

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ "СТЕФАН ДИТЕЛОВ"

ЛЮБА СИМЕОНОВА СИМЕОНОВА

ПРОУЧВАНЕ НА КОМБИНИРАНОТО РЕЙСТВОЕ НА
РИМАНТАРИН И ОСЕЛТАМИВИР
СПРЯМО ТРИПЕН ВИРУС А

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен "Доктор"

Научен ръководител:

Академик д-р Ангел С. Гилъров, ФМН

София, 2011

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ “СТЕФАН АНГЕЛОВ”

ЛОРА СИМЕОНОВА СИМЕОНОВА

ПРОУЧВАНЕ НА КОМБИНИРАНОТО ДЕЙСТВИЕ НА
РИМАНТАДИН И ОСЕЛТАМИВИР СПРЯМО ГРИПЕН ВИРУС А

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен “Доктор”

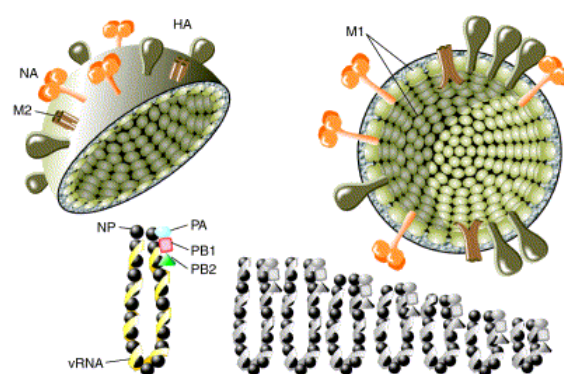
(научна специалност 01.06.13 Вирусология)

Научен ръководител:
Академик д-р Ангел С. Гълъбов, дмн

София, 2011

ЗАЩИТАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА ЩЕ СЕ СЪСТОИ НА ОТ ЧАСА. В
ЗАСЕДАТЕЛНАТА ЗАЛА НА ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ НА ОТКРИТО
ЗАСЕДАНИЕ НА ИЗБРАНОТО СПЕЦИАЛИЗИРАНО НАУЧНО ЖУРИ .

МАТЕРИАЛИТЕ ПО ЗАЩИТАТА СА ПУБЛИКУВАНИ НА ИНТЕРНЕТ СТРАНИЦАТА НА
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ (WWW.MICROBIO.BAS.BG) И СА НА
РАЗПОЛОЖЕНИЕ НА ИНТЕРЕСУВАЩИТЕ СЕ В БИБЛИОТЕКАТА НА ИНСТИТУТА, УЛ. АКАД.
ГЕОРГИ БОНЧЕВ №26, СОФИЯ.



[Hatta и Kawaoka, 2002]

Τά πάντα ρεῖ καὶ οὐδὲν μένει.

Ἡράκλειτος ὁ Ἐφέσιος (535 BC - 475 BC)

Няма нищо постоянно, освен промяната

ДИСЕРТАЦИЯТА СЪДЪРЖА 168 СТРАНИЦИ, 15 ТАБЛИЦИ И 34 ФИГУРИ. СТРУКТУРИРАНА Е ВЪВ ВЪВЕДЕНИЕ И ДЕВЕТ ГЛАВИ. БИБЛИОГРАФИЯТА ОБХВАЩА 196 ИЗТОЧНИКА: 9 ЗАГЛАВИЯ НА КИРИЛИЦА, 187 ЗАГЛАВИЯ – НА ЛАТИНИЦА.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНАТА РАБОТА Е ИЗВЪРШЕНА В ДЕПАРТАМЕНТ ВИРУСОЛОГИЯ КЪМ ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“, БАН, КЪДЕТО ЛОРА СИМЕОНОВА РАБОТИ КАТО АСИСТЕНТ, КАКТО И В РЕФЕРЕНТНАТА ЛАБОРАТОРИЯ ПО ГРИП ЗА СЕВЕРНА ФРАНЦИЯ, ИНСТИТУТ ПАСТЬОР ПАРИЖ.

ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД Е ОБСЪДЕН НА СЕМИНАР НА ДЕПАРТАМЕНТ „ВИРУСОЛОГИЯ“ ПРИ ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“, БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ И НАСОЧЕН ЗА ЗАЩИТА ПРЕД НАУЧНО ЖУРИ В СЪСТАВ.

Доцент д-р Любка Думанова, председател на научното жури, рецензент

Доцент д-р Юлия Серкеджиева, рецензент

Доцент д-р Росица Коцева, становище

Академик Ангел С. Гълъбов, дмн, научен ръководител, становище

Проф. д-р Георги Георгиев, становище

Списък на най-често срещаните съкращения:

БИ – белодробен индекс

БК – белодробна консолидация

ИЗ – индекс на защита

ММ – молекулна маса

НАИ – невраминидазни инхибитори

СВП – средно време на преживяване

СЗО – Световна Здравна Организация

ЦПЕ – цитопатичен ефект

MDCK – Madine-Darby Canine Kidney – клетъчна линия от кучешки бъбрек

H, HA – хемаглутинин

N, NA – невраминидаза

CCID₅₀ – клетъчно-културелни инфекциозни дози 50

DMEM – Dulbecco Minimum Essential Medium

MIC₅₀/IC₅₀ – концентрация, инхибираща 50% вирусното размножение

MLD₅₀ – летална доза, предизвикваща 50% смъртност в мишки

WHO – World Health Organization

ВЪВЕДЕНИЕ

Грипът е инфекциозно заболяване, описано за пръв път в 412 г. пр.н.е. (Hippocrates) и до момента е бил причина за над 31 тежки епидемии. Безпрецедентна е пандемията “Испанска болест” от 1918 г., отнела живота на над 50 милиона души – статистика, сравнима с тази на броя загинали във Втората световна война. През 2009 г. нов за човешката популация свински вирус тип H1N1 с голяма заболяемост и директна трансмисия от човек на човек, започна циркулацията си сред хора, предизвиквайки поредната грипна пандемия. За щастие патогеността и леталитетът остават до момента ниски и сравними с тези на сезонните епидемични вълни. Друг грипен вирус, обаче, би могъл да се превърне в реална пандемична заплаха – птичи щам H5N1, високо патогенен и вирулентен за човека.

Въпреки огромния напредък на науката в изучаването на причинителите на грипа, понастоящем той продължава да бъде едно от най-масово разпространените заболявания, ежегодно нанасящо огромни щети върху здравето и икономиката на човечеството. Ежегодните изменения в антигенната характеристика на вируса, обусловени от биологично силно изменчивата му природа, а както и внезапното преминаване на нови щамове в човешката популация обаче, поставя сериозни ограничения пред ефективността на ваксините. Изработването на дадена ваксина в промишлен мащаб технологично отнема до 6 месеца, които в кризисна ситуация биха били твърде дълъг период от време. Не на последно място ваксините не успяват да преодолеят и проблема с превенцията при лица с компрометирана имунна система, за които грипната е една от най-често срещаните суперинфекции. Модификаторите на биологичния отговор – антиоксиданти и имуномодулатори при антигрипно лечение се сблъсква с индивидуалните особености в имунния статус на даден организъм, като за съжаление не рядко този фактор се явява непреодолима бариера за тяхната ефективност, особено приложени в самостоятелната терапия.

Специфичната противовирусна химиотерапия е направление, което показва значителни резултати, както в профилактиката, така и в лечението на грипните заболявания. Усилената работа в последните 40 години в изследването на вещества с инхибиторен ефект върху различни мишени на грипните вируси е довело до утвърждаването в клинична употреба на две групи съединения: M2 блокери (производни на адамантана) и невраминидазни инхибитори. Въпреки доказаните им антивирусни свойства, пред оптималната противогрипна стратегия стоят няколко съществени препятствия. Липсата на ефективност срещу грипен вирус тип В на адамантановите производни, силната степен на развитие на резистентност и към двата класа съединения, както и страничните им ефекти, а в някои случаи цената им, поставят необходимостта от търсенето на нови подходи в противогрипната терапия – откриване на нови субстанции, както и разработване на високоефективни комбинации на съществуващите препарати.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е :

Да се проучи комбинираното действие на оселтамивир и римантадин при експериментална инфекция с грипен вирус А *in vitro* и *in vivo*.

Във връзка с постигането на така формулираната цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се определи чувствителността на клинични изолати към римантадин хидрохлорид и оселтамивир карбоксилат чрез биологични и генетични методи
2. Да се определи характерът на взаимодействие на комбинацията оселтамивир и римантадин срещу репликацията на грипен вирус А в клетъчни култури.
3. Да се проучи комбинираното действие на римантадин и оселтамивир в профилактична схема на приложение в бели мишки в различни дозови съотношения.
4. Да се проучи ефектът на терапевтичен курс с комбинации на двата инхибитора в различни дозови съотношения в бели мишки.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Съединения

▪ Римантадин хидрохлорид

α -метил-1-адамантанметиламин хидрохлорид (римантадин хидрохлорид), предоставен от Joint – Stock Company Olainfarm, Рига, Латвия.
ММ = 216 g/mol

▪ Оселтамивир

([3R,4R,5S]-4-ацетамидо-5-амино-3-[1-етилпропокси]-1циклохексан-1-карбоксилна киселина), GS 4071 – оселтамивир карбоксилат, активна форма на субстанцията в организма. GS 4104 – етилов естер за перорално приложение. предоставени от Hoffman La Roche Ltd Basel, Switzerland.

In vitro

GS 4071

оселтамивир карбоксилат

ММ = 386.43 g/mol

In vivo

GS4104 (Tamiflu®)

етилов естер на оселтамивир фосфат

ММ = 410.4 g/mol

▪ Занамивир

[4-гуанидино-2,4-дидеоокси-2,3-дехидро-N-ацетилневраминова киселина], предоставен от Mark von Itzstein на референтния център по грип за Северна Франция, Париж, където е извършена експерименталната работа с него.

ММ = 332.31 g/mol

При опитите *in vitro* занамивир, оселтамивир и римантадин се разтваряха *ex tempore* в хранителна среда Dulbecco MEM (Gibco) с 0.5% фетален телешки серум (Gibco) в съответните работни концентрации.

При експериментите *in vivo* оселтамивир фосфат се разтваряше *ex tempore* във фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS), а римантадин хидрохлорид – в бидестилирана вода в съответните работни дози.

Вируси

- 26 проби на грипен вирус тип А, от които 14 (H3N2) и 12 (H1N1), изолирани от пациенти в периода 2004 – 2007 г. и типизирани в лабораторията по грип и ОРЗ към Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ).
- A/Aichi/2/68(H3N2) и A/Puerto Rico/8/34(H1N1), предоставени от Института по вирусология “Д. Й. Ивановский” към Руската академия на науките, Москва, Русия
- A/Panama/2007/99(H3N2) и A/New Caledonia/20/99(H1N1) от колекцията на Референтната лаборатория по грип за Северна Франция.

Опитни животни

Бели мишки: 10-12 или 14-16 гр., мъжки пол, рендомбредна линия ICR, доставени от Експериментална развъдна база за опитни животни на БАН, гр. Сливница.

Кокоши ембриони

Кокоши ембриони: 10-11 дневни, доставени от Птицекомбинат, „Джиев”, гр. Костинброд.

Клетъчни култури

Клетъчна линия от кучешки бъбрек MDCK (Madine-Darby canine kidney), получена от ATCC (American Type Culture Collection), USA.

Фенотипно определяне чувствителността към римантадин хидрохлорид на грипни вируси тип H3N2 и H1N1 в клинични изолати

След вирусна инокулация в MDCK монослой, римантадин се прилагаше в концентрации от 0.01 до 3.2 μ M. След 72 ч. инкубация се отчиташе инфекциозният вирусен титър в $\log_{10}$ по метода на крайното разреждане на Reed and Muench [1938].

Оценката на противовирусния ефект на инхибитора към даден изолат се извършваше чрез сравнение с паралелно заложен вирусна контрола и с ефекта на съединението към съответния чувствителен референтен щам.

Фенотипно определяне чувствителността към невраминидазните инхибитори занамивир и оселтамивир на грипни вируси тип H3N2 и H1N1 от клинични изолати

Определянето на IC_{50} за всеки изолат се извършваше чрез измерване на флуоресцентен сигнал с 40 μ M субстрат MUNANA по метода на Potier и съавт., 1979 на флуорометър Twinkle LB970 (Berthold Technologies). Резултатите във флуоресцентни единици се обработваха с програма Kaleidagraph и се изчисляваше IC_{50} .

Генетично определяне на маркери на резистентност към M2 блокери и невраминидазни инхибитори

Екстракцията на РНК се извършваше с кит Qiamp Mini Spin®, Qiagen и се проведе RT-PCR амплификация на HA, NA и M генните сегменти. Използваха се праймери, разработени и прилагани в Националната референтна лаборатория по грип за Северна Франция. Амплифицираните генни сегменти бяха секвенирани в секвенатор ABI PRISM 3730XL DNA analyzer, Applied Biosystems в Platform 8, Institut Pasteur Paris. Последователностите бяха обработени, анализирани за мутации, допринасящи за развитието на резистентност и бе определена филогенезата на съответните вируси чрез построяване на дендрограми за HA, NA и M гените с neighbor-joining метод със CLC Main Workbench® софтуер.

Генните последователности бяха депозирани в международната база данни на NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>] под съответни номера за достъп от CY103741 до CY103790.

Определяне на индивидуалните ефекти (IC_{50}) на римантадин и оселтамивир по съдържанието на извънклетъчен вирус в клетъчни култури

Първоначално се определяха MIC_{50} на римантадин и оселтамивир по метода на крайното разреждане на Reed & Muench [1938]. Те се използваха като база за определяне на концентрациите на веществата за изпитване на комбинираното им действие, по метода на Prichard и Shipman [1990], по схема 2x, 1x, 0.5x, 0.25 x MIC_{50} .

Определяне комбинирания ефект на римантадин и оселтамивир

За определяне на комбинираните ефекти на двете вещества се използваха концентрации или дози на двата инхибитора самостоятелно или в комбинация в шахматна схема на приложение. Стойностите се обработваха с програма MacSynergy™ и се оценяваше характерът на взаимодействие по метода на Prichard и Shipman.

Проучване на ефекта на вирусните инхибитори и тяхната комбинация при експериментална инфекция с грипен вирус А (H3N2) в бели мишки

Лабораторните животни се анестезираха чрез инхалационно третиране с етер и се заразяваха интраназално с 20 MLD₅₀ и 10 MLD₅₀/ 0,05 ml, определени по метода на Kärber, 1931. Разрежданията на вируса до необходимата инокулационна доза се извършваха в PBS.

Съединенията се прилагаха per os в петдневен курс, като оселтамивирът два пъти дневно през 10-12 часови интервали, а римантадинът - веднъж дневно.

Профилактичен курс – начало 4 часа преди вирусна инфекция

Терапевтичен курс – начало 24 часа след вирусна инфекция

Плацебо контролните групи се третираха перорално на същите времеви интервали с по 0,1 ml PBS.

