

УДК 615.281.8.015.4:578.8

Определение активности рибавирина в опытах *in vitro* на модели вируса Батаи

С.А. Терехин, И.С. Клименко, А.М. Бутенко, Т.В. Гребенникова, В.Ф. Ларичев

НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, Россия

Данное исследование проводилось с целью изучения способности рибавирина подавлять *in vitro* репродукцию вируса Батаи. В исследовании использовался рибавирин производства ICN Switzerland AG (Швейцария). Препарат и иммунную асцитическую жидкость (ИАЖ) вносили через 1 час после контакта вируса с клетками

при 37 °С. Рибавирин также вносили за 1 час до контакта вируса с клетками и через 2, 4, 6 и 18 часов после их инфицирования. В этой работе было впервые показано, что рибавирин активно подавляет *in vitro* репликацию вируса Батаи.

Ключевые слова: рибавирин, вирус Батаи, ингибирование.

In Vitro Activity of Ribavirin in Experimental Model of Batai Virus

S.A. Terekhin, I.S. Klimenko, A.M. Butenko, T.V. Grebennikova, V.F. Larichev

Research Institute of Virology named after D.I. Ivanovskiy, Moscow, Russia

This study was performed to evaluate a potential of ribavirin for inhibiting Batai virus replication *in vitro*. Ribavirin manufactured by ICN Switzerland AG (Switzerland) was used for the study. The drug and specific immune ascitic fluid were added to a cell culture (Vero E6) 1 hour after the

virus-to-cell contact at 37 °C. Ribavirin was also added 1 hour before and 2, 4, 6 and 18 hours after the virus-cell contact. This study first showed that ribavirin significantly inhibited Batai virus replication *in vitro*.

Key words: ribavirin, Batai virus, inhibition.

Введение

Рибавирин – 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид [1, 2]. Это нуклеозидное производное характеризуется уникально широким спектром противовирусного действия и эффективностью при заболеваниях, вызываемых ДНК- и РНК-содержащими вирусами, а именно: при аденовирусных, герпетических инфекциях, гепатитах А, В и С, гриппе А и В, парагриппозных инфекциях, эпидемическом

паротите, геморрагических лихорадках (Ласса, аргентинская, боливийская, крымская – КГЛ, долины Рифт – ЛДР и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом – ГЛПС) [1, 3–5].

Механизм действия рибавирина заключается в ингибировании образования кэп-структур на 5'-конце вирусных мРНК и ингибировании активности фермента инозинмонофосфатдегидрогеназы [4].

Представитель семейства *Bunyaviridae* – вирус Батаи (род *Orthobunyavirus*) – является патогенным для человека. Вирус Батаи вызывает гриппоподобные заболевания, сопровождающиеся лихорадкой, миалгией, анорексией и иногда симптомами бронхопневмонии, менингита и другими симптомами поражения ЦНС.

Контактный адрес:
Сергей Анатольевич Терехин
Эл. почта: hjsnjd1@yandex.ru
Тел.: (499) 190-3053

Таблица 1. Определение активности рибавирина в опытах *in vitro* на моделях вирусов Батаи

Вирус	Титр вируса (в lgТЦИД ₅₀ /0,1 мл) в присутствии рибавирина в соответствующих концентрациях (в мкг/мл)				Контрольное титрование вируса	Индекс нейтрализации вирусов с гомологичной ИАЖ
	500/0,5	250/7,5	125/7,0	62,5/8,5		
Батаи	500/0,5	250/7,5	125/7,0	62,5/8,5	7,8	3,0

Наша работа посвящена изучению способности рибавирина подавлять репродукцию *in vitro* вируса Батаи.

Материал и методы

Вирус. В работе был использован штамм вируса Батаи (ММ 2222) из коллекции лаборатории биологии и индикации арбовирусов. Вирус был пассирован на новорождённых белых мышах 2 раза и идентифицирован в серологических реакциях с использованием специфических антисывороток.

Для заражения культуры клеток использовали вирусосодержащие суспензии мозговой ткани инфицированных новорождённых белых мышей, приготовленные на среде Игла MEM с 1% эмбриональной телячьей сыворотки (High Clone, США).

