

Экспериментальное изучение противовирусной активности препарата «Гриппферон» в отношении «мексиканского» пандемического вируса гриппа A/H1N1/2009 *in vitro*

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. Н. ЩУКИНА¹, Г. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. П. БОНДАРЕВ¹, В. А. ШЕВЦОВ²

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

² Главный государственный центр санитарно-эпидемиологического надзора Министерства обороны Российской Федерации, Москва

Experimental Study of Grippferon Antiviral Activity Against Mexican Pandemic Influenza Virus A/H1N1/2009 *in vitro*

S. YA LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. N. SHCHUKINA, G. V. BORISEVICH, V. P. BONDAREV, V. A. SHEVTSOV

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

Chief State Centre for Sanitary and Epidemiologic Inspection, Ministry of Defense of the Russian Federation, *Moscow*

Проведённый анализ эффективности Гриппферона и препаратов сравнения Реальдилона и Реаферона-ЕС в отношении вируса гриппа А (H1N1)/2009 в чувствительных постоянных культурах клеток свидетельствует о том, что исследуемый препарат в изученных концентрациях эффективно подавляет цитопатическую активность вируса и формирование специфического гемагглютинина.

Ключевые слова: *грипп А(H1N1)/2009, гриппферон, противовирусная эффективность, культура клеток.*

Analysis of the efficacy of Grippferon vs. the reference drugs Realdiron and Reaferon-EC against the influenza virus A(H1N1)/2009 in susceptible static cell cultures showed that in the concentrations tested it was efficient in inhibition of the virus cytopathic activity and generation of specific hemagglutinin.

Key words: *influenza virus A (H1N1)/2009, Grippferon, antiviral efficacy, cell culture.*

Грипп и ОРВИ остаются серьёзной проблемой для здоровья людей практически во всех странах мира и вызывают ежегодные эпидемии, во время которых заболевает от 5 до 15% всего населения планеты, а во время пандемий число заболевших возрастает в 4–6 раз [1]. Развитие современного скоростного транспорта, тесные международные контакты, массовые миграции населения, паломничество и туризм способствуют быстрому распространению гриппа по всему миру. С годами процесс распространения вирусов гриппа и других возбудителей ОРВИ будет только ускоряться [2, 3]. В середине апреля 2009 г. в Мексике и США от больных людей были выделены первые штаммы нового пандемического вируса гриппа А, позже названного как вирус гриппа А/H1N1/2009 (или А (H1N1) — 2009) [4]. Этот грипп в литературе встречается и под другими наименованиями — «мексиканский», «калифор-

нийский». Пандемический грипп А/H1N1/2009 с апреля 2009 г. зарегистрирован практически во всех странах мира. Летальность среди госпитализированных пациентов составила около 1,0% [5]. К августу 2010 г. констатировали завершение пандемии гриппа А/H1N1/2009. В эпидсезон 2010–2011 гг. возбудитель гриппа А/H1N1/2009 полностью вытеснил подтип А/H3N2. При этом в сезон 2010/2011 гг. он доминировал на территории Европы и Северной Азии [6].

Учитывая сохраняющуюся актуальность пандемического подтипа вируса гриппа необходимо было оценить в отношении него эффективность отечественного препарата «Гриппферон». Являясь основным фактором стимуляции клеточного иммунитета, интерферон обеспечивает включение важнейших защитных механизмов противовирусной защиты особенно в тех случаях, когда интерфероны 1-го типа подавляются возбудителем. При этом интерферон подавляет репродукцию вирусов на стадии, обязательной для всех вирусов: они блокируют начало трансляции. Следовательно, интерфероны являются препара-

© Коллектив авторов, 2011

Адрес для корреспонденции: 141306 Московская обл., Сергиев Посад-6. Вирусологический центр

Таблица 1. Результаты оценки эффективности Гриппферона по подавлению цитопатической активности вируса гриппа, штамм A/California/07/2009 (H1N1) в культуре клеток MDCK через 72 ч после инфицирования

