

# Изучение противовирусной активности препарата Панавир при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом кори в культурах клеток

С. Г. МАРКУШИН, А. А. ЛИТВИН\*

НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН, Москва

\* Национальная исследовательская компания, Москва

## Antiviral Activity of Panavir in Experimental Infection Due to *Morbillivirus* in Cell Cultures

S. G. MARKUSHIN, A. A. LITVIN

I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

National Research Company, Moscow

**Исследована антивирусная активность препарата Панавир на экспериментальной модели инфекции, вызванной вирусом кори, в перевиваемых культурах клеток Vero и В-16. Показано, что при множественности заражения (0,001—0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл) Панавир ингибирует размножение вируса кори.**

*Ключевые слова:* панавир, антивирусная активность, вирус кори

**Antiviral activity of Panavir was studied in a model of experimental infection due to *Morbillivirus* in subcultures of cells Vero and B-16. It was shown that at multiplicity of the infection (0.001—0.0001 TCD<sub>50</sub>/cell) Panavir inhibited reproduction of the virus in concentrations of 12—100 mcg/0.2 ml.**

*Key words:* panavir, antiviral activity, *Morbillivirus*

Корь занимает важное место в инфекционной патологии человека, являясь одной из наиболее распространённых детских инфекций. Для неё характерны достигающие больших размеров вспышки и эпидемии. В развивающихся странах смертность от кори составляет более одного миллиона человек в год. В США и европейских странах, включая Россию, отмечается в настоящее время «повзросление» кори, т. е. увеличивается число случаев заболевания молодых людей и взрослых. В связи с этими обстоятельствами Всемирная организация здравоохранения поставила задачу снижения смертности от данного заболевания на 95%, а заболеваемости корью на 90% по сравнению с уровнями, которые наблюдались до начала широкомасштабной программы вакцинации против кори.

Вакцинация против кори показывает высокую эффективность. Вместе с тем, учитывая большое количество серьёзных осложнений в процессе заболевания корью, а также недостаточно эффективную вакцинацию против кори в отдельных районах земного шара, важное значение

имеют другие способы борьбы с данной инфекцией, в частности, разработка препаратов, способных воздействовать на вирус кори на различных этапах его внутриклеточной репродукции.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке противовирусной активности препарата Панавир на экспериментальной модели инфекции, вызванной вирусом кори, в перевиваемых культурах клеток.

### Материал и методы

В работе использовали отечественный вакцинный штамм Л-16 вируса кори, относящийся к генетической линии 1. В процессе исследования были использованы инфекционные дозы штамма Л-16 в диапазоне от 1 до 0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл.

Действие препарата на репродукцию вакцинного штамма Л-16 наблюдали в культуре перевиваемых клеток Vero, полученных из Национального института биологических стандартов (Лондон, Великобритания), а также в перевиваемой культуре В-95 (перевиваемая культура лимфобластов мармозетов), полученной из Института Р. Коха (Берлин, Германия). Обе культуры использовали в виде однодневного монослоя клеток, выращенного в 96-луночных пластиковых панелях фирмы Costar. Для пересева и поддержания культур использовали синтетические среды RPMI-1640 и MEM с добавлением 5% фетальной сыворотки NuClone с добавлением глутамина и гентамицина.

Препарат Панавир был предоставлен фирмой «Национальная исследовательская компания» в виде лиофилизированной субстанции. Разведения препарата, содержащие раз-

© С. Г. Маркушин, А. А. Литвин, 2009

Адрес для корреспонденции: 105064 Москва, М. Казенный пер., 5А. НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова

**Таблица 1. Цитотоксическое действие препарата Панавир на клеточные культуры Vero и В-95а**

| Концентрация препарата мкг/0,1 мл                                  | 1000 | 100 | 50  | 25  | 12,5 | 6,25 | 3,1 | 1,0 | 0,5 | 0,25 |
|--|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|
| % жизнеспособных клеток Vero на 4-й день после внесения препарата  | 0    | 50  | 100 | 100 | 100  | 100  | 100 | 100 | 100 | 100  |
| % жизнеспособных клеток В-95а на 4-й день после внесения препарата | 0    | 50  | 100 | 100 | 100  | 100  | 100 | 100 | 100 | 100  |

**Таблица 2. Вирулицидное действие препарата Панавир при температуре 4°C**

| Материал в пробе                  | Титр вируса ТЦД <sub>50</sub> /мл |                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
|                                   | 0 час                             | 144 часа          |
| Штамм Л-16 вируса кори            | 10 <sup>4,0</sup>                 | 10 <sup>3,0</sup> |
| Штамм Л-16 вируса кори + Панавир* | 10 <sup>4,0</sup>                 | 10 <sup>2,0</sup> |

**Примечание.** \* Концентрация препарата Панавир в пробе составляла 5 мг/мл. К 1,0 мл. вирусосодержащей жидкости с титром  $2 \times 10^{4,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/кл добавляли 1,0 мл препарата Панавир с концентрацией 10 мг/мл. Нулевые пробы титровали в начале опыта.

