

Изучение противовирусной активности триазавирина в отношении возбудителя клещевого энцефалита в культуре клеток

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. Л. РУСИНОВ², У. Н. УЛОМСКИЙ², В. Н. ЧАРУШИН², О. Н. ЧУПАХИН²

¹ Научно-исследовательский центр «33 Центральный научно-исследовательский испытательный институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

² Уральский государственный технический университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург

Investigation of Triazavirin Antiviral Activity Against Tick-Borne Encephalitis Pathogen in Cell Culture

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. L. RUSINOV, U. N. ULOMSKY, V. N. CHARUSHIN, O. N. CHUPAKHIN

Central Research Institute No. 33, Ministry of Defense of the Russian Federation, *Sergiev Posad*
B. N. Eltsin Ural State Technical University, *Ekaterinburg*

Проведенный сравнительный анализ эффективности Триазавирина в отношении вируса клещевого энцефалита в чувствительной культуре клеток и эффективного лекарственного препарата Рибавирина® показал, что исследуемый препарат в концентрации 128 мкг/мл эффективно подавляет репродукцию вируса клещевого энцефалита, штамм Софийн (по накоплению в культуре клеток СПЭВ).

Ключевые слова: клещевой энцефалит, Триазавирин, Рибавирин®, противовирусная эффективность, культура клеток.

The efficacy of Triazavirin against the tick-borne encephalitis virus was estimated in the sensitive cell culture vs. the active drug Ribavirin®. In a concentration of 128 mcg/ml Triazavirin was shown active in inhibition of the tick-borne encephalitis virus reproduction (strain Sofin) by accumulation in the SKEV cell culture.

Key words: tick-borne encephalitis, Triazavirin, Ribavirin®, antiviral efficacy, cell culture.

Клещевой энцефалит (КЭ) по эпидемической значимости для большинства регионов России, тяжести течения инфекции и летальности занимает существенное место среди природно-очаговых вирусных инфекций [1, 2].

В настоящее время эпидемиологическая обстановка в отношении КЭ в Российской Федерации остаётся неблагоприятной. Наблюдается расширение нозоареала инфекции в Сибири, на Урале, в Волго-Вятском районе, а также в Северной Европе. За последние 10 лет ежегодно регистрируется от 5163 до 10298 случаев заболевания. За последние 15–20 лет изменилась структура заболеваемости. До 80% больных КЭ составляют невакцинированные городские жители [3]. Таким образом, профессиональный фактор в определении группы риска утратил ведущее значение. Территориально большинство регионов России являются эндемичными в отношении КЭ [4].

Специфическая профилактика КЭ, основанная на вакцинации групп риска, является одним

из важных средств защиты против этого заболевания [5]. Однако необходимость многократной вакцинации, наличие тенденции к неконтролируемому расширению групп риска и опасность возникновения аллергических реакций и тяжёлых поствакцинальных осложнений, в том числе демиелинизирующего энцефалита, наличие значительной иммунодефицитной прослойки населения являются практически неустраняемыми недостатками системы специфической профилактики КЭ.

Первым этапом лабораторного изучения противовирусной эффективности препаратов являются исследования, проводимые с использованием культур клеток [6–8].

Целью представленной работы являлась оценка эффективности Триазавирина *in vitro* в отношении вируса клещевого энцефалита. Основой данных исследований является оценка влияния изучаемого препарата на репродукцию вируса в культуре клеток.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус клещевого энцефалита, штамм Софийн. Штамм хранится в Специализированной коллекции НИЦ ФГКУ «33 ЦНИИИ» МО РФ.

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 141306 Московская обл., Сергиев Посад-6. Центральный научно-исследовательский испытательный институт

Изучение влияния Триазавирина на репродукцию вируса клещевого энцефалита в культуре клеток СПЭВ

Препарат	Доза препарата, мкг/мл	Уровень накопления вируса, lg БОЕ/мл	Подавление репродукции вируса	
			Δ , lg	%
Триазавирин	128	2,9±0,1	2,3±0,1	99,50
	64	3,5±0,2	1,7±0,2	98,00
	1	4,0±0,1	1,2±0,1	93,30
	0,5	4,5±0,1	0,7±0,1	80,30
	100	2,0±0,2	3,2±0,2	99,99
Рибавирин®		5,2±0,2	—	—
Контроль (без препарата)				

Культура клеток. Использована постоянная культура клеток почек свиньи — СПЭВ. В качестве ростовой среды и среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Хенкса, содержащую 7,5 и 2% сыворотки крупного рогатого скота, соответственно.

Исследуемый препарат. Исследуемый препарат Триазавирин синтезирован специалистами ИОС Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия.

Контрольный препарат. Рибавирин® — производства ЗАО «ВЕРОФАРМ», Россия.

Противовирусную эффективность препаратов *in vitro* оценивали по следующим показателям.

