

# Экспериментальное изучение противовирусной активности Ингавирина® в отношении вируса парагриппа человека

В. В. ЗАРУБАЕВ<sup>1</sup>, В. З. КРИВИЦКАЯ<sup>1</sup>, В. Е. НЕБОЛЬСИН<sup>2</sup>, О. И. КИСЕЛЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Научно-исследовательский институт гриппа СЗО РАМН»

<sup>2</sup> ОАО «Валента Фарм», Москва

## Experimental Investigation of Ingavirin® Antiviral Activity Against Human Parainfluenza Virus

V. V. ZARUBAEV, V. Z. KRIVITSKAYA, V. E. NEBOLSIN, O. I. KISELEV

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

Valenta Farm Co., Moscow

Изучены противовирусные свойства препарата Ингавирин® в отношении вируса парагриппа как актуального респираторного патогена человека двумя методами — иммуноферментного анализа и микротетразолиевого теста. Полученные результаты свидетельствуют о том, что помимо прямой противовирусной активности Ингавирин® обладает неспецифическим цитопротекторным действием. Влияя на синтез вирусных белков, препарат снижает проявление вирусного цитопатогенного действия. Применение препарата значительно снижало долю клеток бронхиального эпителия, погибших в острой стадии инфекции.

**Ключевые слова:** вирусы парагриппа, Ингавирин®, противовирусная эффективность, цитопротекторное действие.

The Ingavirin® antiviral properties with respect to the parainfluenza virus, as an actual human respiratory tract pathogen, were investigated by two methods, i.e. immunoenzymatic analysis and microtetrazolium test. The results showed that along with the immediate antiviral activity Ingavirin® had nonspecific cytoprotective properties. While affecting the virus proteins synthesis, Ingavirin® lowered the virus cytopathogenic action. The drug significantly decreased the portion of the bronchial epithelium cells killed at the stage of acute infection.

**Key words:** parainfluenza virus, Ingavirin®, antiviral activity, cytoprotective action.

## Введение

Несмотря на успехи в области вакцинации, химиопрофилактики и химиотерапии респираторных вирусных инфекций, эти заболевания по-прежнему занимают ведущее место в структуре инфекционной патологии человека. Появление в человеческой популяции вирусов гриппа птиц H5N1 и свиней H1N1, вызывающих заболевания человека в последние годы, свидетельствует о том, что эпидемический потенциал гриппа по-прежнему высок. Помимо гриппа, существенную долю респираторных инфекций составляют заболевания, вызванные вирусами других семейств: корона-, адено- и парамиксовирусами (респираторно-синцитиальный вирус и вирус парагриппа).

Вирусы парагриппа классифицированы в 4 серотипа. Они способны вызывать поражения верхних дыхательных путей у пациентов всех

возрастных групп, при этом наибольшая тяжесть заболевания отмечается у детей от полугода до 3 лет [1]. Подъем заболеваемости обычно наблюдается в конце года. Вызываемые ими заболевания представлены ларинготрахеобронхитами, бронхиолитами и пневмониями, приобретающими особую тяжесть у пациентов с иммунодефицитами различной природы. В ряде случаев вирусы парагриппа связывают с развитием острого респираторного дистресс-синдрома, цистического фиброза, миокардита, гепатита и ряда неврологических заболеваний, таких как рассеянный склероз и подострый склерозирующий панэнцефалит [1].

Несмотря на многочисленные сообщения об активности синтетических и природных соединений самых разных групп в отношении респираторных вирусов, арсенал препаратов, применяемых в клинической практике для их лечения, в частности при парагриппозной инфекции, весьма ограничен [2, 3]. Ведущим противовирусным средством является рибавирин, хотя его актив-

© Коллектив авторов, 2010

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

ность различается от одного исследования к другому [2]. Другие препараты для лечения парагриппозной инфекции включают пуриновые и пиримидиновые производные, антиоксиданты, ингибиторы слияния, статины, простагландины, нуклеозидные антибиотики, ингибиторы кальциевого гомеостаза и углеводородные производные. Ни один из этих классов препаратов, однако, на сегодняшний день не проходит клинических испытаний и не разрешен для лечения парагриппозной инфекции [4]. Рибавирин, являясь аналогом нуклеозидов, обладает существенными побочными эффектами, приводя к угнетению кроветворения и анемии [5]. Препараты интерферона, применяемые для лечения респираторных инфекций, эффективны в основном при профилактическом применении, в том числе при экстренной профилактике, и не могут считаться основным средством терапии при тяжёлых случаях инфекции. Вирусы парагриппа, кроме того, обладают эффективными механизмами подавления интерферон-индуцированного противовирусного каскада реакций, вследствие чего устойчивы к действию интерферона и его индукторов [4]. Ряд исследований, однако, свидетельствует об эффективности комбинированного применения иммуностимуляторов и стероидов у животных на модели парагриппозной инфекции [6].

