

# Влияние препарата Панавир на репродукцию вируса гриппа

Е. Н. ПРОКУДИНА, Г. А. ГАЛЕГОВ, Н. П. СЕМЕНОВА, Т. А. ГРИГОРЬЕВА,  
Т. С. КАЛИНИНА\*, А. А. ЛИТВИН\*, С. В. СТОВБУН\*, В. И. СЕРГИЕНКО\*

НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва

\* НИИ физико-химической медицины Минздравсоцразвития России, Москва

## Effect of Panavir on Grippe Virus Reproduction

E. N. PROKUDINA, G. A. GALEGOV, N. P. SEMENOVA, T. A. GRIGORYEVA,  
T. S. KALININA, A. A. LITVIN, S. V. STOVBUN, V. I. SERGIENKO

D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Ministry of Health and Social Development of Russia, Moscow

Изучались митогенные свойства препарата Панавир, а также его влияние на репродукцию вируса гриппа в клеточных системах *in vitro* и на выживаемость мышей в условиях экспериментальной гриппозной инфекции. Установлено, что, не обладая цитотоксичностью, панавир характеризуется выраженной митогенной активностью и, следовательно, может рассматриваться как перспективный иммуномодулятор. В условиях *in vitro* при относительно высокой дозе заражения клеток вирусом гриппа панавир вызывает снижение вирусной продукции в клеточных системах. При малой дозе заражения клеток панавир вызывает задержку вирусной продукции, выявляющуюся на ранних этапах инфекционного процесса. В условиях *in vivo* при экспериментальной инфекции на мышах панавир обладает противогриппозной активностью как в отношении устойчивой, так и неустойчивой к романтадину популяций вируса гриппа А.

**Ключевые слова:** панавир, противогриппозный препарат, иммуномодулятор.

Mitogenic properties of panavir, as well as its effect on the grippe virus reproduction in cell systems *in vitro* and the effect on the survival of mice with the experimental grippe infection were studied. It was shown that panavir had no cytotoxic action whereas it was characterized by pronounced mitogenic activity and subsequently could be considered as a perspective immunomodulator. Under *in vitro* conditions with the use of relatively high doses for the cell contamination with the grippe virus, panavir lowered the virus production in the cell systems. When the contaminating doses were low, panavir inhibited the virus production detected at the early stages of the infection. In the *in vivo* studies on mice with the experimental grippe infection panavir showed antigrippe activity against both the romantadine resistant and the remantadine nonresistant populations of the grippe A virus.

**Key words:** panavir, antigrippe drugs, immunomodulator.

## Введение

Поиск антивирусных средств является одной из актуальнейших проблем современной медицины. Иммуномодуляторы и, в частности, вещества, обладающие митогенной активностью, занимают важное место в ряду антивирусных средств, применяемых при различных вирусных заболеваниях, включая ВИЧ-инфекцию [1]. В современной литературе имеются сведения о проявлении *in vitro* иммуномодуляторных свойств веществами растительного происхождения [2], к которым относится и объект настоящей работы — препарат Панавир. Было показано, что панавир эффективен при лечении герпесвирусных инфекций [3—6], а также заболеваний, вызванных вирусом папилломы человека [7, 8]. В условиях *in vitro* панавир обладает способностью тормозить реп-

ликацию вируса гепатита С и повышать жизнеспособность зараженных клеток [9].

Цель настоящей работы состояла в оценке антигриппозной активности панавира. Было исследовано митогенное действие панавира и его влияние на репродукцию вируса гриппа в клеточных системах *in vitro*. Изучена также противовирусная активность панавира в условиях экспериментальной гриппозной инфекции на мышах.

## Материал и методы

Препарат Панавир был использован в виде субстанции производства ООО «Флора и Fauna» (РФ).

