

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, ИНГИБИРУЮЩИЕ РАЗМНОЖЕНИЕ АРЕНАВИРУСОВ *IN VITRO*

Богданова Н.Л., Рустамова Л.М., Красько А.Г., Фомина Е.Г., Семижон П.А., Петкевич А.С.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Республика Беларусь

Реферат. Этиотропные лекарственные средства, применяемые для лечения лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) и геморрагической лихорадки (ГЛ) Ласса практически отсутствуют, специфическая профилактика не разработана. Были исследованы следующие лекарственные средства: ланатозид Ц, цитовир-3, амиксин и амизон.

Ключевые слова: аренавирусы, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус Ласса, вирусингибирующая активность, лекарственные средства.

Введение. Вирус лимфоцитарного хориоменингита и вирус Ласса являются представителями РНК-содержащих вирусов семейства *Arenaviridae*, вызывающих одноименные лихорадки с выраженным геморрагическим синдромом. Относятся к антропозоонозным природно-очаговым инфекциям. Геморрагические лихорадки, вызываемые этими возбудителями, высоко контагиозны. Возбудитель передается воздушно-капельным или алиментарным путями. Заболевание, вызываемое вирусом ЛХМ, регистрируется повсеместно, в т. ч. на территории Республики Беларусь. При осложненной форме ЛХМ в 7–10 % случаев возможен летальный исход. Смертность при геморрагической лихорадке Ласса может достигать 80%. Лихорадка Ласса, относится к категории особо опасных вирусных инфекций, встречается во многих странах Африки и может быть завезена из эндемичных территорий. Описан ряд случаев распространения вируса Ласса из Западной Африки в Европу и Северную Америку. По определению Национального института аллергии и инфекционных болезней (США) аренавирусы категории А, в т. ч. лихорадка Ласса, принадлежат к патогенам, которые могут быть использованы в качестве биологического оружия. [1–3].

В настоящее время практически отсутствуют эффективные средства этиотропной и неспецифической защиты от возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций, а имеющийся в современной медицинской практике арсенал противовирусных лекарственных средств ограничен. Применение рибавирина, известного противовирусного средства, сопряжено с ухудшением качества жизни пациента, поскольку данный препарат токсичен и имеет ряд побочных эффектов.

Научный интерес представляет поиск противовирусных препаратов не только синтетической природы, но и растительного происхождения. Биологически активные вещества (БАВ), содержащиеся в быстро делящихся клетках растений (эволюционный аналог эмбриональных и стволовых клеток млекопитающих), обладают уникальными регуляторными, некоторые из них — противовирусными свойствами. Например, известно, что сердечные гликозиды являясь активными действующими веществами листьев наперстянки, семян строфанта, плодов ландыша применяются в течение уже нескольких веков в медицине, причем раньше их использовали для лечения самых разных болезней, таких как туберкулеза, сифилиса, эпилепсии и др. В структуре сердечных гликозидов выделяют две основные части: сахаристую часть (гликон), представляющую собой цепочку сахаров, которых может быть от одного до четырех, и несахаристая часть (агликон), в которую входит стероидный фрагмент и лактонное кольцо. Сахара, входящие в структуру сердечных гликозидов, определяют их водо- и липидорастворимость и поэтому существенно влияют на скорость развития и длительность действия препаратов. В свою очередь агликон ответственен за весь спектр эффектов сердечных гликозидов, включая их способность связываться с белками различных тканей в организме в зависимости от полярности молекул: чем меньше полярность, тем больше связь (у дигитоксина — 97%, у дигоксина и целанида — 15–30%). Таким образом, можно заключить, что гликон определяет кинетику, а агликон — фармакодинамику сердечных гликозидов [4, 5].

Учитывая высокую контагиозность вируса Ласса, растущие международные связи, миграцию населения и необходимость обеспечения биологической безопасности Республики Беларусь актуальными являются исследования по изучению противовирусной активности лекарственных средств.

Лекарственные средства с установленной вирусингибирующей активностью могут быть рекомендованы к использованию в схемах терапии вирусных инфекций по новому назначению, что расширяет их спектр применения. Ранее нами изучены противовирусные свойства ряда фармакопейных препаратов на моделях арена-, ортомиксо- и флавивирусов с выявлением противовирусной активности [6].