Препарат	Схема внесения препарата	Доза препарата, МЕ/мл	Частота выявления ЦПД	Коэффициент подавления ЦПД, %, $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$
Гриппферон, серия №1	-24 ч	1×10^4	9/30	$70,0 \pm 0,0$
	+1 ч	1×10^4	12/30	$60,0 \pm 0,0$
Гриппферон, серия №2	-24 ч	1×10^4	7/30	$76,7 \pm 3,4$
	+1 ч	1×10^4	12/30	$60,0 \pm 0,0$
Реаферон-ЕС	-24 ч	1×10^5	7/30	$76,7 \pm 3,4$
		1×10^4	8/30	$73,3 \pm 3,4$
	+1 ч	1×10^5	9/30	$70,0 \pm 0,0$
Реальдирон		1×10^4	8/30	$73,3 \pm 3,4$
	-24 ч	1×10^5	7/30	$76,7 \pm 3,4$
		1×10^4	7/30	$76,7 \pm 3,4$
	+1 ч	1×10^5	8/30	$73,3 \pm 3,4$
		1×10^4	8/30	$73,3 \pm 3,4$
Контроль (без препарата)			30/30	—

тами универсально широкого противовирусного действия. Никакие иные противовирусные препараты не обладают в полном объеме функциональными свойствами, присущими или даже подобными интерферонам.

Целью наших исследований являлось изучение эффективности препарата «Гриппферон» в отношении экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной пандемическим вирусом гриппа A/H1N1/2009 *in vitro*.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус гриппа, штамм A/California/07/2009 (H1N1), полученный из ФГУ «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

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.

Исследуемый препарат. Препарат Гриппферон (интерферон альфа-2) производства «ФИРН М», Россия, серии №№ 1 и 2.

Референс-препараты. Реаферон-ЕС — производства ЗАО «ВЕКТОР-МЕДИКА», серия 09. Реальдирон — производства НПО «Фермент», экспериментальный завод ИОС «Санитас», Рига, Латвия.

Противовирусную эффективность препаратов *in vitro* оценивали по следующим показателям:

- снижение уровня цитопатического действия вируса под воздействием препарата;
- снижение уровня образования вирусспецифического гемагглютинина;
- коэффициент ингибирования (Ки, %).

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ [7]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Стьюденту [8].

Результаты и обсуждение

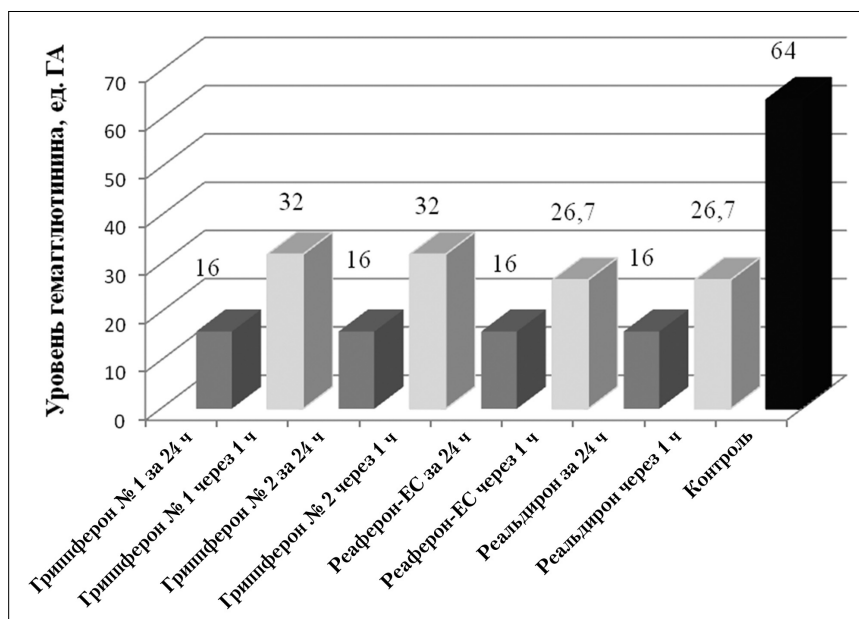
Исследования активности препарата Гриппферон проводили по определению подавления цитотоксичности вируса и формирования специфического гемагглютинина вируса в монослой культуры клеток MDCK.

