

Изучение противовирусной активности Ингавирина® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2) *in vitro*

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, И. В. СЕМЕНОВА¹, 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*

Investigation of *in vitro* Activity of Ingavirin® Against Influenza Virus A (H3N2)

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

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

Проведённый сравнительный анализ эффективности Ингавирина® и этиотропных химиопрепаратов (Арбидол® и Ремантадин®) в отношении вируса гриппа А (H3N2) в чувствительных постоянных культурах клеток свидетельствует о том, что исследуемый препарат в изученных концентрациях эффективно подавляет цитопатическую активность вируса, формирование специфического гемагглютинаина и репродукцию вируса (по накоплению).

Ключевые слова: грипп А, Ингавирин®, противовирусная эффективность, культура клеток.

The comparative analysis of the efficacy of Ingavirin® and etiotropic chemotherapeutics, such as Arbidol® and Remantadin®, against the influenza virus A (H3N2) performed with the use of susceptible permanent cell cultures showed that in the used concentrations Ingavirin® was efficient in inhibition of the virus cytopathic activity, formation of the specific hemagglutinin and reproduction of the virus (by the accumulation).

Key words: influenza virus A, Ingavirin®, antiviral efficacy, cell culture.

Одним из первых этапов доклинического исследования новых лекарственных противовирусных препаратов является оценка их активности в чувствительных культурах клеток в отношении вируса гриппа. В связи с тем, что различные типы и линии клеток обладают разной чувствительностью к воздействию противовирусных препаратов, оценку их эффективности нередко проводят с использованием нескольких типов и линий клеток [1]. Использование нескольких культур клеток позволяет более достоверно осуществлять оценку активности существующих и новых лекарственных соединений.

Целью наших исследований являлось изучение эффективности нового отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении экспериментальной гриппозной инфекции *in vitro*.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали адаптированный к лёгким белых мышей вирус гриппа, штамм А/Aichi/2/68 (H3N2), по-

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, ул. Нагатинская, д. За. ГНЦА

лученный из ГУ «НИИ вирусологии» им. Д. И. Ивановского РАМН. Штамм А/Aichi/2/68 вируса гриппа, подтип H3N2, является прототипным по отношению к основным подтипам, циркулирующим в настоящее время (H3N2 и H1N1). Он широко используется отечественными и зарубежными специалистами при оценке защитной эффективности лекарственных средств (химиопрепаратов, интерферона и его индукторов) и медицинских иммунобиологических препаратов (вакцин, иммуноглобулинов).

Штамм хранится в Специализированной коллекции Филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России – ВЦ».

Культуры клеток. Использованы постоянные культуры клеток почек зелёных мартишек – GMK-AH-1(Д), почек свиньи – СПЭВ и почек собаки – MDCK. 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.

Исследуемые препараты. Ингавирин® – производства ОАО «Валента Фарм», Россия; Арбидол® – производства ЗАО «Мастерлек», Россия; Ремантадин® – производства ООО «РОЗФАРМ», Россия. В исследованиях использовались коммерческие препараты с гарантированным производителем сроком годности.

Противовирусную эффективность препаратов *in vitro* оценивали по следующим показателям:

– снижение уровня накопления вируса под воздействием препарата (Δ , lg);

Таблица 1. Сравнительная эффективность Ингавирина® по подавлению цитопатической активности вируса гриппа, штамм А/Аichi/2/68 (H3N2), в постоянных культурах клеток

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Культура клеток	Коэффициент подавления ЦПД, % (Хср.±σ _{хср.})
Ингавирин®	200	GMK-AN-1(Д)	66,7±3,3
	100		50,0±0,0
Арбидол®	25,0	MDCK	33,3±3,3
Ремантадин®	50,0		80,0±5,7
Ингавирин®	200		64,0±1,3
	100	СПЭВ	58,0±3,3
Арбидол®	25,0		40,0±3,1
Ремантадин®	50,0		86,0±2,4
Ингавирин®	200		70,0±0,0
	100		60,0±5,8
Арбидол®	25,0		36,7±3,3
Ремантадин®	50,0		83,3±3,3

Примечание. Здесь и в табл. 2: Количество опытов при изучении эффективности ингавирина и арбидола в культуре клеток MDCK составило 27, а в культурах клеток СПЭВ и GMK-AN-1(Д) — по 3 соответственно. На каждое разведение использовалось по 10 пробирок. Здесь и в табл. 2 и 3 препараты вносили через 2 часа после инфицирования. Здесь и в табл. 2 и 3 инфицирующая доза составляла 0,01 ЦПД/клетку.