личные его концентрации были сделаны на питательных средах RPMI-1640 и MEM. Для изучения противовирусного действия препарата Панавир, последний в различных концентрациях вносили в инфицированные вирусом культуры клеток Vero и В-95а в момент заражения, за 1 час до заражения и через 1 час после заражения клеток вирусом. Инфекционную активность вируса кори учитывали по результатам титрования начиная с 3-го дня после инфекции, учитывая количество симпластов в каждой лунке и используя формулу Рида и Менча для подсчета титра вируса кори.

## Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов проводилось изучение цитотоксического действия Панавира на перевиваемые культуры клеток, выбранных для проведения исследования. С этой целью препарат в различных концентрациях вносили в культуру клеток Vero (однодневную, в каждую лунку вносили по 30000 клеток). Концентрации препарата варьировали в пределах от 10 мг/мл до 0,5 мкг/мл. Монослой клеток наблюдали в течение 10 дней. Полная гибель клеток наблюдалась на вторые сутки при концентрации препарата 10 мг/мл. Значительная часть клеток погибала через три дня при концентрации 1 мг/мл. При более низких концентрациях цитотоксический эффект не наблюдался. Аналогичные результаты наблюдались в отношении перевиваемой культуры В-95а. Следует отметить, что данная культура частично отслаивается от стекла через 4–5 дней, поэтому опыты с применением данной культуры проводились в период 5 дней (табл. 1).

Полученные данные позволяли сделать вывод, что препарат Панавир в концентрации ниже 500 мкг/мл не обладал цитотоксическими свойствами в отношении вышеупомянутых клеточных культур и это позволяло использовать более низкие концентрации препарата для изучения его антивирусного действия. Однако прежде было целесообразно исследовать вирулицидное действие этого препарата, учитывая его широкий спектр действия. С этой целью к 1 мл вирусосодержащей

жидкости штамма Л-16 вируса кори добавляли равное количество препарата Панавир в концентрации 10 мг/мл и инкубировали при температурах 37°C и 4°C различные периоды времени. Аликваты отбирались и титровались в культуре Vero. Результаты опытов представлены в табл. 2.

Было обнаружено, что при температуре 37°C происходит быстрая инаktivация вируса, даже при отсутствии препарата, что не позволяло исследовать его вирулицидное действие. Данные, полученные при инкубации вируса с препаратом при температуре 4°C, позволяют сделать вывод о том, что препарат в концентрации 5 мг/мл обладает слабым вирулицидным действием.

В следующей серии экспериментов было исследовано антивирусное действие препарата в отношении вируса кори. С этой целью клетки Vero были инфицированы штаммом Л-16 с различной множественностью заражения (0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл, 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл, 0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл) при концентрациях препарата в диапазоне от 100 мкг/0,2 мл до 0,1 мкг/0,2 мл. Через 4 дня инкубации при 37°C пробы замораживали и затем их титровали в культуре клеток Vero. Результаты опытов представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, препарат обладал антивирусным действием в отношении вируса кори при концентрациях 100 мкг/0,2 мл — 12 мкг/0,2 мл при множественности заражения: 0,001—0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Эффект подавления вирусной репродукции особенно проявлялся при множественности заражения 0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл: снижение инфекционного титра вируса достигало 2–3 lg.

Представляло интерес выяснить, на какой стадии цикла репродукции вируса кори действует препарат Панавир. С этой целью препарат вносили в среду за 1 ч до инфицирования клеток вирусом, одновременно с инфицированием и через час после инфицирования. Результаты исследования отражены в табл. 4, 5. Как видно из данной

**Таблица 3. Влияние воздействия препарата Панавир на репродукцию вакцинного штамма Л-16 вируса кори в культуре клеток Vero**