Таким образом, весьма актуальной является проблема поиска и разработки новых противовирусных препаратов, не обладающих побочными эффектами и возможно более широкого спектра действия. Ранее была показана активность препарата Ингавирин® (2-(имидазол-4-ил)-этанамида пентандиовой-1,5 кислоты) в отношении вируса гриппа. Ингавирин® является низкомолекулярным аналогом эндогенного пептидоамина, выделенного из морского моллюска *Aplysia californica*. Как в опытах *in vitro* [7], так и *in vivo* на модели гриппозной инфекции [8] было показано, что препарат способен ограничивать репликацию вируса в культуре клеток, а также обладает высокой протективной активностью при экспериментальном гриппе у мышей.

Цель настоящего исследования — оценка противовирусных свойств препарата Ингавирин® в отношении вируса парагриппа как актуального респираторного патогена человека.

## Материал и методы

**Препараты.** В работе использовали препарат Ингавирин® (ОАО «Валента Фарм»). Аликвоты препарата разводили в среде для клеточных культур Игла МЕМ (БиолоТ, Санкт-Петербург, кат. # 1.3.3). В качестве референс-препарата использовали рибавирин (ICN Pharmaceuticals, Швейцария) в концентрациях 30–300 мкг/мл.

**Вирусы и клетки.** В работе был использован вирус парагриппа человека 3 типа штамм С-243 (ПГЗ) из коллекции вирусных штаммов НИИ гриппа СЗО РАМН. Вирус культивировали в клетках МА-104.

**Изучение противовирусной активности препаратов.** Из исходного вируссодержащего материала готовили серию десятикратных разведений от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$  на среде МЕМ. Клетки инфицировали ПГЗ в присутствии исследуемых препаратов. Заражённые клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в газопоточном инкубаторе Sanyo-175. Срок культивирования составлял 72 часа.

**Иммуноферментный анализ.** Клетки промывали 2 раза нейтральным фосфатным буфером, фиксировали 10 минут при +4°C 80% ацетоном, промывали 5 минут дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Продукцию вирусных белков в фиксированных клетках оценивали при помощи иммуноферментного анализа. Первичные типоспецифические антитела против вирусов гриппа (ООО ППДП, Санкт-Петербург) растворяли в фосфатном буфере с добавлением 5% обезжиренного сухого молока (для блокирования сайтов неспецифического связывания антител с белковыми детерминантами) до концентрации 5 мкг/мл и инкубировали с фиксированными клетками в течение 1 часа при 37°C (0,1 мл на лунку). Клетки промывали 3 раза по 0,1 мл/лунку фосфатного буфера и инкубировали с раствором антимишного иммуноглобулина, меченного пероксидазой (Sigma, Cat.# A2304), в разведении 1:10000 (0,1 мл на лунку) в течение 1 часа при 37°C. Несвязавшиеся антитела отмывали 3 раза по 0,1 мл/лунку фосфатного буфера и проводили цветную реакцию с раствором 3,3',5,5'-тетраметилбензидина с добавлением 0,03% перекиси водорода в ацетатном буфере pH 5,0 (0,1 мл на лунку). Реакцию останавливали 2N серной кислотой (0,1 мл на лунку) и измеряли оптическую плотность в ячейках при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Victor 1420 (Wallac, Финляндия). Реакцию считали положительной, если оптическая плотность в ячейках превышала фоновые значения для интактных клеток вдвое (такую дозу вируса принимали за 50% экспериментальную инфекционную дозу, EID<sub>50</sub>) и больше.

