



УТВЕРЖДАЮ

Зам. Директора НИИ вирусологии
Им. Д.И. Ивановского РАМН, д.м.н.

П.Г. Дерябин

» ИЮНЬ 2003г

О Т Ч Е Т

Об изучении противовирусного действия препарата
«Панавир» на цитомегаловирусную инфекцию
в клеточной системе *in vitro*

Рук. Лаборатории
НИИ вирусологии РАМН
д.м.н., проф. Куш А.А.

Москва, 2003 г

Отчет об изучении противовирусного действия препарата "Панавир" на цитомегаловирусную инфекцию в клеточной системе *in vitro*.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке противовирусного эффекта препарата "Панавир" и в изучении цитотоксического и антипролиферативного действия препарата в экспериментальной клеточной системе *in vitro*.

В работе были использован лабораторный штамм цитомегаловируса человека (ЦМВ) AD 169, любезно предоставленный проф. Л. Перейра (Медицинский Центр Университета г. Сан-Франциско, Калифорния, США).

Для анализа цитотоксического и противовирусного действия "Панавира" на цитомегаловирусную инфекцию использовали диплоидные клетки фибробластов эмбрионов человека (ФЭЧ), которые являются наиболее чувствительными к ЦМВ. Клетки ФЭЧ культивировали в смеси среды 199 и среды Игла MEM в соотношении 1:1 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, глутамина и гентамицина.

Препарат "Панавир" был предоставлен в виде сухого порошка. Разведения препарата, содержащие различные концентрации "Панавира" готовили на питательной среде для выращивания клеток без добавления сыворотки.

Все эксперименты были проведены в 3 повторах

Первая серия экспериментов была посвящена изучению цитотоксического действия препарата на культуру клеток. Для этого клетки ФЭЧ выращивали в 96-луночных пластиковых панелях (Coster, США) в течение 48 часов до достижения полного монослоя. Затем препарат в концентрациях 10 мг/мл, 5 мг/мл, 3 мг/мл, 1 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл вносили в культуру клеток. Наблюдения проводили в течение последующих 7 дней. При изучении сублетальной цитотоксичности (24 часа воздействия) было установлено, что препарат обладал незначительным цитотоксическим действием на диплоидные фибробласты. Так, через 24 часа после внесения в культуру только 3% клеток погибало при использовании максимальной концентрации препарата - 10 мг/мл. При более низких концентрациях препарата (0,1 мкг/мл - 5 мг/мл) цитотоксический эффект в течение первых 24-х часов отсутствовал. Метод графической экстраполяции, представленный на рис 1, позволил определить, что 50% гибель клеток наступает при концентрации препарата 90 мг/мл в первые сутки после внесения в культуру (ЦДзо). При изучении цитотоксического действия в течение 72 часов в присутствии 10 мг/мл препарата наблюдалась гибель 10%

клеток, что свидетельствовало об усилении цитотоксического эффекта. В концентрациях 0,1 мкг/мл - 5 мг/мл препарат не оказывал цитотоксического действия на клетки на протяжении 72 часов культивирования. Расчет по графику (рис 1) показал, что гибель 50% клеток наступает при концентрации препарата 30 мг/мл через 72 часа после внесения в культуру (LD_{50}). Таким образом, острая цитотоксичность характеризовалась LD_{50} равной 30 мг/мл. Увеличение срока культивирования клеток в присутствии "Панавира" до 7 суток (хроническая цитотоксичность) приводило к усилению цитотоксического эффекта препарата. При концентрации 10 мг/мл наблюдалась гибель 30% клеток, 10% клеток погибало при использовании концентрации препарата 5 мг/мл. Более низкие концентрации не оказывали цитотоксического эффекта даже при длительном сокультивировании в течение 7 дней.

