

Оценка эффективности комбинации риамиловира и осельтамивира на модели экспериментальной гриппозной инфекции мышей

*И. Н. ФАЛЫНСКАЯ¹, И. А. ЛЕНЁВА¹, О. В. МАКАРОВА, Н. Р. МАХМУДОВА¹,
Е. А. ГЛУБОКОВА¹, Н. П. КАРТАШОВА¹, В. А. МХИТАРОВ, Д. Ш. ДЖАЛИЛОВА

¹ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва

² НИИ морфологии человека, Москва

Evaluation of the Efficacy of Riamilovir and Oseltamivir Combination on the Experimental Model of Mice Influenza Infection

* I. N. FALYNSKOVA¹, I. A. LENYOVA¹, O. V. MAKAROVA², N. R. MAKHMUDOVA¹,
E. A. GLUBOKOVA¹, N. P. KARTASHOVA¹, V. A. MKHITAROV², D. SH. DZHALILOVA²

¹ I. I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, Moscow

² Research Institute of Human Morphology, Moscow

Риамиловир («Триазавирин®») — оригинальный российский препарат семейства азолоазинов, аналог пуринового нуклеозида (гуанозина), относится к ингибиторам синтеза вирусных РНК и репликации геномных фрагментов. Препарат обладает широким спектром противовирусной активности, эффективен для ряда острых респираторных вирусных инфекций, в том числе гриппа А и В, и включен в клинические рекомендации для лечения гриппа у взрослых. Цель работы — изучение на модели вирусной гриппозной пневмонии мышей эффективности комбинации риамиловира и осельтамивира при различных дозах. Эффективность препаратов оценивали по увеличению выживаемости и снижению потери массы тела мышей, изменению титра вируса в лёгких, морфологическому состоянию лёгких, а также увеличению продолжительности жизни животных по сравнению с контрольными животными, не получавшими лечения. В экспериментальной модели вирусной гриппозной пневмонии мышей в двух опытах с низкой и высокой дозой заражения, с использованием клинических, вирусологических и морфологических параметров показано, что комбинация риамиловира в дозах 12,5 или 25 мг/кг/день с осельтамивиром в дозе 5 мг/кг/день позволяет повысить эффективность лечения по сравнению с эффективностью лечения каждым препаратом в соответствующей дозе и по соответствующей схеме в отдельности. Данное лечение статистически значимо снижало гибель животных, предотвращало потерю ими массы тела и увеличивало продолжительность жизни по сравнению с контрольной группой животных, не получавших лечение. Комбинация риамиловира в дозе 12,5 мг/кг/день с осельтамивиром оказывала терапевтический эффект на морфологическое состояние лёгких. Кроме того, указанные комбинации препаратов при заражении низкой дозой вируса статистически значимо снижали размножение вируса в лёгких животных, а при высокой дозе заражения подавляли размножение вируса полностью.

Ключевые слова: вирус гриппа, противовирусные препараты, риамиловир, осельтамивир, комбинированное действие.

Riamilovir (Triazavirin®) is an original Russian preparation of the azoloazine family, an analogue of the purine nucleoside (guanosine), it belongs to inhibitors of the synthesis of viral RNAs and replicators of genomic fragments. The drug has a wide spectrum of antiviral activity, is effective for a number of acute respiratory viral infections, including influenza A and B, and is included in clinical recommendations for treatment of influenza in adults. The aim of this work is to study the efficacy of a combination of riamilovir and oseltamivir in different doses on a model of viral influenza pneumonia in mice. The efficacy of the drugs was evaluated by increasing the survival rate and reducing the loss of body weight of mice, changing the titer of the virus in the lungs, the morphological state of the lungs, and also increasing the life span of animals compared to control animals that were not treated. In the experimental model of viral influenza pneumonia in mice in two experiments with low and high doses of infection it was shown with the use of clinical, virological, and morphological parameters that the combination of riamilovir in doses of 12.5 or 25 mg/kg/day with oseltamivir at a dose of 5 mg/kg/day makes it possible to increase the effectiveness of treatment compared to the effectiveness of separate treatment with each drug in the appropriate dose and according to the corresponding scheme. This treatment showed a statistically significant reduction in animal mortality, prevented their loss of body weight, and prolonged life expectancy compared to the control group of animals that did not receive treatment. The combination of riamilovir at a dose of 12.5 mg/kg/day with oseltamivir had a therapeutic effect on the morphological state of the lungs. Furthermore, said combinations of drugs significantly reduced the multiplication of the virus in the lungs of animals when infected with a low dose of the virus and suppressed the reproduction of the virus completely at a high dose of infection.

Keywords: influenza virus, antiviral drugs, riamilovir, oseltamivir, combined action.