**Микротетразолиевый тест.** Репликация вируса в присутствии препаратов была дополнительно изучена по проявлению цитопатогенного действия вируса в культуре клеток. Вирус культивировали в присутствии препаратов, как описано выше, клетки были промыты 2 раза по 5 минут фосфатно-солевым буфером, и количество живых клеток было оценено при помощи микротетразолиевого теста (МТТ), характеризующего интенсивность митохондриального дыхания живых клеток [9]. С этой целью в лунки планшетов было добавлено по 100 мкл раствора (5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромид (ICN Biochemicals Inc., Aurora, Ohio) на физиологическом растворе. Клетки были инкубированы при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 часов и промыты в течение 5 минут фосфатно-солевым буфером. Осадок растворяли в 100 мкл на лунку ДМСО, после чего оптическую плотность в лунках планшетов измеряли на многофункциональном ридере Victor 1420 (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны 535 нм. Тест на наличие вируса считали положительным, если оптическая плотность в лунке была в два и более раз меньше, чем в контрольных лунках без вируса.

За титр вируса в обоих тестах принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию в половине инфицированных лунок планшетов. Титр выражали в логарифмах 50% цитотоксической дозы (lg СТД<sub>50</sub>). О вирусингибирующем действии соединений судили по снижению титра вируса в присутствии препарата по сравнению с соответствующими контрольными лунками без препаратов.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку результатов (расчёт средних значений и стандартных отклонений, а также расчёт 50% эффективных доз при помощи линейной регрессии) проводили при помощи программы Microsoft Excel. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия между группами, если параметр «*p*» не превышал 0,05.

**Таблица 1.** Противовирусная активность Ингавирина® в отношении вируса парагриппа 3 типа по результатам иммуноферментного анализа

Препарат, концентрация	Оптическая плотность (1000×OD <sub>450</sub> ) в лунках при разведении вируса					Титр вируса, lg ЭИД <sub>50</sub> *
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	0 (контроль препарата)	
Ингавирин® 500 мкг/мл	895±27	854±33	826±6	152±11	136±2	4,0±0,0
Ингавирин® 170 мкг/мл	978±3	866±17	853±10	169±8	137±2	4,3±0,3
Ингавирин® 50 мкг/мл	965±14	862±8	849±24	829±13	156±6	4,7±0,3
Рибавирин® 50 мкг/мл	890±16	851±21	754±14	212±9	142±5	4,3±0,3
Контроль вируса	947±6	867±8	836±17	829±14		5,0±0,0
Контроль клеток			137±5			—

**Примечание.** \* — титр вируса вычислен из трёх параллелей на планшете.

**Таблица 2.** Противовирусная активность Ингавирина® в отношении вируса парагриппа 3 типа по результатам микротетразолиевого теста

Разведение вируса	Оптическая плотность (OD <sub>535</sub> ) в присутствии препаратов						
	Ингавирин®, мкг/мл		Рибавирин, мкг/мл			Контроль вируса	
	500	170	50	300	100	30	
-1	178±8	166±3	114±5	240±17	307±23	233±8	120±9
-2	267±7	249±12	189±3	356±21	408±19	339±33	151±6
-3	383±30	324±13	282±9	528±6	548±5	361±18	249±14
-4	607±6	513±7	409±6	461±14	594±3	488±20	310±23
-5	616±4	591±26	607±20	569±12	656±11	673±15	493±11
-6	690±13	679±18	698±12	615±33	661±14	657±14	700±16
Контроль клеток				683±15			
Титр вируса* (lg EID <sub>50</sub> /0,2 mL)	2,0±0,0**	2,7±0,3**	3,0±0,0**	0,7±0,3**	1,3±0,3**	1,7±0,5**	3,8±0,2

**Примечание.** \* — титр вируса вычислен из трёх параллелей на планшете, \*\* — отличия от контроля вируса достоверны при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании противовирусная активность Ингавирина® в отношении вируса парагриппа человека 3 типа была изучена при помощи двух методов — иммуноферментного анализа (ИФА) и микротетразолиевого теста (МТТ).

Данные по влиянию Ингавирина® на продукцию специфических вирусных белков в культуре клеток суммированы в табл. 1.

По результатам ИФА применение Ингавирина® приводило к 10-кратному снижению вирусной продукции в культуре клеток, при этом активность Ингавирина® в максимальной концентрации вдвое превосходила активность препарата сравнения — рибавирина. При помощи регрессионного анализа была рассчитана 50% эффективная доза (ЕС<sub>50</sub>) Ингавирина® для вируса парагриппа, составившая 203 мкг/мл. Из ранее полученных данных 50% цитотоксическая доза Ингавирина® составляет >1000 мкг/мл, что дает индекс селективности >5. Исходя из полученных результатов, Ингавирин® следует характеризовать как этиотропный препарат против вируса парагриппа.

