

Изучение активности противовирусных препаратов в отношении возбудителя лихорадки Зика в культуре клеток

С. Я. ЛОГИНОВА, В. Н. ЩУКИНА, Г. В. БОРИСЕВИЧ, И. В. СУРОВЯТКИНА, С. В. БОРИСЕВИЧ

48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

The Study of Antiviral Drugs' Activity Against The Causative Agent of Zika Fever in Cell Culture

S. YA. LOGINOVA, V. N. SHCHUKINA, G. V. BORISEVICH, I. V. SUROVYATKINA, S. V. BORISEVICH

48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiyev Posad

Вирус Зика (ZIKV) является представителем вирусов рода *Flavivirus*, семейства *Flaviviridae*, и относится к зоонозным арбовирусным инфекциям, переносимым комарами рода *Aedes*. В организме человека этот флавивирус вызывает заболевание, известное как лихорадка Зика, этиологически родственное жёлтой лихорадке, лихорадкам денге, Западного Нила и Чикунгунья. Специфического лечения лихорадки Зика нет, вакцина или же химиопрепараты на сегодняшний день также отсутствуют. Проведенный сравнительный анализ эффективности химиопрепаратов, индукторов интерферона и двух классов интерферона α -, β -, и γ - показал, что препараты интерферона эффективно подавляют репродукцию вируса Зика в культуре клеток Vero в широком диапазоне концентраций. Химиопрепараты Триазавирин®, Виразол®, Зовиракс®, Цитарабин® и Ингавирин® не влияли на репродукцию вируса Зика, штамм MR 766V, в культуре клеток Vero. В присутствии Виразола® и Рибавирина® в концентрации 100 мкг/мл статистически значимо снижался размер негативных колоний вируса Зика.

Ключевые слова: вирус Зика, Триазавирин®, Рибавирин®, Ингавирин®, Реаферон-ЕС®, Ребиф ($\beta 1a$)®, противовирусная эффективность, культура клеток.

Zika virus (ZIKV) is a representative of the viruses of the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*, it belongs to the zoonotic arbovirus infections transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. In humans, this flavivirus causes a disease known as zika fever, etymologically related to yellow fever, dengue, West Nile and Chikungunya viruses. There is no specific treatment for zika fever, just as there is no vaccine or preventive measures available to date. A comparative analysis of the effectiveness of chemotherapy medications, interferon inducers and two classes of interferon α -, β -, and γ - showed that interferon drugs effectively inhibit the reproduction of Zika virus in Vero cell culture in a wide range of concentrations. Chemotherapy medications Triazavirin®, Virazole®, Zovirax®, Cytarabine®, and Ingavirin® did not affect the reproduction of Zika virus strain MR 766V in Vero cell culture. The size of negative Zika virus colonies was significantly reduced in the presence of Virazole® and Ribavirin® at a concentration of 100 μ g/ml.

Keywords: zika virus, Triazavirin®, Ribavirin®, Ingavirin®, Reaferon-EU®, Rebif ($\beta 1a$)®, antiviral efficacy, cell culture.

Введение

В связи со сложившейся неблагополучной эпидемической ситуацией в мире по лихорадке Зика, активно проводятся исследования по выявлению эффективных противовирусных средств в отношении его возбудителя [1–3].

Так, учитывая особенности репликативного цикла вируса Зика, особый интерес представляют гипополипидермический компонент nordihydroguaiaretic acid (NDGA) и его синтетический дериват — tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic (M4N) [3]. В культуре клеток Vero (CCL-81) препараты NDGA, M4N, Zileuton, Fatostatin, Resveratrol, и BFA в концентрациях 10–35 mM

при внесении в среду через 1 ч после инфицирования эффективно подавляют репродукцию вируса Зика [4–8] и могут рассматриваться как потенциальные лекарственные препараты против флавивирусных инфекций [9]. До настоящего времени в мире отсутствуют лицензированные препараты в отношении лихорадки Зика, поэтому актуальным являются исследования по поиску эффективных средств защиты от лихорадки Зика.

