

ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА ИНФЛЮЦИД *IN VITRO* ПРОТИВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ШТАММА 2009 Г. A(H1N1) «СВИНОГО» («МЕКСИКАНСКОГО») ГРИППА

М.Ю. Еропкин, Н.И. Коновалова, В.А. Григорьева, Д.М. Байбус, Т.М. Гудкова

НИИ гриппа СЗО РАМН (г. Санкт-Петербург)

РЕЗЮМЕ

Глобальное развитие пандемии гриппа новой разновидности подтипа A(H1N1) – так называемого «свиного», или «мексиканского», гриппа, а также отсутствие надежных противогриппозных этиотропных препаратов, эффективных против всего многообразия циркулирующих штаммов, обуславливают поиски менее узконаправленных гомеопатических и фитопрепаратов против гриппа. В данной работе показана эффективность в модельной системе *in vitro* препарата Инфлюцид против эталонного штамма пандемического гриппа A(H1N1). Активность препарата выражена, главным образом, не в прямом противовирусном, а, скорее, в адаптогенном действии, приводящем к повышению резистентности клеток к вирусному цитопатогенному эффекту.

Ключевые слова: пандемия гриппа, A(H1N1), «свиной грипп», Инфлюцид.

ВВЕДЕНИЕ

Гомеопатический препарат Инфлюцид («Немецкий гомеопатический союз» – DHU) имеет следующий состав: 100 г раствора содержит – Aconitum D3 10g, Gelsemium D3 10g, Ipecacuanha D3 10g, Phosphorus D5 10g, Bryonia D2 10g, Eupatorium perfoliatum D1 10g. Прочие ингредиенты: Eucalyptus globules, 96 % этанол, вода очищенная. Содержание алкоголя 45 об.%. По данным литературы, Инфлюцид существенно снижает такие симптомы, присущие всем ОРЗ, как: гипертермия, боли в конечностях, кашель, гиперимия слизистых, воспалительные процессы в глотке и гортани [1].

Ранее мы исследовали противовирусное действие препарата Инфлюцид *in vitro* в отношении панели вирусов гриппа А птиц (H5N1; H5N2; H7N3; H9N2), а также эталонных штаммов гриппа человека A(H3N2), A(H1N1) и В. Также было проведено исследование действия препарата *in vivo* на мышцах, зараженных летальной дозой адаптированного к этой модели штамма A/PR8/34 (H1N1) [2].

В настоящий момент мы являемся свидетелями развертывания первой пандемии XXI века – пандемии так называемого «свиного» или «мексиканского» гриппа, вызванной качественно новым штаммом гриппа А подтипа (H1N1) – тройным реассортантом, сочетающим в себе сегменты РНК, происходящие от Североамериканской линии свиного гриппа (сегменты NA, NP и NS), Евразийской линии

свиного гриппа (сегменты NA и M), Североамериканской линии птичьего происхождения (сегменты PA и PB2) и сегмент PB1 от сезонного гриппа подтипа H3N2 [5]. На момент написания этой статьи (07.07.2009), по данным ВОЗ, в мире зарегистрировано 94512 лабораторно подтвержденных случаев «свиного гриппа», из них 429 закончились летальным исходом. Пандемия продолжается главным образом в странах Южного полушария, где сейчас разгар климатической зимы (Аргентина, Австралия, Чили, Новая Зеландия). Однако и в ряде стран Северного полушария, несмотря на летний сезон, продолжается рост заболеваемости этой новой разновидностью гриппа – прежде всего, в США, где количество выявленных случаев достигло почти 34000, а также в Мексике, Канаде, КНР, Японии, Тайланде [6].