Вторая серия экспериментов была направлена на изучение действия препарата на пролиферативную активность диплоидных фибробластов. Для этого клетки в концентрации 60 тыс./мл высаживали в 24-х луночные пластиковые панели (Costar, США), с покровными стеклами. Затем вносили "Панавир" (опыт) в различных концентрациях (5 мг/мл, 1 мг/мл и 0,1 мг/мл) и клетки фиксировали ежедневно в течение 3-х суток. Проводили подсчет клеток на единицу площади цитологического препарата и митотических фигур в культуре ФЭЧ в присутствии различных концентраций препарата (опыт) и в необработанной культуре (контроль). Анализ полученных данных показал, что при концентрации 5 мг/мл препарат "Панавир" подавлял прирост клеток на 20% через 24 часа после внесения препарата в культуру. Количество митотических клеток в этой культуре было снижено на 73% относительно контроля. При концентрации 1 мг/мл препарат подавлял прирост клеток и митотический индекс на 10% и 14%, соответственно. Через 72 часа после внесения "Панавира" антипролиферативный эффект препарата усилился. Так при концентрации 5 мг/мл число клеток в культуре было снижено на 52% относительно контрольной популяции, а митотические клетки отсутствовали. Препарат в концентрации 1 мг/мл подавлял прирост клеток и митотическую активность на 21% и 26%, соответственно. При концентрации 0,1 мг/мл препарат не оказывал ингибирующего действия на клеточное размножение. Таким образом, 50%-ое подавление прироста клеток ФЭЧ наблюдалось при концентрации 5 мг/мл. Рассчитанное по графику 50%-ое подавление митотического деления (IP_{50}) соответствовало концентрации препарата 2,4 мг/мл.

Третья серия экспериментов была посвящена изучению противовирусного эффекта препарата "Панавир". Для этой цели клетки выращивали до достижения

полного монослоя в 96-ти луночных панелях, заражали ЦМВ с инфекционной множественностью (ИМ) 0,1; 0,01; 0,001 и 0,0001 БОЕ/кл. Препарат вносили в культуру после адсорбции вируса в концентрациях от 3 мг/мл, 1 мг/мл, 0,1 мг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл. Противовирусное действие препарата оценивали по развитию цитопатического действия вируса (ЦПД) и по подавлению образования бляшек, для чего проводили подсчет бляшкообразующих единиц (БОЕ) в опытных и контрольных культурах. Количество БОЕ подсчитывали на 7 сутки после инфицирования и внесения "Панавира" в различных концентрациях, так как к этому сроку вирусспецифические бляшки наиболее отчетливо выражены. БОЕ выявляли с помощью иммунопероксидазного окрашивания *in situ* с использованием смеси мышинных моноклональных антител, направленных к неструктурному сверххранному IE1 и тегументному рр65 белкам ЦМВ. Результаты проведенных экспериментов отражены в таблице. Было установлено, что при ИМ вируса 0,1 и 0,01 БОЕ/кл развитие ЦПД (время появления, 50% и 100% поражение клеток вирусом), а так же количество БОЕ достоверно не отличалось в опытных и контрольных культурах. Таким образом, ни при одной из используемых концентраций препарата "Панавир" не оказывал противовирусного действия при ИМ 0,1 и 0,01 БОЕ/кл. При заражении клеток с более низкой ИМ 0,001 и 0,0001 БОЕ/кл. "Панавир" в концентрации 3 мг/мл полностью подавлял развитие ЦМВ-инфекции в культуре ФЭЧ. Препарат в концентрации 1 мг/мл подавлял развитие ЦПД на 45% при ИМ 0,001 БОЕ/кл. и на 70% при ИМ 0,0001 БОЕ/кл. При использовании концентрации 0,1 мг/мл ингибирование развития ЦПД наблюдалось на 10% и 30% при ИМ 0,001 БОЕ/кл. и 0,0001 БОЕ/кл., соответственно. При концентрации 10 мкг/мл препарат не обладал противовирусным действием. Расчет концентрации препарата, ингибирующей развитие вирусного ЦПД на 50% (ID_{50}), показал, что при ИМ вируса 0,001 БОЕ/кл ID_{50} составляет 1,2 мг/мл, а при ИМ 0,0001 БОЕ/кл - 0,6 мг/мл (рис 2).