© Коллектив авторов, 2018

*Адрес для корреспонденции: E-mail: falynskova@mail.ru

Список сокращений

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) — культура клеток почки собаки
MEM — минимальная среда Игла
МЛД₅₀ и МЛД₉₀ — мышинные летальные дозы
ФСБ — фосфатно-солевой буфер
ЦПД — цитопатическое действие
ТЦИД₅₀ — тканевая цитопатическая инфекционная доза 50
СПЖ — средняя продолжительность жизни
P/p — объёмная плотность: отношение площади объекта к общей площади среза

Введение

Один из подходов для увеличения эффективности химиопрепарата против вирусной инфекции — использование его в комбинации с другим препаратом. Преимущества комбинированной терапии заключаются в возможности использования более низких доз препаратов, что позволяет повысить их эффективность и снизить побочные эффекты [1]. Кроме того, использование комбинированной терапии — один из возможных путей предотвращения возникновения резистентных к препарату штаммов вируса. К настоящему моменту комбинации противогриппозных препаратов изучены как в экспериментальных опытах, в культуре клеток и на моделях животных, так и в клинических исследованиях [1]. Интересные данные получены при комбинации осельтамивира, римантадина и рибавирина в культуре клеток, эта комбинация оказалась эффективной в отношении штаммов вируса гриппа, резистентных к римантадину и осельтамивиру [2]. Эта комбинация позже была успешно применена при лечении тяжёлого случая гриппа, вызванного пандемическим штаммом вируса гриппа H1 [2]. Синергидный эффект комбинации умифеновира с римантадином и осельтамивиром был показан в культуре клеток, эффективность последней комбинации подтвердилась в клинических исследованиях [3, 4]. Показано, что лучшие результаты даёт сочетание препаратов, имеющих различный механизм действия [1]. Мишень для применяемых в химиотерапии вируса гриппа препаратов занамивира и осельтамивира — поверхностный гликопротеин нейраминидаза, функцию которого эти препараты ингибируют. Риамиловир (метилтионитрооксодигидротриазолотриазинид натрия, «Триазавирин®») — оригинальный российский препарат семейства азолоазинов, аналог пуринового нуклеозида (гуанозина), относится к ингибиторам синтеза вирусных РНК и репликации геномных фрагментов [5]. Препарат создан совместными усилиями Уральского политехнического института и Института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН и Научно-исследовательского института гриппа. Риамиловир обладает широким спектром противовирусной активности, эффективен для ряда острых респираторных вирусных инфекций [6], в том числе гриппа А и В как в культуре клеток [7], так и на модели вторичной пневмонии мышей после гриппозной инфекции [8], и включен в клинические рекомендации для лечения гриппа у взрослых [9, 10]. Установлено, что использование риамиловира в этиотропной терапии гриппа способствует сокращению продолжительности основных симптомов заболевания (интоксикации, лихорадки, катаральных симптомов), снижает частоту развития осложнений и объём симптоматической терапии [5].

Предварительные данные позволяют предположить, что механизм противовирусного действия риамиловира отличается от механизма действия существующих противогриппозных препаратов. Существующие данные указывают на его плейотропность, однако основным механизмом риамиловира, вероятно, является ингибирование синтеза вирусных РНК и репликации геномных фрагментов [11].

Предварительные данные позволяют предположить, что механизм противовирусного действия риамиловира отличается от механизма действия существующих противогриппозных препаратов. Существующие данные указывают на его плейотропность, однако основным механизмом риамиловира, вероятно, является ингибирование синтеза вирусных РНК и репликации геномных фрагментов [11].

Материал и методы

1. Препараты, их субстанции, приготовление растворов для экспериментов. Использовали субстанцию риамиловира (метилтионитрооксодигидротриазоло-триазинид натрия, «Триазавирин®»), предоставленную производителем, ООО «Завод Медсинтез» и лекарственную форму осельтамивира в виде капсул «Тамифлю», производитель Хоффманн-Ля Рош Лтд. Для приготовления растворов для введения препараты растворяли в дистиллированной воде перед проведением эксперимента. Дозы осельтамивира готовились и указаны из расчёта содержания чистой субстанции в лекарственной форме. Вещества взвешивали с точностью до 0,1 мг на аналитических весах. Дозы препаратов рассчитывали в относительных весовых единицах — мг/кг массы тела животных в сутки. Животным давали растворы препаратов перорально в объёме 200 мкл, при комбинированном использовании смесь обоих вводилась также в объёме 200 мкл.

Исследуемые дозы: риамиловир 12,5 и 25 мг/кг/день, осельтамивир 5 мг/кг/день, комбинации риамиловир 12,5 мг/кг/день и осельтамивир 5 мг/кг/день, риамиловир 25 мг/кг/день и осельтамивир 5 мг/кг/день.

2. Вирус. Для моделирования гриппозной пневмонии мышей был использован штамм вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009), полученный из ВОЗ и адаптированный к мышам. Для подготовки инфицирующего материала мышей заражали интраназально аллантаоисным вирусом, после проявления признаков болезни в стерильных условиях получали гомогенат лёгочной ткани. Этот гомогенат использовали для заражения 10-дневных куриных эмбрионов, из которых получали аллантаоисный вирус и после определения его инфекционной активности на мышах вирус использовали для инфицирования животных. В обоих опытах использовали аликвоты одного пула вируса, который замораживали и хранили при температуре -70°C.

3. Животные. Нелинейных мышей, самок массой тела 12–14 г, получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и содержали на стандартном рационе в виварии. Содержание животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Кормили животных брикетированными кормами в соответствии с утверждёнными нормами, у животных был свободный доступ к воде. Маркировка животных по группам производилась с помощью окраски красителями

поверхности тела. Все эксперименты проводились в соответствии с правилами гуманного обращения с животными и были утверждены Этическим комитетом НИИВС им. Мечникова.