Митогенную активность панавира исследовали классическим методом бласттрансформации лимфоцитов [10]. Готовили культуру селезеночных мышиных лимфоцитов, которую расфасовывали в лунки многолуночных планшетов. К лимфоцитам добавляли различные концентрации панавира и выдерживали при 37°C в течение 48 часов. Для оценки интенсивности синтеза ДНК в лимфоцитах через 48 часов вводили предшественник синтеза ДНК <sup>3</sup>H-тимидин, и образцы инкубировали при 37°C в течение 3 часов. Анализировали радиоактивность кислотонерастворимого материала, которую просчитывали в спектрометре фирмы Бекман. Результаты учитывали по або-

© Коллектив авторов, 2006

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а.  
Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

**Таблица 1. Влияние панавира на репродукцию вируса гриппа в клетках MDCK**

Концентрация панавира, мкг/мл	Доза заражения			
	10 ИД <sub>50</sub> /клетка	1 ИД <sub>50</sub> /клетка	0,1 ИД <sub>50</sub> /клетка	0,01 ИД <sub>50</sub> /клетка
100	32 ГАЕ	64 ГАЕ	64 ГАЕ	16 ГАЕ
10	64 ГАЕ	64 ГАЕ	64 ГАЕ	16 ГАЕ
0	128 ГАЕ	128 ГАЕ	64 ГАЕ	16 ГАЕ

лютным показателям радиоактивности или по индексу стимуляции (ИС), где ИС = имп/мин<sub>стимул</sub> / имп/мин<sub>контроль</sub>.

Изучение влияния панавира на репродукцию вируса гриппа *in vitro* проводили в перевиваемых клетках MDCK, зараженных лабораторным штаммом вируса гриппа человека A/WSN/33(H1N1) в дозах от 0,01 до 10 ИД<sub>50</sub> на клетку. Панавир вводили до заражения или в различные после заражения сроки. Продукцию вируса оценивали по титрам гемагглютининов в культуральной жидкости.

Исследование антигриппозных свойств панавира в условиях *in vivo* проводилось на белых аутбредных мышах массой 9–11 г, содержащихся в стандартных условиях. Животных заражали интраназально вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), резистентным и не резистентным к ремантадину штаммами, при инфицирующей дозе 5ЛД<sub>50</sub>. Резистентный к ремантадину штамм получали в условиях стандартной процедуры пассивирования вируса в клетках MDCK в присутствии возрастающих концентраций ремантадина от 2 до 10 мкг/мл. После 6-го пассажа штамм приобретал выраженную резистентность к ремантадину и использовался для заражения мышей. Панавир применяли в виде стерильного изотонического раствора хлорида натрия, содержащего 200 мкг активной субстанции в 0,4 мл. Панавир в дозе 0,4 мл вводили внутривенно дважды: через 24 и 96 часов после заражения животных. В качестве препарата сравнения использовали известный противогриппозный препарат ремантадин, который вводили животным дважды в дозе 40 мг/кг.

## Результаты и обсуждение

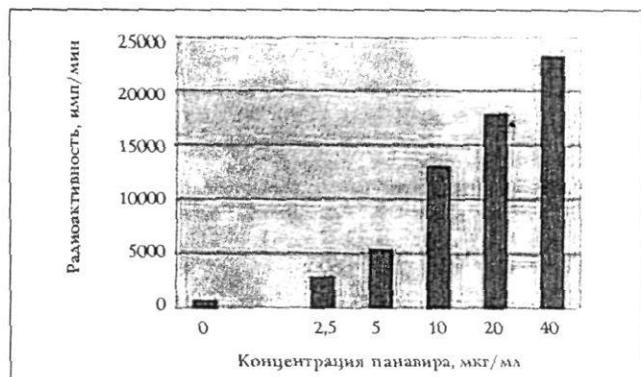
### Митогенная активность панавира

На рис. 1 показана зависимость митогенной активности панавира от его концентрации в реакции бласттрансформации лимфоцитов. Результаты представлены в абсолютных показателях радиоактивности (имп / мин). Из рис. 1 видно, что отрицательный контроль без панавира (0) демонстрировал включение <sup>3</sup>H-тимицина около 500 имп/мин, тогда как образцы с панавиром эффективно включали <sup>3</sup>H-тимицин, что соответствовало радиоактивности от 3000 имп/мин до 24000 имп/мин. В диапазоне используемых доз (до 40 мкг/мл) препарат не оказывал токсических эффектов в отношении лимфоцитов.

Выраженная митогенная активность панавира в нетоксических дозах позволяет рассматривать данный препарат как перспективный иммуномодулятор при вирусных инфекциях, сопровождающихся снижением иммунитета.

