

УДК 615.281(047.3)(476), 616.928.9:578.7(047.3)(476)

*Н. Л. БОГДАНОВА, А. Г. КРАСЬКО,
Л. М. РУСТАМОВА, П. А. СЕМИЖОН, А. С. ПЕТКЕВИЧ*

**ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ГРУППЫ МЕТАБОЛИКОВ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГЕМОРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК,
ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ МАРБУРГ И ЭБОЛА**

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь,
e-mail: oleandr10@list.ru*

Проведена оценка защитных свойств двух лекарственных средств (ЛС) группы метаболитов на 2–4-дневных белых беспородных мышках-сосунках, инфицированных вирусами Марбург и Эбола, вызывающими тяжелые геморрагические лихорадки с высоким процентом смертности. Установлены высокие протективные свойства обоих ЛС при лечении экспериментальных инфекций. Данные ЛС рекомендованы в качестве средств оказания экстренной медицинской помощи пациентам при геморрагических лихорадках Марбург и Эбола в дополнение к патогенетической терапии.

Ключевые слова: геморрагические лихорадки, филловирuses Марбург, Эбола, защитные свойства, лекарственные средства.

N. L. BOGDANOVA, A. G. KRASKO, L. M. RUSTAMOVA, P. A. SEMIZHON, A. S. PETKEVICH

**USE OF THE MEDICATION GROUP OF METABOLITES FOR TREATMENT OF EXPERIMENTAL
HEMORRHAGIC FEVER CAUSED BY SEVERELY HAZARDOUS FILOVIRUSES MARBURG AND EBOLA**

*Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus,
e-mail: oleandr10@list.ru*

The protective properties of the two drugs (medicines) of the group of metabolites on 2–4 day albino mice-suckers, infected with Ebola and Marburg viruses that cause severe hemorrhagic fevers with a high percentage of mortality, are evaluated. High protective properties of the both drugs applied for treatment of experimental infections are revealed. Drugs are recommended for use as a means of providing emergency medical care to patients in hemorrhagic fever Marburg and Ebola in addition to the pathogenetic therapy.

Keywords: hemorrhagic fevers, filoviruses Marburg, Ebola barrier properties, medicaments.

Введение. Вирусы Марбург (MARV) и Эбола (EBOV) – представители РНК-содержащих вирусов, семейство Filoviridae, имеющих незначительные антигенные различия между собой и в то же время существенно отличающихся от всех известных вирусов по ультраструктуре и антигенному составу. Данные вирусы являются возбудителями особо опасных геморрагических лихорадок (ГЛ), вызывающих нозокоминальные вспышки. EBOV и MARV передаются людям от летучих мышей – крыланов, которые являются природным резервуаром инфекций. Заражение может произойти и от некоторых инфицированных диких животных (шимпанзе, горилл, антилоп и др.). Далее инфекция распространяется путем передачи от человека человеку при непосредственном контакте, а также парентерально – вирус содержится во всех средах организма.

Возможны и другие пути передачи вируса – аэрозольный, контактный, пищевой, трансмиссивный (посредством эктопаразитов). Эндемичными территориями распространения EBOV являются районы Центральной и Западной Африки вблизи влажных тропических лесов; для MARV – Демократическая Республика Конго, Кения, Уганда и Южная Африка. Впервые две крупные вспышки болезни Марбург были зарегистрированы в 1967 г. Они произошли одновременно в городах Марбург (что определило название инфекции), Франкфурт (Германия) и Белград (Сербия) и были связаны с лабораторными работами, которые проводились с африканскими зеле-

ными маргитками (*Cercopithecus aethiops*), ввезенными из Уганды. Установлено, что репродукция MARV может осуществляться в комарах *A.×Ixodes ricinus* (последние расселены повсеместно) в сроки до 15 дней. Есть сведения, указывающие на возможность вертикальной передачи возбудителя.

ГЛ Эбола впервые была зарегистрирована в 1976 г. в Судане и Демократической Республике Конго в одном из селений рядом с рекой Эбола (что определило название болезни). Вспышка ГЛ Эбола, возникшая в Гвинее в декабре 2013 г., была зафиксирована далее в Либерии, Нигерии и Сьерра-Леоне. В августе 2014 г. появились сообщения о 1711 случаях заболевания (1070 подтвержденных, 436 возможных, 205 предполагаемых), включая 932 смертельных случая. По данным ВОЗ, при вспышке ГЛ Эбола 2014–2015 гг. от смертельного заболевания в Гвинее, Либерии и Сьерра-Леоне погибли 11 064 человека, зараженными в этих странах остаются 26 722 человека.

