

Утверждаю:

Директор ГУ НИИ вирусологии  
им. Д.К. Львовского РАМН  
Академии наук



Д.К. Львов

**ИНАКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА СГОЛ НА  
ИНФЕКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ШТАММА ВИРУСА  
ГРИППА А ПТИЦ (H5N1).**

(Отчет)

Руководитель и ответственный исполнитель:  
Руководитель лаборатории  
Государственной коллекции вирусов  
доктор мед. наук

 П.Г. Дерябин

Москва, 2006 г

В последние годы в ряде стран Восточной и Юго-Восточной Азии регистрируется вспышка гриппа А птиц (H5N1). Инфекция поражает, в основном, домашних птиц - кур и уток, которых, как принято в таких случаях, уничтожают сотнями тысяч. Зарегистрированы случаи заболеваний и среди людей. Общее число жертв инфекции было невелико, но поражает доля смертельных исходов: несмотря на проводившееся лечение, умерло около 70% заболевших. С июля 2005 года высоко патогенный вирус гриппа птиц был занесен на территорию России, и за этот короткий период инфекции вирусом гриппа H5N1 зарегистрирована во многих областях Российской Федерации: в Западной Сибири, на Урале, в Астраханской области.

Как известно, грипп - это прежде всего инфекция птиц, в основном водоплавающих, - Все разновидности вируса гриппа человека происходят от вирусов гриппа птиц. И в геноме любого человеческого вируса присутствуют гены вирусов птичьих.

Птичий грипп смертельно опасен для человека, но, к счастью, люди не передают его друг другу (он же, как мы помним, инфекция пищевая), заражаясь им только от больных птиц. Грипп человеческий прекрасно передается от человека к человеку, но его известные на сегодня штаммы уже укрощены совместной эволюцией. Однако некоторые животные - прежде всего свиньи - легко заражаются и тем, и другим гриппом. Когда эпизоотия птичьего гриппа совпадает с эпидемией гриппа человеческого (а они обычно приходятся на одни и те же месяцы), вирусы того и другого могут встретиться в организме свиньи. Одновременное размножение двух вирусов в организме свиней может привести к реассортации и к появлению нового «гибридного» вируса. в котором «птичьи» белки-антигены вируса гриппа А птиц будут сочетаться со способностью передаваться от человека к человеку. И тогда катастрофа почти неминуема: новый возбудитель будет заразен, как человеческий грипп, и

смертоносен, как птичий. Таким образом, существует реальная угроза появления нового пандемического штамма.

По прогнозу Всемирной организации здравоохранения, в ближайшие годы возможно появление нового варианта вируса гриппа птиц, к которому у людей не будет иммунитета, что может привести к развитию пандемии. Вакцины против инфекции, вызванным таким штаммом, нет, а из противогриппозных препаратов, существующих в настоящее время, ни один не производится в России.

В этой связи, возникает настоятельная необходимость в создании новых средств лечения и профилактики гриппа,

В НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского традиционно проводятся исследования по изучению вируса гриппа птиц, по разработке средств диагностики, лечения и профилактики инфекции. Фактически все известные науке штаммы вируса гриппа птиц и человека имеются в Государственной коллекции вирусов при Институте. и это те вирусы, которые могут послужить строительным материалом для будущего пандемического вируса. В частности, в июле этого года во время первой вспышки вируса гриппа H5N1 от больных и умерших домашних уток и кур были выделены первые высокопатогенные штаммы этого вируса, которые депонированы в Государственную коллекцию вирусов. Проводятся исследования по расшифровке эпизоотий среди птиц в других регионах страны: республика Калмыкии, Астраханская область. Кроме того, исследования Института направлены на совершенствование средств диагностики, профилактики и лечения этой инфекции.

Для изучения противовирусной активности поступившего на исследование препарата СГОЛ в исследованиях использовали высокопатогенный штамм вируса гриппа А птиц (H5N1), выделенный нами во время эпизоотии среди домашних птиц в июле 2005 года в Новосибирской области. Вируссодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из зараженных вирусом H5N1 культур клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) на высоте развития цитопатических проявлений.