— коэффициент ингибирования (Ки), %;
 — подавление цитотоксической активности вируса, %.
 Уменьшение уровня накопления вируса под влиянием препарата (Δ , lg) определяли по формуле:

$$\Delta = A_k - A_0, (1);$$

где A_k — уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду изучаемого препарата (lg ЦПД₅₀/мл); A_0 — уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого препарата (lg ЦПД₅₀/мл).

Коэффициент ингибирования (Ки, %) рассчитывали по формуле:

$$Ki = (A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}) / A_{\text{контр}} \times 100\% (2);$$

где $A_{\text{контр}}$ — уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду изучаемого препарата, (ЦПД₅₀/мл); $A_{\text{оп}}$ — уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого препарата (ЦПД₅₀/мл).

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ [1]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Стьюденту [2]

Результаты и обсуждение

Исследования препаратов проводили по нескольким направлениям: изучение подавления цитотоксичности вируса, формирования специфичного гемагглютинаина и репродукции вируса в монослое культуры клеток.

Результаты оценки токсичности Ингавирина® для постоянных культур клеток GMK-AN-1(Д), СПЭВ и MDCK свидетельствуют, что в концентрациях от 20 до 1000 мкг/мл препарат не вызывает визуально наблюдаемых изменений во всех использованных культурах клеток [3].

В работе использовали максимально эффективные дозы Ремантадина® и Арбидола® (1/2 от максимально переносимой концентрации),

составляющие 50 и 25 мкг/мл соответственно. Более высокие их концентрации токсичны для исследуемых культур клеток, а более низкие менее эффективно ингибируют репродукцию вируса гриппа [3]. В то же время Ингавирин® использовали в концентрации 200 мкг/мл, составляющей 1/5 от максимально переносимой концентрации.

При изучении влияния препаратов на цитотоксическую активность вируса в культурах клеток MDCK, GMK-AN-1(Д) и СПЭВ (табл. 1) было установлено, что Ингавирин® в концентрации 200 мкг/мл подавляет способность вируса гриппа, штамм А/Аichi/2/68 (H3N2), вызывать цитопатический эффект в монослое культур клеток (через 72 ч после инфицирования) на 64—70%. Изучение влияния Ингавирина® на динамику (через 12, 24, 48, 72 ч после инфицирования) репродукции вируса в культурах клеток свидетельствует о том, что в первые двое суток после инфицирования препарат полностью ингибирует цитопатическую активность возбудителя и формирование специфического гемагглютинаина.

Наименее эффективно подавляет цитотоксическую активность вируса Арбидол®, коэффициент ингибирования — 33—40%.

Результаты исследования по выявлению специфического гемагглютинаина в поддерживающей среде культур клеток GMK-AN-1(Д), MDCK и СПЭВ (табл. 2) в присутствии лекарственных препаратов свидетельствуют о том, что Ингавирин® подавляет формирование гемагглютинаина (через 72 ч после инфицирования) соответственно на 87,5, 85,0 и 87,5%; Ремантадин® — на 97,9, 96,9 и 96,7%; Арбидол® — на 33,3, 50,0 и 58,3% соответственно.

Исследования по изучению подавления репродукции вируса в культурах клеток MDCK и

Таблица 2. Сравнительная эффективность Ингавирина® по подавлению образования специфического гемагглютинина вируса гриппа, штамм А/Аichi/2/68 (H3N2), в постоянных культурах клеток

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Культура клеток	Коэффициент подавления ГА, % (Хср.±σ _{хср.})
Ингавирин®	200,0	GMK-AN-1(Д)	87,5±0,0
	100,0		75,0±0,0
Арбидол®	25,0	MDCK	33,3±16,7
Ремантадин®	50,0		97,9±2,1
Ингавирин®	200,0		85,0±1,3
Арбидол®	100,0	СПЭВ	80,0±1,1
	25,0		50,0±0,0
Ремантадин®	50,0		96,9±0,0
Ингавирин®	200,0	СПЭВ	87,5±0,0
Арбидол®	100,0		75,0±0,0
Арбидол®	25,0	СПЭВ	58,3±8,3
Ремантадин®	50,0		96,7±0,0

Примечание. В реакции гемагглютинации использовали эритроциты морской свинки.