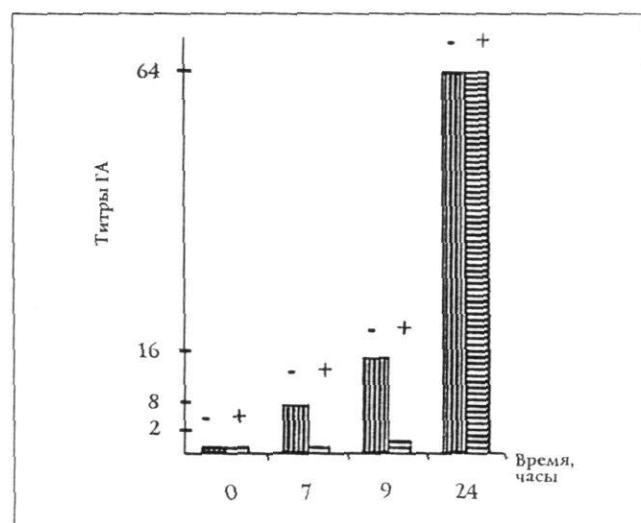
### Влияние панавира на репродукцию вируса гриппа в клеточной системе *in vitro*

Для анализа влияния панавира на репродукцию вируса гриппа *in vitro* клетки MDCK заражали различными дозами вируса, и панавир в различных концентрациях вводили сразу после заражения. Продукцию вируса анализировали че-



**Рис. 1. Митогенная активность панавира.**

Митогенную активность исследовали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (см. «Материалы и методы»). Результаты представлены в абсолютных единицах радиоактивности (имп/мин).



**Рис. 2. Задержка в продукции вируса гриппа при заражении клеток малыми дозами вируса гриппа в присутствии панавира.**

Клетки MDCK заражали вирусом гриппа с множественностью 0,1 ИД<sub>50</sub>/клетка. Панавир вводили сразу после заражения. Через 7, 9 и 24 часа собирали культуральную среду и анализировали титры вируса по гемагглютининам (ГА). На диаграмме представлены показатели ГА в образцах без панавира (-) и в его присутствии (+). По оси абсцисс – сроки регистрации продукции вируса; по оси ординат – титры гемагглютининов.

рез 24 часа после заражения. Из табл. 1 видно, что при заражении клеток относительно большими дозами вируса (10 и 1 ИД<sub>50</sub>/клетка) выявляется тенденция к двукратному и, в некоторых случаях,

**Таблица 2. Влияние панавира (0,016 мг, в/в) на экспериментальную гриппозную инфекцию Aichi H3N2/2/68 у белых мышей**

Препарат	Доза, мг/кг	Выжившие/ погибшие мыши	Выживаемость, %	Защита, %	Средняя продолжительность жизни, дни
<b>Не резистентная к ремантадину популяция штамма вируса гриппа А</b>					
Панавир	0,4	14/6	70	25	13±0,6
Ремантадин	80	20/0	100	55	15±0,2
Физиологический раствор	Эквивалентный объем	9/11	45	—	11±0,3
<b>Резистентная к ремантадину популяция штамма вируса гриппа А</b>					
Панавир	400	14/6	70	25	15±0,3
Ремантадин	160	8/12	40	0	13±0,1
Физиологический раствор	Эквивалентный объем	9/11	45	—	13±0,4

к четырехкратному ингибирующему действию препарата на конечные тотальные титры вируса, регистрируемые через 24 часа инфекции. В отличие от относительно больших заражающих доз, при использовании малых заражающих доз вируса (0,1–0,01 ИД<sub>50</sub>) не выявлялось ингибирующее влияние панавира на конечные титры продуцировавшегося вируса, определяемые через 24 часа после заражения.

С целью более детального анализа возможного влияния панавира на продукцию вируса гриппа при заражении относительно малыми дозами вируса, был проведен анализ динамики вирусной продукции. Клетки заражали с множественностью 0,1 ИД<sub>50</sub>/клетка. Панавир вводили сразу после заражения и регистрировали титры продуцирующегося вируса через различные сроки. Из рис. 2 видно, что при малых дозах заражения клеток вирусом гриппа панавир достоверно задерживает продукцию вируса на ранних этапах инфекции.