Как правило, исследуемый препарат интерферона вносят в культуру за сутки до инфицирования вирусом в связи с тем, что развитие максимального протективного эффекта наступает не ранее чем через 10 ч после внесения препарата. На чувствительность монослоя культуры клеток к интерферону влияют также и другие факторы: количество клеток на пробирку, их плотность, возраст, длительность инкубации с интерфероном, доза вируса, pH среды и время учёта результатов [9, 10].

Для изучения противовирусной эффективности препараты интерферона вносили в поддерживающую среду за 24 ч и через 1 ч после инфицирования. Использовали монослой культуры клеток двухсуточного возраста, инфицирующая доза вируса составила 0,1 ЦПД₅₀/клетку. В течение всего срока наблюдения визуально учитывали цитопатический эффект, вызванный в культуре клеток вирусом, с использованием светового микроскопа (объектив $\times 10$, окуляр $\times 15$), а также определяли уровень специфического гемагглютинина.

Результаты оценки эффективности интерферона по подавлению цитопатической активности и образования специфического гемагглютинина вируса гриппа свидетельствуют, что в первые 24 часа после инфицирования вирус в культуре клеток накапливается в незначительных концентрациях, не вызывая деструкции клеток. В 20% монослоя инфицированных клеток отмечены цитопатические изменения в виде округления клеток и увеличения ядра, выявлен также низкий уровень накопления вирусспецифического гемагглютинина (4 ГА). В присутствии референс-препаратов (Реаферон-ЕС, Реальдирон), а также исследуемых серий Гриппферона через 24 ч после инфицирования возбудитель в клетках не обнаруживался.

Через 72 ч после инфицирования цитопатический эффект отмечен во всех инфицированных клетках контрольной группы (табл. 1). При внесении Гриппферона в дозе 1×10^4 МЕ/мл в культуру



Влияние Гриппферона на уровень формирования специфического гемагглютина вируса гриппа A(H1N1)/2009.

клеток за 24 ч до инфицирования отмечен более выраженный противовирусный эффект: ингибирование цитопатической активности вируса гриппа А составило 70,0 и 76,7% для образцов препарата №№ 1 и 2 соответственно. При внесении исследуемых препаратов интерферона в культуральную среду через 1 ч после инфицирования монослоя клеток эффективность подавления ЦПД вируса составила 60%. Важно отметить, что результаты противовирусной эффективности исследуемого Гриппферона сопоставимы с таковыми для Реаферона-ЕС и Реальдирина.

дуюемого Гриппферона сопоставимы с таковыми для референс-препаратов: Реаферона-ЕС и Реальдирина. Реаферон-ЕС и Реальдирон при внесении их за 24 ч до заражения клеток подавляли 73,3—76,7% цитопатической активности вируса. Сравнение средних величин ингибирующей активности исследуемых образцов препарата Гриппферона и референс-препаратов показало отсутствие достоверных отличий ($p \leq 0,05$). Реаферон-ЕС и Реальдирон при внесении их через 1 час после инфицирования клеток подавляли 70,0—73,3% цитопатической активности вируса. Достоверные различия эффективности исследуемых образцов препарата и референс-препаратов отсутствуют ($p \leq 0,05$).

