирования монослоя клеток (доза инфицирования 0,01 ЦПД₅₀/клетку) были несколько ниже (на 30–40%), чем при внесении препарата до заражения монослоя клеток (см. табл. 1). При 10-кратном снижении инфицирующей дозы вируса до 0,001 ЦПД₅₀/клетку подавление цитопатического

Таблица 3. Эффективность Ингавирина® в отношении аденовируса 5-го типа в суспензионной культуре клеток HeLa

Схема внесения препарата	Доза препарата, мкг/мл	Частота обнаружения ЦПД	Подавление цитопатического действия, %
За 1 ч до инфицирования	200,0	0/10	100
	100,0	5/10	50
Через 2 часа до инфицирования	200,0	2/8	75
	100,0	5/10	50
Контроль (без препарата)	—	10/10	—
Контроль среды	—	0/10	—

Примечание. Инфицирующая доза – 0,01 ЦПД₅₀/клетку. Срок наблюдения после инфицирования – 72 ч.

эффекта вируса составило 100% при всех изученных концентрациях препарата (см. табл. 2).

При внесении Ингавирина® в суспензию клеток более выраженная защитная эффективность препарата выявлена при применении его за 1 час до инфицирования (табл. 3). Отмечено 100% подавление цитопатической активности вируса

Ингавирином® в дозе 200 мкг/мл при внесении в поддерживающую среду за 1 ч до инфицирования и 75% — при внесении препарата через 2 часа после инфицирования культуры клеток HeLa.

Таким образом, Ингавирин® эффективно подавляет репродукцию аденовируса 5-го типа в монослойной и суспензионной культуре клеток HeLa.

ЛИТЕРАТУРА

1. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Eds. by M. H. V. Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop et al. Acad. Press., San Diego, 2000.
2. Колобухина Л. В., Львов Д. К. Вирусные инфекции дыхательных путей / Медицинская вирусология. Под ред. академика РАМН Д. К. Львова. М.: 2008; 408—411.
3. De Oliveira C. B., Stevenson D., La Bree et al. Evolution of cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection in a New Zealand rabbit ocular model. Antiviral Res 1996; 31: 165—172.
4. Duggan J. M., Farrehi J., Duderstadt S. et al. Treatment with ganciclovir of adenovirus pneumonia in cardiac transplant patient. Am J Med 1997; 103: 5: 439—440.
5. Галабов А. С., Галегов Г. А. Методические аспекты химиотерапии вирусных инфекций. Acta virol 1978; 22: 4: 343—351.
6. Чижов Н. П. Методические вопросы научной разработки противовирусных препаратов. Минск, 1977: 36—41.