За ефективността на веществата и техните комбинации се съдеше по следните параметри

1. Леталитет в групата – в проценти.
2. Средно време на преживяване (СВП) - изчисляваше се по следната формула: $СВП = [f(d - 1)]/n$, където f е брой умрели мишки на съответния ден d и n е общият брой на мишки в групата [Grunert и съавт., 1965].
3. Коефициент на защита (КЗ):
 $КЗ = \text{леталитет в \% в плацебо} / \text{леталитет в \% в третираната група}$
4. Индекс на защита (ИЗ) : $ИЗ = КЗ - 1 \times 100\% / КЗ$
5. Характер на взаимодействие - по метода на [Prichard и Shipman 1990]

Определяне на белодробна консолидация и белодробен индекс

На петия или шестия ден след инфекцията се отчитаха видимите изменения в белите дробове и се определяха БИ и БК. Последната се определяше визуално в проценти като за максимална степен на увреденост на дроба се считаха 100% (4 пункта), даващи картина на т.нар. "plum like coloration", а за нормален, здрав дроб 0% (0 пункта).

Белодробният индекс (БИ) = $\text{тегло на бял дроб} \times 100 \% / \text{тегло на мишка}$

Титрация на вируса в бели дробове на мишки

По три мишки от всяка група биваха измервани като тегло и сакрифицирани на различни дни след вирусната инфекция. След измерване на теглото на белите дробове (взимаше се средната стойност от трите мишки и белите дробове за изчисление на БИ), дробовете се стриваха и се приготвяха 10% суспензии, с които се инокулираше клетъчен монослой и се отчиташе вирусен титър в log₁₀ по метода на Reed and Muench.

Статистическа обработка на резултатите

Статистическата достоверност за ефекта на прилаганите дози и комбинациите се оценяваше чрез one-way ANOVA с Bonferroni пост-тест за множествоно сравнение между третираните и контролната, както и между индивидуално и комбинирано третираните групи. Кривите на преживяемост се сравняваха по метода на Kaplan-Meier с log-rank тест, а вирусните титри и разликите в теглото на животните със Student *t*-test Bonferroni пост-тест. Непараметричен Mann-Whitney анализ бе приложен за оценка на степента на белодробна консолидация. За статистически достоверни се считаха стойностите над 95% доверителен интервал ($P < 0.05$). Статистическата обработка на резултатите се извършваше с помощта на програмата GraphPad Prism®. Определянето на IC_{50} - с помощта на програмата Kaleidagraph®, а обработката на нуклеотидните, протеинните секвенции и филогенетичният анализ - чрез CLC GenomicsWorkbench® и FigTree.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Определяне чувствителността към М2 блокери и неврамнинадазни инхибитори на грипни вируси А (H3N2) и (H1N1).

1.1. Фенотипно определяне на чувствителността към М2 блокери

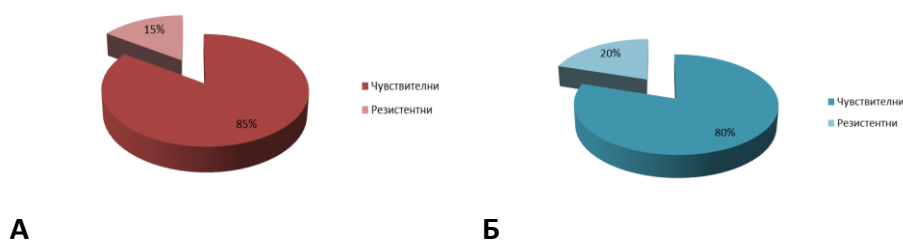
От 26 получени проби, изолирани от пациенти в периода 2004-07 в г. централата по грип и ОРЗ към Националния център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), София, за 23 бе изследвана степента на чувствителност към римантадин в клетки MDCK. Резултатите са представени в **Таблица 1**, като е посочена датата на изолиране и референтните вируси за съответния грипен сезон. Щамове A/Sofia/207/07(H3N2), A/Sofia/490/06(H1N1) A/Sofia/246/06(H1N1) не показаха развитие на ЦПЕ, поради което не беше възможно фенотипната им чувствителност към римантадин да бъде определена. Като чувствителни се характеризираха щамове, чиято репликация бе инхибирана от концентрации на римантадин в диапазон 0.01 – 3.2 µM и разликата в ЦПЕ в сравнение с вирусната контрола бе равна или по-голяма от 1.66 Δlg. Като фенотипно-резистентни бяха характеризирани щамове A/Sofia/1246/06(H3N2), A/Sofia/1250/06(H3N2), A/Sofia/1244/06(H1N1) и A/Sofia/1248/06(H1N1), тъй като не се наблюдаваше потискане на цитопатичния ефект в присъствие на използваните концентрации на римантадин (**Фиг. 1 А и Б**).

Таблица 1. Фенотипна чувствителност към римантадин хидрохлорид на клинични изолати на грипни вируси, изолирани в България в периода 2004-2007 г.

Щам	Дата на изолиране	Етиология	Чувствителност
A/Sofia/649/04 (H3N2)	07.01.2005	По лабораторни данни- епидемична вълна 2004-05. Смесена етиология – A/Wyoming/03/03(H3N2),A/Californi a/07/04(H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	S
A/Sofia/684/04 (H3N2)	14.01.2005		S
A/Sofia/747/04 (H3N2)	07.01.2005		S
A/Sofia/1246/06 (H3N2)	17.11.2006	По лабораторни данни- епидемична вълна 2006 - 07. Смесена етиология – A/Wisconsin/67/05(H3N2) и A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)	R
A/Sofia/1247/06 (H3N2)	17.11.2006		S
A/Sofia/1250/06 (H3N2)	17.11.2006		R
A/Sofia/1251/06 (H3N2)	17.11.2006		S
A/Sofia/206/07 (H3N2)	27.01.2007		S
A/Sofia/209/07 (H3N2)	27.01.2007		S
A/Sofia/319/07 (H3N2)	30.01.2007		S
A/Sofia/374/07 (H3N2)	02.02.2007		S
A/Sofia/413/07 (H3N2)	06.02.2007		S
A/Sofia/427/07 (H3N2)	06.02.2007		S

A/Sofia/240/05 (H1N1)	25.01.2005	По лабораторни данни- епидемична вълна 2004-05. Смесена етиология – A/Wyoming/03/03(H3N2), A/Californi a/07/04(H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	S
A/Sofia/361/05 (H1N1)	01.03.2005		S
A/Sofia/422/05 (H1N1)	02.03.2005		S
A/Sofia/522/05 (H1N1)	13.03.2005		S
A/Sofia/126/06 (H1N1)	24.02.2006	По лабораторни данни- епидемична вълна 2005-06. A/NewCaledonia/20/99 (H1N1) Епидемична вълна 2006- 07.Смесена етиология – A/Wisconsin/67/05(H3N2) и A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)	S
A/Sofia/179/06 (H1N1)	24.02.2006		S
A/Sofia/218/06 (H1N1)	24.02.2006		S
A/Sofia/418/06 (H1N1)	24.02.2006		S
A/Sofia/1244/06 (H1N1)	17.11.2006		R
A/Sofia/1248/06 (H1N1)	17.11.2006		R
A/Aichi/2/68 (H3N2)	-	референтен	S
A/PR/8/34 (H1N1)	-	референтен	S

S – чувствителен, R –резистентен



Фиг. 1. Фенотипна чувствителност към римантадин хидрохлорид на грипни вируси H3N2 (n=13) (А) и H1N1 (n=10) (Б) изолирани в България в периода 2004-2007 г.

Във връзка с непрекъснато нарастващата степен на резистентност към M2 блокери и неврамидазните инхибитори, всички автори наблягат, че проследяването на резистентността е първостепенен фактор в определянето на адекватна терапия на грипната инфекция [Monto и съавт., 2006; Deyde и съавт., 2007; Ong и Hayden, 2007; Rabbaraju и съавт., 2007 и др.]. Съществуват мрежи в световен мащаб за мониторинг на чувствителността на циркулиращите грипни щамове както към адамантанови производни, така и към неврамидазни инхибитори, като част от GISN –Global Influenza Surveillance Network.

От получените резултати е видно, че болшинството от изолатите - 85% H3N2 и 80% - H1N1 са фенотипно-чувствителни към M2 блокери. Доказано е рязко повишаване през периода 2005-2006 г. на циркулиращите H3N2 адамантан-резистентни щамове [Deyde и съавт., 2007], но в нашето изследване на бе установена подобна зависимост, макар че трябва да се има предвид и малката извадка. Литературни данни от подобни

проучвания също сочат, че за същия период се изолират едновременно и резистентни и чувствителни грипни вируси [Yavarian и съавт., 2010]. Ниската степен на резистентност през сезон 2006-07 г. се асоциира с внезапната поява на адамантан-чувствителни варианти, придобили отново чувствителен М сегмент чрез генетична реасортация от близки до циркулиращите преди 2005-06 г. чувствителни вируси [Нау и съавт., 2008; Furuse и съавт., 2009a].

1.2. Фенотипно определяне чувствителността към невраминидазни инхибитори (оселтамивир и занамивир)

За 16 щамове H3N2 (n=7) и H1N1 (n=9) бе проведено определяне на чувствителността на вирусната невраминидаза към оселтамивир и занамивир с флуорецсентен MUNANA субстрат.

Таблица 2. Чувствителност на невраминидаза към осетамивир и занамивир на вируси тип А (H3N2) и А (H1N1), изолирани в България в периода 2004-2007г. **(а)** средни стойности, **(б)** сравнени с референтните вируси

(а)

Щам	IC ₅₀ занамивир (nM) ± SD	IC ₅₀ оселтамивир(nM) ± SD
A/Sofia/747/04 (H3N2)	3.58 ± 1.62	0.47 ± 0.27
A/Sofia/684/04 (H3N2)	1.69 ± 1.21	0.31 ± 0.11
A/Sofia/649/04 (H3N2)	1.69 ± 0.91	0.55 ± 0.46
A/Sofia/1247/06 (H3N2)	2.33 ± 1.45	1.04 ± 0.53
A/Sofia/1250/06 (H3N2)	5.28 ± 2.48	0.55 ± 0.09
A/Sofia/206/07 (H3N2)	1.32 ± 0.91	0.28 ± 0.16
A/Sofia/413/07 (H3N2)	3.58 ± 0.76	1.03 ± 0.09
A/Sofia/361/05 (H1N1)	1.27 ± 0.11	1.15 ± 0.34
A/Sofia/422/05 (H1N1)	1.29 ± 0.37	1.02 ± 0.16
A/Sofia/522/05 (H1N1)	1.05 ± 0.73	0.93 ± 0.17
A/Sofia/240/05 (H1N1)	2.06 ± 0.39	1.59 ± 0.24
A/Sofia/218/06 (H1N1)	1.16 ± 0.59	1.09 ± 0.29
A/Sofia/418/06 (H1N1)	1.31 ± 0.62	1.01 ± 0.15
A/Sofia/179/06 (H1N1)	1.23 ± 0.31	1.13 ± 0.32
A/Sofia/126/06 (H1N1)	1.27 ± 0.84	0.98 ± 0.69
A/Sofia/490/06 (H1N1)	2.42 ± 1.36	1.31 ± 0.26

(б)

Щам	IC ₅₀ занамивир (nM) ± SD	IC ₅₀ оселтамивир(nM) ± SD
A (H3N2) ^a	2.78 ± 1.33	0.6 ± 0.24
A/Aichi/2/68 (H3N2)	1.25 ± 0.3	0.27 ± 0.12
A (H1N1) ^b	1.45 ± 0.59	1.13 ± 0.29
New Caledonia/20/99 (H1N1)	1.27 ± 0.45	0.51 ± 0.46

^a n = 7, ^b n = 9

Всички анализирани щамове бяха определени, като чувствителни спрямо оселтамивир (IC₅₀ от 0.24 до 1.7 nM) и занамивир (IC₅₀ от 0.86 до 5.16 nM) което е в съответствие с литературните данни за вируси, изолирани в други региони в този

период и също характеризирани като чувствителни. Проучванията върху чувствителността на грипни вируси към невраминидазни инхибитори, сочат че резистентните варианти и на двата типа вируси показват стойности с порядъци по-високи (600 -1000 nM), от тези на чувствителните, каквито не бяха измерени в настоящото изследване [Ramaix-Welti и съавт.; 2008, Correia и съавт.; 2010, Puzelli и съавт., 2011]. Както е видно от резултатите, представени на **Таблица 2 (а) и (б)**, общо чувствителността към оселтамивир е по-висока, в сравнение с тази към занамивир. Като субтипovi различия H3N2 тип е с по-висока чувствителност към оселтамивир ($IC_{50}= 0.6$ nM) в сравнение с H1N1 ($IC_{50}= 1.13$ nM), но с по-ниска по отношение на занамивир ($IC_{50}=2.78$ nM за H3N2 и $IC_{50}=1.45$ nM за H1N1 тип), потвърждавайки данни от предишни изследвания [McKimBreshkin и съавт., 2003].

1.3. Генетични маркери на резистентост на H3N2 и H1N1 вируси към M2 блокери и невраминидазни инхибитори (оселтамивир и занамивир).

За 17 щамa бе проведена екстракция на РНК (Qiaamp Mini Spin®, Qiagen) и последваща RT-PCR амплификация на HA, NA и M гените, след което PCR продуктите се визуализираха чрез агарозна гел електрофореза.

Сред анализираните M сегменти, беше установен един изолат A/Sofia/1250/2006(H3N2), носещ мутацията S31N в трансмембрания участък на M2 белтъка, определяща резистентност към адамантани. В над 90% от описаните резистентни варианти се касае именно за тази аминокиселинна замяна. Като втора по честота се открива замяната V27A [Furuse и съавт., 2009b]. В същия изолат присъстваше V27T, но е известно, че тя не допринася за развитие на резистентност [Cadu и съавт., 2009]. Същият щам беше определен и фенотипно като резистентен в клетъчни култури. При всички останали щамове не бяха открити мутациите, описани в литературата, определящи резистентност към адамантани.