Цель работы — изучение *in vitro* эффективности некоторых химиопрепаратов, индукторов интерферона и рекомбинантных человеческих интерферонов.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус Зика, штамм MR 766, хранящийся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 141306, г. Сергиев Посад-6. ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ

Исследуемые препараты. Рибавирин® — препарат (1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) производства Dragon Hwa ChemPharm Co. Limited. Виразол® (Virazole ICN) — химиопрепарат производства ICN «Pharmaceuticals», США. Зовиракс® — химиопрепарат произведён компанией Вэлком Фаундейшен Лимитед, Великобритания. Цитарабин-ЛЭНС — препарат производства ООО «ЛЭНС-ФАРМ». Ингавирин® — противовирусный химиопрепарат ОАО Валента Фармацевтика, Россия. Триазавирин® — противовирусный препарат, производства «Медсинтез», Россия. Реаферон — ЕС® — человеческий рекомбинантный α -2b-интерферон производства ЗАО «Вектор-Медика», Россия. Rebif (β 1a) — человеческий рекомбинантный β -1a интерферон производства Serono, Италия. Роферон-А — человеческий рекомбинантный интерферон α -2a производства Ф. Хоффманн-Ля рош Лтд., Швейцария. Гаммаферон — генно-инженерный человеческий γ -интерферон производства НПО «Фермент» «Санитас». Ларифан — высокомолекулярный индуктор интерферона, дц РНК фага f_2 *E. coli*, производства Института микробиологии им. Кирхенштейна, Латвия. Ридостин® — высокомолекулярный индуктор интерферона, дц РНК дрожжей, производства ЗАО «Вектор-Медика», Россия.

Культура клеток. Использована постоянная культуры клеток почек африканской зелёной мартышки — Vero. В качестве ростовой среды и среды поддержания использовали полусинтетическую среду (ПС-4) на растворе Ирля, содержащую 7,5 и 2 % сыворотки крупного рогатого скота, соответственно.

Оценка биологических свойств вируса. Биологическую активность вируса Зика оценивали титрованием в культуре клеток Vero по формированию негативных колоний (lg БОЕ/мл).

Оценка противовирусной эффективности экспериментальных субстанций осуществлена в соответствии с рекомендациями ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России [10].

Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vivo* являются подавление уровня накопления вируса (lg БОЕ/мл) и показатель коэффициента ингибирования репродукции вируса (Ки, процент).

Результаты и обсуждение

Проведённые исследования по оценке уровня накопления вируса Зика, штамм MR 766, при различной множественности заражения в культуре клеток Vero выявили, что возбудитель в широком диапазоне инфицирующих доз накапливается в высоких концентрациях. Оценку противовирусной эффективности лекарственных препаратов проводили в культуре клеток Vero при инфицирующей дозе 0,001 БОЕ на клетку.

Для изучения влияния препаратов на репродукцию вируса Зика, штамм MR 766, лекарственные препараты вносили в культуру клеток по следующим схемам: за 24 ч до инфицирования в среду поддержания и через 2 ч после инфицирования.

При изучении эффективности препаратов выявили, что Триазавирин®, Виразол® и Ингавирин® при применении как до, так и после инфицирования в высоких концентрациях практически не влияли на уровень накопления вируса в культуре клеток Vero C1008. При внесении препаратов до инфицирования клеток Виразол®, Триазавирин® и Ингавирин® в концентрации 100 мкг/мл подавляли репродукцию вируса на 31, 58 и 67%, соответственно. При внесении препаратов после инфицирования клеток Ингави-

рин® и Триазавирин® не влияли на репродукцию вируса. Виразол® в концентрациях 100 и 10 мкг/мл подавлял репродукцию вируса на 79 и 20%, соответственно.

Человеческие рекомбинантные интерфероны обоих подклассов (α и β) Rebif (β 1a)® и Реаферон-ЕС® (α 2) в концентрации 10^5 МЕ/мл полностью подавляют репродукцию вируса Зика в культуре клеток Vero как при внесении до, так и после инфицирования клеток.