4. Определение эффективности препаратов на модели гриппозной пневмонии мышей. При изучении эффективности риамиловира была использована следующая схема лечения: за 4 ч до и 4 ч после инфицирования, далее в течение 5 дней 2 раза в день. Для лечения осельтамивиром использовали следующую схему: за 1 ч до инфицирования, далее через 8 ч, затем два раза в день в течение 5 дней, комбинацию использовали по такой же схеме. Для перорального введения использовали одноразовый инсулиновый шприц с зондом для кормления животных.

В каждой группе было по 18 животных, на 4-й день после инфицирования для определения титра вируса в лёгких забивали 3 животных, а на морфологическое изучение 5 животных, таким образом, в каждой группе оставалось по 10 животных.

Предварительно взвешенных мышей инфицировали интраназально под наркозом вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 в дозе 10 МЛД₅₀ (I опыт) или МЛД₉₀ (II опыт).

Животные контрольной группы были инфицированы вирусом гриппа и не получали лечения, им перорально давали дистиллированную воду в объёме 200 мкл по схеме применения комбинации препаратов. За лечеными и контрольными животными вели ежедневное наблюдение, в первые 5 дней после инфицирования вирусом мышей взвешивали каждый день, далее через 1–2 дня. Химиотерапевтическую активность соединений на модели вирусной пневмонии мышей оценивали по следующим критериям: выживаемость животных, увеличение средней продолжительности жизни и уменьшение снижения массы тела в группах животных, леченных препаратами, по сравнению с контрольной группой.

Средняя продолжительность жизни мышей высчитывалась по формуле:

$$MSD = \sum f(d-1)/n,$$

где f — количество мышей умерших на день d , выжившие мыши также включены в f , и d в этом случае равно 16, n — количество мышей в группе. Уменьшение или увеличение массы рассчитывалось отдельно для каждой мыши и выражалось в процентах, при этом за 100% принималась масса животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определялось среднее значение процента потери или увеличения массы тела.

5. Получение лёгких мышей. На 4-й день после инфицирования вирусом гриппа в каждой группе умерщвляли по 3 мыши и в стерильных условиях извлекали лёгкие. После промывки в ФСБ, лёгкие гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного раствора ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин и супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK.

6. Гистологическое исследование лёгких. На 4-й день после инфицирования вирусом гриппа в каждой группе умерщвляли по 5 мышей, каждой мыши через трахею, используя шприц, вводили по 1 мл 10% забуференного формалина. После раздувания трахеи хирургическим инструментом открывали грудину, извлекали лёгкие и помещали в стеклянную емкость с формалином.

Лёгкие мышей проводили по спиртовым растворам восходящей концентрации и ксилолам в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr. Обезвоженные образцы заливали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC. Тотальные ступенчатые срезы лёгких толщиной 4–6 мкм изготавливали на микротоме модели Microm HM340E, депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином.

Для количественной оценки распространённости воспалительных изменений лёгких, ступенчатые тотальные срезы (3 уровня) были отсканированы и объединены в единое изображение на микроскопе Axioplan 2 Imaging Carl Zeiss. Затем в программе Adobe Photoshop зоны воспалительной инфильт-

рации были обведены световым пером и окрашены в красный цвет. Остальные зоны срезов, без признаков воспалительного процесса, обводили и окрашивали в голубой цвет. Измерение площадей проводили в морфометрической программе Image-Pro Premier 3D 9.1 Media Cybernetics Inc. Вычисляли объёмную плотность (P/p) — долю площади инфильтрата от суммарной площади среза.

7. Статистическая обработка данных. Полученные цифровые данные были подвергнуты статистической обработке в программе «Statistica 8.0». Поскольку количество животных в группах было небольшим, распределение не подчинялось закону нормального распределения, была использована непараметрическая статистика. Центральные тенденции были вычислены в виде медианы и нижних (25%) и верхних (75%) квартилей, сравнение групп было проведено с использованием метода множественных сравнений Kruskal–Wallis test.

Сравнение выживаемости в группах мышей проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе «Statistica 8.0», для графического представления данных использовали метод Каплана–Мейера.

Для сравнения изменений массы тела мышей использовался однофакторный дисперсионный анализ для нелинейных моделей, использована четырёхпараметрическая log-логистическая модель. Анализ выполнен в приложении R-Studio (Version 1.0.136), пакет 'drc' (C. Ritz, 2016).

Результаты и обсуждения

Было проведено изучение комбинированного действия риамиловира с противогриппозным препаратом ингибитором нейраминидазы осельтамивиром в двух сериях независимых экспериментов с использованием различных доз заражения вирусом — низкой (МЛД₉₀) и высокой (10 МЛД₅₀). Для определения дозы вируса, содержащей 10 МЛД₅₀ и МЛД₉₀, группы, состоящие из 4–6 мышей, заражали полученным цельным аллантоисным вирусом и последовательными 10-кратными его разведениями. Из данных о гибели мышей вычислялись нужные дозы вируса.