Культуры клеток. Эксперименты были выполнены в перевиваемой культуре клеток почек зелёных мартышек (Vero E₆). В качестве ростовой и поддерживающей среды применяли среду Игла MEM, содержащую 5% эмбриональной телячьей сыворотки.

Исследуемый препарат. Противовирусную активность рибавирина (Швейцария) оценивали при его концентрациях, составляющих 500, 250, 125 и 62,5 мкг/мл.

Проведение эксперимента. Десятикратными разведениями вируса Батаи (от 10⁻⁴ до 10⁻⁹) в объёме 100 мкл на лунку заражали культуру клеток Vero E₆, выращенную в 96-луночных планшетах. Контрольное титрование вирусов выполняли в трёх рядах лунок. Титрование вируса проводили в присутствии различных концентраций препаратов и специфических иммунных сывороток (ИАЖ) [6] в двух повторностях (рядах). Препарат и ИАЖ (в разведении 1:50) вносили через 1 час контакта вируса с клетками при 37 °С. Также рибавирин вносили за 1 час до контакта вируса с клетками, через 2, 4, 6 и 18 ч после их инфицирования.

Каждое разведение препаратов контролировали на наличие их возможного цитотоксического действия на клетки Vero E₆.

Инфицированные культуры клеток наблюдали от 3 до 14 дней инкубации планшетов при 37 °С в термостате с СО₂, просматривая лунки планшетов под инвертированным микроскопом (Leitz, Германия).

Результаты и обсуждение

В культуре клеток Vero E₆, инфицированных вирусом Батаи, рибавирин в концентрации 500 мкг/мл подавлял развитие *цитопатогенного действия* (ЦПД) на 2,8 lg, снижая цитопатогенную активность с 7,8 до 5,0 lg ЦПД₅₀/0,1 мл. При концентрации препарата 250 и 125 мкг/мл цитопатогенная активность вируса снижалась до 7,5 и 7,0 lg ЦПД₅₀/0,1 мл. При концентрации рибавирина 62,5 мкг/мл снижения цитопатогенной активности вируса не происходило. Титр вируса Батаи в контроле составлял 7,8 lg ЦПД₅₀/0,1 мл.

Снижение инфекционного титра вируса Батаи в присутствии гомологичной ИАЖ (индекс нейтрализации) составило 3,0 lg ЦПД₅₀. Эффективность препарата возрастала пропорционально его концентрации, при этом он не обладал цитотоксическим действием (табл. 1).

Нами выявлено, что рибавирин за 1 час до контакта клеток с вирусом не оказывает защитного действия. Также он не защищает клетки через 18 часов после заражения монослоя. В то же время он оказывает заметный противовирусный эффект спустя 2, 4 и 6 часов после заражения, снижая цитопатогенную активность (табл. 2).

В этой работе нами впервые было показано, что рибавирин активно подавляет репликацию вируса Батаи.

Таблица 2. Определение активности рибавирина в динамике внесения препарата в опытах *in vitro* на модели вируса Батаи

Время внесения препарата до и после заражения клеток Vero E ₆	Титр вируса в присутствии рибавирина	Титр вируса Батаи в контроле
	lg ЦПД ₅₀ /0,1 мл	
За 1 ч	7,5	
Через 1 ч	5,0	
Через 2 ч	5,5	
Через 4 ч	5,5	7,8
Через 6 ч	5,5	
Через 18 ч	8,0	

Литература

1. Белов А.В., Ларичев В.Ф., Галкина И.В., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. и др. Активность отечественного рибавирина в опытах *in vitro* на моделях вирусов крымской геморрагической лихорадки, лихорадки долины Рифт, Тягиня и Дхори. *Вопр вирусол* 2008; (1):34-5.
2. Константинова И.Д., Есипов Р.С., Муравьева Т.И. и др. Способ получения 1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рибавирин). Пат. РФ № 2230118 от 21.08.2002 г.
3. Enria V.A., Maiztegui S.L. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 1994; 23:23-31.
4. Huggins J.W., Cosgriff T.M., Smith J.I. Interruption study of viremia of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome in the febrile phase. *Chin Med J* 1991; 104:149-53.
5. Sidwell R.W., Huffman J.H., Barnett B.B., Pifat D.Y. *In vitro* and *in vivo* phlebovirus inhibition by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:331-6.