



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

1

2012

ISSN 0507-4088



9 770507 408005



ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

Е. И. Исаева¹, В. Е. Небольсин², И. С. Козулина², О. В. Морозова¹

Изучение противовирусной активности Ингавирина® *in vitro* в отношении метапневмовируса человека

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России; ²ОАО «Валента Фарм», Москва

Исследовали противовирусную активность Ингавирина® в отношении инфекции, вызванной метапневмовирусом человека (HMPV) *in vitro*. В работе были использованы перmissive для HMPV клеточная линия человека Chang Conjunctiva, клон 1-5C4, и штамм HMPV, выделенный в Институте вирусологии имени Д. И. Ивановского. Проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что при внесении в питательную среду Ингавирина® в концентрации от 50 до 500 мкг/мл через 24 ч после инфицирования HMPV он эффективно подавляет репродукцию вируса на 2,2–3,3 lg соответственно. В концентрации 500 мкг/мл Ингавирин® защищал клетки от инфекции HMPV при внесении его за 24 ч до инфицирования клеток.

Ключевые слова: метапневмовирус человека, Ингавирин®, рибавирин, клеточная линия человека Chang Conjunctiva, клон 1-5C4, противовирусная активность

In vitro investigation of the antiviral activity of Ingavirin® against human metapneumovirus

E. I. Isayeva¹, V. E. Nebolsin², I. S. Kozulina², O. V. Morozova¹

¹D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow;
²OAO Valenta Pharm, Moscow

The antiviral activity of Ingavirin® against human metapneumovirus (HMPV) infection was investigated *in vitro*. The investigation used the human cell line ChangConjunctiva, permissive for HMPV, clone 1-5C4, and the HMPV strain isolated at the D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology. The experimental studies suggest that when added at a concentration of 50 to 500 µg/ml to a nutrient medium 24 hours after HMPV infection, Ingavirin® suppressed effectively virus replication by 2.2-3.3 logs, respectively. When used at a concentration of 500 µg/ml 24 hours before cell infection, Ingavirin® protected cells from HMPV infection.

Key words: human metapneumovirus; Ingavirin®; Ribavirin; the human cell line ChangConjunctiva, clone 1-5C4; antiviral activity

Метапневмовирус человека (HMPV) впервые был выделен из респираторных образцов у детей с ОРЗ неясной этиологии в Нидерландах и Швеции в 2001 г. Впоследствии он был обнаружен у людей всех возрастов на всех континентах. В настоящее время многие зарубежные исследователи рассматривают HMPV в качестве одного из лидирующих патогенов в этиологической структуре вирусных заболеваний нижних дыхательных путей в детском возрасте и у пожилых пациентов [1, 6, 9, 11, 17]. Известно, что HMPV способен проникать в ЦНС, приводя к развитию тяжелых энцефалитов [14].

Несмотря на ограниченные данные о патогенезе HMPV-инфекции в организме человека, в настоящее время ведутся исследования по разработке специфических противовирусных препаратов. В качестве потенциальной терапевтической стратегии рассматривается применение рибавирина, сульфатидсиалила липида (NMSO3), моноклональных антител, ингибиторов вирусно-клеточного слияния, а также наномолекул siRNAs, обладающих специфической анти-HMPV-активностью [10, 12, 20].

Имеются достижения в исследованиях по созданию моноклональных нейтрализующих антител к F-белку HMPV, которые оказались способными нейтрализовать прототипные штаммы А и В подгрупп HMPV *in vitro* [15].

Между тем самый инновационный подход, который открывает новую терапевтическую концепцию, – использование siRNAs – наномолекул, обладающих специфической анти-HMPV-активностью, заключаю-

щейся в подавлении репликации РНК HMPV, продемонстрировали С. Deffrasnes и соавт. [10].

На экспериментальных моделях *in vitro* было показано, что рибавирин оказывает эффективное действие на HMPV, значительно снижая вирусную нагрузку. Рибавирин применяют для лечения тяжелых случаев ОРВИ, однако его использование ограничено токсичностью препарата [19].