Изучение комбинированного действия риамиловира с осельтамивиром на модели гриппозной пневмонии мышей индуцированной низкой дозой вируса гриппа. В контрольной группе животных, заражённых вирусом гриппа и не получавшей лечения, начиная с 4-го дня, наблюдалась гибель, к 16-му дню наблюдения выжила 1 мышь из 10 (рис. 1). Средняя продолжительность жизни в этой группе была 9,5 дней (табл. 1). Анализ изменения массы тела показал, что в контрольной группе мышей, наблюдалось максимальное снижение массы тела, достигшее к 7-му дню около 15% (рис. 2).

Лечение одним риамиловиrom снижало смертность животных и повышало среднюю продолжительность их жизни в дозах 12,5 и 25 мг/кг/день, однако эти эффекты не были статистически значимы. В этих группах также было отмечено меньшее снижение массы тела по сравнению с группой вирусного контроля (см. рис. 2).

Лечение осельтамивиром в дозе 5 мг/кг/день было сходно по эффекту с лечением риамиловиrom в дозах 12,5 и 25 мг/кг/день, защищая 40% ин-

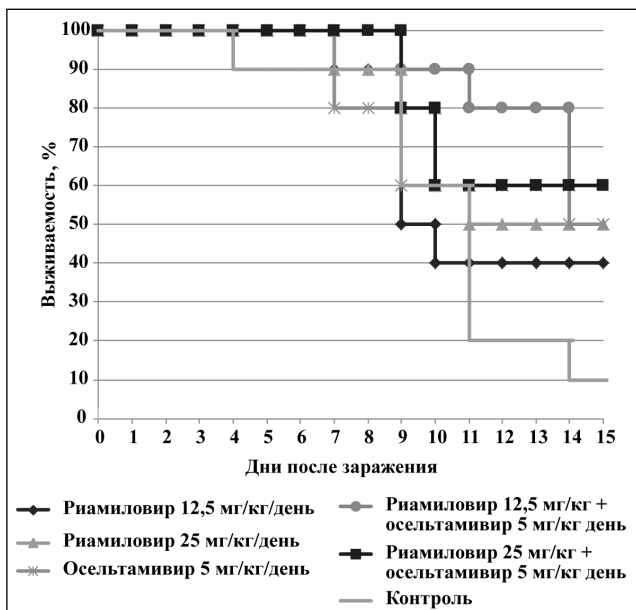


Рис. 1. Выживаемость мышей при лечении препаратами и их комбинациями на модели гриппозной пневмонии мышей, инфицированных низкой дозой вируса (I опыт).

фицированных животных, увеличивало их среднюю продолжительность жизни (см. рис. 1, 2), при этом потери массы тела в данной группе не наблюдалось.

Использование комбинации риамиловира в двух дозах 12,5 и 25 мг/кг/день с осельтамивиром в дозе 5 мг/кг/день было более эффективно, чем лечение каждым из препаратов в отдельности, статистически значимо снижая гибель, предотвращая потерю массы тела и увеличивая среднюю продолжительность жизни инфицированных и леченных животных. При комбинации риамиловира с осельтамивиром повышение дозы риамиловира (с 12,5 до 25 мг/кг/день) не приводило к увеличению эффективности лечения по всем параметрам.

Результаты вирусологического исследования лёгких подтвердили данные клинической эффек-

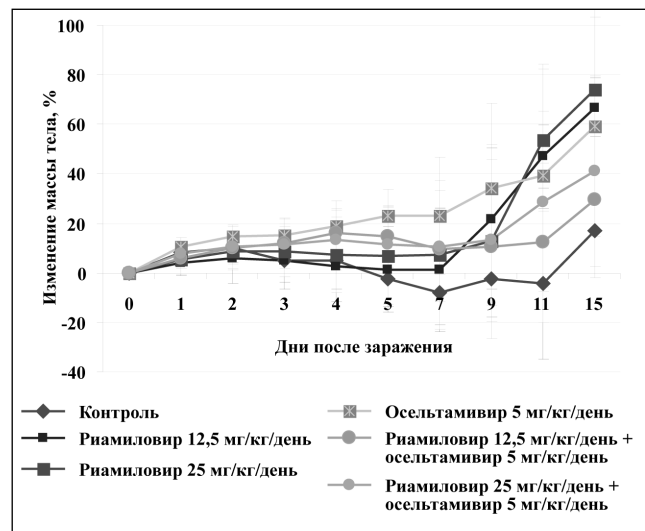


Рис. 2. Изменение массы тела при лечении препаратами и их комбинациями на модели гриппозной пневмонии мышей, инфицированных низкой дозой вируса (I опыт).

тивности. Лечение риамиловиром во всех изученных дозах, а также осельтамивиром в дозе 5 мг/кг/день, примерно одинаково, на 1,0—1,33 lg ТЦИД₅₀ ингибировало титр вируса, однако это ингибирование не было статистически значимым. При комбинированном использовании препаратов, подавление размножения вируса в лёгких было статистически значимо и составляло 3,5—3,67lg ТЦИД₅₀ (см. табл. 1).

Изучение комбинированного действия риамиловира с осельтамивиром на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной высокой дозой вируса гриппа. Во второй серии опытов была использована высокая доза заражения 10 МЛД₅₀, вызывающая более острое течение инфекции и гибель всех животных в группе вирусного контроля.