Смертность во время вспышек при ГЛ Марбург варьируется в пределах от 24 до 88 %, при Эбола – до 90 %. MARV и EBOV принадлежат к патогенам, которые могут быть завезены на любую территорию мира как случайно, так и намеренно (могут быть использованы в качестве биологического оружия). Несмотря на обнадеживающие результаты ряда исследований, вакцины против филовирюсов находятся пока в стадии разработки. Поэтому проводят патогенетическую и симптоматическую терапию, вводят плазму реконвалесцентов. Применение плазмы эффективно только в течение первой недели заболевания, при ее введении в более поздние сроки возможно ухудшение состояния пациента. Однако плазма не всегда имеется в наличии или ее количества недостаточно. Патогенетическая терапия, применяемая в мире, мало эффективна. Поэтому актуальной является разработка эффективных средств терапии и профилактики в отношении ГЛ Марбург и Эбола, вызываемых одноименными вирусными агентами [1–3].

Нами осуществлен прицельный поиск лекарственных средств (ЛС) фармакопейного статуса в отношении исследуемых инфекций среди представителей группы препаратов, способных подавлять выработку эндогенного холестерина. Известно, что холестерин и его метаболиты влияют на определенные стадии репродукции вирусов в зараженных клетках. Интерес представляет также плейотропный антитромботический эффект, заключающийся в угнетении адгезии и агрегации тромбоцитов. Это свойство является немаловажным звеном для предотвращения формирования диссеминированного васкуляторного синдрома (ДВС-синдрома) при ГЛ вирусной этиологии. Существуют ЛС, способные связываться с тропными участками токсинов в течение развития инфекции, усиливая процессы элиминации токсинов, и ЛС, способные подавлять наработку S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы – ключевого фермента в обмене нуклеиновых кислот. Многие вирусы, в том числе филовирюсы, чувствительны к ингибиторам этого фермента [4–13].

При установлении у ЛС антивирусных свойств они могут быть рекомендованы к применению в схемах терапии вирусных инфекций по новому назначению, что позволит расширить спектр их применения. Ранее нами проведены исследования противовирусных свойств ряда фармакопейных препаратов на моделях арена-, ортомиксо- и флавивирюсов с выявлением у них антивирусных свойств [14–15].

Цель настоящей работы – установить в эксперименте на мышцах-сосунках защитные свойства отобранных лекарственных средств группы метаболитов в отношении MARV и EBOV.

Материалы и методы исследования. Вирусы. В связи с высокой биологической опасностью возбудителей работы выполняли с соблюдением условий максимальной защиты, соответствующих международному уровню безопасности Р4. В ходе исследования использовали EBOV, штамм Заир и MARV, штамм 426, хранящиеся в Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека (РНИЦ эпидемиологии и микробиологии). Разведения вируса готовили на физиологическом растворе. Животных заражали интрацеребрально (i/c) в дозе 1000 БОЕ/мышь в объеме 0,01 мл, что приводило к 80–100 %-ной гибели контрольных животных, не получавших лечения. Препарат разводили на бидистиллированной воде.

Животные. В работе использованы белые беспородные 2–4-дневные мыши. Поставки животных осуществляли из вивария РНИЦ эпидемиологии и микробиологии. Пригодными для эксперимента были признаны только клинически здоровые, но восприимчивые к соответствующим

ющим вирусам, применяемым в исследовании, животные. Мышат содержали на стандартном рационе с достаточным количеством питьевой воды. Все манипуляции с ними в процессе проведения эксперимента осуществляли в соответствии с ветеринарным законодательством. Помет новорожденных мышат содержали вместе с матерями (одна семья в клетке).

Лекарственные средства. Для установления противовирусной активности в отношении MARV и EBOV исследовали ЛС группы метаболитов с шифрами 14-01 (гиполипидимическое ЛС) и 14-02 (органотропное ЛС). Испытуемые дозы ЛС готовили на бидистиллированной воде. Предварительно были установлены их максимальные нетоксичные концентрации для исследуемых животных по стандартным методикам. Максимально переносимой считали 1/2 наивысшей переносимой концентрации, не вызывающей, в отличие от контроля, гибель животных.