В опытах использовали дозу вируса H5N1, равную 10,0 и 5,0 ТЦД50.

Исследования противовирусной активности препарата проводили в культурах клеток СПЭВ, выращенных в виде однодневного монослоя в 48-луночных панелях. Использовали двукратные разведения препарата СГОЛ на среде 199, используемой для питания культур клеток СПЭВ, начиная с 1:10.

Определение цитотоксических свойств препарата СГОЛ. Препарата СГОЛ в разведениях от 1:10 и выше использовали для определения его токсического влияния на жизнеспособность клеток. В разных разведениях его добавляли в питательную среду культур клеток СПЭВ, после чего на протяжении 4-х суток наблюдали за жизнеспособностью и пролиферативной активностью клеток. Учет результатов проводили по регистрации % жизнеспособных клеток и их пролиферативной активности.

Для изучения противовирусных свойств препарата СГОЛ культуры клеток СПЭВ обрабатывали различными концентрациями препарата за 1 час до заражения клеток, сразу после адсорбции вируса и через 1 час после инфекции вирусом.

Полученные результаты представлены в табл. 1- 4.

Обнаружено, что препарат СГОЛ обладает слабыми цитотоксическими свойствами только при использовании его в разведениях 1:20 и ниже. Цитотоксический эффект препарата не проявлялся в случае использования его разведений выше 1:20 для культур клеток. В то же время следует отметить формирование темно-серой пленки, покрывающей монослой клеток полностью при разведении его в десять раз, или частично – при разведении препарата в 20 раз. Более низкие концентрации препарата не вызвали эффекта пленки в клеточных культурах.

В дальнейших исследованиях при изучении противовирусной активности использовали 48-луночные пластиковые панели и препарат СГОЛ в разведениях 1:20 и выше в объеме 40 мкл на лунку. Как видно из табл.2, препарат СГОЛ в концентрациях, не вызывающих цитотоксический эффект, обладает высокой способностью подавлять репликацию вируса гриппа А

(H5N1) в культурах клеток СПЭВ в случае обработки клеток за 1 час до заражения вирусом. В частности, показано, что препарат СГОЛ, разведенный до 1:160 и внесенный в объеме 40 мкл на лунку способен в этих условиях защитить от вирусиндуцированной гибели 100% клеток, зараженных вирусом H5N1 в дозе 5,0 и 10,0 ТЦД<sub>50</sub> в течение 48 часов после заражения клеток (срок наблюдения), в то время как в культурах клеток СПЭВ, зараженных вирусом гриппа А/H5N1, но не обработанных препаратом, происходила 100%-я гибель клеток. В разведении 1:320 препарат защищает 45% клеток СПЭВ, зараженных вирусом в дозе 5,0 ТЦД<sub>50</sub> от вирусиндуцированной гибели. В больших разведениях препарат СГОЛ утрачивал противовирусные свойства.

Высокая способность защищать уже инфицированные культуры клеток СПЭВ была зарегистрирована при воздействии препарат СГОЛ на монослой клеток СПЭВ сразу же после заражения вирусом гриппа А. Сколько-нибудь серьезных различий в полученных результатах исследований противовирусной активности препарата, вводимого до или в момент заражения клеток, не было выявлено, когда использовали разведения препарата от 1:20 до 1:80. Препарат обладал высокой противовирусной активностью даже в условиях высоких доз заражения вирусом гриппа А птиц. В частности, в разведении 1:160 препарат защищал 50% клеток, зараженных вирусом гриппа в дозе 5,0 ТЦД<sub>50</sub>.