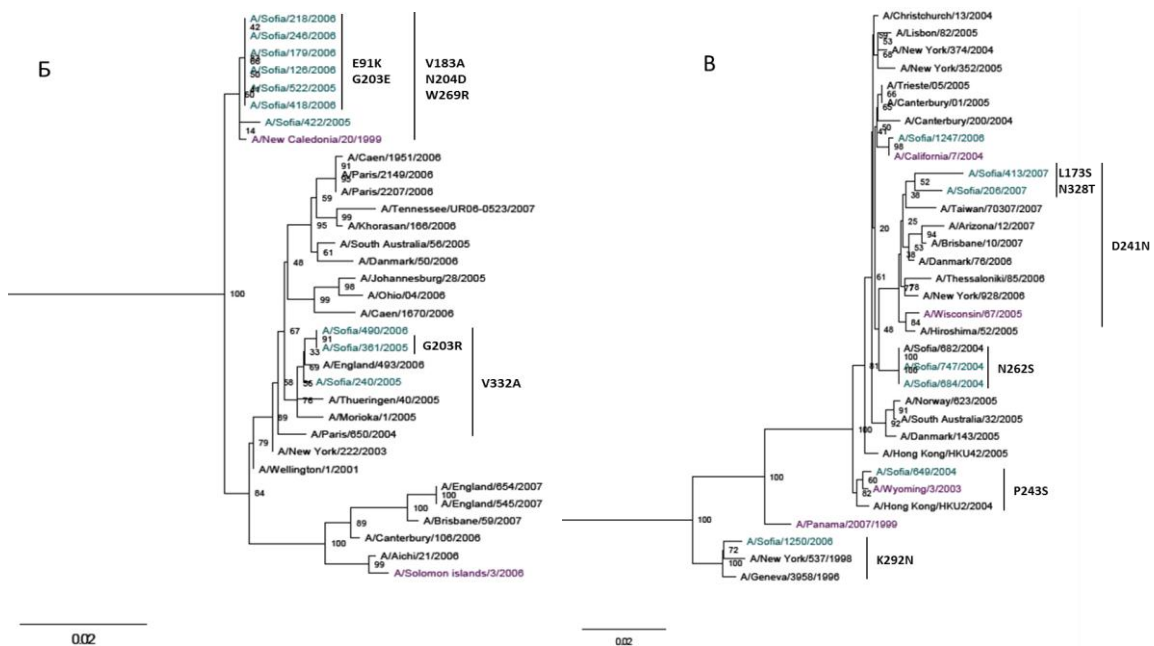
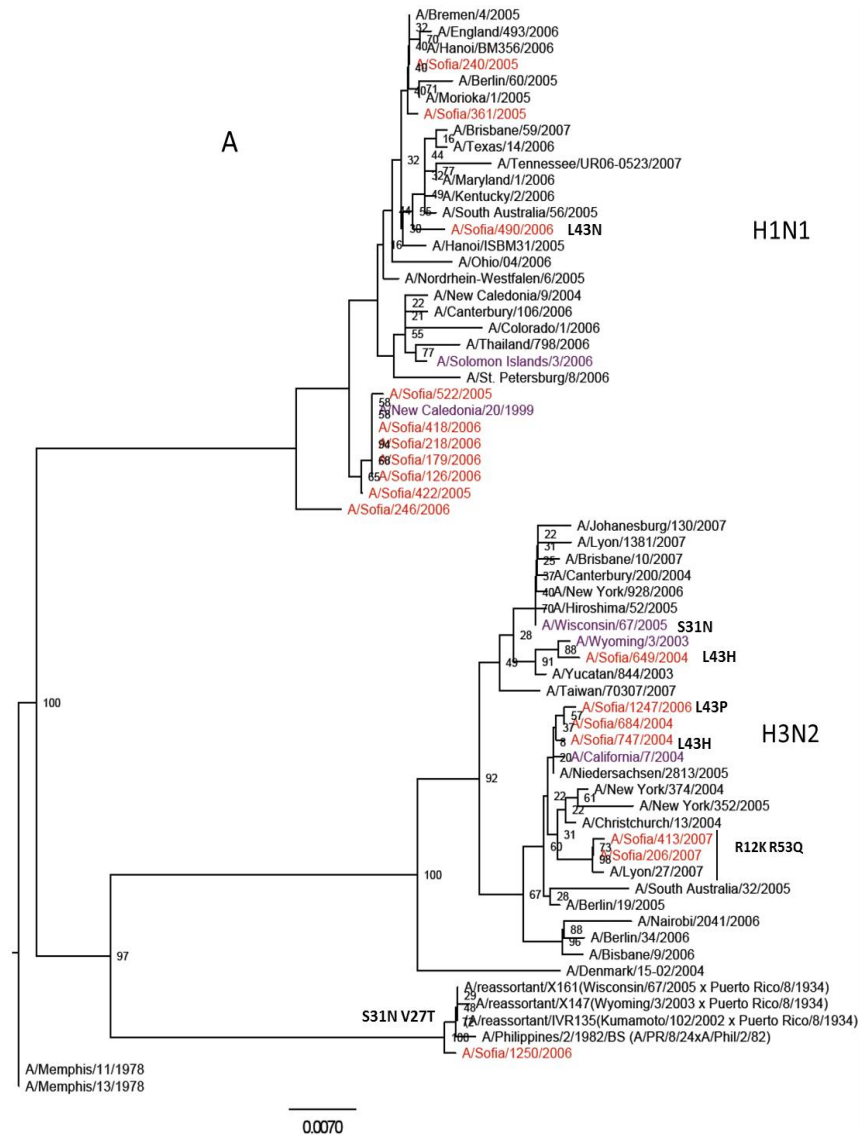
Филогенетичният анализ на M гена показва близко родство на по-голямата част от H1N1 изолатите с референтния щам A/New Caledonia/20/99 (H1N1). H3N2 показаха значителна вариация по отношение на M сегмента, като някои бяха родствено близки до A/Wyoming/3/2003, A/California/7/2004, но щам A/Sofia/1250/2006 (H3N2) с S31N мутация не бе групиран с резистентния A/Wisconsin/67/2005. Причината за това са допълнителните мутации, както в трансмембрания, така и в други региони на йонния канал. Интересно е да се отбележи 43 позиция в M2 белтъка, която в различни вируси, показва три различни аминокиселинни замени – L43N, L43H и L43P, както при H3N2, така и при H1N1. Това е позиция, която се счита за възможен свързващ сайт на M2 блокери – заедно с 41 и 42-а те образуват хидрофобен джоб, който взаимодейства с метиловата група на римантадиновата молекула. Тройни мутанти Leu40, Ile42 и Leu43 към Ala в този участък показват намалена чувствителност към римантадин [Pielak и съавт., 2009]. Описана е и замяната L43W, като естествена мутация в йонния канал на H1N1 вируси [Du и съавт., 2010]. Конкретните аминокиселинни замени, които показва настоящото

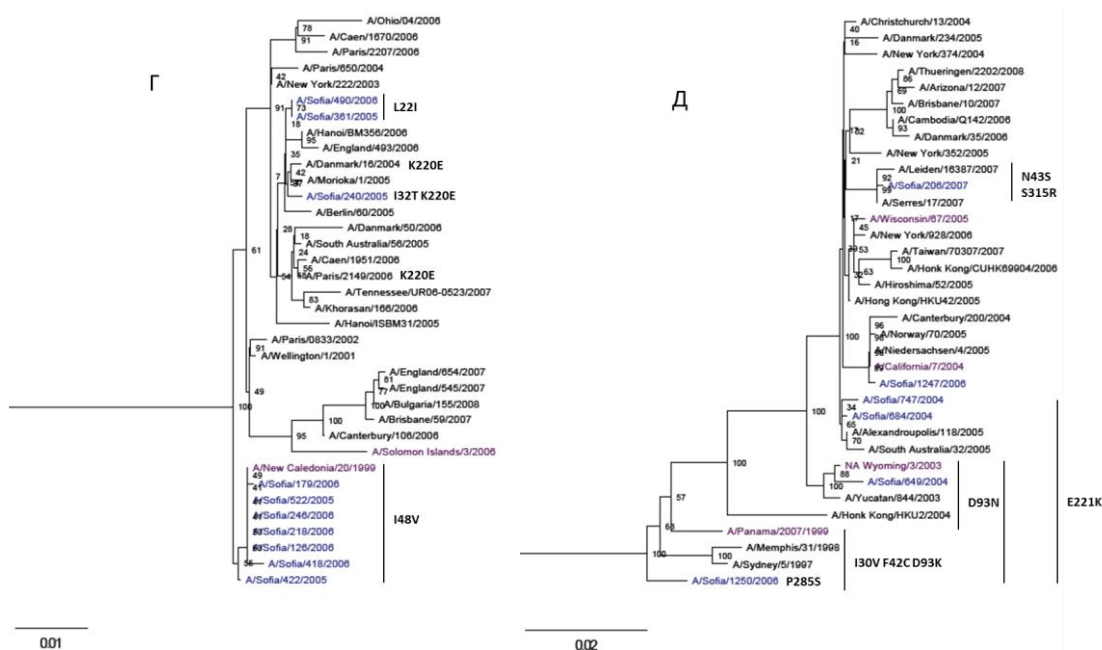
изследване не са описани досега. Вероятно те не повлияват значително свързването с римантадиновата молекула, тъй като фенотипните изследвания на показваха увеличение в концентрациите на римантадин, необходими за потискане репликацията на изолатите.

Секвенирането и генетичният анализ на NA сегмент (1413 нп), кодиращ невраминидазата не показва присъствие на нито една от известните H275Y (H1N1), E119V, R292K, I222V и N294S (H3N2) замени в транслираните протеини, отговорни за резистентността към оселтамивир, както и на R136Q, I223V, R – за тази към занамивир. Не беше установена и замяната S247N, открита в невраминидазата на сезонни и пандемични вируси H1N1 от Sheu и съавт., 2008 Hurt и съавт., 2011, допринасяща за намалена чувствителност и към двата инхибитора. Вирусите тип H1N1, които показваха филогенетични различия с останалите изолати от България по отношение на M сегмента, бяха клъстерирани в различни групи и спрямо NA гена - A/Sofia/240/2005, A/Sofia/361/2005 и A/Sofia/490/2006. Общите мутации са отбелязани на дендрограмата на **Фиг. 2 (А, Г и Д)**. За щам A/Sofia/413(H3N2) не беше успешно амплифициран NA сегментът, поради което не беше възможно секвениране и по-нататъшен анализ за детекция на генетични маркери на резистентност към невраменидазни инхибитори.

В настоящето изследване беше амплифициран участък от 1080 нп, което представлява HA1 на хемаглутининовия мономер. Известно е, че определени аминокиселинни замени в редица вирусни белтъци, повлияват патогенността и вирулентността на вируса в нов гостоприемник. Описани са мутации в M1(D232N, A41V и T139A), NS (S23N), PB2 (D701N) и HA1 (G218W) сегментите, отговорни за този ефект [Ward, 1995; Ping и съавт., 2010]. В анализирания HA1 протеинни секвенции не беше открита мутацията G218W, която доказано е адаптивна мутация и значително усилва репликацията на вируса в бронхиалния епител на мишки, експериментално заразени с рекомбинантен мутантен вирус тип H3N2 [Kaleta и съавт., 2008]. HA1 на щамове H1N1A/Sofia/240/2005, A/Sofia/361/2005 и A/Sofia/490/2006 бяха също секвенционно отдалечени от A/New Caledonia/20/99(H1N1) и останалите анализирани изолати, което определя тези вируси, като цялостно филогенетически различни (**Фиг. 2 Б и В**). Изолатите тип H3N2 бяха разпределени в разнородни клъстери и родствени до различни референтни вируси, като тази вариабилност е обяснима с по-високата степен на изменчивост на H3 и N2 субтипове гликопротеини в сравнение с H1 и N1 вариантите.

Всички последователности от сегментите, за които беше успешно извършена амплификация и секвениране бяха депозирани в генната банка на NCBI под последователни номера за достъп от CY103741 до CY103790.





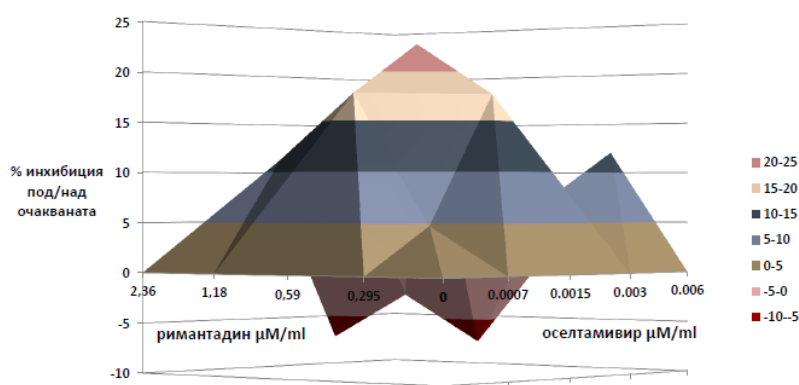
Фиг. 2 (А-Д). Филогенетичен *neighbor-joining* анализ на М (А), Н1 (Б), Н3 (В), N1 (Г) и N2 (Д) сегменти на грипни вируси тип А, изолирани в България в периода 2004-2007г. Отбелязани са общите аминокиселинни замени в съответните клъстери. Секвенциите, използвани за сравнение и групиране са публично достъпни под съответните номера в NCBI Influenza Virus Sequence Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2. Определяне характера на комбинирано действие на оселтамивир и римантадин *in vitro*

За определяне на комбинирания ефект на римантадин хидрохлорид и оселтамивир карбоксилат върху репликацията на грипен вирус бе използван методът на Prichard и Shipman. По схема 2х, 1х, 0.5х и 0.25хMIC₅₀ прилагаме римантадин в концентрации от 2.36, 1.18, 0.59 и 0.295 µM/ml, а оселтамивир – 0.006, 0.003, 0.0015 и 0.0007 µM/ml. На база на получените резултати бе определен общият характер на взаимодействие на прилаганите концентрации на веществата и се застрои на триизмерна графика за общия процент на реален инхибиторен ефект на всяка проба, при прилагането на комбинациите от различните концентрации римантадин и оселтамивир (Таблица 3 и Фиг. 3).

Таблица 3. Цифрови данни за реалния процент на вирусна инхибиция на комбинациите римантадин хидрохлорид и оселтамивир карбоксилат

Оселт Рим	0	0.0007	0.0015	0.003	0.006
2.36	0	3.32	8.55	-7.2	-0.45
1.18	0	11.24	14.32	-2.61	14.79
0.59	0	17.77	22.85	-7.22	0.14
0.295	0	4.73	17.66	7.66	12.08
0	0	0	0	0	0



Фиг. 3. Оценка на комбинирания ефект на римантадин хидрохлорид и оселтамивир карбоксилат, по метода на Prichard & Shipman (95% доверителен интервал)

Областите над теоретично изчислената адитивна равнина отговарят на синергичен характер на действие, пиковите зони – на максимум синергизъм. Областите под равнината са показател за антагонизъм на съответните комбинации. Наблюдан бе синергизъм в почти всички комбинации на двете вещества. Слаб антагонизъм се отчита при прилагане на 0.003 $\mu\text{M/ml}$ оселтамивир с 2.36, 1.18 и 0.59 $\mu\text{M/ml}$ римантадин, както и при най-високите прилагани дози – 2.36 $\mu\text{M/ml}$ + 0.006 $\mu\text{M/ml}$, за римантадин и оселтамивир, съответно. Най-висока степен на синергизъм се наблюдава при прилагане на римантадин 0.59 $\mu\text{M/ml}$ + 0.0015 $\mu\text{M/ml}$ оселтамивир. Забележителен е фактът, че при двете най-малки концентрации на оселтамивир (0.0015 и 0.0007 $\mu\text{M/ml}$) се отчита синергизъм в комбинация с всички концентрации на римантадин. Трябва да се обърне внимание на наблюдавания изразен синергизъм при най-ниската концентрация на оселтамивир – 0.0007 $\mu\text{M/ml}$, комбинирана с 0.59 $\mu\text{M/ml}$ римантадин, както и при най-ниската концентрация римантадин 0.295 $\mu\text{M/ml}$ приложена с 0.0015 $\mu\text{M/ml}$ оселтамивир.

Резултатите, получени от проведените експерименти, доказват синергичния антивирусен ефект при комбиниране на римантадин и оселтамивир при инфекция с грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) в клетъчна култура MDCK. Те потвърждават публикуваните литературни данни за синергизъм между двете антивирусни вещества срещу същия субтип вирус, демонстриран в клетки MDCK [Govorkova и съавт., 2004]. Те потвърждават и изследванията, показали синергично действие на амантадин (M2 блокер) и оселтамивир срещу субтипове H1N1 H3N2 и H5N1 *in vitro* [Ilyushina и съавт., 2006; Smee и съавт., 2009].

