

Изучение профилактической эффективности Триазавирина в отношении возбудителя гриппа А (H5N1)

С. Я. ЛОГИНОВА, С. В. БОРИСЕВИЧ, В. А. МАКСИМОВ, В. П. БОНДАРЕВ,
С. К. КОТОВСКАЯ¹, В. Л. РУСИНОВ¹, В. Н. ЧАРУШИН¹, О. Н. ЧУПАХИН¹

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

¹ Уральский государственный технический университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, *Екатеринбург*

Triazaverin Prophylactic Efficacy Against Influenza Virus A (H5N1)

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. A. MAKSIMOV, V. P. BONDAREV,
S. K. KOTOVSKAYA, V. L. RUSINOV, V. N. CHARUSHIN, O. N. CHUPAKHIN

Virological Centre, Central Research Institute No 48, Ministry of Defense of the Russian Federation, *Sergiev Posad*
B. N. Yeltsin Urals State Technical University, *Ekaterinburg*

Изучение профилактической эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы гриппа А (H5N1) у белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм А/курица/Курган/Россия/02/05, в сравнении с препаратами Тамифлю®, Ремантадин и Арбидол® выявило, что исследуемый препарат в дозах 1–100 мг/кг эффективно защищает животных от гибели. Препарат эффективен также при применении его по схеме экстренной профилактики. Триазавирин эффективно подавляет размножение вируса гриппа А в лёгких инфицированных белых мышей.

Ключевые слова: *грипп А, триазавирин, противовирусная эффективность, профилактика.*

The experimental study of the prophylactic efficacy of Triazaverin against the experimental form of the influenza virus A (H5N1) on albino mice intranasally infected with the influenza virus A/Chicken/Kurgan/Russia/02/05 vs. the reference drugs Tamiflu®, Remantadin and Arbidol® showed that in doses of 1 to 100 mg/kg it was efficient in the animal protection from death. The drug was also efficient in the urgent prophylaxis. Triazaverin effectively inhibited the influenza A virus multiplication in the lungs of the albino mice.

Key words: *influenza virus A, triazaverin, antiviral efficacy, prophylaxis.*

В настоящее время большое внимание уделяется разработке эффективных средств профилактики гриппа А, что связано с возможностью появления эпидемически и эпизоотически значимых его подтипов (H5N1, H7N7, H1N1)). Складывающаяся ситуация с распространением и появлением новых типов вируса гриппа обосновывает актуальность задачи поиска эффективных медицинских неспецифических средств защиты в отношении возбудителя гриппа А (H5N1).

Целью настоящей работы явилось доклиническое изучение профилактической эффективности препарата Триазавирин, относящегося к группе соединений триазоло-as-триазинов.

Материал и методы

Вирус. Использовали вирус гриппа, штамм А/курица/Курган/Россия/02/05 (H5N1), выделенный в октябре 2005 года специалистами филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ» из биопроб павших кур Утятской птицефабрики Курганской области. Штамм был охарактеризован с помощью биологических [1] и молекулярно-биологических методов исследования [2] и депонирован в Специализированную коллекцию Филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ».

Исследуемые препараты. Исследуемый препарат Триазавирин синтезирован специалистами ИОС Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия.

В качестве контроля использовали:

— Арбидол® — производства ЗАО «Мастерлек», Россия, серия 770905.

— Ремантадин — производства ООО «РОЗФАРМ», Россия, серия 1209.

— Осельтамивир (Тамифлю®) — производства фирмы Хоффманн — Ла Рош Лтд., Швейцария, серия В 1154.

Лабораторные животные. Для моделирования экспериментальной формы гриппа А использовали белых мышей массой 10–12 г, полученных из вивария филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ».

Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 14 суток. Титрование возбудителя гриппа А проводили на 10-суточных РКЭ.