Тем не менее в настоящее время в клинической практике врача лечение заболеваний, ассоциированных с HMPV, остается симптоматическим. Умеренное и тяжелое течение инфекции может требовать поддерживающей гидратации и дополнительной оксигенотерапии. Пациентам с тяжелой дыхательной недостаточностью необходима искусственная вентиляция легких [16, 18]. В связи с этим поиск противовирусных препаратов остается весьма актуальной проблемой.

В последние годы в качестве противовирусного средства применяется препарат Ингавирин®, который обладает способностью подавлять активность вирусов гриппа А H3N2 и H1N1, гриппа В, парагриппа, аденовируса и активно изучается в клинической практике [1–5, 8].

Задачей настоящего исследования являлось установление эффективности противовирусного лекарственного препарата Ингавирин® в отношении HMPV на экспериментальной модели *in vitro*.

Материалы и методы

Вирус. В исследовании использовали авторский вирусный штамм метапневмовируса (HMPV), выде-

Контактная информация:

Исаева Елена Ивановна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: immunol.lab@mail.ru

ленный из носоглоточного смыва ребенка и депонированный в Государственную коллекцию вирусов (рег. № 2476).

Культура клеток. Исследование проводили на пермиссивной для НМРВ эпителиальной клеточной линии человека Chang Conjunctiva, клон 1-5C4. В работе использовали монослой перевиваемой клеточной линии Chang Conjunctiva, выращенный на среде 199 и Игла MEM (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hy Clone, США), L-глутамина и антибиотиков. Все вирусосодержащие пробы включали трипсин в концентрации 5 мкг/мл.

Определение активности НМРВ. Детекцию РНК НМРВ в супернатантах инфицированной эпителиальной клеточной линии человека Chang Conjunctiva, клон 1-5C, проводили с помощью ПЦР. За титр вируса принимали наибольшее разведение супернатанта зараженной культуры, в котором идентифицировали РНК НМРВ.

Инфекционный титр вируса определяли общепринятым методом путем внесения 10-кратных разведений вируса на подготовленный монослой клеток. Вирус был адсорбирован в течение 1 ч при 37°C, после чего была добавлена соответствующая среда, содержащая 2% сыворотки и 2 мкг/мл трипсина. Инфицированные клетки инкубировали в течение 5–6 дней при 37°C. После этого в надосадочной жидкости клеточной культуры определяли инфекционный титр НМРВ (представлен как среднее с значением $lg \pm m$).

В опытах использовали множественность заражения для инфицирования 0,01 и 0,1 ТЦИД₅₀/клетка. Питательная среда поддержки содержала 2 мкг/мл трипсина («Sigma» США), необходимого для репликации этого вируса [10].

Препараты. Противовирусный препарат Ингавирин® производства ОАО «Валента Фарм».

В качестве референс-препарата был использован Рибавирин (ООО «Озон», Россия).

Включенные в исследование препараты зарегистрированы, внесены в Государственный реестр лекарственных средств РФ и разрешены к применению.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для выделения РНК вируса применяли коммерческие тест-системы «Рибо-сорб» производства «Амплисенс» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для амплификации НМРВ использовали тест-системы производства «Амплисенс» (Россия). Также были использованы праймеры для ПЦР, любезно предоставленные профессором С. О. Вязовым (Эссен, Германия) из области N-гена [17]. ПЦР проводили в двухраундовом режиме по 35 циклов каждый: 94°C – 1 мин, 60°C – 1 мин и 72°C – 2 мин в режиме автоматической амплификации на приборе «Терцик» (ЗАО «ДНК-Технология», Москва). Продукты ПЦР анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующей визуализацией в ультрафиолетовом спектре. Количество продукта анализировали, используя денситометрическую компьютерную программу Image J. 1.36.1 на флуоресцентном ПЦР-анализаторе Ала1/4 (Biosan).

Исследование цитотоксического действия противовирусных препаратов на культуре клеток. В системе доклинического исследования лекарственных препаратов первым этапом является оценка токсичности соединений для культуры клеток [7]. Как правило, в процессе исследования токсичности соединений изучают влияние различных концентраций препаратов на морфологию клеток, на которых проводят все дальнейшие исследования.