Представените резултати дават доказателство за сложния характер на комбинираното взаимодействие на инхибиторите на вирусна инфекция. Постигането на изразен синергичен антивирусен ефект е в зависимост не само от механизма на действие, но и от конкретната комбинация на прилаганите концентрации на веществата. Едни и същи инхибитори, прилагани в различни комбинации на дадени концентрации могат да проявяват антагонистичен, адитивен или синергичен ефект. Точният механизъм, определящ тези взаимодействия, все още не е изяснен.

3. Проучване комбинираното действие на римантадин и оселтамивир в профилактичен курс срещу грипен вирус A *in vivo*.

3.1. Пилотно определяне характера на взаимодействие на римантадин и оселтамивир в профилактичен курс *in vivo*

3.1.1. Определяне на ефекта върху преживяемостта, индекса на защита и средното време на преживяване и оценка на общия характер на взаимодействие

В начална серия скринингови опити беше използвана висока вирусна инокулационна доза от 20MLD₅₀, предизвикваща 88.6% смъртност в контролната плацебо група. Прилагаха се общо 6 дози на римантадин и оселтамивир, които според литературни данни не показват протективен ефект или са близки до минималните ефективни дози. По литературни данни минималната ефективна доза на римантадина при инфекция с щам A/Aichi/2/68/H3N2 *in vivo* е 20 mg/kg/day, а тази на оселтамивир, отново за грипен вирус A (H3N2) е 1 mg/kg/day [Узунов, С. 1996, Sidwell и съавт., 1997].

Представените в **Таблица 4** резултати показват отчетлив протективен ефект на лечебен курс с комбинациите от 0.05 и 0.2 mg/kg/day оселтамивир с 5.0 и 7.5 mg/kg/day римантадин, както и на комбинацията на 0.2 mg/kg/day оселтамивир и 2.5 mg/kg/day римантадин и 0.1 mg/kg/day оселтамивир с 5 mg/kg/day римантадин. Индивидуалното прилагане на тези дози, както и останалите комбинации не повлияват значително инфекцията по отношение на леталитета в групите в сравнение с групата плацебо, но оказват влияние върху средната продължителност на живота, увеличавайки я с над 2 дни, сравнено с плацебо групата.

Особено внимание заслужават комбинациите с максимално ниска доза оселтамивир 0.05 mg/kg/day с 5.0 и 7.5 mg/kg/day римантадин, показали съответно 41.2% и 38.7% ИЗ спрямо контролната група. Смъртността в групата 0.05 mg/kg/day

оселтамивир е 83.3%, а в 7,5 mg/kg/day римантадин е 62.5%, тази в 0.05 mg/kg/day с 5 mg/kg/day римантадин е 52.2%, значително по-ниски в сравнение със 88.6% с плацебо.

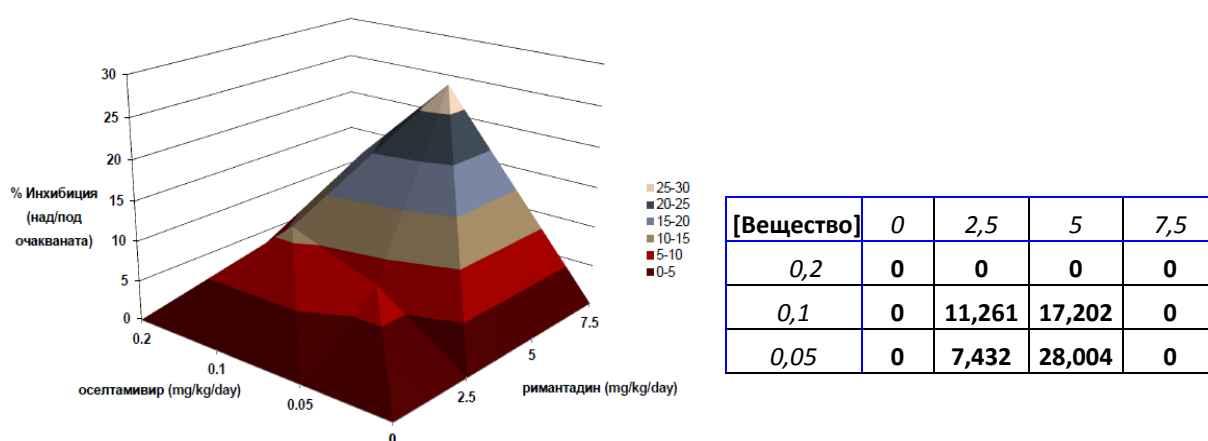
Таблица 4. Ефект върху преживяемостта на мишки, експериментално заразени с 20 MLD₅₀ грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) и третирани с комбинации на римантадин и оселтамивир в профилактичен курс на приложение

Оселтамивир Римантадин mg/kg/day		Живи/ Общ брой	Смъртност (%)	ИЗ (%)	СВП ± SE (дни) [¶]
0.05	2.5	6/24	75.0	15.3	8.3 ± 0.7*
0.05	5.0	11/23	52.2	41.2	9.5 ± 0.8***
0.05	7.5	11/24	54.2	38.7	9.9 ± 0.9 ***
0.05	-	4/24	83.3	5.7	8.3 ± 0.7*
0.1	2.5	6/23	73.9	16.7	8.9 ± 0.7**
0.1	5.0	10/24	58.3	34.2	9.9 ± 0.8***
0.1	7.5	11/23	52.2	41.2	10.0 ± 0.8***
0.1	-	3/24	87.5	1.0	7.9 ± 0.6
0.2	2.5	10/23	56.5	36.3	10.3 ± 0.8***
0.2	5.0	10/24	58.3	34.2	9.7 ± 0.8***
0.2	7.5	10/24	58.3	34.2	10.3 ± 0.8
0.2	-	5/24	79.2	10.7	8.0 ± 0.7
-	2.5	3/24	87.5	1.0	7.1 ± 0.8
-	5.0	2/24	91.7	0	7.2 ± 0.5
-	7.5	9/24	62.5	29.6	9.0 ± 0.8**
Плацебо PBS		4/35	88.6		6.4 ± 0.5

Във всяка експериментална група бяха третирани 11-12 животни (15-20 в плацебо групата). Експериментите се извършваха в две повторения. Броят на животните е сумиран, а за останалите параметри е представена средната стойност. Статистически анализ: SE – стандартна грешка; ¶ t-test *P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 сравнено с PBS.

Очевидно е, че римантадинът в концентрации 5.0 mg/kg/day взаимодейства благоприятно и с трите дози оселтамивир, както и концентрацията 0,2 mg/kg/day оселтамивир дава 30-50% по-висока преживяемост в комбинация с използваните дози римантадин, в сравнение с индивидуалните ефекти на веществата. Макар, че римантадинът и оселтамивирът, приложени в избраните дози самостоятелно не повлияват значително смъртността в групите, те имат известно влияние върху СВП, удължавайки живота средно с 2.5 дни, сравнено с плацебо групата (**Таблица 4**).

На базата на получените резултати за процентната смъртност във всички изследвани групи се определи общият характер на взаимодействие на прилаганите дози на веществата, чрез метода на Prichard и Shipman (1990) и се построи триизмерна графика, представяща общия процент реален инхибиторен ефект на всяка една от третираните групи (**Фиг. 4**).



Фиг. 4. Оценка на комбинирания ефект на оселтамивир и римантадин при инфекция с грипен вирус A H3N2 *in vivo* по метода на Prichard и Shipman

От фигурата е видно, че са налице отчетливи зони на синергизъм при 0.05 mg/kg/day оселтамивир + 5.0 mg/kg/day римантадин, 0.1 mg/kg/day оселтамивир + 2.5 и 5.0 mg/kg/day римантадин. Адитивен характер показват комбинациите 0.1 и 0.2 mg/kg/day оселтамивир + 7.5 mg/kg/day римантадин, както и 0.2 mg/kg/day оселтамивир + 5 mg/kg/day римантадин. Антагонизъм не бе наблюдаван при никоя от прилаганите комбинации.

От гледна точка на една от целите на комбинираната терапия – максималното понижаване на прилаганите дози, от получените в скрининговия експеримент резултати, бяха подбрани тези комбинации, показали синергичен ефект в най-ниски концентрации. За потвърждаване на тези резултати бяха изпитани 0.05 mg/kg оселтамивир с 5 mg/kg и 7.5 mg/kg римантадин, както и самостоятелният им ефект върху инфекцията със същата вирусна доза (20 MLD₅₀) и двукратно по-ниска такава (10 MLD₅₀). Резултатите от проведените експерименти са представени на **Таблица 5**.

И при двете вирусни дози се отчете смъртност 78.9 % в контролните групи плацебо, както и индивидуалните ефекти на веществата в двете паралелни групи показват едни и същи стойности за процент смъртност – 100% за оселтамивир 0.05 mg/kg/day, 90.9% - за римантадин 5.0 mg/kg/day и 63.6 % - за римантадин 7.5 mg/kg/day. По отношение на комбинациите, в групата, заразена с 20 MLD₅₀ се регистрираха по-високи стойности на ИЗ за оселтамивир 0.05 + 5.0 римантадин – 65.9%, сравнена с комбинацията със 7.5 римантадин – 42.9%. В групите, инокуирани с 10 MLD₅₀ вирус бе наблюдавана зависимостта доза-отговор, както в индивидуалното действие на римантадин, така и в комбинациите му с прилаганата 0.05 оселтамивир. ИЗ в съответните комбинирани-третирани групи бяха съответно 42.9% и 87.3%.

Таблица 5. Комбиниран ефект на оселтамивир (0.05 mg/kg/day) и римантадин (5.0 и 7.5 mg/kg/day) при експериментална инфекция с 20 MLD₅₀ и 10 MLD₅₀ грипен вирус A/H3N2 в бели мишки

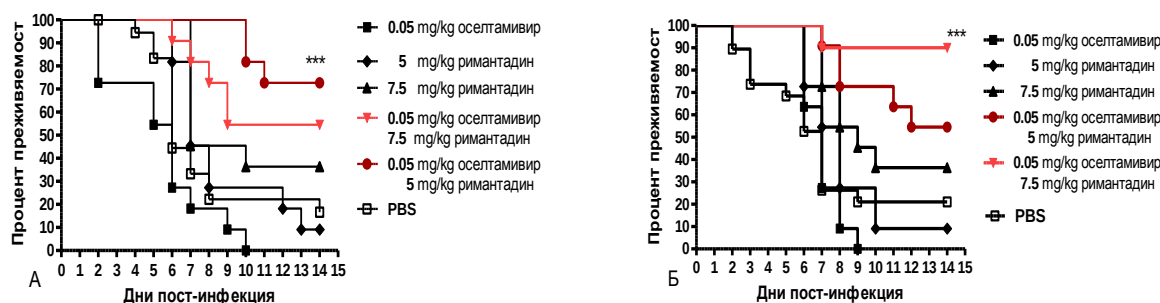
Вирусна доза	Оселтамивир mg/kg/day	Римантадин mg/kg/day	Живи/Общ брой	Смъртност (%)	ИЗ (%)	СВП ± SE (дни) [†]
20 MLD ₅₀	0.05	5.0	8/11	27.3	65.9	12.6 ± 0.7**
	0.05	7.5	6/11	45.5	42.9	10.7 ± 1.2*
	0.05	-	0/11	100	0	5.3 ± 0.8
	-	5.0	1/11	90.9	0	7.6 ± 0.9
	-	7.5	4/11	63.6	18.7	9.2 ± 1.2
	Плацебо (PBS)		4/19	78.9	-	6.8 ± 0.9
10 MLD ₅₀	0.05	5.0	6/11	45.5	42.9	11.4 ± 1.0**
	0.05	7.5	9/10	10	87.3	13.2 ± 0.9***
	0.05	-	0/11	100	0	6.0 ± 0.3
	-	5.0	1/11	90.9	0	7.3 ± 0.8
	-	7.5	4/11	63.6	18.7	9.5 ± 1.1
	Плацебо (PBS)		4/19	78.9	-	6.3 ± 1.0

Във всяка експериментална група бяха третирани 9-11 животни (19 в плацебо групата). Експериментите се извършваха в две повторения. Представени са средните стойности

Статистически анализ: [†] t-test *P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001, сравнено с PBS

При сравняване на стойностите за СВП се наблюдава приблизително два пъти удължаване на живота в групите 0.05 mg/kg/day оселтамивир с 5.0 mg/kg/day римантадин, инокулирани с 20 MLD₅₀ и 0.05 mg/kg/day със 7.5 mg/kg/day римантадин, заразени с 10 MLD₅₀. В останалите две комбинации удължаването на СВП бе средно 1.6 пъти спрямо контролната плацебо група.

Данните от проследяването динамиката на преживяемостта по дни във всички групи са представени на **Фиг. 5 (А)** за групата, заразявана с 20 MLD₅₀ и на **Фиг. 5 (Б)** - за тази с 10 MLD₅₀.



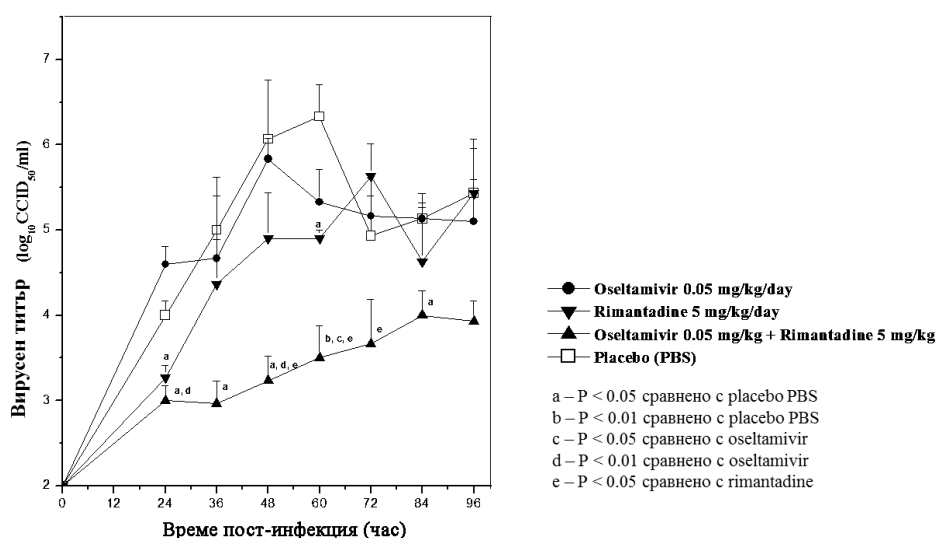
Фиг. 5 (А и Б). Ефект на профилактичен курс с комбинации 0.05 mg/kg/day римантадин с 5 и 7.5 mg/kg/day оселтамивир върху преживяемостта на мишки, заразени с 20 MLD₅₀ (А) и 20 MLD₅₀ (Б) грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) вирус.