По данным лабораторных исследований, пандемический штамм A(H1N1) устойчив к адамантанам (ремантадин и амантадин), но чувствителен к ингибиторам нейраминидазы (озельтамивир и занамивир). Однако уже появилось сообщение о выделении первого вируса этой разновидности, устойчивого к озельтамивиру (Тамифлю) [6]. Опыт последних лет показывает, что практически невозможно подобрать этиотропный противовирусный препарат, эффективный против всего многообразия циркулирующих сезонных вирусов. Так, ремантадин, кроме того, что он неэффективен против гриппа В, в последние эпидсезоны

не действовал на значительную часть вирусов подтипа А(Н3N2). Вирусы подтипа А(Н1N1), напротив, были в большинстве чувствительны к ремантадину, но быстрыми темпами приобрели устойчивость к озельтамивиру. Все это является основанием для поиска препаратов, направленных не на вирус как таковой или его взаимодействие с клеткой, а на стимуляцию клеточной резистентности, выработку интерферонов, иммунную защиту. При неясных на данный момент перспективах своевременного появления пандемической вакцины против «свиного гриппа», роль таких препаратов в начальной фазе пандемии является особенно важной. Это побудило нас исследовать возможное действие *in vitro* препарата Инфлюцид в отношении эталонного штамма «свиного гриппа» А/Калифорния/07/09 (H1N1) swl.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование действия Инфлюцида проводили на культуре клеток MDCK, рекомендованной референс-центрами ВОЗ по гриппу и Минздравсоцразвития РФ для выделения и исследования вирусов гриппа [3]. Штамм пандемического «свиного гриппа» А/California/07/09 (H1N1) swl был любезно предоставлен нам для научных исследований проф. А.И. Климовым (Центры по контролю и предотвращению заболеваемости (CDC), Атланта, Джорджия, США).

Для наших целей более удобной оказалась жидкая (капельная) форма Инфлюцида. Как показано ранее, препарат характеризовался полным отсутствием токсичности при его разведениях в 1/50–1/400 и контакте с клетками в течение 3 суток.

Оценку противовирусного действия Инфлюцида проводили на клетках, засеянных в стандартной дозе в 96-луночные планшеты для клеточных культур. Из исходной вирус-содержащей аллантоисной жидкости готовили серию десятикратных разведений от 10^{-1} до 10^{-7} и вносили в соответствующие лунки с клеточным монослоем. Результаты учитывали через 48 часов по реакции гемагглютинации (РГА). За титр вируса в контроле и опыте принимали величину, обратную десятичному логарифму наибольшего разведения исходного вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации в лунке, и выражали в количестве 50% тканевых инфекционных доз (ТИД₅₀). Вирусингибирующее

действие препарата оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с контролем ($\Delta \lg \text{ТИД}_{50}$). Вторым важным индикатором служила реакция восстановления клетками в культуре тетразолиевого красителя МТТ (Тиазолила голубого), интенсивность которой отражает степень жизнеспособности клеток в результате восстановления красителя митохондриальными и частично цитоплазматическими дегидрогеназами. Тест часто используется в вирусологии для оценки цитопатогенного действия вирусов на клетку [8]. Его результаты можно интерпретировать как степень устойчивости клеток к действию вирусов. Микротетразолиевый тест также широко используется в оценке воздействия на клетки токсикантов, фармакологических препаратов, неблагоприятных факторов окружающей среды [4], поэтому одновременно с противовирусным эффектом можно оценивать токсичность исследуемых препаратов *in vitro*. Препарат вводили в среду культивирования клеток за 1 час до заражения вирусом («профилактическая» схема введения) и через 1 час после заражения вирусом («лечебная» схема введения) в разведении на буфере PBS 0,5 % и 1 % (концентрация в среде исходного жидкого препарата).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При введении образцов Инфлюцида по лечебной схеме (через 1 час после заражения клеток) препарат умеренно подавлял продукцию вирусных частиц, выявляемую в реакции гемагглютинации) – при концентрации 1 % снижение гемагглютинирующей активности ($\Delta \lg \text{ТИД}_{50}$) составило 1,0; а при дозе 0,5 % – 0,5, т.е. инфекционная активность вируса упала в 10 и 6,7 раза, соответственно. Результаты сравнительного исследования эффекта препарата по данному критерию в отношении панели вирусов гриппа человека и птиц представлены в табл. 1. Наибольшая активность Инфлюцида в этом исследовании проявлялась в отношении эталонных штаммов вируса гриппа человека А и В разных лет выделения и была сравнительно невысока или отсутствовала в отношении ряда разновидностей гриппа птиц.

