

Изучение лечебно-профилактического действия препарата «Реаферон-ЕС липинт®» на мышах, инфицированных вирусом гриппа птиц (субтип H5N1)

О. К. ДЕМИНА, А. А. СЕРГЕЕВ, А. П. АГАФОНОВ, А. Н. ШИКОВ,
А. О. СЕМЕНЦОВА, АЛ. А. СЕРГЕЕВ, А. Н. СЕРГЕЕВ, И. Г. ДРОЗДОВ

ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Investigation of Therapeutic and Protective Action of Reaferon-ES Lipint® on Mice Infected with Avian Influenza Virus (Subtype H5N1)

O. K. DEMINA, A. A. SERGEEV, A. P. AGAFONOV, A. N. SHIKOV,
A. O. SEMENTSOVA, AL. A. SERGEEV, A. N. SERGEEV, I. G. DROZDOV

State Scientific Centre of Virology and Biotechnology Vektor, Koltsovo, Novosibirsk Region

Проведено изучение эффективности лечебной, профилактической и экстренно-профилактической схем применения препарата Реаферон-ЕС липинт® (липосомальная форма человеческого α -интерферона рекомбинантного для перорального применения) при инфекции у мышей, вызванной вирусом гриппа птиц. Показано, что штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 (субтип H5N1) вируса гриппа птиц обладает высокой вирулентностью для мышей линии ICR. На основе теоретически обоснованных расчётов предложена оптимальная для мышей лечебно-профилактическая доза препарата Реаферон-ЕС липинт®, которая составляла 1000 ед/животное. Установлено, что только при профилактическом введении препарат Реаферон-ЕС липинт® эффективно защищает мышей ICR, инфицированных дозой 10 ЛД₅₀ вируса гриппа птиц [штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)] (коэффициент защиты — 0,35). В этом случае эффективность данного препарата сравнима с таковой у препарата «Тамифлю». Таким образом, препарата Реаферон-ЕС липинт® может быть рекомендован для профилактики заболевания, вызванного не только сезонными штаммами гриппа, но и штаммами вируса гриппа птиц.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц (субтип H5N1), экспериментальная инфекция, мыши, Реаферон-ЕС липинт®, профилактика, лечение.

The efficacy of the therapeutic, prophylactic and urgent prophylactic schemes for the use of Reaferon-ES lipint®, a liposomal human recombinant α -interferon for oral use, was studied on mice infected with the avian influenza virus. Strain A/Chicken/Kurgan/05/2005 (subtype H5N1) of the avian influenza virus showed high virulence with respect to mice ICR. Theoretically-based calculations allowed to design an optimal therapeutic and prophylactic dose of the drug for the mice (1000 units/animal). It was observed that only after prophylactic use of Reaferon-ES lipint® it was effective in protection of the mice infected with 10 LD₅₀ of the avian influenza virus (A/Chicken/Kurgan/05/2005, H5N1). The protection coefficient was 0.35. Under such conditions the drug efficacy was comparable with that of Tamiflu. Therefore, Reaferon-ES lipint® could be recommended for prophylaxis of the infection due not only to the season strains of the influenza virus, but also to the strains of the avian influenza virus.

Key words: avian influenza virus (H5N1), experimental infection, mice, prophylaxis, Reaferon-ES lipint®, therapy.

Введение

Грипп птиц — высококонтагиозное заболевание вирусной этиологии, вызывающее массовую гибель дикой и домашней птицы, нанося тем самым огромный ущерб сельскому хозяйству. Возбудителем этого заболевания является вирус гриппа птиц (ВГП), который принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*. Среди наиболее патогенных для птиц антигенных вариантов ВГП выделяют субтипы H7N7 (вирус «куриной чумы») и

H5N1. Высокопатогенные варианты ВГП H7N7 вызвали в 2003 году повсеместное поражение фермерских куриных хозяйств в Нидерландах, а ВГП H5N1 явился причиной гибели миллионов кур в странах Юго-Восточной Азии начиная с 1997 года [1]. Кроме того, установлено, что ВГП (H5N1) вызывает чрезвычайно тяжёлую форму заболевания у людей (по данным ВОЗ на 30 апреля 2008 года — 382 человека), которая более чем в 60% случаев заканчивается летальным исходом [2]. Для лечения заболевания ВОЗ рекомендует использовать специфический ингибитор нейраминидазы осельтамивир («Тамифлю®»). Другим

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 630559 р.п. Кольцово Новосибирского района Новосибирской области. ГНЦ ВБ «Вектор»

классом соединений, обладающих выраженной антивирусной активностью, являются интерфероны (ИФН). Препараты ИФН могут оказаться перспективными в решении проблемы лечения заболевания, вызванного вирусами гриппа птиц, еще и по причине появления данных о резистентности вновь выделяемых штаммов этого вируса к препарату «Тамифлю®» [3, 4].