Таблица 3. Сравнительная эффективность Ингавирина® в отношении вируса гриппа, штамм А/Аichi/2/68 (H3N2), по подавлению репродукции вируса в постоянных культурах клеток (n=3)

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Культура клеток	Уровень подавления накопления вируса, Δ, lg (Хср.±σ _{хср.})	Коэффициент ингибирования, % (Хср.±σ _{хср.})
Ингавирин®	200	GMK-AN-1(Д)	2,3±0,1	99,1±0,1
	100		1,4±0,2	92,2±0,2
Арбидол®	25	MDCK	1,5±0,1	92,5±0,2
Ремантадин®	50,0		4,8±0,1	99,99±0,1
Ингавирин®	200		2,2±0,1	99,4±0,1
Арбидол®	100	MDCK	1,4±0,1	96,0±0,1
	25		1,8±0,1	98,4±0,1
Ремантадин®	50,0		4,9±0,1	99,99±0,2

Примечание. Инфекционный титр вируса определяли титрованием на 9-суточных куриных эмбрионах (ЭИД₅₀/мл).

GMK-AN-1(Д) исследуемыми препаратами выявили, что препарат Ингавирин® эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа, штамм А/Аichi/2/68 (H3N2), в культурах клеток через 72 ч после инфицирования. Референс-препарат Ремантадин® также эффективно подавляет репродукцию вируса *in vitro*, в отличие от препарата Арбидол® (табл. 3). Учитывая результаты изучения цитотоксичности Ингавирина® и противовирусной эффективности можно сделать вывод о том, что величина ХТИ (химиотерапевтический индекс) для этого препарата более 10.

Исторически Ремантадин® является эталонным препаратом, эффективным в отношении вируса гриппа А, применяющийся для сравнительной оценки противовирусных средств *in vitro* и *in vivo* на модельных штаммах вируса гриппа, чувствительных к нему [4, 5]. Однако проблема быстрого появления резистентных штаммов к Ремантадину (в США в сезон 2005—2006 г. цир-

кулировало более 90% резистентных штаммов в популяции вируса гриппа А (H3N2), а в Российской Федерации в сезон 2007—2008 г. — до 77% резистентных штаммов в популяции вируса гриппа А (H3N2)) на фоне проводимого лечения гриппозной инфекции определила запрет на применение препаратов адамантанового ряда в ряде стран мира на протяжении последних трёх эпидемических сезонов [6].

Таким образом, проведённый сравнительный анализ эффективности Ингавирина® в отношении вируса гриппа А (H3N2) в чувствительных постоянных культурах клеток в сравнении с референс-препаратами (Ремантадин® и Арбидол®), свидетельствует о том, что Ингавирин® эффективно подавляет цитопатическую активность вируса, формирование специфического гемагглютинина и репродукцию вируса (по накоплению) и может быть рекомендован в качестве средства выбора противовирусной терапии при гриппе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: 2005.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: 1990.
3. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А., Бондарев В. П. Оценка токсичности неспецифических медицинских противовирусных средств, предназначенных для профилактики и лечения опасных и особо опасных вирусных инфекций. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 3—4: 11—14.
4. Saelens X., Vanlandschoot P., Martinet W. et al. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. Eur J Biochem 1999; 260: 1: 166—175.
5. Yingsakmongkon S., Miyamoto D., Sriwilaijaroen N. et al. In vitro inhibition of human influenza A virus infection by fruit-juice concentrate of Japanese plum (*Prunus mume* SIEB. et ZUCC). Biol Pharm Bull 2008; 31: 3: 511—515.
6. Бурцева Е. И., Шевченко Е. С., Белякова Н. В. и др. Мониторинг чувствительности выделенных в России эпидемических штаммов вирусов гриппа к этиотропным химиопрепаратам. Вопр. вирусол 2009; 5: 25—28.