При оценке в тесте восстановления МТТ выявлено существенное уменьшение цитопатогенного действия вируса как при «профилактической» (рис. 1 и 2), так и при «лечебной» (рис. 3 и 4) схемах введения препарата. При «профилактической» схеме введения

6 действие препарата было дозозависимым (рис.1) – Инфлюцид в концентрации 1 % имел достоверно более сильное воздействие, чем 0,5 %-ный. Действие было наиболее выраженным в зоне высоких титров вируса (-1 и -2 log или 10^4 и 10^3 ТИД₅₀), причем препарат в концентрации 1 % практически полностью блокировал цитопатическую реакцию клеток в культуре даже при наивысшей заражающей дозе вируса – 10^4 ТИД₅₀ (рис. 2). Инфлюцид достоверно уменьшал цитопатогенное действие вируса также при «лечебной» схеме введения (рис. 3 и 4), причем в этом случае действие препарата в дозе 0,5 и 1,0 % было примерно одинаковым, но достоверно отличным от контроля (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

7 При сравнении полученных методом МТТ данных с результатами регистрации методом РГА можно видеть, что препарат Инфлюцид оказывает в случае инфицирования высокопатогенным штаммом «свиного» гриппа А/Калифорния/07/09sw1 положительное действие, главным образом, уменьшая цитопатическую реакцию клеток на вирус, то есть усиливает резистентность самих клеток. В этом смысле его действие можно рассматривать, скорее, не как прямое противовирусное, а как адаптогенное, результатом которого является усиление сопротивляемости организма к вирусным инфекциям.

Сравнение данных по активности препарата в отношении различных эталонных штаммов вируса гриппа показывает, что его активность по РГА против пандемического штамма

А(Н1N1) относительно невелика – наибольшая активность проявлялась в отношении штаммов А(Н3N2) и В. Небольшой эффект наблюдался также и против модельного вакцинного штамма гриппа А(Н5N1) – NIBRG-14 (табл. 1). Однако следует отметить, что в этом сравнительном исследовании не использовался метод оценки цитопатогенного эффекта вирусов по восстановлению зараженными клетками МТТ, так что все возможные стороны действия препарата не могли проявиться. Тем не менее, следует подчеркнуть важность даже относительно невысокого положительного действия Инфлюцида против штаммов А(Н5N1), так как угрозу эпидемии высокопатогенного «птичьего» гриппа нельзя снимать с повестки дня, несмотря на начавшуюся пандемию «свиного» гриппа, поскольку регулярно появляются сообщения о случаях заболевания гриппом А(Н5N1) в развивающихся странах, смертность от которого превышает 50 % [7].

Наконец, несмотря на простоту и объективность моделей *in vitro* следует отметить их ограничения при исследовании гомеопатических препаратов, которые, безусловно, действуют главным образом на системном уровне. Поэтому противовирусный эффект Инфлюцида также был подтвержден нами ранее на животной модели – белых мышах, зараженных летальной и сублетальной дозами адаптированного к ним широко известного штамма А/PR/8/34 (Н1N1) [2]. Разведенный физиологическим раствором препарат вводили мышам внутрижелудочно один раз в сутки в течение 4-х дней с момента заражения в фармакологически адекватной дозе.

Таблица 1

Сравнительное противовирусное действие препарата Инфлюцид *in vitro* на штаммы различных подтипов вируса гриппа при оценке методом РГА

№	Штамм вируса	Противовирусный эффект в ΔlgТИД ₅₀
1	А/Н.Каледония/20/99 (Н1N1) *	1,5
2	А/Виктория/35/72 (Н3N2) *	2,0
3	А/Висконсин/67/05 (Н3N2) *	1,0
4	В/Малайзия/2506/04 *	2,0
5	А/NIBRG-14 (Н5N1) **	1,0
6	А/утка/Потсдам/1402/6/86 (Н5N2) †	0,5
7	А/кряква/NT/12/02 (Н7N3) †	0
8	А/Гонконг/1073/99 (Н9N2) †	0
9	А/Калифорния/07/09 (Н1N1)sw1 ***	0,75

Примечание: * – вирусы гриппа человека, ** – вакцинный штамм А(Н5N1), *** – пандемический вирус А(Н1N1) (вирус «свиного», или «мексиканского», гриппа), вызвавший развивающуюся с апреля 2009 г. пандемию гриппа, † – вирусы гриппа птиц.

