

Изучение профилактической эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей

С. Я. ЛОГИНОВА¹, С. В. БОРИСЕВИЧ¹, В. Л. РУСИНОВ²,
У. Н. УЛОМСКИЙ², В. Н. ЧАРУШИН², О. Н. ЧУПАХИН², П. В. СОРОКИН³

¹ 48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации, *Сергиев Посад*

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

³ Уральский центр биофармацевтических технологий, *Екатеринбург*

Investigation of Prophylactic Efficacy of Triazavirin Against Experimental Forest-Spring Encephalitis on Albino Mice

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

Central Research Institute No. 48, Ministry of Defense of the Russian Federation, *Sergiev Posad*

B. N. Eltsin Ural State Technical University, *Ekaterinburg*

Ural Centre of Biopharmaceutical Technologies, *Ekaterinburg*

Проведён сравнительный анализ профилактической эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей и эффективного лекарственного препарата — Рибавирина®. Отмечено значительное увеличение показателя средней продолжительности жизни животных в опытных группах (от 4 до 5 суток), а также статистически ($p < 0,05$) значимое снижение уровня накопления вируса в органе-мишени — головном мозге.

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

Prophylactic efficacy of Triazavirin against experimental Forest-Spring encephalitis was studied on albino mice vs. the active drug Ribavirin®. A significant increase of the animal lifespan in the test groups (from 4 to 5 days) and a statistically ($p < 0.05$) valid decrease of the virus accumulation level in the target organ (the brain) were observed.

Key words: Forest-Spring encephalitis, Triazavirin, Ribavirin®, prophylaxis, antiviral efficacy.

Важным аспектом совершенствования профилактики клещевого энцефалита является расширение существующего арсенала эффективных противовирусных средств профилактики одноименной инфекции.

Ранее на первом этапе исследований была выявлена эффективность Триазавирина в культуре клеток [1]. Поэтому было принято решение оценить его профилактическую активность на лабораторных животных.

Целью представленной работы являлась оценка профилактической эффективности Триазавирина *in vivo* в отношении вируса клещевого энцефалита.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус клещевого энцефалита, штамм Софьин. Штамм хранится в Специализированной коллекции ФГБУ «48ЦНИИ» Минобороны России.

Культура клеток. Использована постоянная культуры 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.

Лабораторные животные. Для моделирования экспериментальной формы клещевого энцефалита использовали белых мышей массой 10–12 г, полученных из вивария ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. На каждое разведение использовали по 20 животных. Наблюдение за инфицированными животными проводили в течение 15 суток. Уровень накопления вируса в тканях головного мозга оценивали методом формирования негативных колоний в монослой культуры клеток СПЭВ под твердым агаровым покрытием.

Специфичность гибели мышей подтверждали выделением вируса из головного мозга павших животных и оценивали наличие по ЦПД в культуре клеток СПЭВ.

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 141306 Московская обл., Сергиев Посад-6.
48 Центральный НИИ

Таблица 1. Результаты оценки профилактической эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита

Препарат	Доза препарата (суточная), мг/кг	Схема применения препарата	Защита животных от гибели, %	Средняя продолжительность жизни, сутки, X	Увеличение средней продолжительности жизни, сутки, X
Триазавирин	400	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	55,0	14,4	5,6
		-48 ч, -24 ч	50,0	12,7	3,9
		-24 ч, -1 ч	50,0	12,3	4,3
	200	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	50,0	14,0	5,1
		-48 ч, -24 ч	40,0	12,5	3,6
		-24 ч, -1 ч	40,0	12,7	3,8
	100	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	45,0	13,1	4,2
		-48 ч, -24 ч	45,0	12,5	3,6
		-24 ч, -1 ч	35,0	12,4	3,5
	10	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	30,0	12,3	3,4
		-48 ч, -24 ч	30,0	12,3	3,4
		-24 ч, -1 ч	30,0	12,3	3,4
Рибавирин	20	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	60,0	13,2	4,5
Контроль (без препарата)	—	—	—	8,9	—
Контроль	—	—	—	15,0	—

Исследуемый препарат. Исследуемый препарат «Триазавирин» предоставлен производителем ООО «Завод Медсинтез», Россия, г. Новоуральск

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

Оценка противовирусной эффективности используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями МЗ РФ [2]. Основными критериями оценки эффективности *in vivo* являлись: показатели защиты лабораторных животных от гибели; средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных; подавление репродукции вируса в тканях головного мозга.

