

Оценка токсичности неспецифических медицинских противовирусных средств, предназначенных для профилактики и лечения опасных и особо опасных вирусных инфекций

С. Я. ЛОГИНОВА, С. В. БОРИСЕВИЧ, В. А. МАКСИМОВ, В. П. БОНДАРЕВ

Филиал ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» – «Вирусологический центр», *Сергиев Посад*

Toxicity Estimation of Unspecific Medicinal Antiviral Agents for Prophylaxis and Therapy of Hazard and Especially Hazard Viral Infections

S. YA. LOGINOVA, S. V. BORISEVICH, V. A. MAKSIMOV, V. P. BONDAREV

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

Изучение цитотоксичности химиопрепаратов (Рибавирин®, Ремантадин® и Ингавирин®), интерферона (Реальдирон®) и индукторов интерферона (Ларифан®, Ридостин®, Арбидол® и Цитарабин®) в постоянных и диплоидной культуре клеток показало, что наименее токсичными из группы химиопрепаратов являются Ингавирин® и Рибавирин®, а из группы индукторов интерферона — Ларифан® и Ридостин®. Реальдирон в максимальных концентрациях ($\geq 10^6$ МЕ) не вызывает визуально наблюдаемых под световым микроскопом цитопатических изменений во всех исследованных культурах клеток. Результаты изучения острой токсичности *in vivo* свидетельствуют о том, что Реальдирон® не токсичен для белых мышей и кроликов породы шиншилла в концентрации 10^6 МЕ/кг массы животного. Максимально переносимые дозы Ингавирин® для белых мышей составляет ≥ 3000 мг/кг, Арбидол® — 401,25 мг/кг, Рибавирин® — 170 мг/кг, Ларифан® — ≥ 100 мг/кг и Ридостин® — ≥ 100 мг/кг.

Ключевые слова: цитотоксичность, острая токсичность, максимально переносимая доза, максимально переносимая концентрация, химиопрепараты, интерферон, индукторы интерферона.

Cytotoxicity of chemotherapeutics (Ribavirin®, Remantadin® and Ingavirin®), interferon (Realdiron®) and interferon inducers (Larifan®, Ridostin®, Arbidol® and Cytarabin®) was investigated with the use of persistent and diploid cell cultures. Ingavirin® and Ribavirin® from the group of the chemotherapeutics and Razifan® and Ridostin® from the group of the interferon inducers showed the lowest toxicity. Light microscopy revealed no visible cytopathic changes in the investigation cell cultures exposed to maximum concentrations ($\geq 10^6$ IU) of Realdiron®. *In vivo* acute toxicity investigation demonstrated that in a concentration of 10^6 IU per animal weight Realdiron® was not toxic for the albino mice and chinchilla rabbits. The maximum tolerance doses for the albino mice were the following: ≥ 3000 mg/kg of Ingavirin®, 401.25 mg/kg of Arbidol®, 170 mg/kg of Ribavirin®, ≥ 100 mg/kg of Larifan® and ≥ 100 mg/kg of Ridostin®.

Key words: cytotoxicity, acute toxicity, maximum tolerance dose, maximum tolerance concentration, chemotherapeutics, interferon, interferon inducers.

В решении проблемы направленного подавления репродукции возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, важное значение имеет поиск лекарственных препаратов, характеризующихся низкой токсичностью и широким спектром противовирусного действия. Учитывая, что вирусы являются строго внутриклеточными паразитами, одним из основных требований, предъявляемых к антивирусным инги-

биторам, является избирательное подавление репродукции вируса без побочного действия на жизненные функции клеток хозяина.

В системе доклинического исследования лекарственных препаратов первым этапом является оценка токсичности соединения для культуры клеток и лабораторных животных [1].

Как правило, в процессе исследования токсичности соединений изучают влияние различных концентраций препарата на морфологию клеток. Однако в связи с тем, что различные типы и линии клеток неодинаково чувствительны к

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. 3а. Редакция журнала «Антибиотики и химиотерапия»

АНТИБИОТИКИ И ХИМИОТЕРАПИЯ, 2009, 54; 3–4

11

воздействию противовирусных препаратов, оценку их эффективности нередко проводят с использованием нескольких типов и линий клеток [1]. Использование нескольких культур клеток позволяет более достоверно осуществлять оценку токсичности существующих и новых лекарственных соединений.