Лекарственные средства для исследований отобраны с учетом свойств, механизма действия их активных компонентов. Учитывались также особенности патогенетических изменений, индуцируемых вирусом в результате развития инфекционного процесса в организме человека.

Все лекарственные средства применяли в концентрациях, не вызывающих цитодеструктивных изменений монослоя культур клеток.

Цель работы — оценка вирусингибирующих свойств лекарственных средств на растительной основе и синтетической природы в системе *in vitro* на модели вирусов ЛХМ и Ласса, обладающих различными фармакологическими свойствами.

Материалы и методы. *Вирусы.* В работе использовали вирус ЛХМ, штамм Armstrong, вирус Ласса, штамм Josiach. Вирусы хранятся в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск. Восстановление и накопление инфекционного материала для исследований осуществляли пассированием вирусов в перевиваемой культуре клеток почки африканской зеленой марьшанки Vero E6.

Для подтверждения аутентичности вирусов ЛХМ и Ласса использовали молекулярно-генетические методы. Для исследования вируса ЛХМ — метод обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени по технологии TaqMan (с применением гибридационно-флуоресцентной пробы) производства государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии». Для анализа комплементарной нуклеотидной последовательности генома вируса ЛХМ использовали участок в 3'-нетранслируемой области S-сегмента, который проводили с помощью программного обеспечения прибора IQ 5 для ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени». Для вируса Ласса реакцию обратной транскрипции проводили со случайными праймерами с использованием набора «Реверта-L», производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии (РФ). Полученную в результате реакции комплементарную ДНК (кДНК) использовали для постановки ПЦР. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Лекарственные средства. Исследованы препараты синтетической природы: Цитовир-3, ЗАО «Цитомед», Санкт-Петербург; Амизон, ОАО «Фармак», Украина; Амиксин (тилорон), ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм» и ЛС растительного происхождения — Ланатозид Ц (Lanatoside C) — гликозид листьев наперстянки шерстистой, Nobilus Ent, Польша. Рабочие концентрации ЛС готовили на физиологическом растворе или бидистиллированной воде.

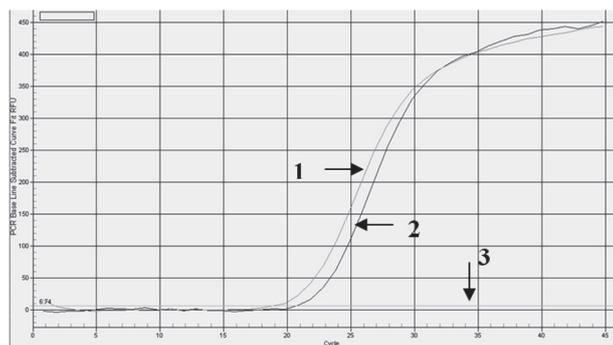
Определение токсических свойств препаратов на культуре клеток. В работе использовали трехсуточную культуру клеток Vero E6. ЛС вносили в разных концентрациях в среду поддержки ДМЕМ (Sigma) с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки. Результат учитывали через 36–72 ч. Токсичность исследуемых лекарственных средств оценивали по четырехкрестовой системе, анализируя морфологию клеток и целостность монослоя при микроскопировании в инвертированном микроскопе. За максимально переносимую концентрацию принимали 1/2 дозы, при которой не определялось цитопатическое действие препарата.