Статистически анализ: Kaplan-Meier survival analysis (log-rank test) *** P < 0.001

При инокулация с 20 MLD₅₀ най-висока степен на протекция спрямо динамиката на преживяемостта в отделните групи показва комбинацията на 0.05 mg/kg/day оселтамивир с 5.0 mg/kg/day римантадин, докато при заразяване с 10 MLD₅₀ ефектът бе най-ясно изразен при групата на комбинацията 0.05 mg/kg/day оселтамивир с 7.5 mg/kg/day. Известен ефект и в двата случая, макар и не отчетливо изразен, оказа и индивидуалното прилагане на 7.5 mg/kg/day. В останалите групи, динамиката в леталитета е близка до тази в плацебо контролата

3.1.2. Определяне ефекта на комбинацията оселтамивир и римантадин в съотношение 1:100 върху съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове и белодробните показатели

На базата на получените резултати от експериментите, проведени *in vivo*, за изследване на вирусния титър в белите дробове беше избрана една комбинация, показала синергичен характер на взаимодействие в най ниските дози - 0,05 mg/kg/day оселтамивир и 5,0 mg/kg/day римантадин. От всяка от четирите групи животни инокуирани с 20 MLD₅₀, оселтамивир + римантадин, оселтамивир, римантадин и плацебо се сакрифицираха по 3 мишки в първите 4 дни на инфекцията на 12 часови интервали и се приготвяха 10% белодробни суспензии (смесени проби), след което се провеждаше определяне на вирусния титър на MDCK клетъчна монослойна култура в 96-ямкови плаки по метода на крайното разреждане. Резултатите от титрацията на пробите, отчитани на 72 час са представени на **Фиг. 6**.



Фиг. 6. Ефект на комбинацията оселтамивир 0.05 mg/kg/day с римантадин 5.0 mg/kg/day върху вирусния титър в белите дробове

Бе отчетено изразено снижение с 1.0 - 2.8 log₁₀ (на 60-ия час - пик в контролната плацебо група) за комбинацията оселтамивир + римантадин, докато в групите, третирани самостоятелно с оселтамивир 0.05 mg/kg и римантадин 5 mg/kg

демонстрираха снижение само 0.1-1.0 log₁₀ и 1.1-1.4 log₁₀, респективно, като динамиката бе близка до тази на плацебо контролната група. Вирусният пик в групата, третирана с римантадин беше изместен на 72 час, а този в комбинирано третираната група – на 84 час. Изместването на пиковите на вирусния титър на различен ден от началото на инфекцията за различните групи е потвърдена и в други проучвания, присъстващи в литературата [Sidwell и съавт., 1997; Leneva и съавт., 2000].

На 5-ия ден от инфекцията, се отчитаха и средното тегло на мишка в групата, теглото на белия дроб (също средно за трите мишки) и се изчисляваше белодробният индекс за всяка група. За отделна група от 3 нетретирани мишки допълнително се определяха същите параметри. По видимите изменения се определяше белодробната консолидация. Цифровите резултати са представени в **Таблица 6**.

От третираните групи най-високи стойности за белодробен индекс (БИ) в % бяха получени за плацебо контролата – 2.1%, а най-ниски в експерименталната група, третирана с комбинацията на веществата – 1.3%. Най-висока степен на белодробна консолидация - 3.3 показват плацебо групата и тази с индивидуално прилаган оселтамивир – 3.1, докато при комбинираното третиране се наблюдават само 1.2 видими изменения в белодробната тъкан. По отношение на ефектите на индивидуално приложената доза римантадин се наблюдава известна редукция с 1.2 пункта в белодробната консолидация на органите на животните, но е без съществен ефект върху БИ (0.3 % разлика с плацебо групата).

Таблица 6. Ефект на оселтамивир 0.05 mg/kg/day, римантадин 5.0 mg/kg/day и тяхната комбинация върху белодробни параметри на 5 ден след вирусна инокулация с грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2)

Експериментални групи	Средно тегло мишка (g) ± SE	Средно тегло бял дроб (g) ± SE ^{¶¶}	Белодробен индекс (%)	Белодробна консолидация ± SE ^{§§}
оселтамивир 0.05 mg/kg римантадин 5 mg/kg	12.0 ± 0.21**	0.159 ± 0.002 ***	1.3	1.2 ± 0.08**
0.05 mg/kg оселтамивир	13.27 ± 0.24***	0.193 ± 0.004*	1.5	3.1 ± 0.11
5 mg/kg римантадин	10.7 ± 0.17	0.189 ± 0.003**	1.8	2.1 ± 0.08*
Плацебо (PBS)	10.2 ± 0.21	0.217 ± 0.004	2.1	3.3 ± 0.1
Интактни	11.33 ± 0.18	0.09 ± 0.019	0.8	0

^{¶¶} SE: стандартна грешка, * P< 0.05, **P<0.01, ***P<0.001 сравнено с плацебо контрола (t-test за сравнение на теглото на мишките и белите дробове и Mann-Whitney test за сравнение на степента на белодробна консолидация)

Данните, получени в проведените експерименти представят доказателство за синергичния характер на комбинираното действие на оселтамивир и римантадин при експериментална инфекция с грипен вирус A/H3N2 *in vivo* в бели мишки. Беше

изследван ефектът и доказан протективният ефект на комбинации от дози 200 пъти по-ниски (0.05 mg/kg/day) от оптималните ефективни за оселтамивир и 8-16 пъти по-ниски (5.0 mg/kg/day) от тези на римантадин. Направеното изследване е в съответствие с присъстващите в литературата данни за синергизъм на M2 блокери с оселтамивир в условия *in vitro* срещу вируси тип H1N1, H3N2 и H5N1 [Govorkova и съавт., 2004; Ilyushina и съавт., 2006; Smee и съавт., 2009] и със синергичен ефект при профилактичното приложение както на ниски, така и на високи дози на препаратите спрямо H1N1, H3N2 и H5N1 експериментална инфекция *in vivo* [Masihi и съавт., 2007; Smee и съавт., 2009].

Представените резултати дават още едно доказателство за сложния характер на комбинираното действие на инхибиторите на вирусна инфекция. Постигането на изразен синергичен антивирусен ефект е в зависимост не само от механизма на действие, но и от конкретната комбинация на прилаганите концентрации на веществата. Едни и същи инхибитори, прилагани в различни комбинации на дадени концентрации могат да проявяват адитивен или синергичен ефект.

Що се отнася до тестирането на комбинирани препарати *in vivo* от важно значение са фармакокинетичните параметри на всеки от тях в организма – постигане на добра бионаличност, ефективен клирънс, достигане на таргетните органи и взаимодействие с други субстанции, намиращи се в организма. Проучвания върху фармакокинетиката на оселтамивир, самостоятелно и в комбинация с M2 блокера амантадин не показват лекарствени взаимодействия и/или повишена токсичност в пациенти. Това е от изключително значение, имайки предвид не малкото странични ефекти при индивидуалното им приложение [Hill и съавт., 2002; Morisson и съавт., 2007].

3.2. Проучване на комбинирания ефект в профилактичен курс на оселтамивир и римантадин в дозово съотношение 1:25 срещу грипен вирус A/ H3N2 *in vivo*

3.2.1. Определяне на ефекта на комбинациите върху преживяемостта, индекса на защита и средното време на преживяване

Проведеното в предишния раздел изследване даде убедителни данни за ефекта на комбинация на два антивирусни инхибитора с различен механизъм на действие, ефективни към актуалния причинител на епидемии A/H3N2 грипен вирус. Вземайки под внимание комплексния характер на взаимодействие на инхибиторите, участници в комбинираната терапия, зависещ в голяма степен от конкретните дозови отношения, след като бе доказан синергичният характер на действие в съотношение 1:100 бе проведен панел от експерименти за проучване на същата комбинация но при съчетаване на дози в съотношение 1:25 оселтамивир римантадин. Подборът на дозите отново се определяше спрямо минималните ефективни такива, описани в литературата, като дозите от 0.2 mg/kg и 0.4 mg/kg оселтамивир са 2.5 до 5 пъти по-ниски от минималната ефективна (1 mg/kg) за терапевтика, а дозите от 5 и 10 mg/kg римантадин 2 и 4 пъти по-ниски от описаната, като минимална ефективна, респективно за римантадин (20 mg/kg).

Таблица 7. Ефект на профилактичен курс с комбинацията римантадин и оселтамивир (25:1 дозово съотношение) срещу експериментална инфекция с 10 MLD₅₀ грипен вирус A Aichi/2/68 (H3N2) в мишки

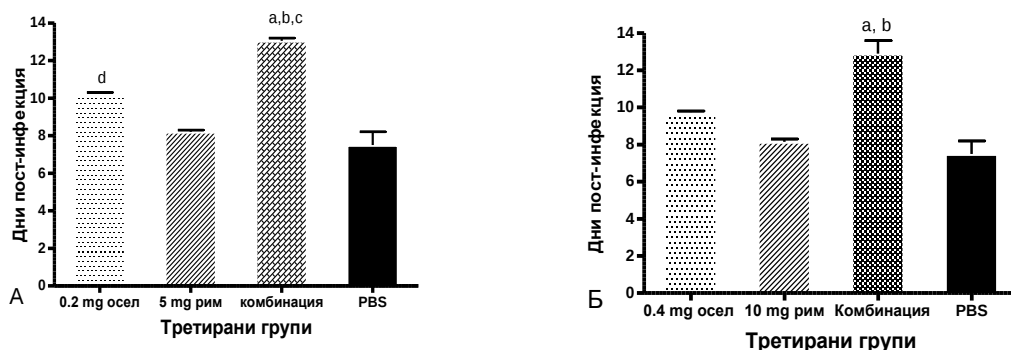
Оселтамивир mg/kg/day	Римантадин	Живи/ Общ брой ^a	Смъртност %	ИЗ %	СВП Дни ± SE ^b
0.4	10	24/30***	20	75	12.9 ± 0.7*
0.4	-	11/30	63.3	23.1	9.8 ± 0.05
-	10	2/29	93	-	8.2 ± 0.15
0.2	5	25/30***	16.7	79.6	13.1 ± 0.15*
0.2	-	13/29	55.2	33.3	10.3 ± 0.05
-	5	6/30	80	0	8.2 ± 0.1
Плацебо PBS		9/45	80.5		7.5 ± 0.7

Във всяка експериментална група бяха третираны 14-15 животни (20-25 в плацебо групата). Експериментите се извършваха в две повторения. Броят на животните е сумиран, а за останалите параметри е представена средната стойност. Статистически анализ: SE – стандартна грешка* P< 0.05 *** P<0.001 спрямо PBS контролна група, ^a Kaplan-Meier Survival analysis (log rank test), ^b t-test

От **Таблица 7** се вижда, че се открояват комбинациите с отчетливо протективен ефект - 0.2 mg/kg оселтамивир с 5 mg/kg римантадин с ИЗ 79.6%, както и 0.4 mg/kg оселтамивир в комбинация с 10 mg/kg римантадин – ИЗ 75%. Трябва да се отбележи, че при първоначалното проучване на комбинацията 0.2 mg/kg оселтамивир с 5 mg/kg римантадин ИЗ бе 34.2% в сравнение с 10.7% и 0% за самостоятелните дози, което ясно демонстрира протективния ѝ ефект (**Таблица 4**).

На базата на изчислените стойности за СВП бяха построени графики за крайния ефект на комбинациите върху удължаването на живота на третираните животни. **Фиг. 7 (А)** представя ефекта на комбинацията 0.2 mg/kg оселтамивир с 5 mg/kg римантадин, където бе установена статистически значима разлика между комбинацията и плацебо контролната група с 5.6 дни, както и с групите при индивидуално приложените терапевтични – 2.8 дни, сравнено с групата 0.2 mg/kg оселтамивир и 4.9 дни с групата 5 mg/kg римантадин. **Фиг. 7 (Б)** представя графично разликите в СВП на експерименталните групи за 0.4 mg/kg оселтамивир 10 mg/kg римантадин и тяхната комбинация, като бяха отчетени разлики от 5.4 дни с вирусната плацебо контрола и комбинирано третираната група, както и 3.1 дни спрямо оселтамивир и 4.7 – римантадин самостоятелно приложени. Липсата на ефект върху СВП на индивидуално приложените дози е логичен резултат, като се има предвид, че използваните дози са от

25 (за оселтамивир) и 4-8 пъти (римантадин) по-ниски от оптималните ефективни и за двата препарата.

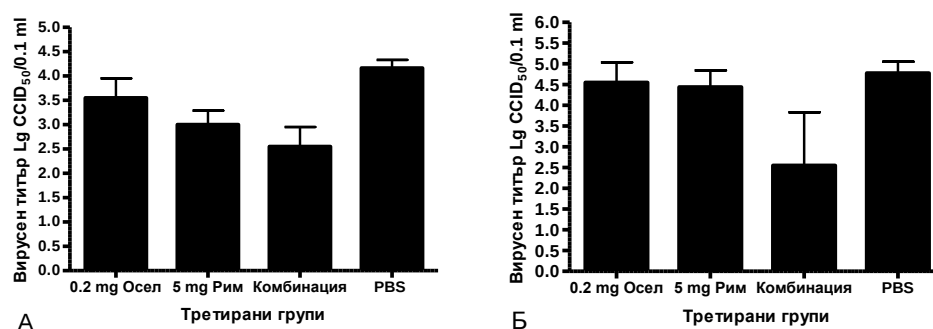


Фиг. 7 (А и Б). Комбиниран ефект на римантадин и оселтамивир в съотношение 25:1 върху средното време на преживяване на експериментално заразени опитни животни с грипен вирус H3N2. (А) 0.2 mg/kg оселтамивир + 5 mg/kg римантадин, (Б) 0.4 mg/kg оселтамивир + 10 mg/kg римантадин

Статистически анализ: One-way ANOVA с Bonferonni's multiple comparison post-test. ^a P<0.01, сравнено с PBS; ^b P<0.01, сравнено с 5 mg/kg римантадин; ^c P<0.05, сравнено с 0.2 mg/kg оселтамивир; ^d P<0.05, сравнено с PBS

3.2.2. Определяне ефекта на комбинациите оселтамивир и римантадин в съотношение 1:25 върху съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове и белодробните показатели

На базата на тези резултати бе проведено изследване ефекта на тези комбинации върху съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове (Фиг.8 А и Б, Фиг. 9 А и Б).

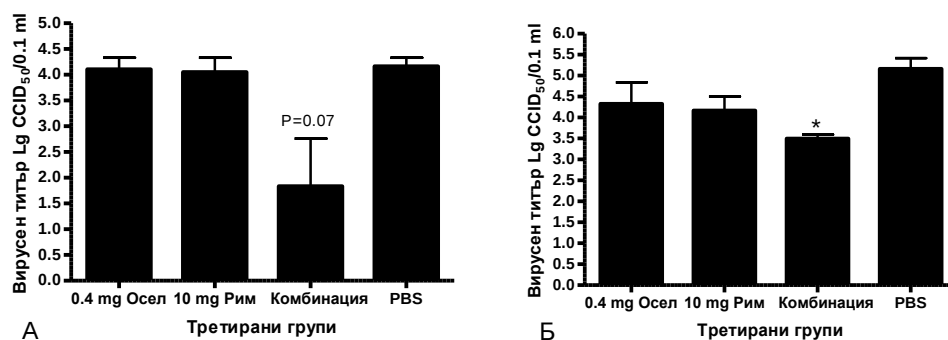


Фиг. 8 (А и Б). Ефект на комбинацията 5 mg/kg римантадин и 0.2 mg/kg оселтамивир върху съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове на мишки, експерименталнозаразени с вирус A/Aichi/2/68(H3N2) на първи ден (А) и на четвърти ден (Б) след вирусната инокулация

Статистически анализ: One-way ANOVA с Bonferonni's multiple comparison post-test

На ден първи бяха отчетени следните разлики между титрите на комбинирано третираните животни с оселтамивир 0.2 mg/kg и римантадин 5 mg/kg: от 1.7 log₁₀ спрямо плацебо контролата, 1 log₁₀ спрямо оселтамивир и 0.5 log₁₀ спрямо римантадин

самостоятелно. За ден четвърти, който отговаря на пика на вирусното съдържание в дробовите, бяха регистрирани $2.2 \Delta\log_{10}$ за комбинацията спрямо плацебо, $1.9 \Delta\log_{10}$ спрямо оселтамивир и $1.8 \Delta\log_{10}$ спрямо римантадин индивидуално. На 1-ви и 4-ти ден беше определено и съдържанието на вирус в белите дробове за групите, третирани с дози 0.4 mg/kg оселтамивир, 10 mg/kg римантадин, комбинацията им и за плацебо контролната група (Фиг. 9 А и Б).