В контрольной группе животных, зараженных вирусом гриппа в дозе 10 МЛД₅₀ и не получавшей лечения, в соответствии с дозой заражения, начиная с 5-го дня, наблюдалась гибель,

Таблица 1. Эффективность риамиловира и его комбинации с осельтамивиром на модели гриппозной пневмонии мышей при заражении низкой дозой адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)

Доза, мг/кг	Данные на 16-й день наблюдения		СПЖ, дни	Титр вируса в лёгких на 4-й день инфекции
	выживаемость (выжившие/общее количество мышей)	смертность, %		
Риамиловир				
12,5	4/10 ($p=0,134596$)	60	10,7	5,0±1,32
25	5/10 ($p=0,054371$)	50	10,2	4,83±2,02
Осельтамивир				
5	5/10 ($p=0,054371$)	50	13,4	2,5±2,0
Осельтамивир + риамиловир				
12,5	6/10 ($p=0,017679$)	40	13,4	2,5±2,0
25	6/10 ($p=0,017679$)	40	12,4	2,33±2,25
Вирусный контроль				
—	1/10	90	9,5	6,0±0

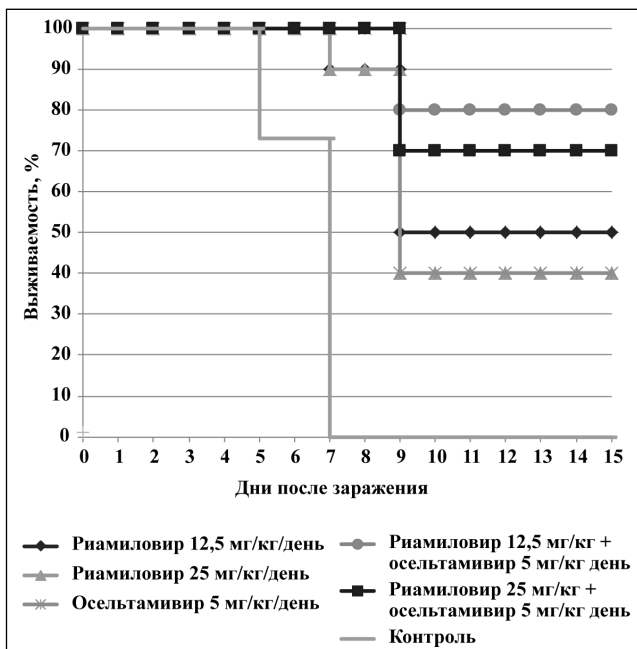


Рис. 3. Выживаемость мышей при лечении препаратами и их комбинацией на модели гриппозной пневмонии мышей, инфицированных низкой дозой вируса (II опыт).

которая за два дня к 7-му дню достигла 100% (рис. 3). Средняя продолжительность жизни в этой группе была 5,5 дней. Ко дню полной гибели вирусного контроля лечение риамиловиром в двух изученных дозах 12,5 и 25 мг/кг/день, осельтамивиром в дозе 5 мг/кг/день, а также их комбинациями практически полностью предотвращало гибель животных. Лечение наиболее высокой из изученных доз риамиловира защищало от смертности треть животных, при этом потеря массы тела животных от вирусной гриппозной пневмонии была сравнима с группой вирусного контроля (табл. 2, рис. 4).

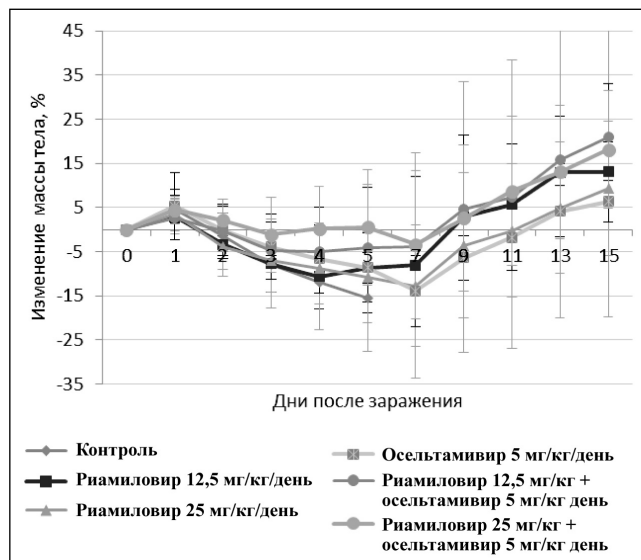


Рис. 4. Изменение массы тела при лечении препаратами и их комбинацией на модели гриппозной пневмонии мышей, инфицированных высокой дозой вируса (II опыт).

При дальнейшем наблюдении за животными было отмечено, что во всех группах леченных животных наблюдалась гибель. К концу срока наблюдения оказалось, что лечение риамиловиром в дозах 12,5 и 25 мг/кг/день было сходно по эффективности с лечением осельтамивиром в дозе 5 мг/кг/день и защищало от смертности 40—50% животных, увеличивая продолжительность их жизни в 1,6—2 раза и снижая потерю массы тела. Лечение комбинацией риамиловира в дозах 12,5 и 25 мг/кг/день с осельтамивиром было более эффективно, чем лечение каждым из препаратов в соответствующих дозах в отдельности. Данное лечение приводило к защите от смертности 70—77% животных, увеличению их продолжительности жизни.

