

Изучение эффективности Ингавирина® *in vitro* в отношении возбудителя гриппа В

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, И. А. СЕМЕНОВА¹, Г. 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 ОАО «Валента Фармацевтика», *Москва*

In vitro Investigation of Ingavirin® Efficacy Against Influenza B Virus

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, I. A. SEMENOVA, G. 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 эффективности Ингавирина® в отношении вируса гриппа В показало, что исследуемый препарат в концентрациях 100 и 200 мкг/мл эффективно подавляет его репродукцию: на 75% снижает цитопатический эффект; более чем на 2,0 lg снижает уровень накопления возбудителя в культуре клеток MDCK и более чем на 90% подавляет формирование вирусспецифического гемагглютинина.

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

The experimental investigation of Ingavirin® activity against influenza B virus showed that in concentrations 100 and 200 mcg/ml it was efficient in inhibition of the virus reproduction: the cytopathic effect was lowered by 75%, the level of the pathogen accumulation in the MDCK cell culture was decreased by more than 2.0 lg and the formation of the virus specific hemagglutinin was inhibited by more than 90%.

Key words: Ingavirin®, influenza B virus, antiviral effect, cell culture.

В настоящее время на грипп и острые респираторные заболевания приходится от 92,1 до 92,4% от всей инфекционной заболеваемости в России [1, 2]. По мнению специалистов, в годы без пандемий и больших эпидемий на грипп А (H1N1, H3N2) и В приходится от 10 до 20% зарегистрированных случаев ОРЗ [3]. По результатам мониторинга 112 национальных центров в 83 странах мира, сотрудничающих с ВОЗ по гриппу, выявлено, что вирус гриппа В активно циркулировал в сезон 2006–2007 гг. на всех континентах мира [4–6]. Следует отметить, что в сезон 2004–2005 гг. в Европе возбудитель гриппа В (58%) доминировал над вирусом гриппа А (42%), чаще вызывая заболевание среди детей в возрасте от 1 месяца до 14 лет [7]. Обычно грипп В начинается эпидемию гриппа и ее завершает, обуславливая вторую волну эпидемии. Начальную фазу развития эпидемии, вызванную вирусом гриппа В, затем сменяют оба подтипа H3N2 и

H1N1 возбудителя гриппа А. Поэтому очень важно для экстренной профилактики заболевания, особенно на начальном этапе развития эпидемии, иметь в арсенале препарат выбора эффективный как в отношении гриппа А, так и в отношении гриппа В.

Следует отметить, что в последние годы в различных регионах мира выявлены резистентные штаммы вируса гриппа В к осельтамивиру [8]. Опубликованы первые работы специалистов Испании и Японии о низкой эффективности осельтамивира в отношении гриппа В [9, 10].

Таким образом, актуальным является поиск новых эффективных противовирусных препаратов выбора.

Целью настоящей работы является оценка эффективности отечественного препарата Ингавирин® в отношении возбудителя гриппа В *in vitro*.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус гриппа В, штамм Lee, полученный из ГУ «НИИ вирусологии» им. Д. И. Ивановского РАМН. Штамм хранится в Специализированной коллекции филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России – ВЦ».

© Коллектив авторов, 2009

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

Таблица 1. Эффективность Ингавирина® в отношении вируса гриппа В, штамм Lee, в культуре клеток MDCK по подавлению цитопатической активности возбудителя

Препарат	Доза препарата, мкг/мл	Частота выявления ЦПД через 72 ч после инфицирования	Подавление ЦПД, %
Ингавирин®	200	3/12	75
	100	3/12	75
Арбидол®	25	9/12	25
Контроль дозы (без препарата)		12/12	—

Таблица 2. Эффективность Ингавирина® в отношении вируса гриппа В, штамм Lee, в культуре клеток MDCK по подавлению репродукции возбудителя

Препарат	Доза препарата, мкг/мл	Уровень подавления вируса, Δ , lg		Коэффициент ингибирования, %		Уровень накопления вируса, Δ , lg		Коэффициент ингибирования, %	
		24 ч		48 ч		72 ч			
		Уровень подавления	Коэффициент ингибирования, %	Уровень подавления	Коэффициент ингибирования, %	Уровень накопления	Коэффициент ингибирования, %	Уровень накопления	Коэффициент ингибирования, %
Ингавирин®	200	0,6	78,0	2,0	99,1	2,2	99,4		
	100	0,5	73,2	2,0	99,1	1,9	98,8		
Арбидол®	25	0,4	63,4	0,9	87,0	0,8	84,7		

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. Оценка токсичности Ингавирина® была представлена ранее [11].

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

Препарат контроля. Арбидол® — производства ЗАО «Мастерлек», Россия.

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями [12]. Титрование вируса гриппа, проводили по ЦПД и по накоплению возбудителя в аллантоисной жидкости 9-суточных РКЭ.

Для изучения противовирусной эффективности препараты вносили в поддерживающую среду через 2 ч после инфицирования. На каждую дозу препарата использовали не менее 10 пробирок с монослоем культуры клеток двухсуточного возраста. Инфицирующая доза вируса составила 0,01 ЦПД₅₀/клетку. После адсорбции вируса в течение 60 мин при температуре от 36,5 до 37,5°C монослой трижды промывали питательной средой типа ПС-4 на растворе Хенкса, содержащей 2% сыворотки крупного рогатого скота и по 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина, затем вносили свежую среду и инкубировали в течение трёх суток при температуре от 36,5 до 37,5°C. По окончании инкубации визуально учитывали цитопатический эффект, вызванный в культуре клеток вирусом, с использованием светового микроскопа (объектив $\times 8-10$, окуляр $\times 7-10$).