© Коллектив авторов, 2010

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

Таблица 1. Изучение профилактической эффективности триазавирина в отношении экспериментальной формы гриппа у белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм А/курица/Курган/Россия/02/05 (H5N1) (n=3)

Препарат	Схема введения препарата	Доза препарата, мг/кг	Гибель животных	Защитная эффективность от гибели, % ($X \pm \sigma_x$)	Увеличение средней продолжительности жизни, Δ , сутки ($X \pm \sigma_x$)
Триазавирин	-120 ч, -96 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	100	27/60	55,0 \pm 2,9	2,9 \pm 0,1
		50	41/60	31,7 \pm 1,7	2,4 \pm 0,1
		10	39/60	35,0 \pm 0,0	2,6 \pm 0,1
		1	33/60	45,0 \pm 2,9	2,9 \pm 0,1
	-48 ч, -24 ч	100	41/60	31,7 \pm 1,7	2,4 \pm 0,1
		50	42/60	30,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,1
		10	34/60	43,3 \pm 1,7	3,1 \pm 0,1
		1	36/60	40,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,1
	-24 ч, -1 ч	100	44/60	26,7 \pm 1,7	2,3 \pm 0,1
		50	41/60	31,7 \pm 1,7	2,5 \pm 0,1
		10	40/60	33,3 \pm 1,7	2,6 \pm 0,1
		1	42/60	30,0 \pm 0,0	2,7 \pm 0,1
Тамифлю®	-120 ч, -96 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	13	23/60	61,7 \pm 1,7	4,3 \pm 0,1
Ремантадин	—//—	16	27/60	55,0 \pm 0,0	3,5 \pm 0,2
Арбидол®	-24 ч, -1 ч	60	33/60	45,0 \pm 0,0	2,6 \pm 0,1
		30	37/60	38,3 \pm 1,7	2,3 \pm 0,1
Контроль дозы	—	—	60/60	—	—
Контроль стада	—	—	0/60	—	—

Оценку эффективности Триазавирина в отношении вируса гриппа, штамм А/курица/Курган/02/05 (H5N1) проводили *in vivo* на белых мышах массой 10–12 г инфицированных интраназально. В качестве инфицирующего препарата использовали аллантоисную жидкость инфицированных РКЭ с биологической активностью 5,5 lg ЦПД₅₀/мл, 8,3 lg ЭЛД₅₀/мл, 6,3 lg ЛД₅₀МИЦ/мл.

Исследуемые препараты вводили белым мышам перорально по профилактической схеме (за 5 суток до инфицирования, один раз в день, ежедневно), а также по схеме экстренной профилактики (через 2 часа после инфицирования и далее в течение 6 суток).

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями [3]. Основными критериями оценки эффективности *in vivo* являлись:

- показатели защиты лабораторных животных от гибели;
- среднее время жизни животных в группе;
- снижение уровня накопления вируса в лёгких (Δ , lg).

Результаты и обсуждение

Результаты изучения профилактической эффективности Триазавирина в отношении вируса гриппа А свидетельствуют о том, что препарат наиболее эффективен при применении за 5 суток до инфицирования (ежедневно один раз в сутки) в дозе 100 мг/кг массы лабораторного животного (табл. 1). В среднем защита от гибели составила 55,0%, увеличение среднего времени жизни — 2,9 суток. Снижение дозы Триазавирина приводило к уменьшению протективной эффективности препарата. При этом следует отметить, что в наименьшей исследуемой дозе (1 мг/кг) протективная эффективность препарата статистически достоверно не отличалась ($p \leq 0,05$) от такового показателя препарата в дозе 100 мг/кг.

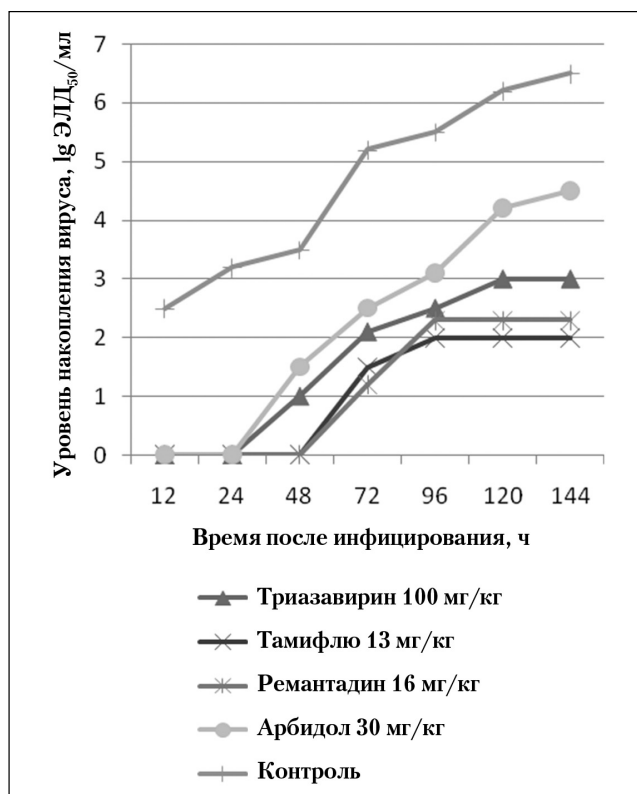
Для выбора наиболее эффективной схемы применения Триазавирина препарат вводили жи-