Схема применения ЛС. ЛС применяли внутрь (per os) или вводили интраперитонеально (i/p) в нетоксичных дозах по 0,1 мл однократно по следующей лечебно-профилактической схеме: за 1 ч до инфицирования вирусом, через 24 ч после инфицирования в течение 12 сут включительно. Срок наблюдения составлял 21 день от момента заражения. Результаты сравнивали с показателями животных контрольной группы, не получавшими лечения; в качестве плацебо инокулировали i/c физиологический раствор. В качестве контроля ЛС использовали бидистиллированную воду, вводимую i/p или per/os. Еще одна опытная группа животных, не подвергавшаяся никаким манипуляциям, называлась контролем стада. Действие препарата оценивали по увеличению выживаемости и удлинению срока жизни животных опытных групп по сравнению с контролем.

Статистическую обработку различий между выживаемостью животных, получавших препараты, и контролем проводили, используя *t*-критерий Стьюдента. Полученные данные считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Присутствие вирусов в пробах от животных подтверждали методом ПЦР, амплифицируя диагностически значимые участки геномов. Была использована универсальная пара олигонуклеотидов (праймеров), ограничивающая фрагмент L-сегмента вирусного генома размером 419 bp, и проведены молекулярно-биологические диагностические тесты. Последовательности праймеров для идентификации РНК вирусов Марбург и Эбола:

M/E/L f	5'-ATCGGAATTTTCTTTCTCATT-3'	13213–13234	419 н. п.
			L-сегмент
M/E/L r	5'-ATGTGGTGGGTATAATAATCACTGACATG-3'	13631–13601	Эбола/Марбург

Для выделения вирусной РНК из вирусосодержащего материала (мозговая суспензия, полученная на пике инфекции; неинфицированная культуральная проба) использовали:

набор реагентов QIAamp MinElute Virus Spin Kit фирмы Qiagen, США;

набор «РИБО-преп» фирмы «АмплиСенс», РФ;

набор «Комплект для выделения ДНК/РНК» фирмы «Литех», РФ;

РНК-золь-гуанидин-фенол содержащий раствор, аналог Trizol, Life technologies, разработанный в лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики РНПЦ эпидемиологии и биотехнологии.

Постановку реакции обратной транскрипции проводили со случайными праймерами с использованием набора «Реверта-L» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, РФ).

Электрофоретический анализ фрагментов ДНК (амплификация диагностически значимых фрагментов) проводили в 1–1,5 %-ных агарозных гелях. В качестве электродного буфера использовали 1×TAE. Для визуализации анализируемой ДНК гели окрашивали раствором бромистого этидия в конечной концентрации 1,0 мкг/мл.

Результаты и их обсуждение. Оценка защитных свойств ЛС 14-01. В контрольной группе животных, не получавших лечения, на 5–6-й день после заражения вирусом MARV и на 7–9-й день после заражения вирусом EBOV гибель мышей составила 80 и 100 % соответственно.

При применении ЛС в дозе 2,5 мкг/мышь наряду с контролем (MARV) в те же сроки погибло лишь 10 % животных. Защитный эффект составил 70 %. При инфицировании мышей EBOV

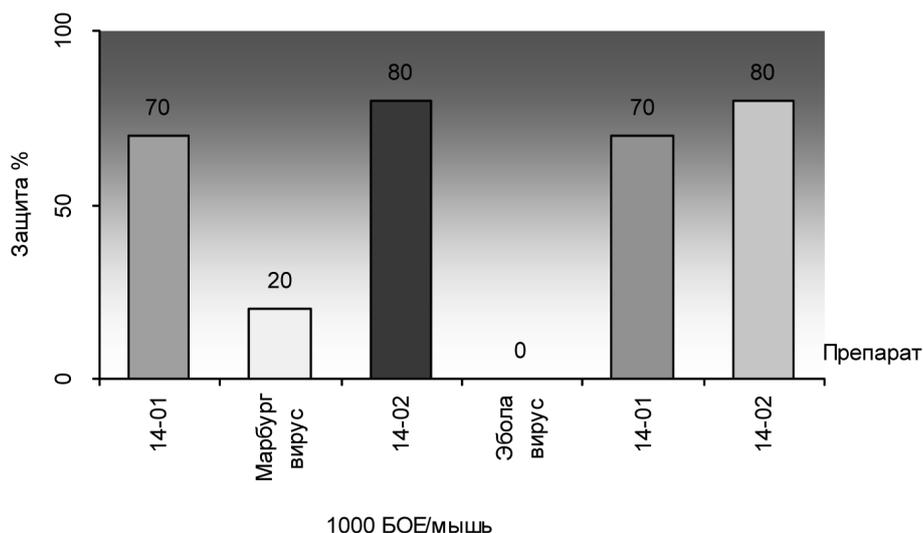


Рис. 1. Выживаемость животных при применении ЛС 14-01 и 14-02 на модели вирусов Марбург и Эбола