Для профилактики и лечения гриппа часто используют препараты ИФН, однако инъекционный способ введения данных препаратов имеет ряд существенных недостатков: низкая производительность при проведении массовых профилактических и лечебных мероприятий, риск сопутного инфицирования вирусными агентами (ВИЧ, вирус Т-клеточного лейкоза, вирус гепатита С и др.), выраженная реактогенность при многократном введении. В этом смысле липосомальная форма ИФН для перорального применения лишена вышеперечисленных недостатков и, кроме того, способствует более длительному нахождению ИФН в крови [5, 6].

Цель работы — изучение эффективности профилактической, экстренно-профилактической и лечебной схем применения препарата «Реаферон-ЕС липинт®» у мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц.

Материал и методы

Вirus. В работе использовали вирус гриппа птиц (ВГП) штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 (субтип H5N1), полученный из коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Биоконцентрация штамма ВГП составляла $8,5 \pm 0,0 \lg 50\%$ эмбриональных инфицирующих доз в 1 мл (ЭИД₅₀/мл). ВГП хранили при температуре -70°C .

Препарат. Использовали препарат «Реаферон-ЕС липинт®» — человеческий α -интерферон рекомбинантный, заключенный в липосомы и лиофильно высушенный. Препарат предоставлен производителем ЗАО «ВЕКТОР-МЕДИКА».

Животные. В исследованиях использовали интактных беспородных разнополых белых мышей ICR массой 14–16 г., полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Интраназальное инфицирование животных проводили с применением седативных средств. Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [7].

В работе использовали 9-суточные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-айленд.

Схема эксперимента. При проведении исследований использовали три схемы применения препарата Реаферон-ЕС липинт®.

1. Профилактическая схема: вводили ежедневно 2 раза в сутки в течение 4 дней до заражения ВГП, последнее введение — перорально в дозе 1000 ед/животное в объеме 0,2 мл за 1 час до заражения ВГП.
2. Экстренно-профилактическая схема: вводили сразу после заражения ВГП, затем — через 4 часа после заражения, а далее — ежедневно перорально 2 раза в сутки в течение 6 дней в дозе 1000 ед/животное в объеме 0,2 мл.
3. Лечебная схема: вводили через 3 сут после заражения мышей ВГП и далее — ежедневно перорально два-

жды в сутки в течение 6 дней в дозе 1000 ед/животное в объеме 0,2 мл.

В качестве контрольных были использованы две группы животных:

- положительный контроль — группе животных за 1 час до заражения мышей ВГП и через 4 часа после заражения, а далее дважды в день в течение 6 суток вводили перорально препарат «Тамифлю®» в дозе 0,1 мг/животное в объеме 0,2 мл; дозу для мышей определили с учетом рекомендованной дозы для человека в пересчете на площадь поверхности тела и массу тела мышей [8].

- отрицательный контроль — группе интактных животных за 4 суток до заражения ВГП и в течение 10 суток после заражения ежедневно вводили перорально 2 раза в сутки изонический раствор хлорида натрия в объеме 0,2 мл.

Каждая группа животных состояла из 20 мышей. Доза заражения для мышей — 10 мышиных ЛД₅₀/животное интраназально в объеме 30 мкл. Учет гибели инфицированных животных проводили ежедневно в течение 15 дней, отмечая количество погибших и живых мышей. Данные по гибели животных использовали для оценки параметров средней продолжительности жизни (СПЖ), процента выживших животных и коэффициента защиты. Для определения СПЖ оценивали среднее значение времени гибели мышей с момента заражения среди павших мышей в каждой из пяти групп. Для определения коэффициента защиты использовали формулу:

коэффициент защиты животных = количество выживших мышей/общее количество мышей в опытной группе — количество выживших мышей/общее количество мышей в группе отрицательного контроля.

Статистическая обработка результатов. При определении параметра СПЖ в качестве ошибки использовали стандартное отклонение [9]. Статистическое сравнение % выживших животных в группах проводили с помощью непараметрического анализа (таблица 2×2 в программе STATISTICA версия 6.0). Был оценен уровень значимости (p) отличий % выживших животных в опытных группах (группы 1–4) в сравнении с контрольной (группа 5) с учетом поправки Йетса. Достоверность отличия % выживших животных относительно отрицательного контроля в группах подтверждалась, если уровень значимости — $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований по изучению эффективности препарата Реаферон-ЕС липинт® для профилактики и лечения гриппозной инфекции у мышей необходимо было определить инфекционную активность штамма вируса при интраназальном инфицировании мышей. Мышам вводили интраназально разведения штамма A/Chicken/Kurgan/05/2005 (субтип H5N1) и на 16-е сутки после инфицирования определяли ЛД₅₀. В результате проведенных исследований было установлено, что штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 вируса гриппа обладает высокой вирулентностью в отношении мышей: доза 10 ЛД₅₀ составляет $2,2 \pm 0,4 \lg \text{ЭИД}_{50}$. При инфицировании мышей данной дозой наблюдалась летальность около 90% животных.