вотным перорально за 2 суток и сутки до инфицирования. При применении Триазавирина двукратно за 48 ч и 24 ч до инфицирования более эффективную защиту животным препарат оказывал в дозе 1 мг/кг и 10 мг/кг. Защита от гибели составила 40,0 и 43,3% соответственно, увеличение показателя средней продолжительности жизни (СПЖ) — 3 суток. Профилактическая эффективность Триазавирина сопоставима с эффективностью Арбидола®. При этом следует подчеркнуть, что доза препарата была значительно ниже, чем референс-препарата Арбидол®.

Применение Триазавирина за сутки и 1 час до инфицирования (однократно) было менее эффективно и показатель защитной эффективности препарата снизился на 10%.

В качестве референс-препаратов использовали Арбидол®, Ремантадин и Тамифлю®. Арбидол® в дозе 30 мг/кг (соответствует профилактической дозе для человека — 200 мг/сутки) защищал от гибели в среднем 38% инфицированных белых мышей. Увеличение СПЖ составило в среднем 2,3 суток. В дозе 60 мг/кг (соответствует равноэффективной дозе человека — 400 мг/сутки) защитная эффективность в среднем составила 45%, увеличение показателя среднего времени жизни — 2,6 суток.

Защитная эффективность Тамифлю® в дозе 13 мг/кг (соответствует 1/2 дозы для человека — 75 мг/сутки) — 62%. При этом наблюдали удлинение СПЖ на 4,3 суток. Защитная эффективность Ремантадина в отношении экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа (H5N1), в дозе 16 мг/кг составила в среднем 55%, увеличение показателя СПЖ — 3,5 суток.



Влияние профилактического применения препаратов на репродукцию вируса гриппа, штамм А/курица/Курган/02/05, в лёгких белых мышей.

Изучение влияния препаратов при профилактическом применении на уровень накопления вируса в лёгких инфицированных животных показало, что в первые сутки после инфицирования все изученные препараты полностью подавляли размножение возбудителя. Тамифлю® и Ремантадин высокоэффективно подавляли репродукцию возбудителя, более чем на 4 lg на пике развития инфекции (рисунок). Наименее эффективно подавлял размножение вируса гриппа в лёгких Арбидол® — в 100 раз.

Таблица 2. Изучение профилактической эффективности триазавирина в отношении экспериментальной формы гриппа у белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм А/курица/Курган/Россия/02/05 (H5N1) при различной кратности его применения

Препарат	Схема введения препарата	Кратность введения препарата	Доза препарата, мг/кг	Гибель животных	Защитная эффективность от гибели, %	Увеличение средней продолжительности жизни, Δ, дни
Триазавирин	-48 ч, -24 ч	1	10	13/20	35	2,9
		2	10	11/20	45	3,2
	-120 ч, -96 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	1	10	13/20	35	2,8
		1	10	12/20	40	2,6
		2	10	13/20	35	2,9
		2	10	11/20	45	3,2
Тамифлю®	—//—	1	13	7/20	65	4,2
		1	60	11/20	45	2,5
Арбидол®	-24 ч, -1 ч	1	30	12/20	40	2,2
		—	—	20/20	—	—
Контроль стада	—	—	—	0/20	—	—

Таким образом, Триазавирин проявлял противовирусный эффект при применении его в диапазоне доз от 1 до 100 мг/кг массы животного по профилактическим схемам: за 5 суток до инфицирования, ежедневно, и за 2 суток до инфицирования, ежедневно. Величина профилактической эффективности Триазавирина (в дозе 1 мг/кг) сопоставима с эффективностью Арбидола®, при этом доза последнего выше в 30—60 раз.