Высокомолекулярные индукторы интерферона Ларифан® и Ридостин® выявили низкую противовирусную активность. В высоких концентрациях при внесении препаратов как до, так и после инфицирования выявлено незначительное подавление репродукции вируса ($p < 0,05$). Ларифан® и Ридостин® в концентрации 100 мкг/мл подавляли репродукцию вируса на 84 и 53%, соответственно, при внесении до инфицирования; на 78 и 51%, соответственно, при внесении после инфицирования.

Для изучения влияния препаратов на формирование негативных колоний вирусом Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero лекарственные препараты в различных концентрациях вносили в агаровое покрытие.

При множественности инфицирования клеток 30 БОЕ препарат Rebif (β 1a)® в концентрации 10^4 — 10^5 МЕ/мл при внесении в агаровое покрытие полностью подавлял формирование негативных колоний вирусом в культуре клеток Vero. В более низких концентрациях препарат не влиял на образование негативных колоний (табл. 1).

Препарат Реаферон-ЕС (α 2в)® полностью подавлял формирование негативных колоний вирусом Зика в концентрациях 1000—100000 МЕ/мл. Более низкие концентрации не влияли на формирование негативных колоний вирусом Зика в культуре клеток Vero.

Роферон-А (α 2a)® так же как Реаферон-ЕС (α 2в)® полностью подавлял формирование негативных колоний вирусом Зика в концентрациях 1000—100000 МЕ/мл, в более низких концентрациях не влиял на формирование негативных колоний.

Гаммаферон® полностью подавлял формирование негативных колоний вируса Зика в концентрации 100 000 МЕ/мл. В более низких концентрациях препарат значимой эффективности не выявил.

Все изученные препараты (Виразол®, Рибавирин®, Ингавирин®, Зовиракс®, Цитарабин®) при внесении их в агаровое покрытие эффективности не выявили.

Изучение S-признака вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero в присутствии интерферона установили, что все препараты с высокой степенью достоверности снижают размер не-

Таблица 1. Изучение влияния интерферона на формирование негативных колоний вирусом Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero

Препарат	Концентрация препарата, МЕ/мл	Количество негативных колоний, $\bar{X} \pm \sigma_x$	Коэффициент ингибирования формирования бляшек, процент
Rebif ($\beta 1a$) [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	0±0	100
	10 ³	15±3	52
	10 ²	39±4	0
	10 ¹	34±2	0
	1	41±5	0
Реаферон-ЕС ($\alpha 2b$) [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	0±0	100
	10 ³	0±0	100
	10 ²	23±1	24
	10 ¹	30±6	1
	1	32±3	0
Роферон-А ($\alpha 2a$) [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	0±0	100
	10 ³	0±0	100
	10 ²	23±2	24
	10 ¹	31±4	0
	1	32±3	0
Гаммаферон [®]	10 ⁵	0±0	100
	10 ⁴	19±2	36
	10 ³	27±2	12
	10 ²	34±3	0
	10 ¹	27±3	12
Контроль без препарата	—	30±2	—

Таблица 2. Изучение влияния интерферона на S-признак вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero

Препарат	Концентрация препарата, МЕ/мл	S-признак, мм, $\bar{X} \pm \sigma_x$	Снижение диаметра бляшек, Δ , мм, $X_{ср}$	Достоверность редукции бляшек, уровень значимости, %
Rebif ($\beta 1a$) [®]	10 ³	0,69±0,04	4,62	99,9
	10 ²	3,98±0,12	1,33	99,9
	10 ¹	5,23±0,19	0,07	<50
	1	4,95±0,18	0,36	80,0
Реаферон-ЕС [®] ($\alpha 2$)	10 ²	1,30±0,14	4,0	99,9
	10 ¹	3,31±0,15	2,0	99,9
	1	5,33±0,25	отс	<50
Роферон-А [®]	10 ²	1,52±0,12	3,78	99,9
	10 ¹	3,24±0,11	2,07	99,9
Гаммаферон [®]	10 ⁴	1,46±0,13	3,85	99,9
	10 ³	3,92±0,17	1,38	99,9
	10 ²	4,64±0,28	0,67	96,0
	10 ¹	5,01±0,23	0,29	75,0
Контроль без препарата	—	5,30±0,16	—	—