При расчете дозы изучаемого препарата мы руководствовались ранее опубликованными сведениями [10, 11], в которых научно обосновано использование повышенных доз в пересчете на единицу массы для мелких лабораторных живот-

Определение эффективности лечебно-профилактического действия препарата Реаферон-ЕС липинт® при различных схемах применения у мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц (ВГП) в дозе 10 ЛД₅₀

Группы животных (в зависимости от схемы применения)	Количество животных в эксперименте	Количество выживших животных	СПЖ, сут	Количество выживших животных, %	Уровень значимости (<i>p</i>)
Профилактическая схема	20	9	9,3±1,7	45*	0,034
Экстренно-профилактическая схема	20	6	8,7±1,3	30	0,236
Лечебная схема	20	2	8,3±1,2	10	0,598
Группа положительного контроля	20	14	8,5±1,6	65*	0,001
Группа отрицательного контроля	20	2	8,3±1,1	10	

Примечание. СПЖ — средняя продолжительность жизни среди погибших животных; *p* — уровень значимости отличий (при $p \leq 0,05$ — значения % выживших животных достоверно отличаются от отрицательного контроля); * — значение % выживших животных достоверно отличается от отрицательного контроля.

ных в связи с более интенсивным их метаболизмом. Расчёт основан на том, что коэффициент отношения площади тела к массе тела (S/m) для человека в 4 раза ниже, чем у мыши. По этой причине вводимая доза препарата для мыши на единицу массы тела должна быть в 4 раза выше, чем у человека. Рекомендованная лечебная доза препарата Реаферон ЕС липинт® для человека составляет 1 млн ед в сутки. В результате пересчёта оптимальная суточная доза для мыши со средней массой тела 15 г (с учётом скорости метаболизма и гомологии интерферонов человека и мыши) составила 2000 ед/мышь.

Определение антигриппозной активности препарата Реаферон-ЕС липинт® проводили на мышцах при их инфицировании вирусом гриппа птиц (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 субтипа H5N1) в дозе 10 ЛД₅₀. Результаты исследований представлены в таблице.

Было установлено, что препарат Реаферон-ЕС липинт® обладал способностью защищать мышей при введении летальных доз вируса гриппа птиц при профилактической и экстренно-профилактической схеме применения. Только при использовании профилактической схемы наблюдается достоверное повышение процента выжив-

ших животных по сравнению с отрицательным контролем: коэффициент защиты для этой группы животных составлял 0,35 (см. таблицу). В этой же группе животных наблюдалась тенденция к увеличению СПЖ. При использовании препарата Тамифлю (группа положительного контроля) у мышей наблюдали более высокое значение коэффициента защиты (0,55), но, следует подчеркнуть, достоверно не отличающееся от такового для препарата Реаферон-ЕС липинт® при профилактической схеме применения.

Заключение

Установлено, что при профилактическом введении препарат Реаферон-ЕС липинт® достоверно эффективно защищает мышей ICR, инфицированных дозой 10 ЛД₅₀ вируса гриппа птиц [штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)], коэффициент защиты составляет 0,35. В этом случае эффективность данного препарата сравнима с таковой у препарата Тамифлю®. В связи с этим препарат Реаферон-ЕС липинт® может быть рекомендован для профилактики заболевания, вызванного не только сезонными штаммами вируса гриппа, но и штаммами вируса гриппа птиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов О. К. Анализ основных этапов и механизмов возникновения пандемического вируса из возбудителя птичьего гриппа. Эпидемиол вакцинопрофилактика 2006; 5: 8—13.
2. World Health Organization. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. [serial online] 2008 Apr 30 [cited 2008 May 6]. Available from URL: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_04_30/en/index.html
3. Маркова Т. П., Чувилов Г. Н. Противовирусная терапия в лечении гриппа. РМЖ. Болезни дыхательных путей 2004; 12: 21: 12—16.
4. McKimm-Breschkin J. L., Selleck P. W., Usman T. B., Johnson M. A. Reduced sensitivity of influenza A (H5N1) to oseltamivir. Emerg Infect Dis 2007; 13: 9: 1354—1357.
5. Бажутин Н. Б., Золин В. В., Колокольников А. А., Таргонский С. Н. Перспективы применения липосомальных препаратов в медицинской практике. Terra medica 2003; 3: 31: 3—6.
6. Ерофеева М. К., Максакова В. Л., Позднякова М. Г., Колыванова И. Л. Возможность применения липосомального альфа-2b интерферона для профилактики гриппа и других ОРВИ. Вопр совр педиатр 2007; 6: 1: 42—46.
7. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
8. Трахтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Проблема нормы в токсикологии. 2 изд. М.: 1991.
9. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962.
10. Kleiber M. The Fire of Life. New York: London, John Wiley and Sons; 1961.
11. Schmid R. F., Thews G. Физиология человека. М.: 1986.