- коэффициент ингибирования (Ки, %);
- подавление репродукции вируса, (Δ , lg).

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями МЗ РФ [9].

Результаты и обсуждение

Изучение противовирусных препаратов в культуре клеток складывается из нескольких этапов: оценки токсичности соединения для культуры клеток и определения уровня подавления репродукции вируса. Показателем токсичности соединения для культуры клеток служит показатель максимально переносимой концентрации (МПК), который составляет 1/2 максимальной концентрации препарата, не оказывающей на клетки токсичного действия (по данным прижизненного морфологического исследования). Изучение эффективности Триазавирина проводили в концентрациях, соответствующих МПК и ниже.

Вирус клещевого энцефалита хорошо размножается только в культуре клеток СПЭВ [10]. Известно, что оптимальная множественность инфицирования культуры клеток при оценке противовирусной эффективности препаратов должна составлять от 0,01 до 0,0001 БОЕ/клетку [7, 8].

Величина инфицирующей дозы вируса клещевого энцефалита при оценке эффективности составляла 0,003 БОЕ/клетку. На каждую дозу препарата использовали не менее 5 пробирок с монослоем культуры клеток двухсуточного возраста. После адсорбции вируса в течение 60 мин при температуре от 36,5 до 37,5°C монослой трижды промывали питательной средой ПС-4 на растворе Хенкса, содержащей 2% сыворотки КРС и по 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина,

затем вносили свежую среду. Для изучения противовирусной эффективности препараты вносили в поддерживающую среду через 1 ч после инфицирования и инкубировали в течение 48 ч при температуре от 36,5 до 37,5°C. По окончании инкубации проводили криодеструкцию клеток: трёхкратным быстрым замораживанием (в криостате при температуре минус 30°C) и быстрым оттаиванием (водяная баня при комнатной температуре). Уровень накопления возбудителя в исследуемых пробах определяли посредством титрования проб при использовании метода получения негативных колоний вируса в монослое культуры клеток СПЭВ под твердым агаровым покрытием.

Результаты изучения подавления репродукции вируса клещевого энцефалита, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что Триазавирин в культуре клеток СПЭВ в концентрации, соответствующей максимально возможной концентрации (128 мкг/мл), эффективно подавляет репродукцию вируса клещевого энцефалита. Отмечено снижение уровня накопления вируса на 2,3 lg. При этом коэффициент ингибирования составил 99,5%. Показана зависимость уровня подавления репродукции вируса от концентрации препарата. При внесении Триазавирина в концентрацию 0,5 мкг/мл (составляющей 1/256 МПК) в ростовую среду уровень ингибирования репродукции вируса клещевого энцефалита составил 80,3%.

Следовательно, Триазавирин в широком диапазоне концентраций эффективно подавляет репродукцию вируса клещевого энцефалита.

Следует отметить, что сравнительный анализ препарата сравнения Рибавирина® и Триазавирина показал сопоставимые показатели их противовирусной эффективности в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro*.

Таким образом, в опытах *in vitro* Триазавирин проявил высокую эффективность в отношении вируса клещевого энцефалита и может рассматриваться как перспективный препарат для профилактики и терапии инфекции, вызываемой этим возбудителем, после изучения его активности на адекватной модели с использованием лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Каренберг Э.И., Ковалевский Ю.В.* Основные черты эко-эпидемиологии клещевого энцефалита. Материалы круглого стола в рамках VI Российско-Итальянской науч. Конф. «Инфекционные болезни: диагностика, лечение, профилактика». 14–16 декабря 2000. С.-Пб.: 2000; 13–20.
2. *Болотин Е.И.* Анализ географических различий проявления клещевого энцефалита. *Паразитология* 1999; 33(5): 369–375.
3. *Забит В.И., Львов Д.К.* Современная эпидемиологическая обстановка и стратегия профилактики клещевого энцефалита. Материалы тезисов докладов Всероссийской научной конференции «Современные научные и прикладные аспекты клещевого энцефалита», 15–16 ноября 2007. М.: 2007; 46–48.
4. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О перечне территорий, эндемичных клещевому вирусному энцефалиту», № 01/1520-8-33 от 27.02.2008 г.
5. СП 3.1.3.2352-07 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита». М.: 2008.
6. *Вотьяков В.И., Галегов Г.А., Борзко Е.И. и др.* Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений. Методическом. Минск, 1986.
7. *Чижов Н.П., Еринов Ф.И., Индулен М.К.* Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций. Рига, 1988.
8. *Вотьяков В.И., Андреева О.И., Мишаева Н.Л.* Оценка специфического действия антивирусных веществ при экспериментальных вирусных энцефалитах. Минск, 1986.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005.
10. *Кривченко А.Т., Васильев В.Н.* Сравнительное изучение свойств двух штаммов вируса клещевого энцефалита в культуре тканей. *Вопросы вирусологии* 1960; 6: 649–653.