гативных колоний. Формирование точечных негативных колоний в присутствии интерферона, скорее всего, указывает на образование дефектных вирусных частиц (табл. 2).

Изучение S-признака вируса Зика, штамм MR 766, в присутствии химиопрепаратов выявило, что различие диаметра негативных колоний в контроле и опыте (Зовиракс[®], Ингавирин[®]) не были статистически значимыми. Рибавирин[®] и Виразол[®] в концентрации 100 мкг/мл при внесении их в агаровое покрытие достоверно снижали размер негативных колоний вируса Зика. В присутствии Цитарабина[®] негативные колонии, формируемые вирусом Зика, имели размытые края и увеличивались в диаметре (табл. 3).

В работе изучали противовирусную активность *in vitro* в отношении вируса Зика представителей трёх классов неспецифических медицинских

средств защиты: химиопрепараты, индукторы интерферона и рекомбинантные интерфероны.

Нуклеозидные аналоги представляют собой важный класс противовирусных агентов и в настоящее время широко используются в качестве терапии вирусных инфекций человека, включая СПИД и вирус гепатита В, цитомегаловирус и вирус простого герпеса [11]. Поскольку клетки человека не имеют РНК-зависимой РНК-полимеразы (RDRP), этот класс ферментов, по-видимому, один из самых перспективных мишеней для противовирусного действия в отношении флавивирусов, которые используют RDRP для репликации. Нуклеозидные аналоги могут ингибировать вирусные RDRP, подавляя, таким образом, вирусную репликацию. Эти агенты, как правило, являются безопасными и хорошо переносимыми, так как они нацелены на вирусную, а не клеточ-

Таблица 3. Изучение влияния препаратов на S-признак вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	S-признак, мм, $\bar{X} \pm \delta_x$	Снижение диаметра бляшек, Δ , мм, X_{cp}	Достоверность редукции бляшек, уровень значимости, %
Виразол®	100	4,42±0,25	0,89	99,0
Рибавирин®	100	4,58±0,10	0,72	99,8
Ингавирин®	250	5,55±0,34	отс	<50
Зовиракс®	100	5,01±0,23	0,29	75,0
Цитарабин®	100	6,07±0,24	отс	98,0*
Контроль без препарата	—	5,30±0,16	—	—

Примечание. * — увеличение размера негативных колоний.

ную полимеразу и способны вызывать преждевременное прекращение синтеза вирусной нуклеиновой кислоты [11]. В отношении возбудителя лихорадки Зика оценена противовирусная активность ряда аналогов нуклеозидов [1]. Рибавирин и Фавипиравир уже одобрены для использования в качестве противовирусных препаратов для человека в отношении других вирусных инфекций (ЛЗН, денге, жёлтая лихорадка, КЭ, ЯЭ), но показали меньшую противовирусную эффективность *in vitro* в отношении вируса Зика [12]. Исследованные химиопрепараты (Рибавирин®, Зовиракс®, Цитарабин-ЛЭНС, Ингавирин®, Триазавирин®) при внесении в различных схемах не влияли на репродукцию вируса. При этом следует отметить, что лекарственные препараты Виразол® и Рибавирин® с высокой степенью достоверности (99,0 и 99,8%, соответственно) снижают размер негативных колоний.