Определение противовирусной активности препаратов в культуре клеток Vero E6. Во флаконы с культурой клеток, зараженной вирусами с множественностью инфицирования 0,1–0,001 БОЕ/клетка, вносили исследуемые лекарственные средства в составе агарового покрытия в максимально переносимых концентрациях (МПК), а также последовательных двукратных разведениях, рассчитанных для каждого препарата. В качестве контроля использовали зараженные вирусом культуры клеток Vero E6, необработанные препаратом. На 4-е сут вносили раствор нейтрального красного в опытные и контрольные образцы для визуальной идентификации сформировавшихся негативных колоний. Противовирусную активность определяли методом редукции бляшек в присутствии препарата в сравнении с контрольными культурами клеток. Максимально активной концентрацией считали 1/2 концентрации лекарственного средства, не вызывающего цитодеструктивных изменений монослоя культуры клеток Vero. Минимально активной концентрацией считали ту, которая снижала титр вируса на 1,5–1,7 lg БОЕ/мл. Эффективность препарата оценивали по значению химиотерапевтического индекса (ХТИ), который вычисляли по отношению МПК/МАК. Препараты с ХТИ = 2 считали слабо активными, с ХТИ ≥ 4 — средней активности, при ХТИ ≥ 8 — высоко активными. Перспективными для дальнейшего изучения считали препараты, у которых ХТИ был равен или выше 4.

Статистическую обработку результатов всех экспериментов проводили путем вычисления средней геометрической титра для каждой пробы, определяемую в 3-х повторах для каждой группы нетоксичных и эффективных концентраций каждого исследуемого на противовирусную активность лекарственного средства в соответствии с методическими рекомендациями Ашмарина И.П. и Воробьева Л.А. [7]. Достоверность различий титров, выраженных в lg БОЕ/мл, вычисляли с помощью t-критерия Стьюдента–Фишера. Полученные данные считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследованы восстановленные штаммы вирусов ЛХМ и Ласса по подтверждению их аутентичности. Для этой цели подобраны пары праймеров к вирусам ЛХМ и Ласса и проведены молекулярно-генетические исследования.

Регистрацию накопления продуктов амплификации фрагментов ДНК вируса ЛХМ осуществляли с помощью анализа кривых накопления флуоресцентного сигнала. Установлено наличие специфических фрагментов генетического материала вируса ЛХМ, определенное с помощью контрольной положительной пробы (К+ПЦР), содержащей диагностически значимый фрагмент РНК вируса ЛХМ, амплифицированной в одном эксперименте с РНК, выделенной из клинических образцов (К-ПЦР, отрицательный контроль (рисунок 1)).



1 — амплификат исследуемого образца; 2 — амплификат положительного контрольного образца;
3 — амплификат отрицательного контрольного образца

Рисунок 1. — Амплификация фрагмента 3'-нетранслируемой области S-сегмента генома вируса ЛХМ с детекцией сигнала в режиме реального времени

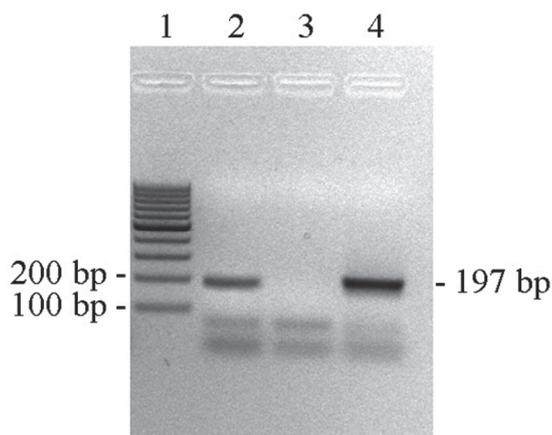
В ОТ-ПЦР установлено, что используемые праймеры фланкируют фрагмент генома размером 156 нуклеотидных основания (позиции в геноме для прямого праймера — 3222–3240, для обратного праймера — 3361–3377) согласно нуклеотидной последовательности штамма Armstrong. Как показали результаты в образцах, взятых для исследования, содержится генетический материал вируса лимфоцитарного хориоменингита:

Arena-For 5'-3'	3222–3240	156 н.п.
Arena-Rev 5'-3'	3361–3377	S- сегмент вируса ЛХМ

Для подтверждения аутентичности вируса Ласса использовали пару олигонуклеотидов (праймеров), ограничивающих фрагмент L-сегмента вирусного генома размером 197 bp:

Arena-For	5'-AGCCTGATCCCAGATGCCACACA TCTAG-3'	5190-5218	197 н.п.
Arena-Rev	5'-TGCTGTTGGAGCGGCTGATGGTC TCAG-3'	5360-5387	L- сегмент вируса Ласса

В результате анализа продуктов амплификации показано, что на матрице РНК исследуемого образца вируса Ласса амплифицируется характерный для данного вируса кДНК-фрагмент размером 197 н.п. Его присутствие выявлено в образце, выделенном из вирусосодержащей культуральной жидкости (положительная проба). В остальных образцах наличие характерного фрагмента РНК вируса Ласса не обнаружено (рисунок 2).