Особую значимость это приобретает при изучении препаратов интерферона и его индукторов, так как одним из важных биологических свойств является их выраженная видовая специфичность [2]. Так, при исследованиях в гетерологичных культурах клеток препараты интерферона проявляют значительно меньшую активность, чем в гомологичных. Вместе с тем это свойство не всегда является абсолютным. Постоянные линии клеток являются менее чувствительными к действию препаратов интерферона и обладают меньшей способностью к продукции интерферонов, чем первичные и диплоидные культуры клеток [2].

Следует отметить, что большинство токсических агентов действует на клетку путем вмешательства в молекулярные механизмы гомеостаза. Это действие может выражаться в целом наборе эффектов, которые включают изменения фундаментальных клеточных реакций, определяющих, в свою очередь, функции конкретного органа-мишени. Мембраны клеток являются закономерной мишенью повреждающего действия токсикантов, а увеличение проницаемости плазматической мембраны, приводящее к деструктивным изменениям, является универсальным механизмом цитотоксичности [3]. Поэтому, наиболее простым и доступным методом оценки цитотоксичности является визуальное наблюдение за состоянием клеток с помощью светового микроскопа при малом увеличении.

Целью настоящей работы является оценка цитотоксичности и острой токсичности существующих и новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения опасных и особо опасных вирусных инфекций.

Материал и методы

Культуры клеток. Использовали постоянные культуры клеток почек зеленых мартишек — GMK-АН-1(Д), Vero-E6, почек свиньи — СПЭВ, почек собаки — MDCK, HeLa, HeP-2, а также диплоидную культуру клеток ДК ЛЭЧ КЛ-17 с плотностью 200-250 тыс./мл.

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. По окончании формирования сплошного монослоя клеток, ростовую среду удаляли, вносили свежую питательную среду, содержащую различные концентрации исследуемых препаратов, и помещали в термостат для наблюдения в течение 5 суток при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. С использованием светового микроскопа наблюдали за состоянием монослоя клеток: частичная или полная деструкция монослоя клеток, повреждение отдельных клеток, образование клеточного синцития. Контролем являлись пробы

монослоем, в которые была внесена поддерживающая среда без препарата.

Лабораторные животные. Для оценки острой токсичности препаратов использовали кроликов породы шиншилла, массой 2,0—2,5 кг и белых мышей массой 6—8 г, полученных из вивария филиала ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России — ВЦ».

Исследуемые препараты. Химиопрепарат ингавирин® (витаглутам) производства ОАО «Валента Фармацевтика», Россия. Химиопрепарат рибавирин® производства ЗАО «ВЕРОФАРМ», Россия. Химиопрепарат ремантадин® производства ООО «РОЗФАРМ», Россия. Реальдирон® генно-инженерный лейкоцитарный человеческий α_2 -интерферон, производства НПО «Фермент», «Санитас». Низкомолекулярный индуктор интерферона арбидол® производства ЗАО «Мастерлек». Высокомолекулярный индуктор интерферона ларифан® производства Института микробиологии им. Кирхенштейна, Латвия. Высокомолекулярный индуктор интерферона ридостин®, производства ЗАО «Вектор-Медика», Россия. Низкомолекулярный индуктор интерферона циклоферон® производства «Полисан», Россия.

Оценка противовирусной эффективности *in vitro* и *in vivo* используемых лекарственных препаратов осуществлена в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета Российской Федерации [1].

Оценка цитотоксичности препаратов. В качестве показателя токсичности каждого соединения для избранной культуры клеток служила максимально переносимая концентрация (МПК), которая составляет 1/2 максимальной концентрации препарата, не оказывающей на клетки токсического действия (по данным прижизненного морфологического исследования и нарушения поглощения клетками витального красителя) [4]. Как правило, оптимальный срок контакта изучаемого соединения с культурой клеток при определении МПК соответствует периоду максимального функционирования клеточных структур (в среднем 4—5 суток) [5].

