

Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении «мексиканского» пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А, штаммы А/California/04/2009 и А/California/07/2009

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, М. В. ЛЫКОВ¹, Е. В. ВЕДЕНИНА¹,
Г. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. П. БОНДАРЕВ¹, В. Е. НЕБОЛЬСИН², А. Г. ЧУЧАЛИН³

¹ Филиал ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» — «Вирусологический центр», *Сергиев Посад*;

² ОАО «Валента Фармацевтика», *Москва*;

³ НИИ пульмонологии Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, *Москва*

In vitro Efficacy of Ingavirin Against the Mexican Pandemic Subtype H1N1 of Influenza A Virus, Strains A/California/04/2009 and A/California/07/2009

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, M. V. LYKOV, E. V. VEDENINA,
G. V. BORISEVICH, V. P. BONDAREV, V. E. NEBOLSIN, A. G. CHUCHALIN

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

Research Institute of Pulmonology, Federal Medico-Biological Agency of the Russian Federation, *Moscow*.

Ингавирин® эффективно ингибирует размножение вируса гриппа, штаммы А/California/04/2009(H1N1) и А/California/07/2009(H1N1), в культуре клеток MDCK. Коэффициент подавления цитопатической активности составил 50 и 60%, а коэффициент подавления формирования специфического гемагглютинаина до обогащения в куриных эмбрионах составил 50 и 50%, после обогащения — 79,1 и 75% соответственно.

Ключевые слова: *грипп А (H1N1), Ингавирин®, противовирусная эффективность.*

Ingavirin® was shown to be efficient in inhibition of the influenza virus strains A/California/04/2009 and A/California/07/2009 (H1N1) in the MDCK cell culture. The coefficient of the cytopathic activity inhibition amounted to 50 and 60%, and the inhibition coefficients of the specific hemagglutinin formation were 50 and 50%, and 79,1 and 75% before and after the enrichment in chick embryos respectively.

Key words: *influenza A virus (H1N1), Ingavirin®, antiviral activity.*

11 июня 2009 г. Всемирная организация здравоохранения объявила первую пандемию гриппа в XXI веке, вызванную «мексиканским» пандемическим подтипом H1N1 вируса гриппа А. Ранее возбудитель гриппа А свиней, подтип H1N1, широко циркулировал на территории Северной и Центральной Америки и в Европе, периодически вызывая эпизоотии среди свиней и, как следствие, заболевания среди фермеров. Чаще всего грипп А вызывают изоляты (штаммы) возбудителя, выделенные от людей и животных, относящиеся к трем подтипам: H1N1, H1N2, H3N2. В литературе описано выделение и других подтипов, вызывающих это заболевание у людей и свиней, однако они в настоящее время не являются эпизоотически и эпидемически значимыми [1, 2].

Центр профилактики и контроля за заболеваниями США (CDC) регистрировал в 90-х годах XX

столетия на своей территории единичные случаи заболевания гриппом А, подтип H1N1, примерно раз в 2 года [3, 4]. Однако с декабря 2005 по февраль 2009 года CDC было зарегистрировано двенадцать случаев инфицирования новым подтипом H1N1 гриппа А людей в десяти штатах США. При этом 6 больных имели прямой контакт с домашними свиньями, 5 больных сообщили о близком контакте с этими животными, а в одном случае источник инфекции не был определен [5–7].

С 2007 года на территории США это заболевание подлежит обязательной регистрации. Так, в 2007 году три случая заражения людей гриппом свиней были зафиксированы в США в штатах Огайо и Иллинойс. Изоляты, выделенные от людей и свиней, были частично секвенированы и отнесены к двум филогенетическим новым подтипам H1N1 и H1N2 вируса гриппа типа А [8]. Очевидно, что возбудитель эволюционно претерпел изменения в сторону эпидемически значимой филогенетической

© Коллектив авторов, 2009

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

Таблица 1. Эффективность Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа А по подавлению цитопатической активности вируса

Препарат	Подавление ЦПД вируса гриппа, подтипа ..., процент, $X_{cp} \pm \sigma_{xcp}$.			
	H1N1, штамм	H1N1, штамм	H3N2	H5N1
	A/California/04/2009 (n=2)	A/California/07/2009 (n=2)	(n=5)	(n=5)
Ингавирин®	50*	60,0*	68,0±3,3	60,0±3,3
Контроль дозы (без препарата)	—	—	—	—
Контроль среды	—	—	—	—

Примечание. * — представлено X_{cp} .