Дорожки: 1 — ДНК-маркер 100 bp; 2 — результат амплификации на матрице, выделенной из культуральной жидкости, содержащей вирус Ласса, штамм *Josiach*; 3 — отрицательный контрольный образец;
4 — положительный контрольный образец

Рисунок 2. — Результаты идентификации вируса Ласса, выделенного из вирусосодержащей культуральной жидкости

В результате исследований лекарственных средств на модели вируса ЛХМ нами установлены следующие показатели противовирусной активности: лекарственное средство ланатозид Ц в дозе МПК и в 1/2 этой дозы полностью подавлял размножение вируса ЛХМ, в дозе 0,06 мкг/мл — снижал инфекционный титр на 1,6 lg БОЕ/мл по сравнению с контролем, ХТИ = 8. Лекарственное средство амиксин в МПК, равной 12,5 мкг/мл и половине

этой дозы, полностью подавлял размножение вируса, в концентрации 3,0 мкг/мл — был практически не активен; его ХТИ = 2. Показатель ХТИ лекарственного средства цитовир-3 также был равен 2. У лекарственного средства амизон противовирусная активность не выявлена (таблица 1, рисунок 3).

Таблица 1. — Изучение противовирусных свойств лекарственных средств различной природы на модели вируса ЛХМ

Лекарственное средство	Концентрация, мкг/мл	Титр вируса, lg БОЕ/кл	Снижение титра вируса, lg БОЕ/кл	ХТИ МПК/МАК
Контроль вируса	0	6,0	—	—
Ланатозид Ц	0,5	0	6,0	8
	0,25	0	6,0	
	0,125	3,4	2,6	
	0,06	4,4	1,6	
Цитовир-3	100	0	6,0	2
	50	4,5	1,5	
	25	5,8	0,2	
Амиксин	12,5	4,2	1,8	2
	6,0	4,5	1,5	
	3,0	5,9	0,1	
Амизон	800	5,8	0,2	2
	400	6,0	0	
	200	6,0	0	

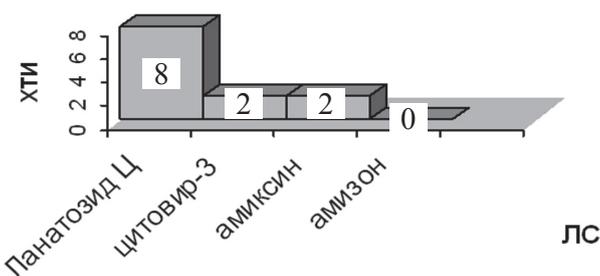


Рисунок 3. — Ингибирующая активность лекарственных средств в культуре клеток Е6, инфицированных вирусом ЛХМ

На модели вируса Ласса исследованы лекарственные средства со значениями ХТИ, равными или выше 4. Таким препаратом явился ланатозид Ц. Действие лекарственного средства ланатозид Ц было исследовано в тех же концентрациях, что и при инфицировании культур клеток Vero E6 вирусом лимфоцитарного хориоменингита.

Лекарственное средство ланатозид Ц в МПК, равной 0,5 мкг/мл, ингибировал размножение вируса Ласса на 4,8 lg, а в 1/4 этой концентрации препарат снижал инфекционный титр на 1,7 lg, ХТИ = 4, средняя активность (таблица 2).

Таблица 2. — Изучение противовирусных свойств лекарственного средства ланатозид Ц на модели вируса Ласса

Лекарственное средство	Концентрация, мкг/мл	Титр вируса, lg БОЕ/кл	Снижение титра вируса, lg БОЕ/кл	ХТИ МПК/МАК
Контроль вируса	0	6,2	—	—
Ланатозид Ц	0,5	1,4	4,8	4
	0,25	3,7	2,5	
	0,125	4,5	1,7	
	0,06	5,4	0,8	

По нашему мнению противовирусный эффект лекарственного средства ланатозид Ц, являющегося сердечным гликозидом, связан с фармакологической способностью его агликона связываться с вирусными белками, подавляя вирусный процессинг на ранних стадиях его развития.

Заключение. Подтверждена аутентичность образца вируса ЛХМ, у которого определен характерный для данного вируса фрагмент значимой области генома размером 156 нуклеотидных оснований в соответствии с нуклеотидной последовательностью штамма Armstrong вируса ЛХМ; образца вируса Ласса, штамм Josiach, размер нуклеотидной последовательности значимой области фрагмента генома которого составляет 197 н.п.

На модели аренавирусов ЛХМ и Ласса *in vitro* проведены исследования противовирусной активности прицельно отобранных ЛС фармакопейного статуса: ланатозид Ц, цитовир-3 амиксин и амизон.

Выявлена антивирусная активность лекарственных средств разной степени выраженности при инфицировании культур клеток Vero E6 вирусами ЛХМ и Ласса. Получены следующие результаты:

на модели вируса ЛХМ:

- ланатозид Ц — лекарственное средство на растительной основе: определена наиболее высокая ингибирующая размножение вируса активность, ХТИ = 8;

- цитовир-3 и амиксин — лекарственные средства синтетической природы: слабо активны, ХТИ = 2;

на модели вируса Ласса:

- ланатозид Ц показал активность средней степени выраженности, ХТИ = 4;

При изучении противовирусных свойств лекарственного средства амизон на модели вируса ЛХМ и Ласса противовирусных свойств не выявлено.

Результаты исследований представляют научный интерес, требуются дальнейшие испытания с целью применения средств по новому назначению, разработки и создания новых антивирусных препаратов.

Литература

1. Use of single-cycle infectious lymphocytic choriomeningitis virus to study hemorrhagic fever arenaviruses / W.W. Shanaka [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 85, № 4. — P. 1684–1695.

2. Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a Guinea pig model / A. Kathleen [et al.] // Antiviral. Res. — 2011. — Vol. 90, № 1. — P. 70–79.

3. Подходы к антивирусной фитотерапии / Ю.А. Смирнов [и др.] // Традиционная медицина. — 2009. — № 2. — С. 47–59.

4. Сердечные гликозиды. Лекция 18 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://studopedia.ru/2_23055_serdechnie-glikozidi.html. — Дата доступа: 17.05.2016.

5. Влияние препаратов различной природы на экспериментальную инфекцию мышей, вызываемую вирусом лимфоцитарного хориоменингита / Н.Л. Богданова [и др.] // Нейроиммунология. — 2011. — Т. 9, № 3–4. — С. 36. — По материалам: Нейроиммунология. Рассеянный склероз: 18-я Всерос. науч.-практ. конф. неврологов «Современные возможности нейровизуализации»: симп., посвящ. 20-летию ПЭТ-исследования в России, Санкт-Петербург, 27–30 сент. 2011 г.

6. Сочетанное применение лекарственных средств разной природы при лимфоцитарном хориоменингите у мышей / Н.Л. Богданова [и др.] // Здравоохранение. — 2008. — № 11. — С. 76–79.

7. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. — Л: Медгиз, 1962. — 280 с.

MEDICINES INHIBIT THE REPLICATION OF ARENAVIRUSES *IN VITRO*

Bogdanova N.L., Rustamova L.M., Krasko A.G., Fomina E.G., Semizhon P.A., Petkevich A.S.

State Institution “National Science & Practice Centre of Epidemiology & Microbiology”, Minsk, Republic of Belarus

Etiotropic of medicines used for the treatment of lymphocytic choriomeningitis (LCM) and hemorrhagic fever (GL) Lassa virtually absent, specific preventive maintenance is not developed. The aim of the study was to evaluate the properties of the sighting inhibition of virus selected medicines (drugs) based on natural or synthetic nature, with different pharmacological properties, *in vitro* system. Lanatoside c, tsitovir-3, amiksin and amizon — the following drugs were studied.

Keywords: arenaviruses, Lymphocytic choriomeningitis, Lassa hemorrhagic fever, medications.