Результаты и обсуждение

Для выбора рабочей дозы препарата была проведена оценка его острой токсичности. Результаты оценки острой токсичности препарата Триазавирин при внутрибрюшинном введении белым мышам массой 10—12 г свидетельствуют, что препарат в диапазоне концентраций от 7,5 до 2000 мг/кг не вызывает гибель и интоксикацию белых мышей массой 10—12 г. Исключение составила группа мышей, которым вводили препарат в дозе 2000 мг/кг. Животные, получавшие препарат Триазавирин в дозе 2000 мг/кг, были менее подвижны и медленнее прибавляли в массу тела (в среднем масса тела была ниже приблизительно на 1,0 г), при этом также как и в случае применения других доз препарата, другие признаки токсичности и летальность отсутствовали [3].

Для оценки профилактического действия Триазавирин животным вводили перорально в объёме 50 мкл по трём схемам: за 5, 2 и 1 сутки до инфицирования однократно, ежедневно, в дозах от 10 до 400 мг/кг массы белых мышей. В качестве референс-препарата использовали Рибавирин за 5 суток до инфицирования однократно, ежедневно, в дозе 20 мг/кг массы животного. Оценивали эффективность Триазавирина при примене-

нии его по схеме экстренной профилактики через 1 час после инфицирования и далее однократно в течение 2 дней и 5 дней в дозах от 10 до 400 мг/кг массы белых мышей.

Результаты изучения профилактической эффективности препарата Триазавирин в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита (табл. 1) свидетельствуют, что препарат выявил наибольшую эффективность при применении его в течение 5 суток до заражения лабораторных животных. Выявлена закономерность изменения противовирусной эффективности препарата в зависимости от его дозы. Триазавирин в суточной дозе 400 мг/кг массы животного в 55, 50 и 50% защищает белых мышей при применении препарата в течение 5, 2 и 1 суток соответственно. Триазавирин в суточной дозе 200 мг/кг массы животного защищает 50, 40, 40% инфицированных белых мышей при его применении в течение 5 суток, 2 суток и 1 суток соответственно. При этом наблюдали увеличение СВЖ на 5,1; 3,6 и 3,8 суток соответственно. В дозе 10 мг/кг Триазавирин выявил низкую защитную эффективность при использовании всех схем применения препарата.

Референс-препарат Рибавирин в дозе 20 мг/кг при пероральном применении по профилактической схеме защищал от гибели 60% белых мышей.

Оценивали защитную эффективность Триазавирина в отношении вируса клещевого энцефалита так же по схеме экстренной профилактики. Препарат животным вводили перорально в объёме 50 мкл по следующим двум схемам:

— через 1 ч после инфицирования и далее ежедневно в течение 4 суток, однократно;

— через 1 ч, 24 ч и 48 ч после инфицирования, однократно в дозе от 10 до 400 мг/кг массы белых мышей.

Таблица 2. Результаты оценки эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита при применении по схеме экстренной профилактики

Препарат	Доза препарата (суточная), мг/кг	Схема применения препарата	Защита животных от гибели, %	Средняя продолжительность жизни, сутки, X	Увеличение средней продолжительности жизни, сутки, X
Триазавирин	400	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	55,0	13,7	4,9
		+1 ч, +24 ч, +48 ч	55,0	13,9	5,0
	200	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	50,0	13,2	4,3
		+1 ч, +24 ч, +48 ч	50,0	13,0	4,1
	100	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	45,0	12,9	4,0
		+1 ч, +24 ч, +48 ч	40,0	12,6	3,7
	10	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	30,0	12,3	3,4
		+1 ч, +24 ч, +48 ч	30,0	12,3	3,4
Рибавирин	20	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	50	13,4	4,5
Контроль (без препарата)		—	—	8,9	—
Контроль		—	—	15,0	—

Таблица 3. Изучение влияния Триазавирина на репродукцию вируса клещевого энцефалита в головном мозге при профилактическом применении

Препарат	Доза препарата (суточная), мг/кг	Схема применения препарата	Уровень накопления вируса в головном мозге, lg БОЕ/мл, X±δ _x	Уровень снижения репродукции в головном мозге, lg, X±δ _x
Триазавирин	400	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	6,5±0,1	2,9±0,1
		-48 ч, -24 ч	6,9±0,3	2,5±0,3
	200	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	7,2±0,1	2,2±0,1
		-48 ч, -24 ч	7,2±0,1	2,2±0,1
		-24 ч, -1 ч	7,7±0,2	1,7±0,2
	100	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	7,4±0,1	2,0±0,1
		-48 ч, -24 ч	7,8±0,1	1,6±0,1
		-24 ч, -1 ч	8,0±0,2	1,4±0,2
	10	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	8,3±0,2	1,1±0,2
		-48 ч, -24 ч	8,4±0,1	1,0±0,1
		-24 ч, -1 ч	8,4±0,1	1,0±0,1
	Рибавирин	20	-120 ч, -96 ч, -72 ч, -48 ч, -24 ч, -1 ч	6,8±0,1
Контроль (без препарата)		—	9,4±0,1	—