Оценка токсичности препаратов на лабораторных животных. Общая продолжительность наблюдения за животными составляла 2 недели, причем в первые сутки после введения животные находились под непрерывным наблюдением. Регулярно фиксировали общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координации движений, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, потребление корма и воды, изменение массы тела. Регистрировали сроки развития интоксикации и гибели животных.

Рибавирин®, ингавирин®, реальдирон®, ларифан® и ридостин® вводили животным однократно, внутривенно, а арбидол® — однократно, перорально.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки цитотоксичности 8 противовирусных препаратов для 7 различных культур клеток, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что высокомолекулярный индуктор интерферона ридостин® в исследуемых концентрациях не токсичен практически для всех используемых культур клеток, МПД составила ≥ 1000 мкг/мл. Исключением является культура клеток СПЭВ, для которой МПД ридостина® составила 125 мкг/мл.

Более токсичным для культур клеток оказался другой высокомолекулярный индуктор интерферона — ларифан®. МПД для культур клеток СПЭВ, HeLa и HeP 2 составила 500 мкг/мл; GMK-АН-1(Д) Vero E6 и ДК ЛЭЧ КЛ-17 — ≥ 1000 мкг/мл.

Таблица 1. Результаты оценки цитотоксичности противовирусных препаратов для культур клеток

Препарат	Максимально переносимая концентрация препаратов для культур клеток, мкг/мл						
	СПЭВ	ГМК-АН-1(Д)	Vero E6	HeLa	ДК ЛЭЧ КЛ-17	HeP2	MDCK
Химиопрепараты							
Рибавирин®	≥2000	≥2000	≥2000	1000	125	1000	≥2000
Ингавирин®	1000	1000	1000	н. д.	1000	н. д.	1000
Ремантадин®	100	50	25	25	25	12,5	100
Интерферон							
Реальдирон®	≥10 ⁶	≥10 ⁶	≥10 ⁶	≥10 ⁶	≥10 ⁶	≥10 ⁶	≥10 ⁶
Индукторы интерферона							
Ридостин®	125	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000	≥1000
Ларифан®	500	≥1000	≥1000	500	≥1000	500	≥1000
Цитарабин®	400	≥800	400	400	≥800	400	400
Арбидол®	50	25	50	25	25	12,5	25

Таблица 2. Показатели острой токсичности противовирусных препаратов

Препарат	Максимально переносимая доза препарата, мг/кг массы животного	
	белые мыши, масса 6—8 г	кролики породы шиншилла, масса 2,0—2,5 кг
Химиопрепараты		
Ингавирин®	≥3000	≥10000
Рибавирин®	170,7	700
Интерферон		
Реаферон®	≥10 ⁶	≥10 ⁶
Индукторы интерферона		
Арбидол®	401,25	≥1400
Ларифан®	≥100	≥100
Ридостин®	≥100	≥100

Низкой токсичностью для всех изученных культур клеток обладает цитарабин®, величина МПД этого препарата колебалась в пределах 400—≥800 мкг/мл.

Низкомолекулярный индуктор интерферона арбидол® в концентрации 100 мкг/мл полностью разрушал монослой всех изученных культур клеток. В концентрации 25 мкг/мл он оказывал токсическое действие только в культуре клеток HeP-2. Величина МПД арбидола® для культур клеток СПЭВ и Vero E6 составила 50 мкг/мл; HeLa, ГМК-АН-1(Д) и ДК ЛЭЧ КЛ-17 — 25 мкг/мл; HeP-2 — 12,5 мкг/мл. Следовательно, арбидол® обладает большей токсичностью для культур клеток, чем высокомолекулярные индукторы интерферона: ридостин® и ларифан®.

Генно-инженерный человеческий лейкоцитарный α₂-интерферон (реальдирон®) в максимальных концентрациях (≥10⁶ МЕ) не вызывает визуально наблюдаемых под световым микроскопом цитопатических изменений во всех исследованных культурах клеток.

Наиболее токсичным рибавирин® оказался для культуры клеток ДК ЛЭЧ КЛ-17, величина МПД составила 125 мкг/мл; на другие виды культур препарат в исследуемых концентрациях практически не оказывал цитотоксического действия.