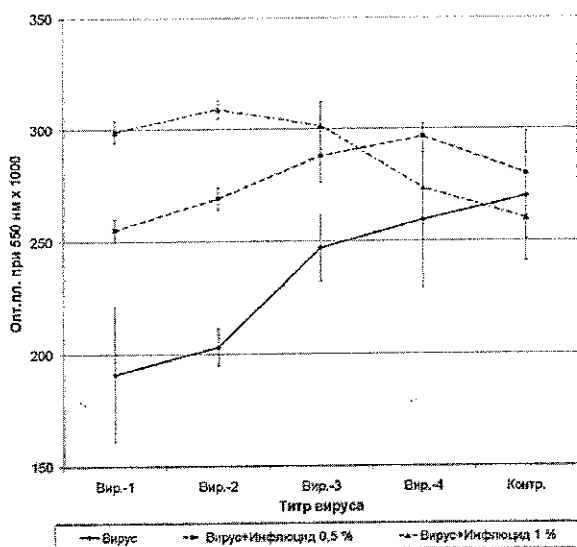


Рис. 1. Противовирусный эффект Инфлюцида в отношении вируса «свиного гриппа» А/Калифорния/07/09 (H1N1)swl в культуре клеток MDCK. Предынкубация с препаратом 1 час, заражение вирусом, учет результатов через 24 час. Тест-метод - МТТ.

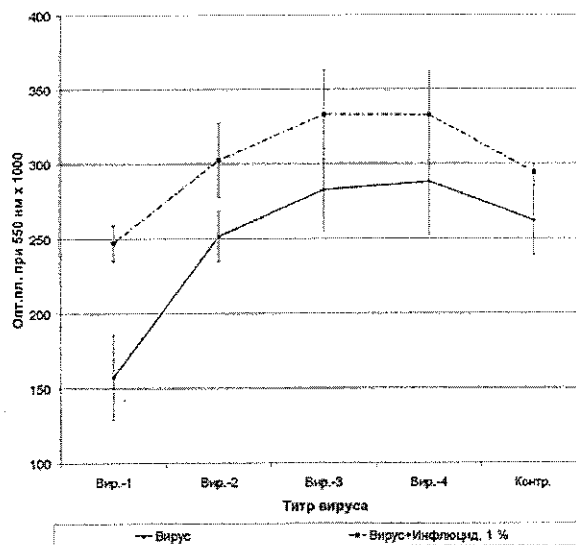


Рис. 3. Противовирусный эффект Инфлюцида на вирус «свиного гриппа» А/Калифорния/07/09 (H1N1)swl при предварительном заражении клеток MDCK вирусом (за 1 час до введения препарата). Тест-метод - МТТ.

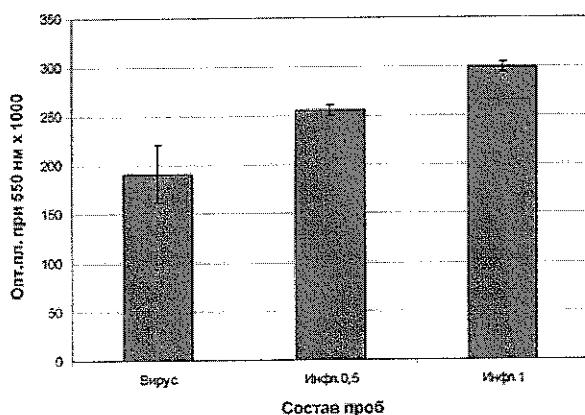


Рис. 2. Противовирусный эффект Инфлюцида в отношении вируса «свиного гриппа» А/Калифорния/07/09 (H1N1)swl. Предынкубация с препаратом 1 час. Тест-метод - МТТ. Данные при дозе вируса 10^4 ТИД₅₀.