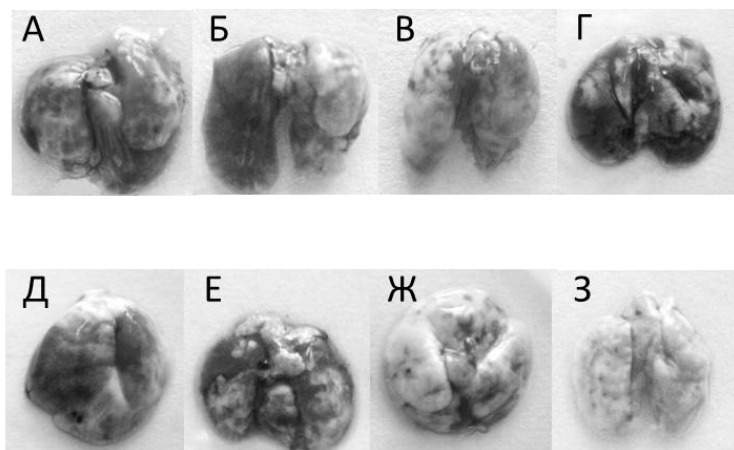
Фиг. 9 (А и Б). Ефект на комбинацията 10 mg/kg римантадин и 0.4 mg/kg оселтамивир върху съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове на мишки, експериментално заразени с вирус A/Aichi/2/68(H3N2) на първи ден (А) и на четвърти ден (Б) след вирусна инокулация

Статистически анализ: One-way ANOVA с Bonferonni's multiple comparison post-test.* P<0.05 Комбинация спрямо PBS контрола

На ден първи бяха регистрирани снижения във вирусния титър на комбинацията римантадин 10 mg/kg с оселтамивир 0.4 mg/kg/day както следва: $2.4 \Delta\log_{10}$ спрямо плацебо групата, $2.3 \Delta\log_{10}$, сравнено с оселтамивир и $2.2 \Delta\log_{10}$ с римантадин самостоятелно-третираните. за 4-ти ден бяха изчислени следните разлики между групите: $1.7 \Delta\log_{10}$ спрямо плацебо, $0.8 \Delta\log_{10}$ спрямо оселтамивир и $0.7 \Delta\log_{10}$ - спрямо римантадин в индивидуален курс.

На шестия ден след вирусната инокулация по три мишки от всяка група бяха сакрифицирани, белите им дробове бяха отделени и изследвани за видимите изменения, резултат от развиващата се вирусна пневмония (Фиг. 10 А-3).

При поражения над $\frac{3}{4}$ -ти от тъканта на дробовите на животни от група плацебо, в комбинирано третирана група, те бяха приблизително $\frac{1}{3}$ -та за комбинацията римантадин 5 mg/kg и оселтамивир 0.2 mg/kg/day и минимални за комбинацията римантадин 10 mg/kg и оселтамивир 0.4 mg/kg/day. Визуално анатомичната картина на дробовите на мишките, третирани с комбинацията наподобяваше тази на интактни – незаразени и нетретирани животни.



Фиг. 10 (А-З). Патоморфологични изменения на бели дробове на мишки, заразени с грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) и третирани в профилактичен курс индивидуално и в комбинация с римантадин и оселтамивир на 6-ти ден след инфекция.

А - 0.2 mg/kg/day оселтамивир; Б - 5 mg/kg/day римантадин; В - 0.2 mg/kg/day оселтамивир с 5 mg/kg/day римантадин; Г - PBS контрола ; Д - 0.4 mg/kg/day оселтамивир; Е - 10 mg/kg/day римантадин; Ж - 0.4 mg/kg/day оселтамивир с 10 mg/kg/day римантадин; З – бели дробове на интактна мишка

Съществуват редица проучвания върху комбинираните ефекти на противогрипни терапевтици, включително и с М2 блокери с невраминидазни инхибитори, прилагани в профилактичен курс при експериментална грипна инфекция. Доказан е подчертан протективен ефект при приложение на комбинации амантадин и оселтамивир спрямо инфекция с високопатогенен H5N1 щам [Ilyushina и съавт., 2007], при начало на лечебния курс 24ч. преди вирусна инокулация, като и с начало 4 ч. преди инфекция [Smee и съавт., 2009]. Демонстриран е повишен защитен ефект на комбинацията върху H9N2 експериментална инфекция с начало на курса 4 ч. преди вирусна инокулация [Leneva и съавт., 2000], както и върху H1N1 (чувствителен и резистентен вариант) и H3N2 инфекция в мишки при профилактичен курс със старт преди вирусното заразяване [Masihi и съавт., 2007]. Проучвания върху други невраминидазни инхибитори (перамивир) в комбинирано приложение с римантадин *in vivo* също установяват синергичен ефект, отново в профилактична схема на прилагане с начало 1 ч. преди инфекция [Bantia и съавт., 2010].

Резултатите от проведените изследвания върху влиянието на подобрите комбинации на римантадин – оселтамивир в съотношение 1:25 върху преживяемостта и върху параметрите на пневмонията дадоха потвърждение на първоначалното ни изследване показало синергичния характер на комбинацията *in vivo* в съотношение 1:100 [Galabov и съавт., 2006].

4. Проучване ефекта на терапевтичен курс с комбинации на римантадин и оселтамивир при H3N2 експериментална инфекция *in vivo*.

4.1. Ефект на терапевтичен курс с комбинацията римантадин и оселтамивир в 25:1 дозово съотношение *in vivo*

4.1.1. Определяне на ефекта на комбинациите върху преживяемостта, индекса на защита и средното време на преживяване

Данните за синергичния характер на действие на оселтамивир и римантадин в профилактичен курс в различни дозови съотношения създадоха интерес и дадоха база за проучването защитния ефект на комбинацията срещу грипна инфекция в терапевтичен курс (начало на лечебния курс след вирусна инокулация).

В следваща серия от експерименти беше изследван защитният ефект на комбинацията оселтамивир и римантадин в съотношение 1:25 с прилагане на веществата 24 часа след интраназална вирусна инокулация с А (H3N2) грипен вирус. В три последователни повторения бяха отчитани отново смъртност, СВП и ИЗ за всички изследвани групи. Бяха подбрани по пет дози, преди това изследвани в профилактичен курс и по-високи от тях, като се спазваше съотношението 25:1 римантадин:оселтамивир (**Таблица 8**).

Комбинацията от 0.2 mg/kg оселтамивир с 5 mg/kg римантадин показала отчетлив протективен ефект в профилактичен курс на лечение, приложена в терапевтичен курс (24 часа след началото на вирусната инфекция) не показва защита върху нито един от изследваните параметри: леталитетът бе значително по-висок – 63.7 %, ИЗ беше 23.3 %, а СВП бе удължено само с 1 ден спрямо вирусната плацебо контрола. Малко по-висок ефект бе наблюдаван за комбинацията на 0.4 mg/kg оселтамивир с 10 mg/kg римантадин с 31.1% ИЗ и 2 дни удължение на СВП.

Индивидуалното прилагане на веществата не показва особен защитен ефект върху заразените животни, с изключение на дозата 3.2 mg/kg оселтамивир (73.9% ИЗ). Изненадващ и неочакван резултат беше отчетен при самостоятелното приложение на римантадин в дозите, считани за оптимални, а именно 80 и 40 mg/kg едва 46.3% и 15.7% ИЗ, съответно.¹ В комбинация, обаче, със съответните дози на другия инхибитор те показаха подчертано благоприятен ефект върху заразените животни с увеличаване ИЗ и СВП.

От **Таблица 8** е видно, че комбинации с ниски дози не повлияха значимо преживяемостта на животните в групите, третирани с комбинациите в сравнение с група плацебо. Комбинациите 0.8 mg/kg с 20 mg/kg, 1.6 mg/kg с 40 mg/kg и 3.2 mg/kg с 80 mg/kg демонстрираха отчетлив защитен ефект с доза-отговор зависим резултат с увеличаване на дозите стойностите за ИЗ съответно бяха: 63.9%, 79.7% и 82.6%. СВП бе удължено с 4.1 дни в комбинацията 0.8 mg оселтамивир + 20 mg римантадин, с 4.2 дни в 1.6 mg оселтамивир + 40 mg римантадин 4.7 дни в 3.2 mg оселтамивир + 80 mg

римантадин. Най-висока степен на защита показва комбинацията на най-високите дози - 80 mg римантадин с 3.2 mg оселтамивир.

Таблица 8. Ефект на терапевтичен курс с комбинацията римантадин и оселтамивир (25:1 дозово съотношение) срещу експериментална инфекция с 10 MLD₅₀ грипен вирус A Aichi /2/68 (H3N2) в мишки

Оселтамивир mg/kg/day	Римантадин	Живи/ Общ брой [§]	Смъртност %	ИЗ %	СВП Дни ± SE ^{§§}
0.2	-	3/29	89,6	5,6	7.7 ± 0.5
0.4	-	12/30	58,7	20,8	9.7 ± 0.8
0.8	-	13/30	57,3	22,9	10.1 ± 0.5
1.6	-	14/30	53,3	27	11.2 ± 0.7
3.2	-	24/30	20,4	73,9	12.8 ± 0.3
-	5	9/30	71,1	5,23	8.9 ± 1.0
-	10	9/30	72,5	13,2	9.8 ± 0.2
-	20	11/30	62,6	18,2	9.8 ± 0.8
-	40	11/30	63,7	15,7	10.0 ± 0.5
-	80	21/30	29,5	46,3	12.5 ± 0.3
0.2	5	11/30	63,7	23,3	9.8 ± 0.3
0.4	10	15/30	52,6	36,1	10.7 ± 1.4
0.8	20	21/30**	31,1	63,9	12.8 ± 0.9*
1.6	40	25/30***	17,4	79,7	12.9 ± 0.6**
3.2	80	25/29***	14,8	82,6	13.4 ± 0.4**
Placebo PBS		17/58	74.1	-	8.7 ± 0.9

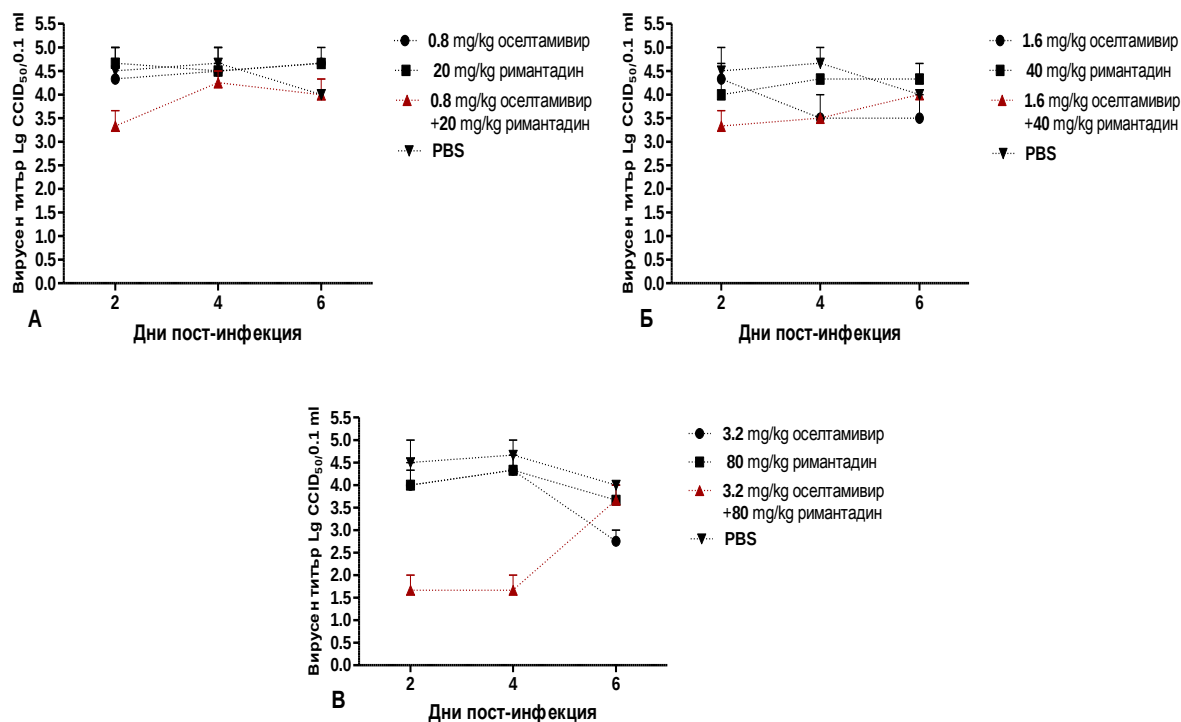
Във всяка експериментална група бяха третираны 9-11 животни (15-23 в плацебо групата).

Експериментите се извършваха в три повторения. Броят на животните е сумиран, а за останалите параметри е представена средната стойност.

Статистически анализ: SE – стандартна грешка[§] - Kaplan-Maier survival (log-rank test), ^{§§}t-test * P<0.05 ** P<0.01, *** P<0.001 сравнено с PBS контролна група

4.1.2. Определяне ефекта на комбинациите оселтамивир и римантадин в съотношение 1:25 върху съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове и белодробните показатели

За комбинациите, показали благоприятен ефект като следваща стъпка беше изследвано съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове на три животни от всяка група на ден 2-ри, 4-ти и 6-ти в клетъчни култури MDCK (Фиг. 11 А-В).



Фиг. 11 (А-В). Ефект на перорално приложена комбинация римантадин и оселтамивир (1:25) върху инфекциозния вирусен титър в белите дробове на мишки, експериментално инокуирани с грипен вирус A/Aichi/2/68(H3N2).

(А) 0.8 mg/kg оселтамивир + 20 mg/kg римантадин, (Б) 1.6 mg/kg оселтамивир + 40 mg/kg римантадин, (В) 3.2 mg/kg оселтамивир + 80 mg/kg римантадин

Статистически анализ: ANOVA one-way analysis of variance

За комбинацията 0.8 mg/kg оселтамивир + 20 mg/kg римантадин бяха отчетени различия в от 0.5 до 1.3 $\Delta \log_{10}$, за 1.6 mg/kg оселтамивир + 40 mg/kg – 0.5 – 1.2 $\Delta \log_{10}$ и за комбинацията от 3.2 mg/kg оселтамивир + 80 mg/kg римантадин най-отчетливо бе снижен титърът до 2 $\Delta \log_{10}$ на 4 ден, когато е пикът в плацебо контролната група. Видно е, че вирусният пик в третираната група с комбинацията е изместен с 48 часа спрямо плацебо групата.