Таблица 2. Эффективность риамиловира и его комбинации с осельтамивиром на модели гриппозной пневмонии мышей при заражении высокой дозой адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)

Доза	Данные к полной гибели вирусного контроля		Данные на 16-й день наблюдения			Титр вируса в лёгких на 4-й день инфекции
	Выживаемость (выжившие/общее количество мышей)	Смертность, %	Выживаемость (выжившие/общее количество мышей)	Смертность, %	СПЖ, дни	
Риамиловир						
12,5 мг/кг	9/10 (<i>p</i> =0,000000)	10	5/10 (<i>p</i> =0,005217)	50	50	3,0±3,0
25 мг/кг	10/10	0	4/10 (<i>p</i> =0,018514)	60	40	3,67±3,21
Осельтамивир						
5 мг/кг	9/10 (<i>p</i> =0,000000)	10	4/10	60	9	1,33±0,29
Осельтамивир + риамиловир						
12,5 мг/кг	9/9	0	7/9 (<i>p</i> =0,000014)	23	13,4	0
25 мг/кг	9/10 (<i>p</i> =0,000000)	10	7/10 (<i>p</i> =0,000119)	30	12,9	0
Вирусный контроль						
—	0/11	100	0/11	100	5,5	6,0

ни более, чем в 2 раза и к практически полному предотвращению потери массы тела (рис. 3 и 4).

Лечение всеми препаратами по отдельности ингибировало размножение вируса в лёгких животных (см. табл. 1). Наиболее эффективным по клиническим признакам лечение комбинациями препаратов полностью подавляло размножение вируса в лёгких таких животных не определялся.

Морфологическое изучение лёгких мышей. Во всех группах в лёгких у мышей, зараженных вирусом гриппа, выявлялись обширные очаги бронхопневмонии, просветы альвеол были заполнены лимфоцитами, макрофагами, эритроцитами и нейтрофилами. В бронхах разных порядков определялся экссудат из нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов, эпителий был очагово десквамирован (рис. 5). В лёгких мышей, леченных препаратом риамилловир в дозе 12,5 мг/кг/день, отличий от контрольной группы не обнаружено. В группах мышей, леченных препаратом риамилловир в дозе 25 мг/кг/день, осельтамивир в дозе 5 мг/кг/день, комбинацией риамилловира в дозе 12,5 мг/кг/день и осельтамивира в дозе 5 мг/кг/день, очаги пневмонии были чётко очерченными и располагались преимущественно перибронхиально, в них был менее выражен геморрагический компонент.

Морфометрический анализ лёгких мышей. В дополнении к качественному гистологическому изучению лёгких был проведён количественный морфометрический анализ. Данные по количественной оценке распространённости воспалительного процесса в лёгких мышей после заражения вирусами гриппа и лечения антивирусными препаратами представлены в гистограмме (рис. 6). В табл. 3 представлена достоверная вероятность результатов сравнения цифровых данных.

По данным морфометрической оценки, риамилловир в дозах 12,5 и 25 мг/кг не оказал терапевтического эффекта. Введение препарата осельтамивир в дозе 5 мг/кг оказывало терапевтический эффект — Р/р очагов воспалительной инфильтрации был снижен на 53% по сравнению с нелечеными мышами.

Сочетание препаратов осельтамивира в дозе 5 мг/кг и риамилловира в дозе 12,5 мг/кг оказывали заметный терапевтический эффект, Р/р воспалительного инфильтрата снижалась на 60% в этой группе, по сравнению с лёгкими нелеченых мышей, а также по сравнению с группой животных, леченных риамилловиром в дозе 12,5 мг/кг отдельно. Таким образом, гистологическое изучение лёгких полностью подтвердило данные, полученные по клиническим признакам и при вирусологическом изучении лёгких.

В нашей работе на модели гриппозной пневмонии мышей показано, что комбинация риами-

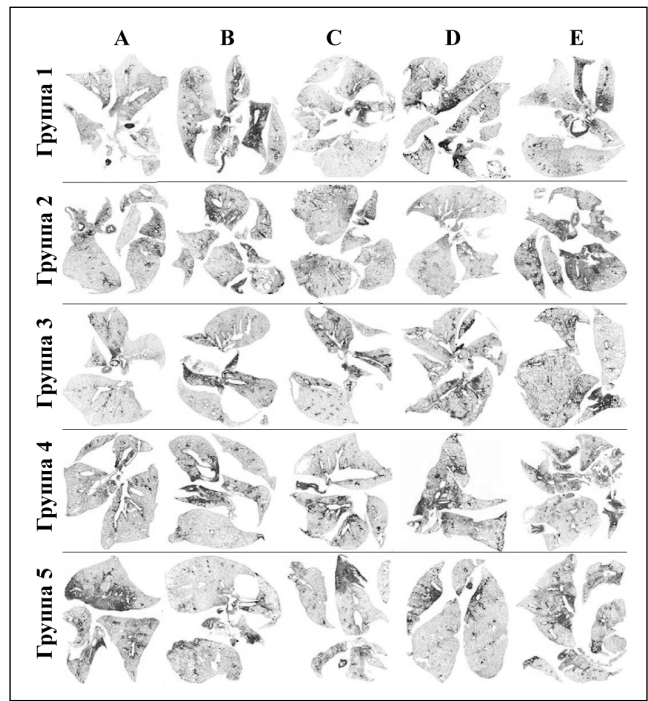


Рис. 5. Общая картина распределения очагов пневмонии на тотальных срезах лёгких мышей экспериментальных групп. Окр. гематоксилин и эозин, ув. 4.