Токсичность препаратов оценивали по жизнеспособ-

ности незараженных клеток культуры Chang Conjunctiva путем воздействия различных концентраций препаратов. Монослой клеточной линии Chang Conjunctiva культивировали в присутствии лекарственных препаратов, добавленных в концентрациях от 12,5 до 1000 мкг/мл в течение 96 ч при 37°C. Результаты учитывали по появлению цитодеструктивных изменений и изменению морфологических свойств культуры клеток. Концентрацию препарата, ингибирующую значение оптической плотности на 50% по сравнению с клеточным контролем, принимали за 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀).

Параметры токсичности рассчитывали, используя установленные в эксперименте значения максимальной переносимой концентрации (МПК), т. е. максимальной концентрации, которая еще не вызывает видимые цитодеструктивные изменения в тканевой культуре.

Противовирусную активность препаратов изучали в культуре клеток Chang Conjunctiva. Инфицирование проводили дозой вируса 0,01 и 0,1 ТЦИД₅₀/клетка на соответствующей среде с добавлением трипсина. Контроли вируса и клеток культивировали в этой же среде. Далее планшеты инкубировали в термостате с СО₂ в течение 24 ч при 37°C, после чего к инфицированным клеткам культуры Chang Conjunctiva добавляли препараты в двукратной концентрации в 100 мкл среды за 24 ч до инфицирования и через 24 ч после инфицирования клеток. После инкубации клеток с исследуемыми препаратами при 37°C через 5–6 дней учитывали результат в ПЦР.

Оценка противовирусного действия препаратов в культуре клеток включала количественное изучение подавления репродукции НМРВ в культуре клеток Chang Conjunctiva. Противовирусный эффект препаратов *in vitro* оценивали по общепринятым показателям: снижение уровня накопления вируса под воздействием препарата (Alg), коэффициент ингибирования (КИ) [1].

Статистическая обработка данных. Статистический анализ результатов выполнен с применением ПО Microsoft Excel на персональном компьютере.

Инфекционные титры вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [13].

Статистическую обработку результатов, касающихся эффективности лекарственных препаратов в отношении НМРВ, проводили по методу Стьюдента. Достоверность различий определяли по величине *p*. Различия считали достоверными при *p* < 0,05, высокодостоверными при *p* < 0,001, недостоверными при *p* > 0,05.

Результаты и обсуждение

При исследовании способности 11 клеточных линий человека и животных поддерживать репродукцию вируса, наиболее чувствительной к НМРВ оказалась эпителиальная клеточная культура человека Chang Conjunctiva, клон 1-5C4 [1]. Изучение противовирусной эффективности препаратов проводили на пермиссивной для НМРВ клеточной линии Chang Conjunctiva в присутствии трипсина. Результаты опыта учитывали на 5–6-е сутки после заражения вирусом, когда уровень накопления НМРВ достигал максимума.

Результаты исследования цитотоксического действия противовирусных препаратов Ингавирин® и рибавирин на морфологию клеток линии Chang Conjunctiva представлены на рис. 1.

Препарат Ингавирин® до концентрации 500 мкг/мл не обладал цитотоксическими свойствами, видимые изменения морфологии клеток не отмечены на протяжении всего наблюдения. При максимальной концентрации 1000 мкг/мл деструктивные изменения происходили в 50% клеток линии Chang Conjunctiva.

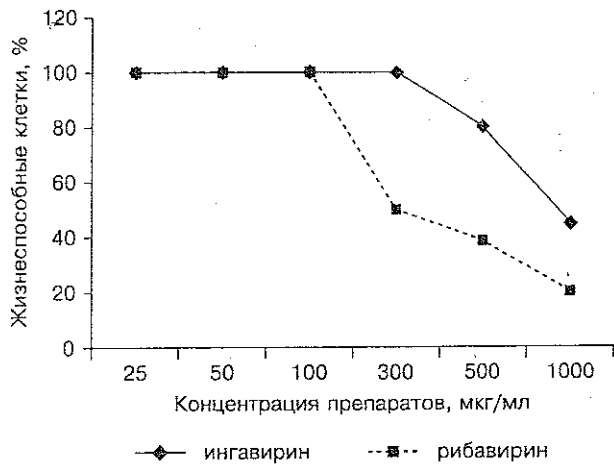


Рис. 1. Влияние концентрации препаратов на жизнеспособность клеток Chang Conjunctiva.

Рибавирин оказался более токсичным для культуры Chang Conjunctiva, величина МПК составила 100 мкг/мл. В концентрации до 100 мкг/мл он не вызывал видимые цитодеструктивные изменения в клеточной линии. В концентрации 300 мкг/мл рибавирина морфология у 50% клеток была изменена.

Результаты изучения эффективности препаратов в отношении НМРВ на культуре клеток Chang Conjunctiva по подавлению инфекционной активности вируса представлены в табл. 1-2. Из табл. 1 следует, что Ингавирин® снижает инфекционный титр НМРВ так же эффективно, как и рибавирин, и подавление инфекционной активности НМРВ зависит от концентрации препаратов.

Через 24 ч после инфицирования Ингавирин® в концентрации 50-500 мкг/мл подавлял репродукцию вируса на 2,2-3,3 lg, КИ составил от 43,3 до 64,8%.

Внесение лекарственного средства в культуру клеток Chang Conjunctiva за 24 ч до инфицирования вирусом в концентрациях препарата 50-300 мкг/мл не влияло на

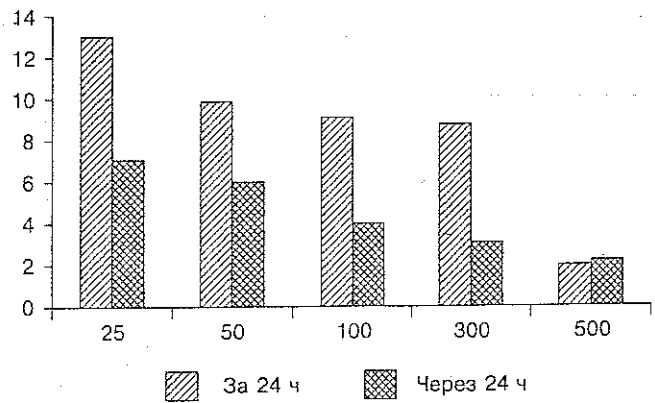


Рис. 2. Влияние различных концентраций препарата Ингавирин® на репродукцию метапневмовируса.

По оси абсцисс - концентрация препарата Ингавирин®, мкг/мл, по оси ординат - количество РНК метапневмовируса по конечной точке в пробах.

репродукцию вируса, при максимальной концентрации 500 мкг/мл инфекционная активность вируса была подавлена на 3,1 lg при КИ 61,4%.

Активность химиопрепарата рибавирин в отношении НМРВ была достаточно высокой (см. табл. 2), что согласуется с данными зарубежных исследователей [19]. Эффективным оказалось использование препарата после инфицирования клеточной культуры вирусом в концентрации 50 мкг/мл. Частичное снижение инфекционного титра НМРВ получено при внесении препарата за 24 ч до инфицирования.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что защитные свойства Ингавирин® зависят от дозы НМРВ, используемой для заражения клеток Chang Conjunctiva. В частности, показано, что препарат в концентрации 50-300 мкг/мл не защищает от действия вируса клетки, инфицированные при множественности заражения 0,1 ТЦИД₅₀. В то же время препарат, внесенный за 24 ч до заражения вирусом в концентрации 300 мкг/мл и выше, защищал культуру клеток от действия

Таблица 1

Противовирусная активность препарата Ингавирин® в отношении НМРВ

Схема внесения препарата	Инфицирующая доза вируса	Концентрация препарата, мкг/мл	Инфекционный титр вируса***		
			уровень накопления вируса, lg	подавление репродукции вируса, Δlg*	КИ**, %
За 24 ч до инфицирования	0,1	50	5,04 ± 0,75	0,04	-
	0,01	50	4,0 ± 0,4	0,5 ± 0,1	11,1
	0,1	100	4,75 ± 0,66	0,25 ± 0,15	4,9
	0,01	100	3,8 ± 0,6	0,7 ± 0,2	15,6
	0,1	300	4,25 ± 0,88	0,75 ± 0,55	14,8
	0,01	300	3,0 ± 0,3	1,5 ± 0,4	33,3
	0,1	500	1,96 ± 0,97	3,12 ± 0,97	61,4
	0,01	500	1,50 ± 0,6	3,0 ± 0,7	66,6
	0,01	50	2,88 ± 0,94	2,2 ± 0,9	43,3
	0,01	50	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,7	53,3
Через 24 ч после инфицирования	0,1	100	2,67 ± 0,77	2,87 ± 0,64	56,5
	0,01	100	1,5 ± 0,2	3,0 ± 0,9	66,6
	0,1	300	2,04 ± 0,83	3,04 ± 0,83	59,9
	0,01	300	1,3 ± 0,1	3,2 ± 0,8	71,1
	0,1	500	1,79 ± 0,8	3,29 ± 0,8	64,8
	0,01	500	1,0 ± 0,1	3,5 ± 0,9	77,7
Контроль вируса без внесения препарата	0,1	-	5,08 ± 0,75	-	-
	0,01	-	4,5 ± 0,4	-	-

Примечание. Здесь и в табл. 2: * - разность между уровнями накопления вируса; ** - коэффициент ингибирования; *** - средние значения по результатам 3 независимых опытов при 4 повторностях для каждой концентрации препарата.

Противовирусная активность препарата рибавирина в отношении НМРВ

Схема внесения препарата	Инфицирующая доза вируса	Концентрация препарата, мкг/мл	Инфекционный титр вируса***		
			уровень накопления вируса, lg	подавление репродукции вируса, Δlg*	КИ**, %
За 24 ч до инфицирования	0,1	25	4,5 ± 0,3	0,6 ± 0,2	11,8
	0,01	25	3,5 ± 0,8	1,0 ± 0,3	22,2
	0,1	50	3,28 ± 0,7	1,2 ± 0,4	22,2
	0,01	50	2,0 ± 0,5	2,5 ± 0,5	44,4
Через 24 ч после инфицирования	0,1	25	3,1 ± 0,5	2,0 ± 0,3	44,4
	0,01	25	2,0 ± 0,9	2,5 ± 0,7	55,6
	0,1	50	1,8 ± 0,75	3,25 ± 0,8	64,0
	0,01	50	0,9 ± 0,2	3,6 ± 1,2	80,7
Контроль вируса без внесения препарата	0,1	–	5,08 ± 0,75	–	–
	0,01	–	4,5 ± 0,4	–	–

НМРВ при инфицирующей дозе 0,01 ТЦИД₅₀.

Как следует из представленных результатов, Ингавирин®, внесенный после заражения клеток вирусом НМРВ, подавляет инфекционные свойства наиболее эффективно, причем степень подавления инфекционной активности вируса прямо пропорциональна концентрации препарата и зависит от инфицирующей дозы вируса. Так, при внесении препарата в концентрации от 50 до 500 мкг/мл через 24 ч после заражения клеток вирусом в дозе 0,01 ТЦИД₅₀ происходило достоверное торможение продукции вируса, о чем свидетельствует снижение инфекционного титра вируса на 2,0 lg и более в зависимости от концентрации Ингавирина®.

Результаты, касающиеся подавления инфекционной активности вируса, коррелировали с показателями, полученными в ПЦР (рис. 2).

Было важно установить, насколько эффективно сохраняется воздействие препаратов на инфекционную активность НМРВ при дальнейшем пассировании.

При последующем определении инфекционной активности вируса после первого воздействия препаратов способность к репродукции НМРВ была подавлена под влиянием Ингавирина® на 1,9 ± 0,77 lg при использовании препарата за 24 ч до заражения в концентрации 500 мкг/мл. Результаты исследования показали, что и после воздействия Ингавирина® через 24 ч после инфицирования клеток вирусом препарат сохраняет свое влияние на НМРВ. Инфекционный титр вируса после воздействия ингавирина в концентрации 500 мкг/мл снизился на 2,5 ± 0,75 lg, 300 мкг/мл – на 1,8 ± 0,5 lg, 100 мкг/мл – на 1,5 ± 0,47 lg и 50 мкг/мл – на 1,0 ± 0,2 lg. Под влиянием рибавирина инфекционный титр вируса снижен на 1,1 ± 0,7 lg в тех же условиях проведения эксперимента при максимальной концентрации 50 мкг/мл.

Таким образом, результаты изучения противовирусных препаратов в отношении НМРВ свидетельствуют о том, что Ингавирин® более эффективно подавляет репродукцию вируса при внесении препарата после инфицирования монослоя клеток. При этом следует заметить, что сохраняется статистически достоверная зависимость от концентрации препарата и множественности заражения вирусом. Противовирусная эффективность Ингавирина® в отношении НМРВ оказалась сравнимой по подавлению инфекционной активности вируса и характеру воздействия с Рибавирином.

Результаты, полученные при исследовании сохранения влияния препаратов на инфекционную активность НМРВ, показали, что только Ингавирин® сохраняет противовирусную активность, причем при всех изученных концентрациях препарата при применении его через 24 ч после инфицирования клеток вирусом.

Таким образом, среди исследуемых препаратов на модели *in vitro* в отношении НМРВ активность Ингавирина® сопоставима с эффективностью рибавирина, однако преимуществом Ингавирина® является то, что он менее токсичен и не оказывает негативное побочное действие. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения препарата Ингавирин® при НМРВ-инфекции у детей и пожилых пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козулина И. С. Новые инфекционные агенты – метапневмовирус и бокавирус человека: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010.
2. Колобухина Л. В., Малышев Н. А., Меркулова Л. Н. и др. Изучение эффективности и безопасности нового противовирусного препарата Ингавирин при лечении больных гриппом // Рус. мед. журн. – 2008. – Т. 16, № 23. – С. 1–15.
3. Колобухина Л. В., Меркулова Л. Н., Бурцева Е. И. и др. Эффективность Ингавирина в лечении гриппа у взрослых // Тер. арх. – 2009. – Т. 81, № 3. – С. 51–54.
4. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др. Изучение лечебной эффективности нового отечественного препарата Ингавирин в отношении возбудителя гриппа А (H3N2) // Антибиотики и химиотер. – 2008. – Т. 53, № 7–8. – С. 27–30.
5. Логинова 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 A/California/04/2005 и A/California/07/2009 // Антибиотики и химиотер. – 2009. – Т. 54, № 3–4. – С. 15–17.
6. Мажуль Л. А., Шилдген О., Исаева Е. И., Вязов С. О. // Вопр. вирусол. – 2007. – № 3. – С. 4–8.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2005.
8. Шлишук Л. Н., Небольсин В. Е., Кабанов А. С. и др. Эффективность Ингавирина *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1/09) // Журн. микробиол. – 2011. – № 2. – С. 93–96.
9. Cilia G., Onate E., Perez-Yarza E. G. et al. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection // J. Med. Virol. – 2008. – Vol. 80, N 10. – P. 1843–1849.
10. Deffrasnes C., Cote S., Boivin G. Analysis of replication of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 488–490.
11. Landry M. L., Cohen S., Ferguson D. Prospective study of human metapneumovirus detection in clinical samples by use of light diagnostics direct immunofluorescence reagent and real-time PCR // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – P. 1098–1100.
12. Miller S. A., Tollefson S., Crowe J. E. et al. Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. // J. Virol. – 2007. – Vol. 81. – P. 141–149.
13. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints // Am. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493–497.
14. Schildgen O., Geikowski T., Glatzel T. et al. Frequency of human metapneumovirus in the upper respiratory tract of children with symptoms of an acute otitis media // Eur. J. Pediatr. – 2005. – Vol. 164, № 6. – P. 400–401.

15. Ulbrandt N. D., Ji H., Patel N. K. et al. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 7799–7806.
16. Van den Hoogen B. G., de Jong J. C., Groen J. et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease // *Nat. Med.* – 2001. – Vol. 7. – P. 719–724.
17. Viazov S., Ratjen F., Scheidhauer R. et al. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N 7. – P. 3043–3045.
18. Wilkesmann A., Schildgen O., Eis-Hubinger A. M. et al. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical

severity as respiratory syncytial virus infections // *Eur. J. Pediatr.* – 2006. – Vol. 165, N 7. – P. 467–475.

19. Wyde P. R., Chetty E. H., Jewell A. M. et al. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by Ribavirin and immune serum globulin in vitro // *Antiviral Res.* – 2003. – Vol. 60. – P. 51–59.
20. Wyde P. R., Moylett E. H., Chetty E. H. et al. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays // *Antiviral Res.* – 2004. – Vol. 63. – P. 51–59.

Поступила 30.09.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 615.371:578.832.11.015.46

А. Н. Найхин, Т. В. Чиркова, Г. Д. Петухова, Д. А. Кореньков, С. А. Донина, Л. Г. Руденко

Стимуляция гомо- и гетерологичной Т-клеточной иммунологической памяти у волонтеров, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной типа А(Н5N2)

НИИ экспериментальной медицины Северо-Западного отделения РАМН, Санкт-Петербург

Работа посвящена изучению способности живой реассортантной гриппозной вакцины (ЖГВ) типа А(Н5N2) стимулировать у людей Т-клеточный иммунный ответ, опосредованный вирусспецифическими CD4⁺- и CD8⁺-клетками иммунологической памяти. Эти данные сопоставлены с количественными характеристиками гуморального иммунного ответа. Показано, что двукратная интраназальная иммунизация ЖГВ А(Н5N2) «наивных» в отношении контактов с возбудителем птичьего гриппа людей индуцирует у них продукцию циркулирующих вирусспецифических CD8⁺- и CD4⁺-клеток памяти, специфических как к вакцинному штамму, так и к актуальному вирусу гриппа А(Н1N1). Получены данные, свидетельствующие о том, что часть взрослых людей не являются абсолютно неиммунными в отношении птичьего вируса гриппа А(Н5N2), поскольку в довакцинальном периоде у них обнаруживают перекрестно реагирующие Т-клетки иммунологической памяти, специфические к этому возбудителю. Количество (в %) этих клеток значительно варьирует внутри группы. Количественные показатели поствакцинального накопления CD4⁺- и CD8⁺-клеток памяти находились в обратной зависимости от их предвакцинального уровня.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина, птичий грипп, иммунологическая память

Stimulation of homo- and heterologic T-cell immunological memory in volunteers inoculated with live influenza A (H5N2) reassortant vaccine

A. N. Naikhin, T. V. Chirkova, G. D. Petukhova, D. A. Korenkov, S. A. Donina, L. G. Rudenko

Research Institute of Experimental Medicine, North-Western Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Saint Petersburg

The study deals with the ability of live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIV) A (H5N2) to stimulate a CD4⁺ and CD8⁺ immunological memory T cell-mediated immune response in volunteers. These data were compared with the quantitative characteristics of a humoral immune response. A two-dose regimen of intranasal vaccination of avian influenza naïve people with A (H5N2) LAIV induced the production of circulating CD4⁺ and CD8⁺ memory cells specific to both A (H5N2) and seasonal A (H1N1) influenza strains. Some of the volunteers were not absolutely A (H5N2) influenza virus naïve since they had been found to have this virus-specific cross-reactive immunological memory T-cells in the prevaccination period. The content (%) of these cells varied significantly within the group. The quantitative values of postvaccination CD4⁺ and CD8⁺ memory cell accumulation were inversely related to their prevaccination level.

Key words: live influenza vaccine, avian influenza, immunological memory

Потенциальным источником появления пандемических вирусов гриппа А в человеческой популяции являются циркулирующие среди диких и домашних птиц вирусы этого подтипа. В 1997—2005 гг. во время многочисленных вспышек гриппа А(Н5N1) среди птиц зарегистрировано несколько сотен людей, инфицированных этим возбудителем [20]. У большей части из них наблюдались тяжелые клинические проявления с частыми летальными исходами. Хотя прямых доказа-

тельств передачи птичьих вирусов гриппа от человека к человеку не получено, по рекомендации ВОЗ разработаны разные типы вакцин для защиты людей от этих вирусов [7]. Проведены клинические испытания нескольких вариантов инактивированных (ИГВ) [7] и живых (ЖГВ) [6, 14] гриппозных вакцин типа А(Н5N1). Все они индуцировали у волонтеров накопление циркулирующих и/или локальных антител.

Разработана ЖГВ типа А(Н5N2) на основе реас-

Контактная информация:

Петухова Галина Дмитриевна, канд. биол. наук, науч. сотр.; e-mail: gala.iem@gmail.com