в группе животных, получавших ЛС, погибло 30 % животных по сравнению с контрольной группой, защитный эффект также составил 70 %.

Оценка защитных свойств ЛС 14-02. На 5–6-й день после инфицирования вирусом Марбург и на 7–9-й день после инфицирования вирусом Эбола в контрольной группе животных, не получавших лечения, гибель составила 80 % (ГЛ Марбург) и 100 % (ГЛ Эбола).

В группе животных, получавших ЛС в дозе 0,6 мкг/мышь (MARV-инфекция), выжили все животные, защитный эффект составил 80 %; при инфицировании вирусом EBOV погибло 20 % животных, защитный эффект также 80 % (рис. 1).

В процессе проводимого лечения с применением как ЛС 14-01, так и ЛС 14-02 у животных (в сравнении с группами «плацебо» и «контроль стада») отмечены следующие визуальные признаки: выжившие мыши в опытной группе охотно принимали пищу, были подвижны, хорошо набирали вес, состояние шерстяного покрова у них было в норме (гладкий, с блеском, густой) по сравнению с таковыми параметрами у животных, не получавших ЛС.

У заболевших животных опытных групп с наступлением периода лихорадки мыши отставали в весе, отказывались от пищи, были малоподвижны, держались плотно рядом, шерсть – клочьями, тусклая.

Следует отметить, что при проведении экспериментов наиболее выраженный защитный эффект наблюдался у ЛС 14-02.

Проведены тесты (ОТ-ПЦР) с отобранными пробами от зараженных животных (мозговая суспензия, полученная на высоте клинических проявлений). В результате постановки ОТ-ПЦР со специфическими праймерами на матрице РНК MARV, штамм 426, и EBOV, штамм Заир, амплифицируется кДНК-фрагмент размером 419 н. п., характерный для данных вирусов (рис. 2).

В пробах, отобранных от зараженных животных, подтверждено присутствие исследуемых вирусов.

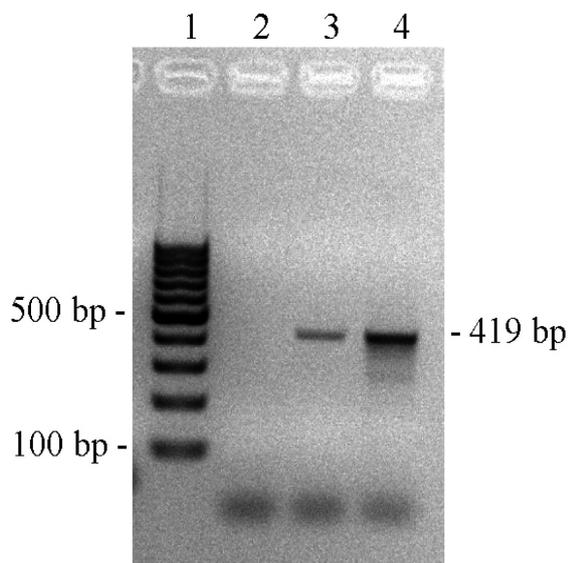


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов амплификации на матрице РНК вирусов Марбург и Эбола: 1 – DNA-ladder 100 bp; 2 – К⁻ (РНК, выделенная из неинфицированной культуральной жидкости); 3, 4 – РНК, выделенная из мозговой суспензии, содержащей вирусы Марбург и Эбола соответственно

Выводы

1. Установлены выраженные протективные свойства ЛС: ЛС под шифром 14-01 в дозе 2,5 мкг/мышь защищало животных от инфекции на 70 %; ЛС под шифром 14-02 в дозе 0,6 мкг/мышь защищало животных от инфекции на 80 %. Наиболее выраженный защитный эффект отмечался у ЛС 14-02;

2. В отобранных пробах от инфицированных животных (на пике клинических проявлений) с помощью ОТ-ПЦР подтверждено присутствие исследуемых вирусов.