Группа 1 — контроль; группа 2 — риамилловир 12,5 мг/кг; группа 3 — риамилловир 25 мг/кг; группа 4 — осельтамивир 5 мг/кг; группа 5 — осельтамивир 5 мг/кг + риамилловир 12,5 мг/кг.

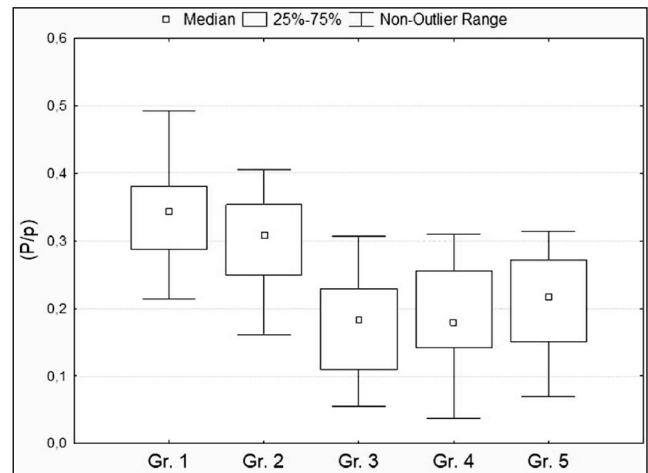


Рис. 6. Гистограмма размаха. Зависимость объёмной доли воспалительного инфильтрата от примененного препарата и его дозы.

Группа 1 — контроль; группа 2 — риамилловир 12,5 мг/кг; группа 3 — риамилловир 25 мг/кг; группа 4 — осельтамивир 5 мг/кг; группа 5 — осельтамивир 5 мг/кг + риамилловир 12,5 мг/кг.

ловира в дозах 12,5 или 25 мг/кг/день с осельтамивиром в дозе 5 мг/кг/день позволяет повысить эффективность лечения по сравнению с эффективностью лечения каждым препаратом в соответствующей дозе и по соответствующей схеме в от-

Таблица 3. Доверительная вероятность различий между группами мышей, зараженных вирусами гриппа и лечения противовирусными препаратами, Kruskal–Wallistest ($n=107$) $H=42,88$; $p=,0000$

Группа	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
1		1,0000	0,0000	0,0001	0,0027
2			0,0051	0,0190	0,1825
3				1,0000	1,0000
4					1,0000

Примечание. Группа 1 – контроль; группа 2 – риамилловир 12,5 мг/кг; группа 3 – риамилловир 25 мг/кг; группа 4 – осельтамивир 5 мг/кг; группа 5 – осельтамивир 5 мг/кг + риамилловир 12,5 мг/кг.

дельности. Данное лечение на модели гриппозной пневмонии мышей статистически значимо снижало гибель животных, предотвращало потерю массы тела и увеличивало продолжительность жизни по сравнению с контрольной группой нелеченых животных. Указанные комбинации препаратов при заражении низкой дозой вируса снижали размножение вируса в лёгких животных, а при высокой дозе заражения подавляли размножение вируса полностью. Кроме того, лечение комбинацией риамилловира в дозе 12,5 мг/кг/день с осельтамивиром оказывало влияние на состояние лёгких животных, уменьшая площадь очагов пневмонии. Данное исследование подтвердило, что комбинированное действие препаратов более эффективно, чем действие каждого препарата отдельно. Проведённые ранее исследования выявили, что риамилловир в модели гриппозной пневмонии мышей имеет узкое терапевтическое окно, то есть диапазон концентраций, при котором он является эффективным. В наших исследованиях комбинация риамилловира с осельтамивиром позволила снизить концентрацию риамилловира без снижения эффективности.

В настоящее время штаммы, резистентные к риамилловиру, не выявлены ни в экспериментах, ни в клинической практике. Резистентность к осельтамивиру при его клиническом использовании выявляется у 1,5–2,5% взрослых пациентов и достигает более высокого процента у детей (18%), а также у пациентов, страдающих нарушениями иммунной системы [12]. Можно полагать, что применение изученной комбинации позволит также снизить и риск возникновения резистентности к осельтамивиру. Полученные данные являются основанием для оптимизации схем и доз лечения противогриппозными препаратами риамилловиром и осельтамивиром, однако для внедрения их комбинированного использования в практику нужны дальнейшие клинические испытания у людей.

Выражение признательности. Авторы выражают признательность за помощь в проведении работы с животными лаборантам ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова Г. А. Богачевой, С. К. Кирьяновой и Е. А. Потаповой.