Несколько иные результаты были получены и при введении препарата СГОЛ через 1 час после заражения клеток вирусом гриппа А (H5N1). В этом случае наблюдали 100% выживание инфицированных вирусом гриппа А клеток в дозе 10,0 и 5,0 ТЦД<sub>50</sub> при обработке препаратом СГОЛ в разведениях от 1:20 до 1:40. В этих условиях культуры клеток СПЭВ, зараженные вирусом, но не обработанные препаратом, как правило погибали в 100% случаев. Препарат, разведенный 1:80 и внесенный через 1 час после инфицирования, вызывал защиту 60% и 30% зараженных вирусом клеток СПЭВ в зависимости от дозы вируса, используемой для заражения клеток.

### **Заключение.**

Изучение противовирусной активности препарата СГОЛ в отношении инфекции, вызванной высокопатогенным вариантом вируса гриппа А птиц (H5N1), показало:

1. Препарат СГОЛ обладает слабо выраженными токсическими для культур клеток СПЭВ свойствами, проявляющимися лишь при использовании низких разведений препарата.
2. В нетоксических концентрациях препарат СГОЛ обладает выраженными лечебно-профилактическими свойствами в отношении инфекции, вызванной высоко патогенным штаммом вируса гриппа А птиц (H5N1) в культурах клеток СПЭВ, активно защищая клетки от вирусиндуцированной гибели.
3. Показана высокая противовирусная активность препарата СГОЛ, внесенного в разведении до 1:160 за 1 час до заражения, в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А/H5N1.
4. В разведении 1:80 и 1:40 препарат эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа А/H5N1 в культурах клеток СПЭВ при внесении его сразу же после заражения или через 1 час после заражения культур соответственно.
5. Низкие токсические свойства препарата СГОЛ в сочетании с высокими противовирусными свойствами, обнаруженными на модели инфекции, вызванной высоко патогенным вариантом вируса гриппа А/H5N1, позволяют рекомендовать изучение данного препарата как противовирусного средства на моделях инфекции *in vivo*, а также для изучения его противовирусных свойств при других вирусных инфекциях.

Табл.1.

**Цитотоксические свойства препарата СГОЛ для культур клеток СПЭВ.**

Препарат	Разведения препарата СГОЛ (мкг/мл) используемые для обработки клеток (% погибших клеток в монослое)					
	1:10	1:20 <sup>1)</sup>	1:40	1:80	1:160	Без препарата
СГОЛ	45	0	0	0	0	0

(Учет результатов через 72 часа после внесения препарата)

1) Препарат СГОЛ разведенный 1:20 и ниже, вызывал появление морфологически измененных клеток и снижение пролиферативной активности клеток СПЭВ.

Табл.2

**Противовирусные свойства препарата СГОЛ в отношении инфекции, вызванной патогенным вариантом вируса гриппа А птиц (H5N1), в культурах клеток СПЭВ (профилактическое действие препарата)**

Доза Вируса (ТЦД50)	% выживших клеток H5N1, инфицированных клеток СПЭВ, обработанных препаратом за 1 час до заражения в разведениях:						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	кв
10,0	100	100	100	100	0	0	0
5,0	100	100	100	100	45	0	0

Табл.3

Противовирусные свойства препарата СГОЛ в отношении инфекции, вызванной патогенным вариантом вируса гриппа А птиц (H5N1), в культурах клеток СПЭВ (лечебное действие препарата)

Доза Вируса (ТЦД50)	% выживших клеток H5N1, инфицированных клеток СПЭВ, обработанных препаратом сразу после заражения клеток разведениях:						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	кв
10,0	100	100	100	25	0	0	0
5,0	100	100	100	50	0	0	0

Табл.4

Противовирусные свойства препарата СГОЛ в отношении инфекции, вызванной патогенным вариантом вируса гриппа А птиц (H5N1), в культурах клеток СПЭВ (лечебное действие препарата)

Доза Вируса (ТЦД50)	% выживших клеток H5N1, инфицированных клеток СПЭВ, обработанных препаратом через 1 час после заражения клеток разведениях:						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	кв
10,0	100	100	30	0	0	0	0
5,0	100	100	60	0	0	0	0