Изучение эффективности рекомбинантного β (ИФ- β) и TNF- α в эпителиальных клетках A549 и клетках Vero показало, что при внесении до инфицирования препараты выявили высокую противовирусную активность. При внесении через 2 ч после инфицирования наблюдали более низкую эффективность по снижению репродукции вируса Зика [2]. Высокую противовирусную эффек-

тивность в отношении вируса Зика, штамм MR 766, в культуре клеток Vero выявили рекомбинантные интерфероны двух классов: γ и α , β . Препараты в широком диапазоне концентраций эффективно подавляют репродукцию вируса, а в низких концентрациях вызывают редукцию негативных колоний. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы. Оба ИИФ типа I и типа II продемонстрировали активность в отношении вируса Зика. Вероятно, ИФН γ , IFN- β и ИФН β можно оценивать в клинических условиях как средство профилактически, постконтактной профилактики и лечения от инфекции, вызванной вирусом Зика.

Резюмируя изложенное можно заключить, что видимое многообразие химиопрепаратов не отражает истинного диапазона их антивирусной активности.

Таким образом, из всех изученных лекарственных средств только рекомбинантные интерфероны выявили высокую противовирусную эффективность *in vitro* в отношении вируса Зика.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Mumtaz N., van Kampen J.J., Reusken C.B., Boucher C.A., Koopmans M.P. Zika Virus: Where Is the Treatment? Curr Treat Options Infect Dis 2016; 8: 208—211. doi: 10.1128/CMR.00072-15.
- Frumence E., Roche M., Krejbich-Trotot P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- γ production and apoptosis induction. Virology 2016; 493: 217—226. doi: 10.1016/j.virol.2016.03.006.
- Shao W., Espenshade P.J. Expanding roles for SREBP in metabolism. Cell. Metab 2012; 16: 414—419. doi: 10.1016/j.cmet.2012.09.002.
- Soto-Acosta R., Bautista-Carbajal P., Syed G. H., Siddiqui A., Del Angel R. M. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits replication and viral morphogenesis of dengue virus. Antiviral Res. 2014; 109: 132—140. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.07.002.
- Syed G. H., Siddiqui A. Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and hepatitis C virus. Hepatology. 2011; 54: 1936—1946. doi: 10.1002/hep.24619.
- Nour A. M., Li Y., Wolenski J., Modis Y. Viral membrane fusion and nucleocapsid delivery into the cytoplasm are distinct events in some flaviviruses. PLoS Pathog 2013; 9: e1003585. doi.org/10.1371/journal.ppat.1003585.
- Pollara J. J., Laster S. M., Petty I. T. Inhibition of poxvirus growth by Terameprocol, a methylated derivative of nordihydroguaiaretic acid. Antiviral Res 2010; 88: 287—295. doi: 10.1016/j.antiviral.2010.09.017.
- Chen Q. Nordihydroguaiaretic acid analogues: their chemical synthesis and biological activities. Curr Top Med Chem 2009; 9: 1636—1659.
- Grossman S. A., Ye X., Peereboom D., Rosenfeld M. R., Mikkelsen T., Supko J. G., Desideri S. Phase I study of terameprocol in patients with recurrent high-grade glioma. Neuro Oncol 2012; 14: 511—517. doi: 10.1093/neuonc/nor230.
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2013; 942с. / Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. chast' 2. M.: Minzdrav R.F., 2005. [In Russian]
- Eyer L., Nencka J., Huvarová I., Palus M., Joao Alves M., Gould E.A., De Clercq E., Růžek D. Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. J Infect Dis. 2016; Sep 1; 214 (5): 707—711. doi: 10.1093/infdis/jiw226. Epub 2016 May 27.
- Botting C., Kuhn R.J. Novel approaches to flavivirus drug discovery. Expert. Opin Drug Discov 2012; 7 (5): 417—428. doi: 10.1517/1760441.2012.673579. Epub 2012 Mar 22.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Логинова Светлана Яковлевна — д. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Шукина Вероника Николаевна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Борисевич Галина Валентиновна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Суровяткина Ирина Валерьевна — к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад

Борисевич Сергей Владимирович — д. б. н., профессор, член-корр. РАН; начальник института, Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад