



Савинова О.В., Шмелёва Н.П., Семижон П.А., Бореко Е.И.
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Беларусь

Изучение противовирусной активности Гропринозина в отношении возбудителя коронавирусной инфекции SARS CoV-2 in vitro*

Подана: 04.02.2022
Принята: 11.02.2022
Контакты: shmelevanataliya@mail.ru

Резюме

Противовирусные свойства Гропринозина исследованы в отношении коронавируса человека SARS-CoV-2 на монослойной культуре клеток почки африканской зелёной обезьяны (Vero E6) методом оценки ингибирования цитопатического действия вируса. Полученные данные свидетельствуют о высоком противовирусном действии препарата в отношении возбудителя коронавирусной инфекции человека COVID-19.

Ключевые слова: Гропринозин, SARS-CoV-2, COVID-19, противовирусная активность

Savinova O., Shmialiova N., Semizhon P., Boreko E.
Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,
Minsk, Belarus

Study of Antiviral Activity of Groprinosin against SARS CoV-2 Coronavirus Infection Agent in Vitro*

Submitted: 04.02.2022
Accepted: 11.02.2022
Contacts: shmelevanataliya@mail.ru

Abstract

The antiviral properties of Groprinosin were studied against the human coronavirus SARS-CoV-2 in a monolayer culture of African green monkey kidney cells (Vero E6) using the method of assessment of the inhibition of the cytopathic action of the virus. The data obtained reveal a high antiviral effect of the medicinal product against the pathogen of human coronavirus infection COVID-19.

Keywords: Groprinosin, SARS-CoV-2, COVID-19, antiviral activity

* На правах рекламы.

■ ВВЕДЕНИЕ

В прошлом веке коронавирусы были известны как возбудители острых респираторных заболеваний человека и животных, однако не относились к числу особо опасных вирусных инфекций. Появление сначала тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome, SARS) в 2002 г., а затем ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome, MERS) в 2012 г. заставило специалистов осознать существенно более высокий уровень эпидемической опасности коронавирусов [3, 6]. В конце 2019 г. в Китайской Народной Республике произошла вспышка новой коронавирусной инфекции. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила официальное название инфекции – COVID-19 (Coronavirus disease 2019). В настоящее время COVID-19 имеет особое значение среди других инфекционных заболеваний в связи с высокой вирулентностью возбудителей, способностью к эпидемическому и пандемическому распространению. Отсутствие эффективного лечения и высокие показатели заболеваемости и смертности обуславливают необходимость поиска новых средств для лечения коронавирусных инфекций.

Гроприносин (Groprinosin, инозин пранобекс) – комплексный препарат, сочетающий в себе свойства универсального иммуномодулятора с прямой противовирусной активностью. Эффективность комплекса обусловлена присутствием производного пурина – инозина. Второй компонент – соль 4-ацетамидобензойной кислоты и N,N-диметиламино-2-пропанола – повышает проницаемость биологических мембран для инозина. Препарат тормозит репликацию широкого спектра ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Его противовирусная активность обусловлена ингибированием присоединения адениловой кислоты к вирусной РНК и изменением стереохимической структуры рибосом, что приводит к нарушению синтеза вирусных белков.

Иммуномодулирующий эффект сопровождается выработкой интерферона. Кроме того, инозин пранобекс модулирует иммунный ответ по клеточному типу, стимулирует активность Т-лимфоцитов и естественных киллеров, функции Т-супрессоров и Т-хелперов, повышает продукцию иммуноглобулина G (IgG), интерферона гамма, интерлейкинов – ИЛ-1 и ИЛ-2, снижает образование противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10, потенцирует хемотаксис нейтрофилов, моноцитов и макрофагов [4].

К настоящему времени накоплен огромный опыт его применения у детей и взрослых для лечения и профилактики различных вирусных инфекций [2, 4, 5]. Данные, полученные в ходе изучения влияния Гропринозина на репродукцию вирусов гриппа *in vitro*, свидетельствуют о выраженной противовирусной активности препарата в отношении вирусов гриппа типа А (в том числе и в отношении вируса гриппа А(H1N1) pdm09) и умеренной активности в отношении вирусов гриппа типа В, что позволяет рекомендовать его как эффективный противовирусный препарат для профилактики и лечения гриппа в ранние сроки заболевания [5].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение противовирусной активности препарата Гроприносин в отношении возбудителя коронавирусной инфекции человека *in vitro*.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коронавирус SARS-CoV-2, изолят 7763, выделенный в марте 2021 г. из секционного материала (суспензия легкого и трахеи) от пациента, перенесшего коронавирусную инфекцию, и имеющийся в коллекции лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РНПЦЭМ).

Коронавирус пассировали на монослойной культуре клеток почки африканской зеленой марышки (Vero E6) производства РНПЦЭМ. Культуру клеток рассевали на 96-луночную стерильную клеточную панель. В исследовании использовали суточную клеточную культуру клеток Vero E6 с 90–100%-ным монослоем, исходная посевная доза составляла 20 тыс. клеток/луночка.

В качестве ростовой среды для культуры клеток использовали среду DMEM с добавлением 10%-ной сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, в качестве среды поддержки – ту же среду без сыворотки.

Гроприносин был предоставлен производителем – ОАО «Гедеон Рихтер» (Венгрия), серия № H07043A. Таблетку препарата растворяли, и готовили концентрации препарата в исследуемом диапазоне на среде поддержки.

Противовирусные свойства Гроприносина в отношении коронавируса человека SARS-CoV-2 исследовали методом оценки ингибирования цитопатического действия вируса (ЦПД). После формирования монослоя клеток ростовую среду заменяли средой поддержки с содержанием препарата в различных концентрациях. Для изучения профилактического действия (группа I) культуру клеток инфицировали 0,01–0,001 ТЦИД₅₀/клетка вируса спустя сутки инкубации со средой поддержки, в группе II (вирусингибирующее действие) инфицирование проводили непосредственно перед внесением среды поддержки. После 48 ч инкубации при 37 °С регистрировали морфологические изменения монослоя клеток (ЦПД, увеличение $\times 80$). После развития ЦПД вируса вычисляли его инфекционный титр. Показателем наличия противовирусного действия служила разность с титром вируса в контроле без препарата.

Концентрации 50 и 90% подавления размножения вируса в присутствии препарата (EC₅₀ и EC₉₀) определяли на основе пробит-анализа и взвешенной линейной регрессии [7].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация Гроприносина 1600 мкг/мл оказалась токсичной для культуры клеток. Исходя из этого максимально переносимой концентрацией (МПК) оказалась концентрация 800 мкг/мл. И в первой (группа I), и во второй группе (группа II) установлен четкий дозозависимый противовирусный эффект (рис. 1). С увеличением концентрации препарата титр вируса снижился.

Вычисленные значения титра вируса в присутствии различных концентраций Гроприносина и их разность с титром вируса в контроле без препарата приведены в таблице. В группе I (профилактическое действие), где инфицирование проводили после 24 ч инкубации со средой поддержки, содержащей Гроприносин, полное подавление репродукции коронавируса имело место в диапазоне концентраций 800–200 мкг/мл препарата. Нижняя граница разведения Гроприносина