На ден 6-ти след инфекцията паралелно с отчитането на вирусния титър бе измервано теглото на 2-4 мишки и белите им дробове, на базата на които се изчисляваше БИ и беше оценявана степента на белодробна консолидация. Данните са представени в Таблица 9.

Таблица 9. Ефект на терапевтичен курс на комбинации с оселтамивир и римантадин (съотношение 1:25) върху експериментална инфекция с вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) в бели мишки: белодробни параметри

Оселтамивир Римантадин (mg/kg/day)		Средно тегло мишка $\pm$ SE [§] (g)	Средно тегло бял дроб $\pm$ SE [§] (g)	Белодробен индекс (%)	Белодробна консолида ция $\pm$ SE [†]
0.8	-	18.9 $\pm$ 0.3	0.38 $\pm$ 0.02**	2.0	3.5 $\pm$ 0.2
1.6	-	16.7 $\pm$ 0.1	0.42 $\pm$ 0.01**	2.5	3.1 $\pm$ 0.4
3.2	-	21.4 $\pm$ 1.2	0.44 $\pm$ 0.03	2.1	2.3 $\pm$ 0.8
-	20	18 $\pm$ 0.4	0.39 $\pm$ 0.02**	2.2	3.1 $\pm$ 0.2
-	40	18.7 $\pm$ 1.6	0.48 $\pm$ 0.04	2.6	3.3 $\pm$ 0.3
-	80	20 $\pm$ 0.5*	0.39 $\pm$ 0.01*	1.9	2.4 $\pm$ 0.1*
0.8	20	22 $\pm$ 1.5*	0.3 $\pm$ 0.05*	1.4	1.6 $\pm$ 0.8*
1.6	40	20.2 $\pm$ 3.8	0.28 $\pm$ 0.02**	1.4	1.7 $\pm$ 0.8*
3.2	80	23.5 $\pm$ 0.6**	0.21 $\pm$ 0.04**	0.9	0.4 $\pm$ 0.2*
Плацебо PBS		17.4 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.01	2.9	3.7 $\pm$ 0.1
Интактна		24.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.03	0.8	0

Статистически анализ: SE – стандартна грешка, [§] t-test, [†] Mann-Whitney sum rank test * P<0.05, **P<0.01 сравнено с PBS контрола

Резултатите за ефекта на изследваните комбинации, представени в **Таблица 9**, потвърждават защитния ефект, наблюдаван при тестирането им върху преживяемостта и съдържанието на вирус в белите дробове. Най-отчетлив ефект отново демонстрираше комбинацията 3.2 mg/kg оселтамивир + 80 mg/kg римантадин с понижени с 2% в стойностите на БИ и 3.3 пункта в белодробната консолидация. Индивидуално приложеният оселтамивир повлияваше съответно с 0.8 % БИ и с 1.4 пункта БК, римантадинът в доза 80 mg/kg - с 1% БИ и 1.5 пункта БК. Благоприятен ефект върху параметрите на пневмонията бе установен и за другите две комбинации, както е видно от цифровите данни в следващата таблица (9).

4.2. Проучване ефекта на терапевтичен курс с комбинации от оптимални дози римантадин и оселтамивир срещу грипен вирус A/Aichi /2/68(H3N2) *in vivo*

1.2.1. Определяне на ефекта на комбинациите върху преживяемостта, индекса на защита и средното време на преживяване и оценка на характера на взаимодействие

В следваща, финална серия от опити в проучването на различни дози и съотношения на инхибиторите бе изследвано комбинираното действие на 5 и 10 mg/kg/day оселтамивир в комбинация с 40 и 80 mg/kg/day римантадин, които дози са посочени като оптимални (и съответно ½ от оптималните) в наличната литература [Sidwell и съавт.,1997, Узунев, 1996]. ИЗ показаха високи стойности между 75.7% за комбинацията 10 mg/kg/day оселтамивир с 40 mg/kg/day римантадин до пълна защита от 100 % при съчетаване на оптималните дози на двете съединения. Корелативно с ИЗ е и влиянието върху СВП, което е удължено с 5.4 до 6.5 дни в сравнение с плацебо контролната група (10 mg/kg оселтамивир с 40 mg/kg римантадин 10 mg/kg и оселтамивир с 80 mg/kg римантадин).

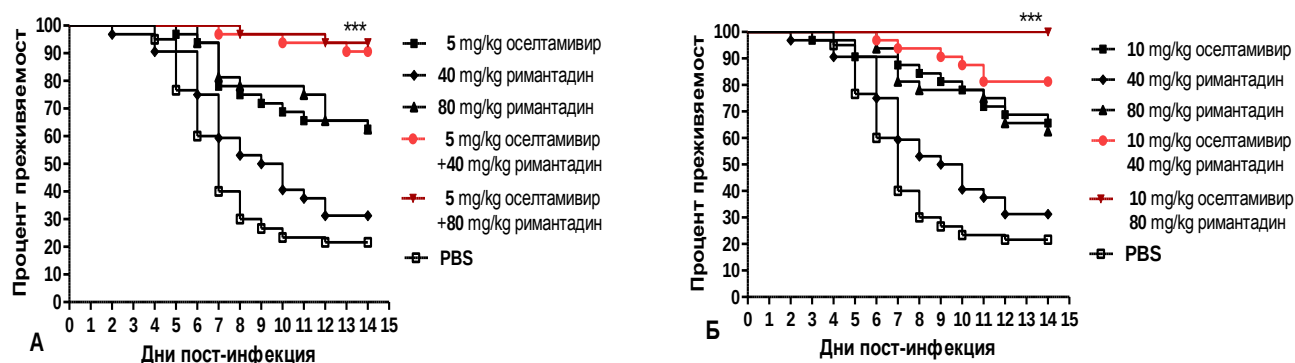
Таблица 10. Ефект на терапевтичен курс с комбинации от оптималните дози на римантадин и оселтамивир върху преживяемостта на мишки, експериментално заразени с A/Aichi/2/68 (H3N2) вирус

Оселтамивир	Римантадин	Живи/ Общ брой [§]	Смъртност (%)	ИЗ (%)	СВП (Дни ± SE ^{§§})
(mg/kg/day)					
5	-	20/32	37.2	52.2	11.0 ± 0.2*
10	-	21/32	33.9	56.5	11.8 ± 0.2*
-	40	10/32	67.8	12.9	8.8 ± 1.2
-	80	20/32	37.2	52.2	11.7 ± 0.8*
5	40	29/32	9.4	87.9	13.6 ± 0.4**
5	80	30/32***	6.1	92.1	13.7 ± 0.2*
10	40	26/32	18.9	75.7	12.9 ± 0.2*
10	80	32/32***	0	100	≥14.0 ± 0.0**
Плацебо PBS		13/60	77.8		7.5 ± 0.6

Статистически анализ: SE – стандартна грешка, [§]Kaplan-Maier survival (log-rank test) ^{§§} t-test * P<0.05 ** P<0.01, сравнено с PBS контрола.

Във всяка експериментална група бяха третирани 9 - 12 животни (20 в плацебо групата). Експериментите се извършваха в три повторения. Броят на животните е сумиран, а за останалите параметри е представена средната стойност.

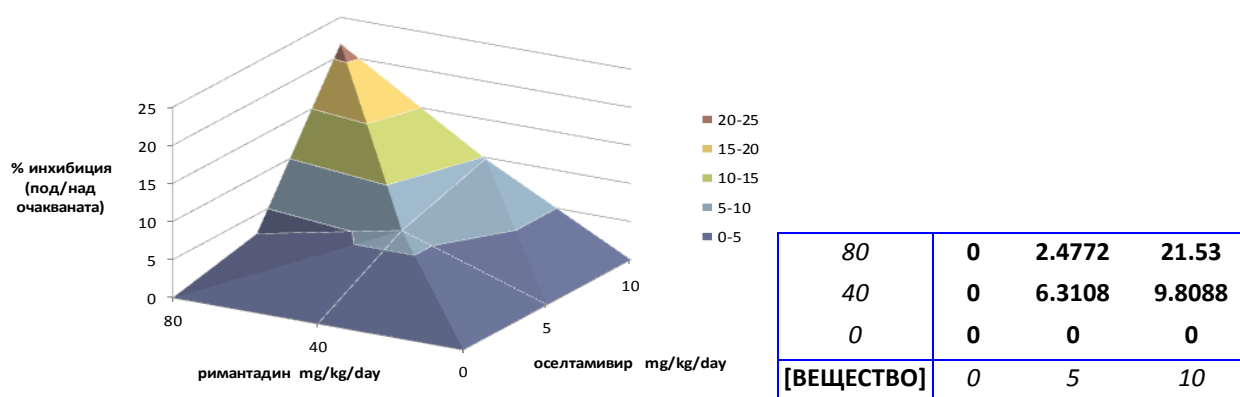
На базата на ежедневното отчитане в броя на преживелите животни в 14-дневния период на наблюдение се построиха кривите на Kaplan-Maier, представящи динамиката в леталитета в третираните групи (Фиг. 12 А и Б).



Фиг.12 (А и Б). Ефект на терапевтичен курс с комбинации от оптималните дози римантадин и оселтамивир върху преживяемостта на мишки, заразени с 10 MLD₅₀ грипен вирус A/Aichi/2/68 (H3N2). (А) 5 mg/kg/day оселтамивир с 40 mg/kg/day и 80 mg/kg/day римантадин, (Б) 10 mg/kg/day оселтамивир с 40 mg/kg/day и 80 mg/kg/day римантадин

Статистически анализ: Kaplan-Meier survival analysis (log rank test) *** P<0.001

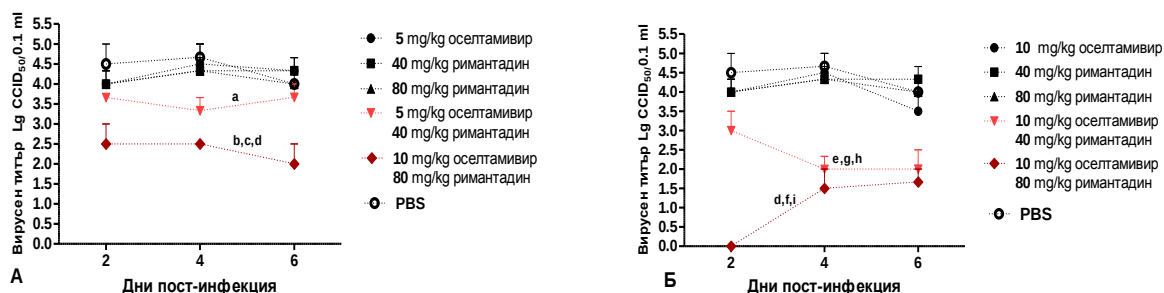
Експерименталните данни за процента смъртност в групите се анализираха с програмата MacSynergy™ и се построи триизмерна графика за оценка за характера на взаимодействие на шахматно приложените комбинации. И за четирите комбинации оценката бе умерен синергичен ефект с отчетлив пик, отговарящ на комбинацията от 10 и 80 mg/kg/day оселтамивир и римантадин – 21.5% инхибиция. Не бе наблюдаван характер на антагонистично взаимодействие за нито една от комбинациите. Общият синергизъм бе 40.1 при 95% интервал на доверителност (Фиг. 13).



Фиг. 13. Комбиниран ефект на римантадин 40 и 80 mg/kg/day и оселтамивир 5 и 10 mg/kg/day при експериментална инфекция с 10 MLD₅₀ A/Aichi/2/68(H3N2) вирус в бели мишки, представен чрез метода на Prichard & Shipman (95% доверителен интервал, Bonferroni adjustment).

1.2.2. Определяне ефекта на комбинациите с оптимални дози оселтамивир и римантадин върху съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове и белодробните показатели

За ефекта на терапевтичния курс с тези комбинации и индивидуалния ефект на всяка от дозите отново бе проучен ефектът върху титъра на вируса на ден 2-ри, 4-ти и 6-ти и белодробната консолидация – на 6-ти ден след вирусна инокулация. На ден 4-ти, когато бе пикът на вирусната инфекция в белите дробове, бяха регистрирани следните разлики: комбинациите на 5 mg/kg оселтамивир с 40 mg/kg римантадин - с 1.33 $\Delta \log_{10}$, а с 80 mg/kg римантадин – с 2.2 $\Delta \log_{10}$, 10 mg/kg оселтамивир и 40 mg/kg оселтамивир – с 2.66 $\Delta \log_{10}$, а 10 mg/kg оселтамивир с 80 mg/kg римантадин – с 3.16 $\Delta \log_{10}$. За последната бе отчетен 0 $\log_{10}$ на ден 2-ри, което е очевидно доказателство за потиснатото вирусно размножение в началните етапи на инфекцията. От **Фиг. 14 (А и Б)** е видно, че самостоятелно приложените дози на веществата не повлияват особено динамиката на вирусния титър в отчитаните дни.



Фиг. 14 (А и Б) Ефект на терапевтичен курс с перорално приложени оптимални дози на веществата индивидуално и в комбинации върху съдържанието на инфекциозен A/Aichi/2/68(H3N2) вирус в белите дробове на мишки

Статистически анализ: ANOVA one-way analysis of variance (Bonferroni multiple comparisons post-test) **a** – $P < 0.05$ спрямо PBS; **b** – $P < 0.001$ спрямо PBS; **c** – $P < 0.001$ спрямо 5 mg/kg римантадин **d** – $P < 0.001$ спрямо 80 mg/kg римантадин; **e** – $P < 0.01$ спрямо PBS; **f** – $P < 0.001$ спрямо PBS **g** – $P < 0.05$ спрямо 40 mg/kg римантадин; **h** – $P < 0.05$ спрямо 10 mg/kg римантадин **i** – $P < 0.001$ спрямо 10 mg/kg оселтамивир

Като финална стъпка в това изследване бяха определени стойностите на белодробните параметри при терапевтичен курс с оптимални дози и техните комбинации на римантадин и оселтамивир (**Таблица 11**).

Таблица 11. Ефект на терапевтичен курс с комбинации от оптималните дози на римантадин и оселтамивир върху преживяемостта на мишки, експериментално заразени с 10 MLD₅₀ вирус A/Aichi/2/68(H3N2): белодробни параметри

Оселтамивир Римантадин (mg/kg/day)		Средно тегло мишка $\pm$ SE [§] (g)	Средно тегло бял дроб SE [§] (g)	Белодробен индекс (%)	БК $\pm$ SE [†]
5	-	21 $\pm$ 1.2	0.39 $\pm$ 0.02*	1.9	2.6 $\pm$ 0.1*
10	-	23.8 $\pm$ 0.4**	0.38 $\pm$ 0.05	1.6	1.5 $\pm$ 0.4*
-	40	18.7 $\pm$ 1.6	0.48 $\pm$ 0.04	2.6	3.3 $\pm$ 0.3
-	80	20 $\pm$ 0.5*	0.39 $\pm$ 0.01**	1.9	2.4 $\pm$ 0.1*
5	40	23.6 $\pm$ 0.2**	0.38 $\pm$ 0.03*	1.6	1.1 $\pm$ 0.2*
5	80	20.1 $\pm$ 0.0	0.27 $\pm$ 0.07*	1.5	0.8 $\pm$ 0.6*
10	40	23.4 $\pm$ 7.0	0.29 $\pm$ 0.05*	1.2	0.4 $\pm$ 0.2*
10	80	23.1 $\pm$ 1.9*	0.28 $\pm$ 0.02***	1.2	0.8 $\pm$ 0.1*
Плацебо PBS		17.4 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.01	2.9	3.7 $\pm$ 0.1
Интактна		24.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.03	0.8	0

Статистически анализ: SE – стандартна грешка, [§] t-test, [†] Mann-Whitney sum rank test * P<0.05 ** P <0.01 , *** P <0.001 сравнено с PBS контрола

Трябва да се отбележи, че прилагането на оптималните и половината на оптималните дози на препаратите, както индивидуално, така и в комбинация, препятства значително загубата на тегло вследствие на грипната инфекция у опитните животни. По отношение на увеличението в теглото на белите дробове, като пряк резултат от възпалението и натрупването на ексудат, в комбинирано-третираните групи то беше съществено редуцирано (средно 0.2 g разлика с теглото на плацебо-третираните животни), докато в тези, подложени на монотерапия, дробовете бяха приблизително с 0.1 g по-леки от контролната група. Като резултат от тези измервания, протективният ефект на комбинациите бе потвърден и от изчислените стойности на БИ и БК (**Таблица 11**).