Полученные данные позволили подсчитать химиотерапевтический индекс (ХТИ) препарата. ХТИ вычислялся как отношение ID_{30} к ID_{50} . Для определения ХТИ препарата, обладающего анти-ЦМВ активностью, использовали ID_{30} , наблюдаемую через 72 часа после внесения препарата в культуру, которая для "Панавира" составляет 30 мг/мл. Следовательно, ХТИ равен 50 (30/1,2) при ИМ 0,0001 БОЕ/кл. и 25 (30/0,6) при ИМ 0,001 БОЕ/кл. При учете антипролиферативного действия препарата ХТИ не превышает 4 (2,4/0,6).

Заключение.

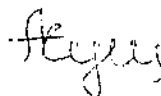
1. В отношении первичных диплоидных фибробластов препарат "Панавир" обладает относительно низким цитотоксическим действием: 50%-ая цитотоксическая доза (CD_{50}) составляет 30 мг/мл при культивировании клеток в присутствии препарата в течение 72 часов. 50%-ая антипролиферативная доза (IP_{50}) составляет 5 мг/мл.

2. Препарат "Панавир" в концентрации 3 мг/мл полностью предотвращает образование вирусиндуцированного ЦПД в клетках, инфицированных ЦМВ с ИМ 0,001 БОЕ/кл. и 0,0001 БОЕ/кл.. Препарат в концентрациях 0,1 мг/мл и 1 мг/мл обладает способностью тормозить развитие ЦПД, вызванное вирусом при заражении с ИМ 0,001 БОЕ/кл. и 0,0001 БОЕ/кл.

3. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) для препарата "Панавир" равен 25-50 при CD_{50} , определяемой через 72 часа после внесения препарата в культуру. Согласно существующим международным требованиям препарат рассматривается как перспективный при ХТИ не менее 100.

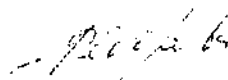
Рук. лаборатории
НИИ вирусологии РАМН
проф.

Исполнитель



А.А. Куш

Н.Е. Федорова



**Таблица. Антивирусное действие препарата "Панавир" на клетки
ФЭЧ, зараженные ЦМВ.**

Множественность инфицирования, БОЕ/кл.	Подавление активности ЦМВ (%), при концентрации препарата						50% ингибирующая доза
	3мг/мл	1мг/мл	0,1мг/мл	10мкг/мл	1мкг/мл	0,1мкг/мл	
0,1	0	0	0	0	0	0	
0,01	0	0	0	0	0	0	
0,001	100	45	10	0	0	0	1,2мг/мл
0,0001	100	70	30	0	0	0	0,6мг/мл