Оценка влияния кратности введения препарата Триазавирин на величину показателя его профилактической эффективности при использовании следующих схем: за 48 ч, 24 ч и за 120 ч, 96 ч, 72 ч, 48 ч и 24 ч (интервал между приёмом препарата составлял 8—10 ч) выявила, что деление суточной дозы на два приёма существенно не влияет на показатель защитной эффективности препарата (табл. 2).

При применении препарата через 1—2 часа после инфицирования (по схеме экстренной профилактики) Триазавирин в дозе 50 мг/кг массы защищал от гибели в среднем 43,3% инфицированных животных, в дозе 100 мг/кг — 48,3% (табл. 3). При этом наблюдали увеличение СПЖ на 2,7 суток и 3,0 суток соответственно.

Арбидол® в дозе 130 мг/кг при использовании его по схеме экстренной профилактики защищал от гибели 30% инфицированных вирусом гриппа белых мышей. Увеличение СПЖ составило в среднем 1,7 суток. Защитная эффективность Тамифлю® в дозе 25 мг/кг (соответствует равноэффективной дозе человека — 150 мг/сутки) составила в среднем 53,3%. При этом наблюдалось удлинение СПЖ на 3,3 суток. Ремантадин при применении по схеме экстренной профилактики в дозе 50 мг/кг защищал от гибели 45% инфицированных животных.

Следовательно, при использовании схемы экстренной профилактики Триазавирин не уступает Ремантадину, превосходит по эффективнос-

Таблица 3. Изучение эффективности триазавирина в отношении экспериментальной формы гриппа у белых мышей, интраназально инфицированных вирусом гриппа, штамм А/курица/Курган/Россия/02/05 (H5N1) при введении его по схеме экстренной профилактики (n=3)

Препарат	Схема введения препарата	Доза препарата, мг/кг	Частота гибели животных	Защитная эффективность от гибели, % ($X \pm \sigma_x$)	Увеличение средней продолжительности жизни, Δ , сутки ($X \pm \sigma_x$)
Триазабирин	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч, +144 ч	50	34/60	43,3 \pm 1,7	2,7 \pm 0,1
		100	31/60	48,3 \pm 1,7	3,0 \pm 0,1
Арбидол®	—//—	130	42/60	30,0 \pm 0,0	1,7 \pm 0,1
Тамифлю®	—//—	25	28/60	53,3 \pm 2,9	3,3 \pm 0,2
Ремантадин	—//—	50	30/30	50,0 \pm 0,0	3,5 \pm 0,2
		100	33/60	45,0 \pm 5,0	3,7 \pm 0,3
Контроль дозы	—	—	60/60	—	—
Контроль стада	—	—	0/60	—	—

ти Арбидол®, однако уступает по протективной эффективности Тамифлю®.

Таким образом, новый отечественный химиопрепарат Триазабирин в широком диапазоне доз выявил противовирусную эффективность при применении его по схемам экстренной профилак-

тики и профилактики. С учётом максимально переносимой дозы Триазавирина целесообразно на этапе клинических испытаний препарата использовать в отношении гриппа А (H5N1) с профилактической целью дозу равную 1 мг/кг (равноэквивалентная доза для человека составляет 6 мг).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сыромятникова С. И., Борисевич С. В., Хамитова М. Ф. и др. Обоснование выбора штамма гриппа А, подтип H5N1, предназначенного для оценки защитной эффективности существующих и вновь разрабатываемых в Российской Федерации лекарственных средств и медицинских иммунобиологических препаратов / Труды второго съезда военных врачей медико-профилактического профиля «Современные проблемы военной профилактической медицины, пути их решения и перспективы развития», 15—17 ноября 2006 г., г. Санкт-Петербург. Вест Росс Военно-мед акад 2006; 1: 15: Приложение: 184—185.
2. Мельников Д. Г., Меркулова О. В., Маношкин А. В. и др. Лабораторная диагностика гриппа А (H5N1) во время эпизоотий 2005—2007 гг. на территории Российской Федерации. Матер. докл. международной научно-практической конференции «Проблемы совершенствования межгосударственного взаимодействия в подготовке к пандемии гриппа», 9—10 октября 2008 г., Новосибирск. 2008; 34—35.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005.