3. Разработана инструкция по применению «Метод экстренной медицинской помощи при геморрагических лихорадках Денге, Марбург и Эбола в дополнение к патогенетической терапии», утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь 27 ноября 2014 г., № 249-12-13.

4. ЛС 14-01 и 14-02 рекомендованы в качестве средств экстренной медицинской помощи при ГЛ Марбург и Эбола (расширение спектра применения предъявленных ЛС).

5. Получено положительное решение Национального центра интеллектуальной собственности Республики Беларусь по двум заявкам на изобретения по выявлению защитных свойств у ЛС 14-01 и 14-02 в отношении инфекций, вызываемых вирусами Марбург и Эбола.

Список использованной литературы

1. *Salvaggio, M. R.* Other viral bioweapons: Ebola and Marburg hemorrhagic fever / M. R. Salvaggio, J. W. Baddley // *Dermatol. Clin.* – 2004. – Vol. 22, N 3. – P. 291–302.

2. Inhibition of Lassa virus and Ebola virus infection in host cells treated with the kinase inhibitors genistein and tyrphostin / A. A. Kolokoltsov [et al.] // *Arch. Virol.* – 2012. – Vol. 157, N 1. – P. 1115–1118.

3. Identification of novel S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors through homology-model-based virtual screening, synthesis, and biological evaluation / P. Khare [et al.] // *J. Chem. Inf. Model.* – 2012. – Vol. 52, N 3. – P. 777–791.

4. *Wolfe, M. S.* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase as a target for antiviral chemotherapy / M. S. Wolfe, R. T. Borchardt // *J. Med. Chem.* – 1991. – Vol. 34, N 5. – P. 1521–1530.

5. Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans / T. Bader [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 103, N 6. – P. 383–389.

6. Chemical combinations elucidate pathway interactions and regulation relevant to Hepatitis C replication / C. M. Owens [et al.] // *Mol. Syst. Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 375. – doi: 10.1038/msb.2010.32.

7. *Bradfute, S. B.* Mouse models for filovirus infections / S. B. Bradfute, K. L. Warfield, M. Bray // *Viruses.* – 2012. – Vol. 4, N 9. – P. 1477–1508.

8. *Драпкина, О. М.* Статины и риск развития инфекционных заболеваний / О. М. Драпкина, Р. Н. Шепель // *Рациональный фармакологический журнал.* – 2013. – Т. 9, № 3. – С. 306–310.

9. Статины и альтернатива статинам, статины: механизм действия, показания, осложнения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://heart-sos.ru/articles/statiny/>. – Дата доступа: 17.11.2013.

10. Обнаружена терапевтическая активность некоторых статинов в отношении хантавирусов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.linezolid.ru/obnaruzhena-terapevticheskaya-aktivnost-nekotoryx-statinov-v-otnoshenii-xantavirusov/>. – Дата доступа: 17.07.2014.

11. Статины снижают смертность при гриппе: невероятное открытие американских исследователей [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antiflu.ru/statiny-snizhayut-smertnost-pri-grippe-neveroyatnoe-otkrytie-amerikanskix-issledovatelej/>. – Дата доступа: 17.06.2014.

12. Применение статинов при гриппе [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://surgeryzone.net/news/primenenie-statinov-pri-grippe.html>. – Дата доступа: 17.06.2014.

13. Активность синтетических и растительных препаратов при экспериментальной геморрагической лихорадке Ласса и лимфоцитарном хориоменингите / Н. Л. Богданова [и др.] // *Материалы V ежегод. Всерос. конгр. по инфекц. болезням.* – М., 2013. – С. 62.

14. *Богданова, Н. Л.* Терапия геморрагической лихорадки денге в эксперименте / Н. Л. Богданова, А. Г. Красько, А. С. Петкевич // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр.* – Минск: ГУ РНМБ, 2013. – Вып. 6. – С. 118–121.

15. *Богданова, Н. Л.* Лекарственные средства, ингибирующие вирусы лимфоцитарного хориоменингита и лихорадки Ласса *in vitro* / Н. Л. Богданова, Л. М. Рустамова, А. Г. Красько // *Здравоохранение.* – 2012. – № 11. – С. 25–27.

Поступила в редакцию 20.08.2015