Цитотоксическое действие «Пана вира» на диплоидные
Фибробласты человека

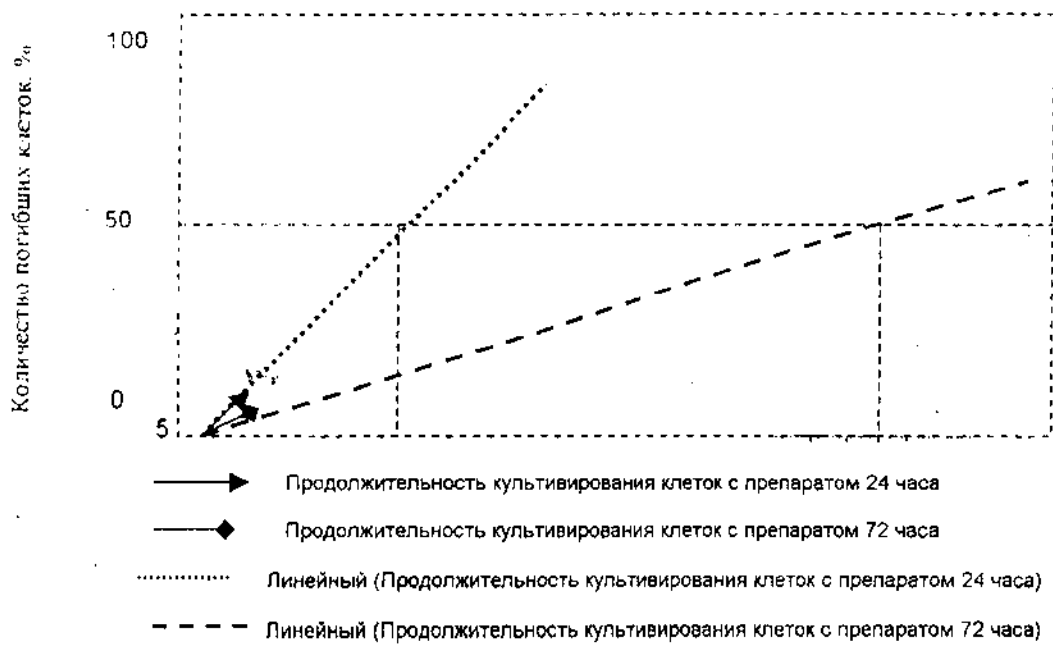


Рис. 1

Подавление активности ЦМВ В присутствии препарата «Панавир»

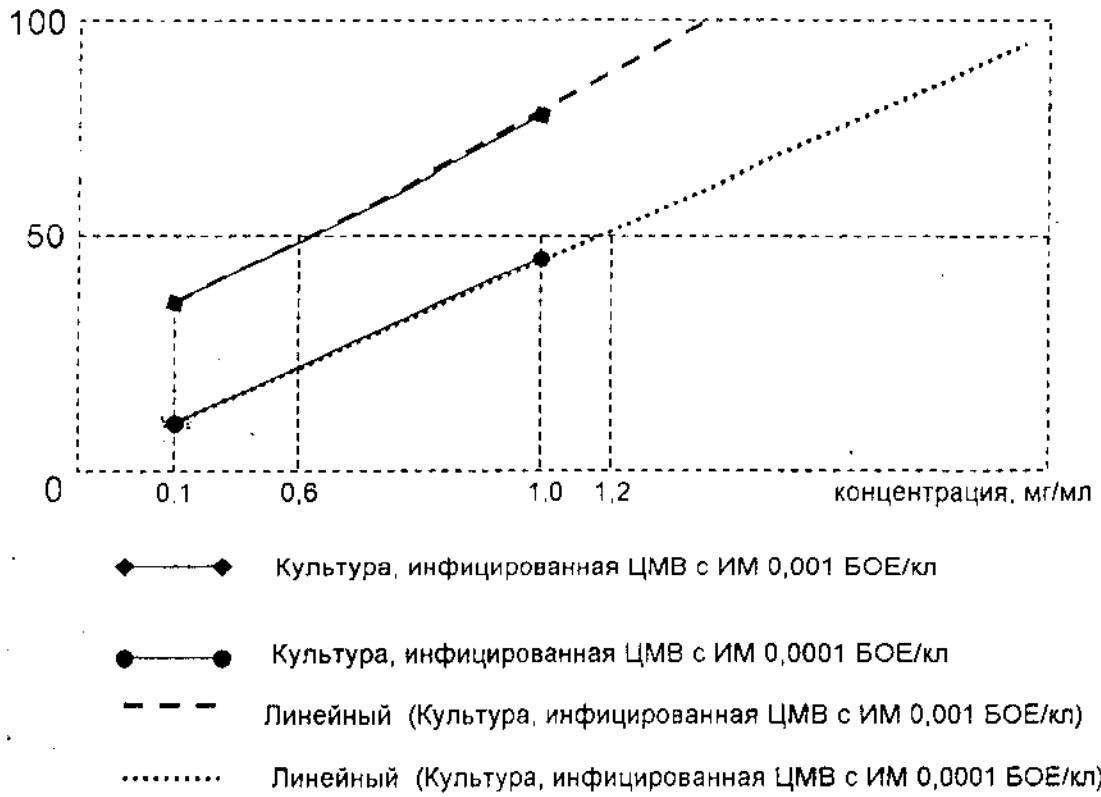


Рис. 2