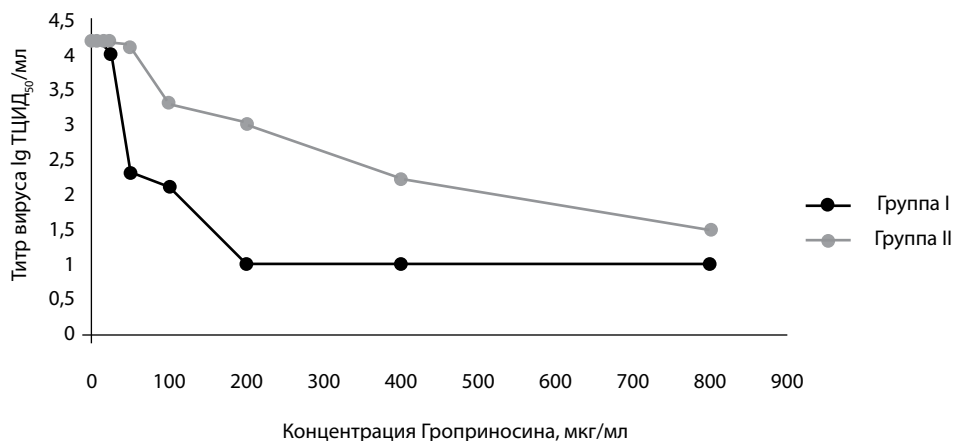


Рис. 1. Зависимость титра вируса от концентрации Гропринозина
Fig. 1. The dependence of the virus titer on the concentration of Groprinosin

с высокой активностью в отношении SARS-CoV-2 (снижение титра вируса более 1 Ig TCID₅₀/мл) при профилактической предобработке культуры клеток соответствует концентрации препарата 50 мкг/мл. Менее значительная противовирусная активность установлена в группе II, где среду поддержки, содержащую препарат, наносили на культуру клеток непосредственно после инфицирования.

Для дополнительной оценки противовирусной активности препарата были вычислены значения EC₅₀ и EC₉₀, а также диапазон эффективных концентраций, нетоксических для культур клеток (широта фармакологического действия, отношение МПК/EC₅₀ и МПК/EC₉₀) (рис. 2).

Снижение титра вируса в присутствии Гропринозина
Decreased virus titer surrounded by Groprinosin

Группа	Концентрация, мкг/мл	Титр вируса ± Sx, Ig TCID ₅₀ /мл	Разность с контролем, Ig TCID ₅₀ /мл
I	800–200	<1,0	>3,18
	100	2,11±0,52	2,07
	50	2,30±0,38	1,88
	25–6,25	4,00±0,53	0,18
	0	4,18±0,26	–
II	800	1,48±0,34	2,70
	400	2,21±0,41	1,97
	200	3,00±0,54	1,18
	100–6,25	3,30±0,32	0,88
	0	4,18±0,26	–

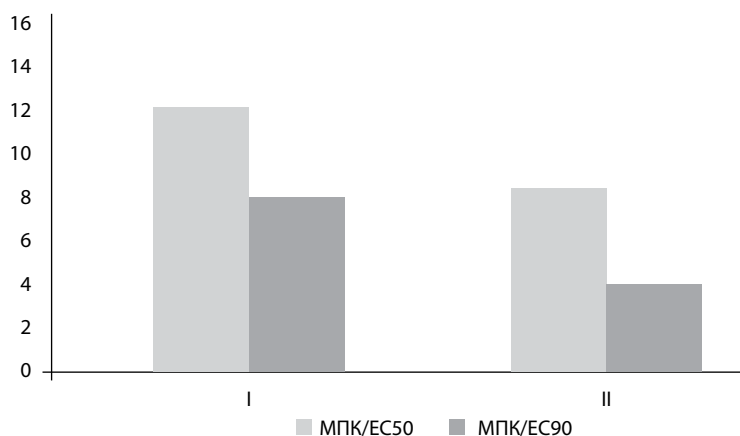


Рис. 2. Диапазон эффективных нетоксических концентраций Гропринозина
Fig. 2. A wide range of effective non-toxic concentrations of Groprinosin

Примечание: группа I – профилактическая схема обработки; группа II – вирусингибирующее действие.