Таблица 4. Изучение влияния Триазавирина на репродукцию вируса клещевого энцефалита в головном мозге при применении по схеме экстренной профилактики

Препарат	Доза препарата (суточная), мг/кг	Схема применения препарата	Уровень накопления вируса в головном мозге, lg БОЕ/мл, X±δ _x	Уровень снижения репродукции в головном мозге, lg, X±δ _x
Триазавирин	400	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	7,0±0,2	2,4±0,2
	200		7,2±0,2	2,2±0,2
	100		7,5±0,1	1,9±0,1
	10		8,4±0,1	1,0±0,1
Рибавирин	20	+1 ч, +24 ч, +48 ч, +72 ч, +96 ч, +120 ч	7,1±0,1	2,3±0,1
Контроль (без препарата)			9,4±0,1	—

Результаты оценки эффективности Триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита при применении по схеме экстренной профилактики (табл. 2) свидетельствуют, что в дозе 400 мг/кг защитная эффективность препарата составила 55%, в дозе 200 мг/кг — 50%, в дозе 100 мг/кг — 40—45%, в дозе 10 мг/кг — 30%.

Защитная эффективность Рибавирина в дозе 20 мг/кг по схеме экстренной профилактики составила 50%.

На пике гибели подкожно инфицированных вирусом клещевого энцефалита белых мышей (8—9 сутки) оценивали уровень накопления вируса в головном мозге.

При применении Триазавирина по профилактическим схемам препарат эффективно подавлял репродукцию вируса в тканях головного мозга (табл. 3). При использовании пролонгированной схемы препарат в дозе 400 мг/кг снижал уровень накопления вируса в головном мозге в 1000 раз, в дозе 100—200 мг/кг — в 100 раз. В дозе

10 мг/кг триазамирин подавлял репродукцию вируса клещевого энцефалита в головном мозге белых мышей всего в 10 раз.

При применении Триазамирин по схеме экстренной профилактики в дозе 400 мг/кг он подавлял накопление вируса в ткани головного мозга в 250 раз, в дозе 200 мг/кг — в 160 раз, в дозе 100 мг/кг — в 100 раз, в дозе 10 мг/кг — в 10 раз (табл. 4).

Таким образом, при пероральном применении Триазамирин в высоких дозах (200—400 мг/кг) по схемам профилактики и экстренной профилактики препарат эффективно защищал инфицированных вирусом клещевого энцефалита белых мышей. При этом отмечено значительное увеличение показателя средней продолжительности жизни

животных в опытных группах (от 4 до 5 суток), а также статистически ($p \leq 0,05$) значимое снижение уровня накопления вируса в органе-мишени — головном мозге.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (14-13-01301) и ООО «Уральский центр биофармацевтических технологий».

ЛИТЕРАТУРА

1. *Логина С.Я., Борисевич С.В., Русин В.Л., Уломский У.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н.* Изучение противовирусной активности триазамирин в отношении возбудителя клещевого энцефалита в культуре клеток. *Антибиотики и химиотер* 2014; 1—2: 3—5. / Loginova S.Ja., Borisevich S.V., Rusinov V.L., Ulomskij U.N., Charushin V.N., Chupahin O.N. *Izuchenie protivovirusnoj aktivnosti triazavirina v otnoshenii vozbuditelja kleshhevogo jencefalita v kul'ture kletok. Antibiotiki i himioter* 2014; 1—2: 3—5. [in Russian]
2. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* М.: Минздрав РФ, 2012.
3. *Логина С.Я., Борисевич С.В., Русин В.Л., Уломский Е.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н.* Оценка токсичности нового отечественного химиопрепарата триазамирин. *Антибиотики и химиотер* — 2012; 11—12: 8—10. / Loginova S.Ja., Borisevich S.V., Rusinov V.L., Ulomskij E.N., Charushin V.N., Chupahin O.N. *Ocenka toksichnosti novogo otechestvennogo himiopreparata triazavirin. Antibiotiki i himioter* — 2012; 11—12: 8—10. [in Russian]