От така представените данни, при които е характеризирано за пръв път комбинираното действие на M2 блокер (римантадин) с неврамидазен инхибитор (оселтамивир) в терапевтичен курс, може да се направи изводът, че при 24-часово закъснение на терапията с противовирусни вещества в комбинация, за да бъде ефективна тя, са необходими по-високи дози, в сравнение с профилактичната схема. Това е в известен смисъл разочароващ факт, от гледна точка на една от целите на комбинираната терапия, а именно понижаване на дозите и страничните ефекти на препаратите. От друга страна, комбинираната терапия на инфекции с високопатогенни вируси, като например H5N1, вероятно би изисквала прилагане на оптимални дози на

медикаментите, за да се намали риска от забавяне в ефекта. Изследването на терапевтичния курс на приложение е от изключителна важност, тъй като е много по-близо до реалната клинична ситуация, при която лекарствените препарати се приемат след появата на първите симптоми (12-72 ч.) след началото на инфекцията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Към настоящия момент римантадин и оселтамивир са най-добре проучените препарати за екстремна профилактика на грип (профилактика прилагана по време на инкубационния период) и терапия за грипна инфекция. В последните години, степента на резистентност към антигрипните химиотерапевтици на циркулиращите човешки щамове нараства с бързи темпове. Непрекъснато се увеличава и броят на публикувани данни в литературата за нежелани странични ефекти при употреба на противогрипни препарати.

Необходим е постоянен и прецизен мониторинг на чувствителността на вирусите към инхибитори, както и търсене на нови подходи в лечението на грипа. Клиничното приложение на комбинацията оселтамивир и римантадин е препоръчана при случаи на грипна инфекция със сезонни щамове в пациенти, при които употребата на занамивир е противопоказна [CDC HEALTH ADVISORY Distributed via Health Alert Network Friday, December 19, 2008, 11:50 EST(11:50 AM EST) CDCHAN-00279-2008-12-19-ADV-N].

Проучена бе степента на чувствителност към римантадин, занамивир и оселтамивир на изолати на грипни вируси от България, 2004-2007 г, както с фенотипни методи, така и с генетичен анализ на сегментите, кодиращи мишените на противовирусните вещества. Бе потвърден синергичният характер на действие на римантадин и оселтамивир в клетъчни култури срещу репликацията на грипен вирус А (H3N2). За пръв път бе изследван ефектът на двете вещества, приложени в комбинация в опитни животни в профилактичен курс върху експериментална инфекция с вирус А (H3N2). Действието беше изпитано при различни дозови съотношения на препаратите. Беше разработена схема на комбинирано приложение на римантадин и оселтамивир в терапевтичен курс, също при различни съотношения на дозите. Представените в настоящата дисертация резултати, до голяма степен са потвърдени и от данните, публикувани от други автори.

Основните цели на използване на комбинираната терапия на невраминидазен инхибитор с M2-блокатор е ограничаване развитието на резистентност, както и проявата на странични ефекти. В сложна епидемиологична обстановка, на едновременно циркулиращи чувствителни и резистентни към различни терапевтици вируси, определянето на чувствителността е от първостепенна важност, а подходът на лечение с комбинирано им приложение е подходяща алтернатива за борба със заболяването.

ИЗВОДИ

1. При определяне на фенотипната чувствителност към М2 блокера римантадин на 23 сезонни щама тип Н3Н2 и Н1Н1, изолирани в България в периода 2004-07 г., 85 % Н3Н2 и 80% Н1Н1 бяха чувствителни към химиотерапевтика в клетъчни култури.
2. При характеризирание на фенотипната чувствителност към невраминидазни инхибитори (оселтамивир и занамивир) на 16 клинични изолата Н3Н2 и Н1Н1, циркулиращи в България в периода 2004-2007 г. чрез определяне на IC_{50} с флуоресцентен субстрат MUNANA всички бяха определени като чувствителни.
3. Секвенционният анализ на генен сегмент М на 17 изследвани вируса тип А показаха наличие на генетичен маркер на резистентност към М2 блокери S31N във вирус A/Sofia/1250/2006(Н3Н2), демонстрирал и фенотипна резистентност в клетъчни култури. Не бяха установени генетично резистентни варианти към невраминидазни инхибитори сред 16-те изследвани изолата при анализа на последователностите на NA сегмент.
4. Комбинираният ефект на оселтамивир карбоксилат и римантадин хидрохлорид върху репликацията на грипен вирус A/Aichi/2/68(Н3Н2) в клетъчни култури е основно със синергичен и адитивен характер.
5. Комбинираното приложение на оселтамивир фосфат и римантадин хидрохлорид в профилактичен курс при дневни дози до 200 пъти по-ниски от оптималните за оселтамивир и 8-16 пъти по-ниски за римантадин върху експериментална инфекция с грипен вирус А(Н3Н2) демонстрира изразен антивирусен ефект (редукция в леталитета, увеличение на индекса на защита и средното време на преживяване). Ефектът бе характеризиран като синергичен.
6. Защитният ефект на комбинацията 0.05 mg/kg/day оселтамивир и 5.0 mg/kg/day римантадин в дозово съотношение 1:100 бе доказан чрез значителното намаление в съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове и изместването на вирусния пик с 24 часа, както и чрез редукцията на параметрите на белодробната патология – белодробен индекс и консолидация.
7. Профилактичен курс с оселтамивир фосфат и римантадин хидрохлорид в дози за оселтамивир 25 пъти по-ниски от оптималните и 4-8 пъти, по-ниски за римантадин, комбинирани при дозово съотношение 1:25 проявяват изразен протективен ефект срещу експериментална инфекция с 10 MLD₅₀ грипен вирус А(Н3Н2) в бели мишки. Ефектът бе доказан чрез проследяване на смъртността, индекса на защита и средното време на преживяване.
8. Комбинациите 0.2 и 0.4 mg/kg/day оселтамивир с 5.0 и 10 mg/kg/day римантадин, приложени профилактично, потискат значително вирусната репликация в белите дробове на опитните животни, както и развитието на патоморфологичните изменения на белодробната тъкан вследствие инфекция с грипен вирус А (Н3Н2).
9. Комбинациите от 0.8, 1.6 и 3.2 mg/kg оселтамивир фосфат с 20, 40 и 80 mg/kg римантадин хидрохлорид при дозово съотношение 1:25, приложени терапевтично

(24 часа след вирусна инокулация) в бели мишки, демонстрират протективен ефект върху преживяемостта на животните. Този ефект се проявява и чрез потискане на вирусното размножение в белите дробове и белодробното възпаление. Комбинациите 0.2 и 0.4 mg/kg/day оселтамивир с 5.0 и 10 mg/kg/day римантадин в дозово съотношение 1:25 не проявяват защитен ефект върху преживяемостта при терапевтичното им приложение.

10. Комбинациите от оптималните ефективни дози 5 и 10 mg/kg оселтамивир фосфат с 40 и 80 mg/kg римантадин хидрохлорид, приложени в терапевтичен курс (24 часа след експериментална вирусна инфекция A(H3N2)), проявяват синергичен характер и силно изразен защитен ефект върху преживяемостта на опитните животни. Той бе доказан и чрез значителното намаление в съдържанието на инфекциозен вирус в белите дробове и съществена редукция на параметрите на белодробни поражения – белодробен индекс и консолидация.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е установена висока ефективност на комбинацията на M2 блокера римантадин хидрохлорид с невраминидазния инхибитор оселтамивир спрямо вирус H3N2 при експериментална инфекция в мишки и е доказан синергичният характер на комбинацията в профилактичен курс на приложение.
2. За първи път е доказана ефективността на профилактичния курс при комбинирането на двата химиотерапевтика оселтамивир и римантадин при различни дозови съотношения (1:100 и 1:25).
3. За първи път е определен терапевтичният ефект на комбинацията на двете съединения в дозово съотношение 1:25, както и на оптималните им ефективни дози.
4. За пръв път у нас е изследвана и характеризирана фенотипната чувствителност към M2 блокери и невраминидазни инхибитори, както и са проучени генетичните маркери на резистентност към двата класа противогрипни химиотерапевтици на сезонни грипни вируси А, изолирани в България.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Galabov, A.S., **Simeonova, L.**, Gegova, G., **2006**. Rimantadine and oseltamivir demonstrate synergistic combination effect in an experimental infection with type A (H3N2) influenza virus in mice. *Antivir. Chem. Chemother.* 17: 251-258.
2. **Simeonova, L.S.** and Galabov, A.S., **2011**. Chemotherapy of Influenza: Current and Novel Approach. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 25(5): in press.

СПЕЦИАЛИЗАЦИИ И УЧАСТИЯ С НАУЧНИ ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

СПЕЦИАЛИЗАЦИИ:

16/05 – 08/08/2010 – FEMS research fellowship

Centre National de Référence du Virus Influenzae (Région France Nord),

Unité de Génétique Moléculaire des Virus à ARN, Institut Pasteur, Paris, France. MOLECULAR DETECTION OF GENETIC MARKERS OF RESISTANCE OF INFLUENZA VIRUSES TO NEURAMINIDASE INHIBITORS AND ADAMANTANES.

Ръководител: Prof. Dr. Sylvie van der Werf

УЧАСТИЯ С НАУЧНИ ДОКЛАДИ

Simeonova, L., Gegova G., Mukova L., Galabov A.S., Koceva R., van der Werf S. *SUSCEPTIBILITY TO NEURAMINIDASE INHIBITORS AND M2 BLOCKERS OF SOME SEASONAL INFLUENZA STRAINS ISOLATED IN BULGARIA 2004-2007.* 24th International Conference of Antiviral Research, Sofia, Bulgaria, 08/05-11/05/2011 г.

Simeonova, L., Gegova G., Mukova L., Galabov A.S., Koceva R., van der Werf S. *PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF RESISTANCE TO NEURAMINIDASE INHIBITORS AND M2 BLOCKERS OF INFLUENZA SEASONAL STRAINS, ISOLATED IN BULGARIA 2004-2007.* 12th Конгрес на микробиолозите в България, Юндола, България, 11/10 – 14/10/2010 г.

Simeonova, L., Gegova G., Galabov A.S., *COMBINATION OF RIMANTADINE AND OSELTAMIVIR ADMINISTERED IN A THERAPEUTIC COURSE IS PROTECTIVE AGAINST INFLUENZA A(H3N2) VIRUS INFECTION IN VIVO.* 6th Balkan Congress of Microbiologists Microbiologia Balkanica, Ohrid, Macedonia, 28/10 – 31/10/2009 г.

Simeonova, L., Gegova G., Mukova L., Galabov A.S. *RIMANTADINE AND OSELTAMIVIR COMBINATION EFFECTS IN A THERAPEUTIC COURSE OF APPLICATION AGAINST INFLUENZA A(H3N2) IN MICE.* 22nd International Conference of Antiviral Research, Miami, Florida, USA, 03/05-07/05/2009 г.

Simeonova, L., Gegova G., Mukova L., Galabov A.S. *PERSPECTIVE CHEMOTHERAPEUTIC COMBINATION TO COMBAT FLU.* II World Conference on Magic Bullets (Paul Ehrlich II), Nurnberg, Germany, 02/10-05/10/2008 г.

Simeonova, L., Gegova G., Mukova L., Galabov A.S. *IN VIVO SYNERGISTIC COMBINATION EFFECT OF RIMANTADINE AND OSELTAMIVIR AGAINST INFLUENZA A(H3N2) VIRUS IS MANIFESTED IN SEVERAL DOSE RATIOS.* 21th International Conference of Antiviral Research, Montreal, Canada, 17/04- 21/04/2008 г.

Simeonova, L., Gegova G., Galabov A.S. *IN VIVO SYNERGISTIC COMBINATION EFFECT OF RIMANTADINE AND OSELTAMIVIR AGAINST INFLUENZA A(H3N2) VIRUS IS MANIFESTED IN SEVERAL DOSE RATIOS.* 5th Balkan Congress of Microbiologists Microbiologia Balkanica, Budva, Montenegro, 24/10 – 27/10/2007 г.

Simeonova, L., Gegova G., Galabov A.S. *СИНЕРГИЧЕН ХАРАКТЕР НА КОМБИНИРАНО ДЕЙСТВИЕ НА РИМАНТАДИН И ОСЕЛТАМИВИР ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ИНФЕКЦИЯ С С ГРИПЕН ВИРУС А/Н3Н2 IN VIVO.* 11th Конгрес на микробиолозите в България, Св. Константин и Елена, България, 5/11– 7/11/2006 г.

Simeonova, L., Gegova G., Galabov A.S. *RIMANTADINE AND OSELTAMIVIR DEMONSTRATE SYNERGISTIC COMBINED EFFECT IN EXPERIMENTAL INFECTION WITH A/H3N2 INFLUENZA VIRUS IN MICE (устен доклад).* 4th Balkan Congress of Microbiologists Microbiologia Balkanica, Bucharest, Romania, 23/11/2005 – 26/11/2005 г.

БЛАГОДАРЯ НА:

- ❖ Научния си ръководител **проф. д-р Ангел С. Гълъбов** за идеите, насоките, доверието, споровете в работата по настоящата дисертация.
- ❖ На **доц. д-р Юлия Серкеджиева** и **доц. д-р Любка Думанова** за обективния и критичен прочит, бележките и съветите към дисертацията.

ИЗКАЗВАМ ИСКРЕНАТА СИ БЛАГОДАРНОСТ НА:

- ❖ **Галина Гегова** за огромната подкрепа при нелеката работа с опитните животни, както и за моралната опора, приятелството и напътствията, за финеса и коректността, които ми даваха сили.
- ❖ **Лучия Мукова** за съдействието при експерименталната работа в клетъчни култури.
- ❖ **Екипа** от Референтната лаборатория по грип за Северна Франция за помощта при генетичния анализ на вирусните щамове, изолирани в България.

СЪРДЕЧНО БЛАГОДАРЯ НА:

- ❖ **Доц. д-р М. Милева, д-р Е. Боджева, проф. д-р Н. Белев, проф. д-р В. Савов** за академичния и емоционалния кураж.
- ❖ **Прекрасните си Семейство и Приятели** за обичта и изключителното търпение, без които нямаше да се справя, както и на **Учителите** си, че възпитаха у мен необходимостта от знание и на **учениците** си, че я поддържат.