При профилактической схеме обработки среднее эффективная концентрация составила 55,6 (58,5±52,7) мкг/мл, при исследовании вирусингибирующего эффекта – 74,7 (80,2±69,5) мкг/мл. Диапазон эффективных концентраций, нетоксических для культур клеток, при вирусингибирующем действии составил 5,5 (исходя из величины $EC_{90}=145,6$ мкг/мл). Согласно принятой оценке степени выраженности противовирусного действия [1], возбудитель высокочувствителен к препарату, степень активности между средней и высокой. При внесении препарата по профилактической схеме диапазон эффективных концентраций, нетоксических для культур клеток, составляет 10 ($EC_{90} = 79,7$ мкг/мл), возбудитель высокочувствителен к препарату, степень противовирусного действия высокая. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высоком противовирусном действии испытанного образца препарата при разных схемах обработки клеток.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о высоком противовирусном действии Гропринозина в отношении возбудителя коронавирусной инфекции человека COVID-19. При профилактической обработке культуры клеток за 24 ч до инфицирования нижняя граница разведения препарата с высокой активностью в отношении SARS-CoV-2 соответствует концентрации 50 мкг/мл, диапазон эффективных концентраций, нетоксических для культур клеток, составляет 10 ($EC_{90} = 79,7$ мкг/мл), при обработке культуры клеток непосредственно после инфицирования нижняя граница разведения препарата с высокой активностью соответствует концентрации 200 мкг/мл, диапазон нетоксических эффективных концентраций составляет 5,5 ($EC_{90}=145,6$ мкг/мл). Коронавирус SARS-CoV-2 (возбудитель COVID-19) высокочувствителен к противовирусному действию Гропринозина.



■ ЛИТЕРАТУРА

1. Votyakov V.I., Boreko E.I., Vlyadyko G.V. (1986) *Pervichnoe izuchenie antivirusnykh svoystv sinteticheskikh i prirodnykh soedinenij. Metod. Rekomendacii* [Primary detection of antiviral properties of synthetic and natural compounds. Method. Recommendations]. Minsk, 26 p. (in Russian)
2. Kishkurno E.P., Amvroševa T.V., Karpov I.A. (2007) K voprosu o terapii eenterovirusnykh infekcij [On the Therapy of Enterovirus Infections]. *Medicina*, no 2 (57), pp. 79–82. (in Russian)
3. L'vov D.K., Al'hovskij S.V. (2020) Istoki pandemii COVID-19: ekologiya i genetika koronavirusov (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (podrod Sarbecovirus), MERS-CoV (podrod Merbecovirus) [Origins of the COVID-19 Pandemic: Ecology and Genetics of Coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (Sarbecovirus subgenus), MERS-CoV (Merbecovirus subgenus)]. *Voprosy virusologii*, vol. 65, no 2, pp. 62–70. (in Russian)
4. Savenkova M.S., Balaktreva G.M., Romyanceva I.G. (2017) Pokazaniya i opyt primeneniya inozina pranobeksa v pediatricheskoj praktike [Indications and Results of Inosin Pranobex Administration in Pediatric Practice]. *Pediatrica (Pril. K zhurn. Consilium Medicum)*, vol. 4, pp. 52–55. (in Russian)
5. Sergienko E.N., Shmeleva N.P., Germanenko I.G. (2009) Gripp u detej: kliniko-epidemiologicheskie osobennosti i novye vozmozhnosti terapii [Influenza in Children: Clinical and Epidemiological Features and New Methods of Therapy]. *Medicinskie novosti*, no 14, pp. 71–74. (in Russian)
6. Shchelkanov M.Yu., Kolobuhina L.V., L'vov D.K. (2013) Koronavirusy cheloveka (Nidovirales, Coronaviridae): vozroschij uroven' epidemicheskoy opasnosti [Human Coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): Increased Epidemic Risk]. *Lechashchij vrach*, no 10, pp. 49–54. (in Russian)
7. Fung K.P. (1989) A computer program in basic for estimation of ED₅₀ and LD₅₀. *Comput. Biol. Med.*, vol. 19, no 2, pp. 131–135.