| Пробы                                  | Титр вируса ТЦД <sub>50</sub> /мл |                             |                              |
|--|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|  | Множественность заражения         | Множественность заражения   | Множественность заражения    |
|  | 0,1 ТЦД <sub>50</sub> /кл         | 0,001 ТЦД <sub>50</sub> /кл | 0,0001 ТЦД <sub>50</sub> /кл |
| Штамм Л-16 (контроль)                  | 10 <sup>4,0</sup>                 | 10 <sup>4,0</sup>           | 10 <sup>3,0</sup>            |
| Штамм Л-16 + панавир (100 мкг/0,2мл)   | 10 <sup>4,0</sup>                 | 10 <sup>2,0</sup>           | 10 <sup>2,0</sup>            |
| Штамм Л-16 + панавир (50 мкг/ 0,2 мл)  | 10 <sup>4,0</sup>                 | 10 <sup>3,0</sup>           | 10 <sup>1,0</sup>            |
| Штамм Л-16 + панавир (25 мкг/0,2 мл)   | 10 <sup>4,0</sup>                 | 10 <sup>3,0</sup>           | <10 <sup>1,0</sup>           |
| Штамм Л-16 + панавир (12,5 мкг/0,2 мл) | 10 <sup>4,0</sup>                 | 10 <sup>3,25</sup>          | 10 <sup>1,0</sup>            |
| Штамм Л-16 + панавир (6 мкг/0,2 мл)    | 10 <sup>4,25</sup>                | 10 <sup>3,0</sup>           | 10 <sup>1,0</sup>            |
| Штамм Л-16 + панавир (3 мкг/0,2 мл)    | 10 <sup>4,5</sup>                 | 10 <sup>4,0</sup>           | 10 <sup>1,5</sup>            |

**Примечание.** Суточный монослой клеток Vero (30 000 кл./лунка) инфицировали вирусом кори с множественностью заражения 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл, 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл, 0,0001 кл./кл. Вирус вносили в объеме 0,1 мл. На 4-день с момента инфицирования клетки замораживали. Затем пробы титровали в культуре клеток Vero.

**Таблица 4. Влияние препарата Панавир на репродукцию вируса кори в клетках Vero в зависимости от момента внесения препарата (в дозе 100 мкг/0,2 мл)**

| Вариант опыта                                       | Титр вируса ТЦД <sub>50</sub> /мл |
|---|-----------------------------------|
| Препарат внесён за 1 час до инфекции                | 10 <sup>2,5</sup>                 |
| Препарат внесён одновременно с вирусной инфекцией   | 10 <sup>2,5</sup>                 |
| Препарат внесён через 1 час после вирусной инфекции | 10 <sup>3,5</sup>                 |
| Контроль (размножение вируса без препарата)         | 10 <sup>4,0</sup>                 |

**Примечание.** Суточный монослой клеток Vero (30 000 клеток/ лунка) инфицировали вирусом с множественностью 0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Вирус вносили в объеме 0,1 мл. В различное время: за 1 час до инфекции, одновременно и через 1 час после инфекции вносили препарат в дозе 100 мкг. Конечный объем среды после внесения препарата был равен 0,2 мл. На 4-е сутки клетки замораживали и затем пробы титровали.

**Таблица 5. Влияние препарата Панавир, внесённого за час до заражения, на репродукцию штамма Л-16 вируса кори в клетках В-95а**

| Проба                                       | Титр вируса ТЦД <sub>50</sub> /кл |
|---|-----------------------------------|
| Контроль (размножение вируса без препарата) | 10 <sup>3,5</sup>                 |
| Вирус + препарат 10 мкг/0,2 мл              | 10 <sup>2,0</sup>                 |
| Вирус + препарат 50 мкг/0,2 мл              | 10 <sup>2,0</sup>                 |
| Вирус + препарат 6 мкг/0,2 мл               | 10 <sup>3,0</sup>                 |

таблицы, штамм Л-16 активно репродуцировался в контроле. Внесение препарата за 1 ч до адсорбции вируса на клетках приводило к снижению вирусной репродукции на 1,5 lg. Аналогичные результаты были получены при внесении препарата в момент инфекции. В то же время внесение препарата через 1 ч после адсорбции вируса на клетках незначительно снижало титр вируса. Полученные факты свидетельствуют о том, что препарат действует на ранних стадиях цикла репродукции вируса кори. Можно предполагать, что антивирусное действие препарата Панавир обусловлено нарушением адсорбции вируса на клеточной поверхности. Учитывая полисахаридную природу препарата, можно допустить наличие конкуренции между молекулами препарата и полисахаридными компонентами клеточных рецепторов за связывание с вирусными рецепторами в момент адсорбции.

## Выводы

1. Препарат Панавир обладает вирулицидным действием.
2. Препарат ингибирует размножение вируса кори в концентрации 12—100 мкг/0,2 мл в клетках различного происхождения, инфицированных с множественностью заражения 0,001—0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/кл.
3. Изучение особенностей действия препарата позволяет сделать вывод, что его активность проявляется на ранних стадиях взаимодействия вируса и клеток. Возможно, препарат препятствует адсорбции вируса на клетках.
4. Препарат обладает достоверным антивирусным действием в отношении вируса кори.