Противовирусную эффективность препаратов оценивали по следующим показателям:

снижение уровня накопления вируса под воздействием препарата (Δ , lg);
коэффициент ингибирования (Ки, %);
подавление цитотоксической активности вируса (%).

Уменьшение уровня накопления вируса под влиянием препарата (Δ , lg) определяли по формуле:

$$\Delta = A_k - A_0,$$

где A_k — уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду изучаемого препарата (lg ЭИД₅₀/мл)

A_0 — уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого препарата (lg ЭИД₅₀/мл).

Результаты и обсуждение

Изучение противовирусной эффективности препаратов в отношении вируса гриппа В, штамм Lee (табл. 1), показало, что Ингавирин® эффективно подавляет размножение вируса при внесении его после инфицирования монослоя клеток. При этом следует отметить, что эффективность подавления ЦПД не изменялась при использовании препарата в концентрации как 200 мкг/мл, так и 100 мкг/мл.

Исследования по изучению подавления репродукции вируса в культуре клеток MDCK исследуемыми препаратами оценивали по уровню накопления вируса (в динамике) в РКЭ (табл. 2). Анализ полученных данных свидетельствует о том, что Ингавирин® эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа В, штамм Lee, в культуре клеток MDCK. Не отмечена зависимость величины ингибирования репродукции вируса от концентрации вносимого препарата. Следует отметить, что через 24 ч после инфицирования монослоя клеток наблюдается более выраженное подавление репродукции вируса Ингавирином®, чем Арбидолом®.

Через 48 ч после инфицирования культуры клеток Ингавирин® снижает накопление вируса на 2,0 lg по сравнению с контролем, а Арбидол® — на 0,9 lg. Ингибирование репродукции вируса не зависело от исследуемой концентрации. Через 72 ч после инфицирования выявлено значительное подавление репродукции вируса гриппа В Ингавирином® — 99,4%.

В табл. 3 представлены результаты оценки эффективности Ингавирина® в отношении вируса гриппа В, штамм Lee, в культуре клеток MDCK по подавлению образования вирусспе-

Таблица 3. Эффективность Ингавирина® в отношении вируса гриппа В, штамм Lee, в культуре клеток MDCK по подавлению образования вирусспецифического гемагглютинина

Препарат	Доза препарата, мкг/мл	24 ч		48 ч		72 ч	
		Уровень накопления гемагглютинина (РГА) обратная величина, ед.	Коэффициент подавления накопления гемагглютинина, %	Уровень накопления гемагглютинина (РГА) обратная величина, ед.	Коэффициент подавления накопления гемагглютинина, %	Уровень накопления гемагглютинина (РГА) обратная величина, ед.	Коэффициент подавления накопления гемагглютинина, %
Ингавирин®	200	22	51,1	11	91,3	9	93,0
	100	27	40,0	11	91,3	11	91,4
Арбидол®	25	38	15,6	45	64,3	42	67,2
Контроль (без препарата)		45	—	126	—	128	—

цифического гемагглютинина в динамике. Ингавирин® через 48 и 72 ч после инфицирования культуры клеток эффективно подавляет образование вирусспецифического гемагглютинина, в то время как Арбидол® слабо влияет на формирование вирусспецифического гемагглютинина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2007 году» // www.rospotreb-nadzor.ru/documents/doclad/2125.pdf.
2. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2006 году» // www.rospotreb-nadzor.ru/documents/doclad/1304.zp.
3. *Беляев А. Л., Слепушкин А. Н.* Современное состояние проблем гриппа и острых респираторных заболеваний (ОРЗ) // http://www.grippol.ru/doc/problma_grippa_i_orvi.doc
4. Influenza in the world. September 2006 — January 2007 // *Weekly Epidemiol. Rec.* 2007; 82: 10: 77—79.
5. Influenza in the world. September 2006 — August 2007 // *Weekly Epidemiol. Rec.* 2007; 82: 41: 358—360.
6. *Ivanova V. T., Kurochkina Ia. E., Burtseva E. I. et al.* The spread and biological properties of epidemic influenza viruses A and B strains circulating in the 2006—2007 season in Russia. *Vopr Virusol* 2008; 53: 5: 19—23.
7. *Meijer A., Meerhoff T. J., Meuwissen L. E. et al.* Epidemiological and virological assessment of influenza activity in Europe during the winter 2005—2006. *Euro Surveill* 2007; 12: 9: 11—12
8. *Hatakeyama S., Sugaya N., Ito M. et al.* Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *JAMA* 2007; 297: 13: 1435—1442.
9. *Rena J.* Peramivir un nuevo y potente inhibidor de la neuraminidasa para el tratamiento de las infecciones pri pales. *Rev Esp Quimioterap* 2006; 19: 4: 317—32.
10. *Sugaya N., Mitamura R., Yamazaki M. et al.* Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 197—202.
11. *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.
12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005.

Таким образом, в изученном диапазоне доз Ингавирин® эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа В: на 75% снижает цитопатический эффект; более чем на 2,0 lg снижает уровень накопления и более чем на 90% подавляет формирование вирусспецифического гемагглютинина.