ЛИТЕРАТУРА

- Govorkova E. A., Webster R. G. Combination chemotherapy for influenza. *Viruses*. 2010 Aug; 2 (8): 1510–1529.
- Nguyen J. T., Hoopes J. D., Le M. H. et al. Triple combination of amantadine, ribavirin, and oseltamivir is highly active and synergistic against drug resistant influenza virus strains in vitro. *PLoS One* 2010; 5 (2): e9332.
- Leneva I. A. Medical agent for treating viral infections. Patent: International Pub. No. WO/2007/075102: International Application No.: PCT/RU2005/000677, 2007.
- Ленёва И.А., Федякина И.Т., Гуськова Т.А., Глушков Р.Г. Чувствительность различных штаммов вируса гриппа к арбидолу. Изучение эффекта арбидола на репродукцию вируса гриппа А в комбинации с различными противовирусными препаратами. *Терапевтический архив*. — 2005. — № 8. — С. 84–88. / *Lenyova I. A., Fedyakina I. T., Gus'kova T. A., Glushkov R. G.* CHuvstvitel'nost' razlichnykh shtamov virusa grippa k arbidolu. Izuchenie ehffekta arbidola na reprodukciju virusa grippa A v kombinacii s razlichnymi protivovirusnymi preparatami. *Terapevticheskij arkhiv* 2005; 8: 84–88. [in Russian]
- Чупахин О.Н., Киселев О.И., редакторы. Триазавирин — противовирусный препарат нового поколения. Монография, 2016. / *Chupakhin O. N., Kiselev O. I., redaktory.* Triazavirin — protivovirusnyj preparat novogo pokoleniya. *Monografiya*, 2016. [in Russian]
- Тихонова Е. П., Кузьмина Т. Ю., Андропова Н. В., Тюшевская О. А., Елистратова Т. А., Кузьмин А. Е. Изучение эффективности противовирусных препаратов (умифеновира, триазавирина) в отношении острых респираторных вирусных инфекций. *Казанский медицинский журнал*. — 2018. — Т. 99. — № 2. / *Tikhonova E. P., Kuz'mina T. Yu., Andronova N. V., Tyushevskaya O. A., Elistratova T. A., Kuz'min A. E.* Izuchenie ehffektivnosti protivovirusnykh preparatov (umifenovira, triazavirina) v otnoshenii ostrykh respiratornykh virusnykh infekcij. *Kazanskij medicinskij zhurnal* 2018; 99: 2. [in Russian]
- Логинава С. Я., Борисевич С. В., Максимов В. А. и др. Изучение противовирусной активности триазавирина в отношении возбудителя гриппа А (H5N1). *Антибиотики и химиотер.* — 2007. — Т. 52. — № 11–12. — С. 18–20. / *Loginova S. Ya., Borisevich S. V., Maksimov V. A. i dr.* Izuchenie protivovirusnoj aktivnosti triazavirina v otnoshenii vozбудителя grippa A (H5N1). *Antibiotiki i khimioter* 2007; 52: 11–12: 18–20. [in Russian]
- Leneva I. A., Falynskova I. N., Makhmudova N. R., Glubokova E. A., Kartasheva N. P., Leonova E. I., Mikhailova N. A., Shestakova I. V. Effect of triazavirine on the outcome of a lethal influenza infection and secondary bacterial pneumonia following influenza in mice. *Microbiol Independ Res (MIR)* 2017; 4 (1): 52–57.
- Федеральные клинические рекомендации под редакцией Международной ассоциации специалистов в области инфекций (МАСОИ) «Грипп у взрослых», 2017. — С. 32. / *ederal'nye klinicheskie rekomendacii pod redakciej Mezhdunarodnoj associacii specialistov v oblasti infekcij (MASOI) «Gripp u vzroslykh», 2017; 32.* [in Russian]
- Клинические рекомендации ассоциаций «Национальное научное общество инфекционистов» и «Общероссийская общественная организация Российское научное медицинское общество терапевтов», 2017. — С. 29. / *Klinicheskie rekomendacii associacii «Nacional'noe nauchnoe obshchestvo infekcionistov» i «Obshcherossijskaya obshchestvennaya organizaciya Rossijskoe nauchnoe medicinskoe obshchestvo terapevtov», 2017; 29.* [in Russian]
- Триазавирин (Triazavirin) инструкция по применению, регистрационный номер ЛП-002604. / *Triazavirin (Triazavirin) instrukciya po primeneniyu, registracionnyj nomer LP-002604.* [in Russian]
- Hurt A. C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr Opin Virol* 2014; 8: 22–29.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Фальнскова Ирина Николаевна — н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва

Ленёва Ирина Анатольевна — д. б. н., заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва

Макарова Ольга Васильевна — д. м. н., профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления ФГБНУ НИИМЧ, Москва

Махмудова Наиля Рамилевна — в. н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва

Глубокова Екатерина Андреевна — м. н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва

Карташова Надежда Павловна — м. н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва

Мхитаров Владимир Аршакович — к. б. н., руководитель группы информатики и морфометрии ФГБНУ НИИМЧ, Москва

Джалилова Джулия Шавкатовна — м. н. с. лаборатории иммуноморфологии воспаления ФГБНУ НИИМЧ, Москва