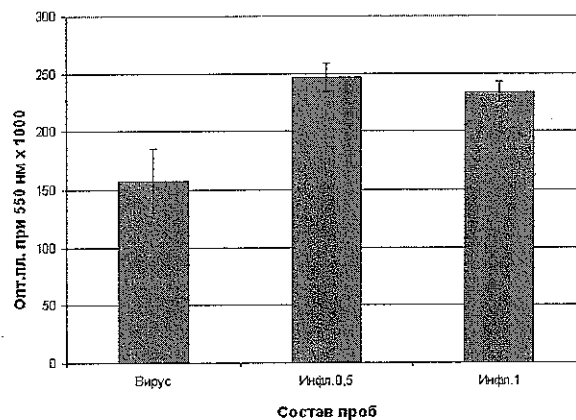


Рис. 4. Противовирусный эффект Инфлюцида на вирус «свиного гриппа» в культуре клеток MDCK при предварительном заражении вирусом за 1 час до введения препарата. Доза вируса 10^4 ТИД₅₀.

По критерию индекса защиты (ИЗ) и учете смертности экспериментальных животных по всем срокам и обеим использованным заражающим дозам вируса 1LD₅₀ и 0,1LD₅₀ мы получили ИЗ = 41,2%, а при заражающей дозе вируса 0,1LD₅₀ ИЗ = 75% (препарат считается активным, если ИЗ ≥ 40%). Таким образом, эффективность препарата была доказана как в целом, так и в особенности при заражающей дозе вируса 0,1LD₅₀ (титр вируса 10^{-2}), когда

ИЗ >> 40%. Статистическая обработка непараметрическими методами (Wald-Wolfowitz Runs Test, программа Statistica for Windows 6.0) также показала достоверный эффект Инфлюцида *in vivo* (для дозы вируса 0,1LD₅₀ Z = -3,676; p = 0,000237). Убедительный результат получен и при обработке методом регрессионного анализа (построения линеаризованных зависимостей числа выживших животных от срока после заражения).

ВЫВОДЫ:

1. Инфлюцид эффективен как адаптогенный противогриппозный препарат *in vitro* в культуре клеток MDCK, зараженных вирусом «свиного» гриппа (новым пандемическим штаммом А(Н1N1)).
2. Активность препарата проявляется как при «профилактической», так и при «лечебной» схемах введения.
3. Положительное действие Инфлюцида выявлено главным образом в тесте восстановления клетками МТТ, что указывает на клеточный механизм противовирусного эффекта, выражающийся в усилении резистентности клеток к цитопатогенному действию вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаращенко Т.И. Комплексные гомеопатические препараты в лечении воспалительных заболеваний ЛОР-органов // Русский Медицинский Журнал. – 2002. – Т.20 – № 10.
2. Еропкин М.Ю., Григорьева В.А., Гудкова Т.М., Коновалова Н.И., Т.Г. Лобова, Байбус Д.М., Ягловская И.Б. Активность препарата «Инфлюцид» в отношении вирусов гриппа в модельных системах // МЕДЛАЙН-Экспресс. – 2007. – № 6. – С. 23–26.
3. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г. и др. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах

и куриных эмбрионах и их идентификация: Методические рекомендации. – СПб., 2006. – 24 С.

4. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparison of two *in vitro* cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium (MTT) tests // Toxicol. In Vitro. – 1988. – Vol. 2 – No. 1. – P. 1–6.

5. Dawood F.S., Jain S., Finelli L. et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans // New Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 361 – P. 1–10.

6. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.htm>

7. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html

8. Watanabe W., Konno K., Ijichi K., et al. MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo- and anti-paramyxoviral agents // J. Virol. Methods. – 1994. – Vol. 48 – No. 2–3 – P. 257–265.

Адрес автора

Д.б.н. Еропкин М.Ю.

Заведующий лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа НИИ гриппа СЗО РАМН

198096, С.Петербург, а/я 52

eropkin@influenza.spb.ru