На пике накопления вируса гриппа в клетках при внесении Гриппферона за 24 ч до инфицирования в дозе 1×10^4 МЕ/мл наблюдали подавление формирования специфического гемагглютина на 75% обоими исследуемыми образцами препарата Гриппферона (рисунок). Полученные результаты противовирусной эффективности исследуемого интерферона сопоставимы с таковыми для Реаферона-ЕС и Реальдирина. Препараты изученных серий

Таблица 2. Сравнительная характеристика препаратов интерферона

Показатель	Гриппферон	Реаферон	Реальдирон
Способ применения	Местно	Внутривенно, внутримышечно, подкожно, ректально, наружно	Внутримышечно, подкожно
Противопоказания	Индивидуальная непереносимость компонентов препарата	Повышенная чувствительность к компонентам препарата; выраженные нарушения функции печени и почек; сердечно-сосудистые заболевания; эпилепсия	Индивидуальная непереносимость компонентов препарата
Побочные действия	Аллергические реакции	Гриппоподобный синдром: тошнота, рвота, поносы; нарушение картины крови; нарушения функции печени; головокружение, сонливость; понижение или повышение артериального давления, аритмии	Озноб, лихорадка, чувство усталости, вялость, головная боль, миалгия, боль в суставах, потеря аппетита (частично купируются парацетамолом); возможны незначительная лейкопения, тромбоцитопения, некоторые отклонения показателей функции печени (исчезают при отмене препарата или снижении его дозы)
Применение у детей и беременных	Разрешён к применению у беременных и у детей в соответствии с возрастной дозировкой	Только в том случае, если ожидаемая польза матери превышает потенциальную угрозу для плода; следует прекратить грудное вскармливание	Возможно, если ожидаемый эффект терапии превышает риск для плода (особенно в I триместре) или ребёнка

Гриппферона по своей противогриппозной активности статистически достоверно не отличались ($p \leq 0,05$).

Следует отметить, что 10-кратное увеличение дозы референс-препаратов до 1×10^5 МЕ/мл практически не отражается на противовирусной эффективности по сравнению с дозой этих же препаратов, равной 1×10^4 МЕ/мл, которая является достоверно достаточной для выраженного противовирусного эффекта, как в первые сутки инфицирования, так и на пике (72 ч) инфицирования.

Несмотря на сопоставимость противовирусной эффективности препарата Гриппферон и референс-препаратов Реальдирон и Реаферон-ЕС, особенностью препарата Гриппферон, капли на-

зальные является его местное противовирусное действие (табл. 2). Введение Гриппферона в носовую полость обеспечивает локальные концентрации препарата непосредственно в очаге поражения. При этом практически отсутствуют побочные эффекты, свойственные парентеральному введению высоких доз интерферона. Препарат Гриппферон разрешён к применению во всех возрастных группах, в том числе и у детей с рождения, а так же в течение периода беременности.

Результаты изучения противовирусной активности Гриппферона свидетельствуют о целесообразности использования его в качестве средства профилактики и раннего этиотропного лечения ОРВИ и гриппа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Слепушкин А. Н. Грипп и другие ОРВИ // под ред. В.И. Покровского, Г.Г. Онищенко, Б.Л. Черкасского Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке. М.: «Медицина», 2003. 184—214.
2. Колобухина Л. В. Вирусные инфекции дыхательных путей // Рус. мед. журн. 2000. № 8. 1—23.
3. Семёнов Б. Ф., Гервазиева В. Б., Сверновская В. В. Распространённость и структура острых респираторных вирусных инфекций // Журн. микробиол. 2002. № 5. 79—86.
4. Чучалин А. Г. Грипп А/Н1N1: уроки пандемии // Пульмонология. 2010. Приложение. 3—8.
5. www.en.wikipedia.org/wiki/2009_flu/pandemic_by_country.
6. www.euroflu.org/cgi-files/bulletin_v2.cgi
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия. М., «Высшая школа». 1990.
9. Dianzani F., Viano I., Santiano M. et al. Effect of cell density on development of the antiviral state in interferon-producing cells: a possible model of *in vivo* conditions / Proc Soc Exp Biol (N.Y.). 1977. 155: 5: 445—448.
10. Lodemann E., Diederich J., Sattler U., Wacker A. Induction of interferon in L cells by polyinosinic-polycytidylic acid in the presence of cationic compounds. II. Basic dyes // Arch. Ges. Virusforsch. 1973. Bd. 40, No. 2. 87—92.