Для изучения возможного вмешательства панавира в основные биохимические процессы клетки, был проведен анализ его влияния на синтезы ДНК, РНК и белка в незараженных клетках МДК по включению соответствующих радиоактивно меченных предшественников синтеза указанных макромолекул. Было установлено, что использование панавира в концентрациях от 10 до 1000 мкг/мл не выявило ингибирующего влияния на синтез исследованных макромолекул (не показано), что дополнительно свидетельствует об отсутствии у панавира цитотоксических свойств. Данные настоящего исследования об отсутствии токсических свойств панавира в отношении лимфоцитов и перевиваемых клеток МДК согласуются с результатами ранее проведенных исследований, в которых было показано, что препарат обладает относительно низким цитотоксическим действием в отношении целого ряда клеточных культур (перевиваемые клетки

линии Vero, диплоидные клетки фибробластов эмбрионов человека, клетки SW-13) [5, 9].

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют об ингибирующем эффекте панавира на продукцию вируса гриппа *in vitro* при отсутствии цитотоксичности, что явилось основанием для исследования его антивирусного эффекта в условиях экспериментальной гриппозной инфекции *in vivo*.

#### Антигриппозные свойства панавира в условиях экспериментальной инфекции на мышах

Из табл. 2 видно, что при заражении животных контрольной группы не резистентным к ремантадину вирусом гриппа регистрировали гибель 55% мышей. Средняя продолжительность жизни животных составила 11±0,3 дня. Двукратное применение панавира вызывало увеличение количества выживших животных на 25% и увеличение их средней продолжительности жизни на 2 дня. Известный противогриппозный препарат ремантадин способствовал выживанию всех инфицированных животных.

При заражении мышей резистентным к ремантадину вирусом гриппа наблюдали гибель 45% животных. Под влиянием двукратного применения панавира гибель животных снизилась на 25%. Ремантадин в данных условиях не защищал зараженных животных от гибели.

Таким образом, установлено, что в условиях экспериментальной инфекции на мышах панавир обладает противогриппозной активностью как в отношении устойчивой, так и чувствительной к ремантадину популяций вируса гриппа типа А.

Представленные в настоящей работе данные о митогенных и антигриппозных свойствах панавира *in vitro* и *in vivo* расширяют представление о спектре его фармакологической активности как противовирусного лекарственного средства.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Winner D. M. Mitogens for curative therapy of HIV-1 infections, an update. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17: 175–182.
2. Wilarsrusmee C. et al. *In vitro* immunomodulatory effects of herbal products. *Am Surg* 2002; 10: 860–864.
3. Кузовкова Т. В., Герасимова Н. М., Кунгурофф Н. В. Опыт применения препарата панавир при лечении больных генитальной герпесвирусной инфекцией. *Вестн последип мед образ* 2004; 20: 3–4: 76–78.
4. Масюкова С. А., Кожушков А. И., Поступова О. Л. и др. Клиническое изучение эффективности препарата панавир при лечении рецидивирующего генитального герпеса. *Там же*, 2004; 20: 4: 14–16.
5. Климова Р. Р., Федорова Н. Е., Козлов А. Ю. и др. Влияние препарата Панавир на течение герпесвирусных инфекций *in vitro*. *Вест дерматол венерол* 2004; 6: 52–56.
6. Кузовкова Т. В., Герасимова Н. М., Кунгурофф Н. В. и др. Панавир в лечении больных простым герпесом. *Панавир в лечении вирусных инфекций*. / Под ред. Сергиенко В.И. М.: 2005; 86–90.
7. Бухарина Е. В. Возможности использования препарата «Панавир» в комплексной терапии папилломавирусной инфекции. *Вест по следил мед образ*. 2004; 20: 2: 61–62.
8. Дубенский В. В. Терапия папиллома-вирусной инфекции. *Панавир в лечении вирусных инфекций*. / Под ред. Сергиенко В. И. М.: 2005; 111–141.
9. Дерябин П. Г., Исаева Е. И., Литвин А. С. и др. Действие панавира на экспериментальную инфекцию, вызванную вирусом гепатита С в культуре клеток. *Инфекции, передав пол путем*. 2003; 3: 31–33.
10. Фримель Г. и др. *Иммунологические методы*. М.: 2002: 177.