Новый отечественный противогриппозный химиопрепарат ингавирин® в концентрациях от 20 до 1000 мкг/мл не вызывал визуально наблюдаемых изменений во всех использованных куль-

тур клеток. В концентрации 2000 мкг/мл наблюдались деструктивные изменения в 25% культур клеток, а в дозе 4000 мкг/мл наблюдалась полная деструкция монослоя. Таким образом, МПК ингавирина® для исследуемых культур клеток составила 1000 мкг/мл.

Результаты оценки острой токсичности лекарственных средств, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что при применении арбидола® в дозе выше 500 мг/кг наблюдали спорадическую гибель животных, а в концентрации 1100 мг/кг препарат вызывал 100% гибель всех белых мышей. При использовании высоких доз арбидола® гибель белых мышей наступала уже в первые сутки. У животных, получавших арбидол® в дозе 250 мг/кг и ниже, не наблюдали отклонения в поведении, потреблении пищи.

Кролики породы шиншилла менее чувствительны к действию арбидола®, чем белые мыши. В исследуемых концентрациях препарат не вызывал гибели животных и каких-либо значимых изменений в поведении кроликов.

Результаты оценки острой токсичности реферона®, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что рекомбинантный интерферон не токсичен для белых мышей и кроликов породы шиншилла в концентрации 10⁶ МЕ/кг массы животного.

Рибавирин® в концентрации 100 мг/кг оказывал токсическое действие на белых мышей при однократном введении. ЛД₅₀ для белых мы-

шей составила 341,3 мг/кг. В высоких концентрациях рибавирин® вызывал диспепсию, потерю веса у белых мышей. МПД для кроликов составила 700 мг/кг массы животного. В концентрациях, превышающих 1000 мг/кг, у кроликов наблюдали ярко выраженную диспепсию, дистрофию, вздутие кишечника.

Высокомолекулярные индукторы интерферона ларифан® и ридостин® в концентрациях от 1 до 100 мг/кг не вызывали гибели ни белых мышей, ни кроликов при однократном введении.

При изучении токсичности ингавирина® установлено, что интоксикация не наблюдалась при введении вещества белым мышам в дозах, превышающих 3000 мг/кг.

Таким образом, в результате изучения цитотоксичности 3 химиопрепаратов (рибавирина®, ремантадина®, ингавирина®), интерферона (реальдилона®) и 4 индукторов интерферона (ларифана, ридостина, арбидола, цитарабина) в культурах клеток GMK-АН-1(Д), Vero Е6, СПЭВ,

МДСК, HeLa, HeP-2, ДК ЛЭЧ КЛ-17, установлено, что наименее токсичными из группы химиопрепаратов являются ингавирин® и рибавирин®, а из группы индукторов интерферона — ларифан® и ридостин®. Реальдирон® в максимальных концентрациях ($\geq 10^6$ МЕ) не вызывает визуально наблюдаемых под световым микроскопом цитопатических изменений во всех исследованных культурах клеток.

Результаты изучения острой токсичности *in vivo* свидетельствуют о том, что реальдирон® не токсичен для белых мышей и кроликов породы шиншилла в концентрации 10^6 МЕ/кг массы животного. Химиопрепарат ингавирин® (МПД для белых мышей — ≥ 3000 мг/кг) менее токсичен по сравнению с рибавирином® (МПД для белых мышей — 170 мг/кг). Высокомолекулярные индукторы интерферона ларифан® и ридостин® в 4 раза менее токсичны для белых мышей (МПД ≥ 100 мг/кг), чем индуктор интерферона — арбидол® (МПД 401,25 мг/кг).

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005.
2. Соловьев В. Д., Бектемиров Т. А. Интерферон в теории и практике медицины. М., 1981.
3. Еропкин М. Ю., Еропкина Е. М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. СПб, 2003. 239.
4. Чижов Н. П., Носков Ф. С. Схема первичного отбора противовирусных препаратов // Молекулярная биология вирусов, химиотерапия и химиопрофилактика вирусных инфекций. Минск, 1974. 217—219.
5. Носков Ф. С., Демченко В. М., Соколова Е. Д. и др. // Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. Минск, 1977. 49—55.