линии вируса гриппа свиней типа А (H1N1). В пользу этого свидетельствует тот факт, что первый штамм, названный А/California/04/2009 (H1N1), выделенный вирусологами США в марте 2009 года от больного гриппом А(H1N1), является филогенетически новым вирусом гриппа типа А, отличным в антигенном отношении от других штаммов, выделенных за последние 30 лет на территории Северной Америки.

Заболевание вызвано реассортантом вируса гриппа типа А/H1N1, комбинация генов которого ранее не встречалась у вирусов гриппа А (H1N1), выделенных от людей, птиц и свиней. Возбудитель в результате мутаций, изменив свои биологические свойства, приобрёл способность инфицировать людей и передаваться аэрогенно от человека к человеку, вызывая в основном не тяжёлые клинические формы заболевания. Специалистами доказано, что новый вирус гриппа А (H1N1) является реассортантом по 3 фрагментам генома возбудителя: от «сезонного» вируса гриппа А человека он «приобрёл» новые последовательности гена белка PB1, от возбудителя гриппа А птиц — последовательности генов белков PB2 и PA, а от вируса гриппа свиней — последовательности генов белков NA, NA, NP, M2, NS2 [9].

Пандемия гриппа А (H1N1) охватила 102 государства мира (по состоянию на 26 июня 2009 г.). Наибольшее количество случаев заболевания выявлено в США (21449 случаев), Мексике (8279 случаев), Канаде (6732 случая), Чили (5186 случаев), Великобритании (3618 случаев), Австралии (3280 случаев), Аргентине (1391 случай), Китае (1089 случаев) и Японии (1049 случаев). Зарегистрированы летальные случаи в Мексике (116 случаев), США (87 случаев), Аргентине (21 случай), Канаде (19 случаев), Чили (7 случаев), Австралии (3 случая), Гватемале (2 случая), Доминиканской Республике (2 случая), Колумбии (2 случая), Коста-Рике (1 случай), Великобритании (1 случай), Филиппинах (1 случай). Общее количество заболевших и погибших, чьи диагнозы были лабораторно подтверждены ВОЗ, составило 59814 и 263 человека (летальность ~0,44 %) соответственно. В Российской Федерации зарегистрировано 3 возвзых случая заболевания людей [10].

Складывающаяся пандемическая ситуация в мире обосновывает актуальность изучения эффективности противогриппозных препаратов в отношении нового подтипа вируса гриппа А (H1N1).

Целью настоящей работы является изучение эффективности *in vitro* отечественного химиопрепарата Ингавирин® в отношении «мексиканского» пандемического подтипа H1N1 вируса гриппа А.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус гриппа А, штаммы А/California/04/2009(H1N1) и А/California/07/2009(H1N1), полученные из ФГУ «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, адаптированные к лёгким белых мышей вирус гриппа, штамм А/Aichi/2/68 (H3N2), полученный в 2003 году из ГУ «НИИ вирусологии» им. Д. И. Ивановского РАМН, а также вирус гриппа, штамм А/кураца/Курган/Россия/2/05 (H5N1), выделенный в октябре 2005 года специалистами филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ» из биопроб, доставленных из очага заболевания на Утятской птицефабрике Курганской области. Все штаммы хранятся в Специализированной коллекции филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ».

Культура клеток. Использована постоянная культура клеток 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. Монослой клеток MDCK инфицировали вирусом гриппа А при температуре 37°C в течение 60 мин в дозе 10 ЦПД₅₀. Оценку цитопатической активности вируса в присутствии и при отсутствии химиопрепаратов проводили с использованием светового микроскопа. Исследуемый препарат вносили спустя 1 час после инфицирования монослоя.

Исследуемый препарат. Ингавирин® производства ОАО «Валента Фармацевтика», Россия. Препарат исследовался в концентрации 200 мкг/мл.

Оценка противовирусной эффективности Ингавирина® осуществлена в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ [11]. Основными критериями оценки эффективности *in vitro* являлись:

- коэффициент ингибирования (Ки, %);
- подавление цитопатической активности вируса (%).

Результаты и обсуждение

Результаты изучения эффективности препарата в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа, штаммы А/California/04/2009(H1N1) и А/California/07/2009(H1N1), по подавлению цитопатической активности вируса свидетельствуют (табл. 1), что Ингавирин® эффективно ингибирует размножение вируса в культуре клеток. Коэффици-

Таблица 2. Эффективность Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа А по подавлению гемагглютинирующей активности

Препарат	Изучение эффективности ингавирина в отношении вируса гриппа А, подтип ...					
	H1N1, штамм A/California/04/2009 (n=1)		H1N1, штамм A/California/07/2009 (n=1)		H3N2, штамм A/Aichi/2/68 (n=5)	
	гемагглютинирующая активность (обратная величина), ед. ГА	подавление ГА, %	гемагглютинирующая активность (обратная величина), ед. ГА	подавление ГА, %	гемагглютинирующая активность (обратная величина), ед. ГА, X _{ср.} ±σ _{ср.}	подавление X _{ср.} ±σ _{ср.}
Ингавирин®	8	50	8	50	14,4±1,6	86,0±2,5
Контроль дозы (без препарата)	16	—	16	—	102,4±15,6	—
Контроль среды	—	—	—	—	—	—

Таблица 3. Эффективность Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа, штаммы A/California/04/2009 (H1N1) и A/California/07/2009 (H1N1), по подавлению гемагглютинирующей активности возбудителя после обогатительного пассажа в куриных эмбрионах

Препарат	Изучение эффективности ингавирина в отношении вируса гриппа А, подтип ...			
	H1N1, штамм A/California/04/2009 (n=2)		H1N1, штамм A/California/07/2009 (n=3)	
	гемагглютинирующая активность (обратная величина) X _{ср.} , ед. ГА	подавление гемагглютинирующей активности вируса, %	гемагглютинирующая активность (обратная величина) X _{ср.} ±σ _{ср.} , ед. ГА	подавление гемагглютинирующей активности вируса, %
Ингавирин®	6,7	79,1	13,3±4,6	75,0
Контроль дозы (без препарата)	32	—	53,3±10,7	—
Контроль среды	0	—	0	—

ент подавления цитопатической активности составил 50 и 60% соответственно. Следует отметить, что эффективность Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении нового подтипа H1N1 вируса гриппа А по подавлению цитопатической активности сопоставима с таковыми показателями в отношении других подтипов (H3N2, H5N1) возбудителя.

Результаты изучения эффективности Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа, штаммы A/California/04/2009(H1N1) и A/California/07/2009(H1N1), по подавлению гемагглютинирующей активности вируса свидетельствуют о том, что Ингавирин® эффективно подавляет формирование специфического гемагглютинина возбудителя на 50 и 50% соответственно. Следует отметить, что показатель активности Ингавирина® по подавлению гемагглютинирующей активности вируса сопоставим с таковым в отношении подтипа гриппа А (H3N2) (табл. 2).

Изучение эффективности Ингавирина® в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа, штаммы A/California/04/2009(H1N1) и A/California/07/2009(H1N1) после обогатительного пассажа в куриных эмбрионах, свидетельствует о том, что Ингавирин® на 79,1 и 75% соответственно подавляет гемагглютинирующую активность возбудителя (табл. 3).

Таким образом, Ингавирин® эффективно ингибирует размножение вируса гриппа, штаммы A/California/04/2009(H1N1) и A/California/07/2009(H1N1) в культуре клеток MDCK. Коэффициент подавления цитопатической активности составил 50 и 60%, а коэффициент подавления формирования специфического гемагглютинина до обогащения в куриных эмбрионах составил 50 и 50%, а после — обогащения — 79,1 и 75% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schnurrenberger P. R., Woods G. T., Martin R. J. Serologic evidence of human infection with swine influenza virus. *Am Rev Respir Dis* 1970; 102: 3: 356—361.
2. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; 56: 1: 152—179.
3. Myers K. P., Olsen C. W., Gray G. C. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 8: 1084—1088.
4. Wells D. L., Hopfensperger D. J., Arden N. H. et al. Swine influenza virus infections. Transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission. *JAMA* 1991; 265: 4: 478—481.
5. Vincent A. L., Ma W., Lager K. M. et al. Swine influenza viruses: a North American perspective. *Adv Virus Res* 2008; 72: 127—154.
6. Vincent A. L., Swenson S. L., Lager K. M. et al. Characterization of an influenza A virus isolated from pigs during an outbreak of respiratory disease in swine and people during a county fair in the United States. *Vet Microbiol* 2009; 137: 1—2: 51—59.
7. Newman A. P., Reisdorf E., Beinemann J. et al. Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 9: 1470—1472.
8. Swine Influenza A (H1N1) Infection in Two Children — Southern California, March—April 2009. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58d0421a1.htm>
9. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_OFFLU2009_05_15.pdf.
10. http://www.who.int/csr/don/2009_06_26/en/index.html.
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Под ред Р. У. Хабриева, М.: 2005.