Данные по противовирусной активности Ингавирина®, полученные при помощи МТТ, суммированы в табл. 2.

По результатам МТТ применение Ингавирина® приводит к снижению инфекционного титра

вируса на 1,8 lg EID<sub>50</sub>/0,2 мл, т. е. снижению вирусной продукции приблизительно в 60 раз. В то же время синтез вирусспецифических белков, регистрируемых при помощи ИФА, при воздействии Ингавирина® снижается в 10 раз. Полученные данные можно объяснить двумя различными и дополняющими друг друга механизмами действия препарата. Помимо прямой противовирусной активности Ингавирин® обладает неспецифическим цитопротекторным действием. Влияя на синтез вирусных белков, препарат, кроме того, снижает проявление вирусного цитопатогенного действия. Цитопротекторное действие Ингавирина® было ранее показано на модели гриппозной инфекции у животных [10]. Использование этого препарата значительно снижало долю клеток бронхиального эпителия, погибших на острой стадии инфекции. Такие свойства Ингавирина® могут играть определенную роль и в случае парагриппозной инфекции в культуре клеток. Кроме того, можно также предполагать влияние Ингавирина® на процесс сборки и/или почкования вирионов потомства.

Следует отметить, что на моделях вирусной инфекции *in vivo* активность химиопрепаратов не ограничивается, как в гомогенной клеточной культуре, прямым противовирусным действием. Механизмы противовирусного действия соеди-

нений в этом случае могут включать в себя иммуномодулирующую, антиоксидантную, противовоспалительную, антитоксическую активность, и т. д. С учётом ранее полученных данных на модели гриппозной инфекции [8] можно предполагать наличие у Ингавирина® противовирусной активности при парагриппозной инфекции у животных и человека.

Помимо рибавирина в доклинических испытаниях, активностью против вируса парагриппа обладают ингибиторы нейраминидазы (занамивир), ингибиторы синтеза белка (пурамицин), ингибиторы нуклеинового синтеза, аскорбиновая кислота, и ряд других природных и синтетических соединений, включая олигопептидные ингибиторы синцитиеобразования. Ни одно из

них не разрешено для терапии парагриппозной инфекции, в том числе и рибавирин, оказавшийся неэффективным в виде аэрозоля при лечении парагриппозной пневмонии [1]. Учитывая вышесказанное, данные по противовирусному действию Ингавирина® в отношении парагриппа следует считать важными для дальнейшей разработки комплексных схем и методов лечения этой инфекции.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о противовирусной активности Ингавирина® в отношении парагриппа. Дополнительные исследования в этом направлении могут дать информацию о механизмах как прямого, так и опосредованного противовирусного действия препарата.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Henrickson K. J.* Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 242—264.
2. *Abed Y., Boivin G.* Treatment of respiratory virus infections. *Antiviral Res.* 2006; 70: 2: 1—16.
3. *Alymova I. V., Taylor G., Takimoto T. et al.* Efficacy of novel hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 against human parainfluenza viruses *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 5: 1495—502.
4. *Saladino R., Ciambecchini U., Nencioni L., Palamara A. T.* Recent advances in the chemistry of parainfluenza-1 (Sendai) virus inhibitors. *Med Res Rev* 2003; 23: 4: 427—455.
5. *De Franceschi L., Fattovich G., Turrini F. et al.* Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology* 2000; 31: 4: 997—1004.
6. *Prince G. A., Porter D. D.* Treatment of parainfluenza virus type 3 bronchiolitis and pneumonia in a cotton rat model using topical antibody and glucocorticosteroid. *J Infect Dis* 1996; 173: 3: 598—608.
7. *Логонова С. Я., Борисевич С. В., Лыков М. В. и др.* Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении «мексиканского» пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А, штаммы А/California/04/2009 и А/California/07/2009. *Антибиотики и химиотер* 2009; 3—4: 15—17.
8. *Логонова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др.* Изучение терапевтической эффективности нового отечественного препарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа А (H3N2). *Антибиотики и химиотер* 2008; 53: 11/12: 27—30.
9. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55—63.
10. *Зарубаев В. В., Гаршинина А. В., Калинина Н. А. и др.* Протективная активность препарата Ингавирин® при экспериментальной летальной гриппозной инфекции белых мышей, вызванной пандемическим вирусом гриппа А(H1N1)v. *Антибиотики и химиотерапия* 2010; 5—6: