

ГЛИЦИРРИЗИН, АКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТ КОРНЕЙ СОЛОДКИ, И РЕПЛИКАЦИЯ SARS-АССОЦИИРОВАННОГО КОРОНАВИРУСА.

J Cinatl, B Morgenstern, G Bauer, P Chandra, H Rabenau, H W Doerr

Вспышка SARS (тяжелого острого респираторного синдрома) требует поиска противовирусных препаратов для лечения этого заболевания. В настоящее время не обнаружено какого-либо специального лечения коронавирусной инфекции, связанной с SARS. Мы оценили противовирусный потенциал рибавирина, 6-азауридина, пиразофурина, микофеноловой кислоты и глицирризина в отношении двух клинических изолятов коронавируса (FFM-1 и FFM-2), полученных от пациентов с SARS (тяжелый острый респираторный синдром), поступивших в клинический центр Франкфуртского университета, Германия. Из всех соединений, глицирризин был наиболее активным в подавлении репликации SARS-ассоциированного вируса. Данные результаты показывают, что глицирризин должен быть проанализирован для лечения ТОРС (SARS, острый респираторный синдром).

Lancet 2003; 361: 2045–46

Новый коронавирус был идентифицирован у пациентов с тяжелым острым респираторным синдромом (ТОРС).¹ ТОРС является инфекционным заболеванием с высокой контагиозностью. Вспышка ТОРС в нескольких странах привела к поиску активных противовирусных соединений для лечения этого заболевания.

Здесь мы оценили противовирусную активность рибавирина, 6-азауридина, пиразофурина, микофеноловой кислоты и глицирризина в отношении двух клинических изолятов коронавируса (FFM-1 и FFM-2) от пациентов с ТОРС, поступивших в клинический центр Франкфуртского университета, Германия. Все препараты доступны в продаже и применяются у пациентов, поскольку обладают противовирусной, противоопухолевой и иммунодепрессивной активностью. Мы визуально оценили цитопатогенность, индуцированную вирусом через 72–96 ч после инфицирования в 96-луночных микропланшетах на непрерывных слоях клеток Vero. Индекс селективности определялся как отношение концентрации соединения, которое снижало жизнеспособность клеток до 50% (CC₅₀), к концентрации соединения, необходимой для ингибирования цитопатического эффекта, до 50% от контрольного значения (EC₅₀). Была определена цитотоксичность лекарственных средств с помощью ММТ теста пролиферативной активности клеток I (Roche, Мангейм, Германия).

Активность соединений в отношении SARS-ассоциированного коронавируса в клеточных культурах Vero

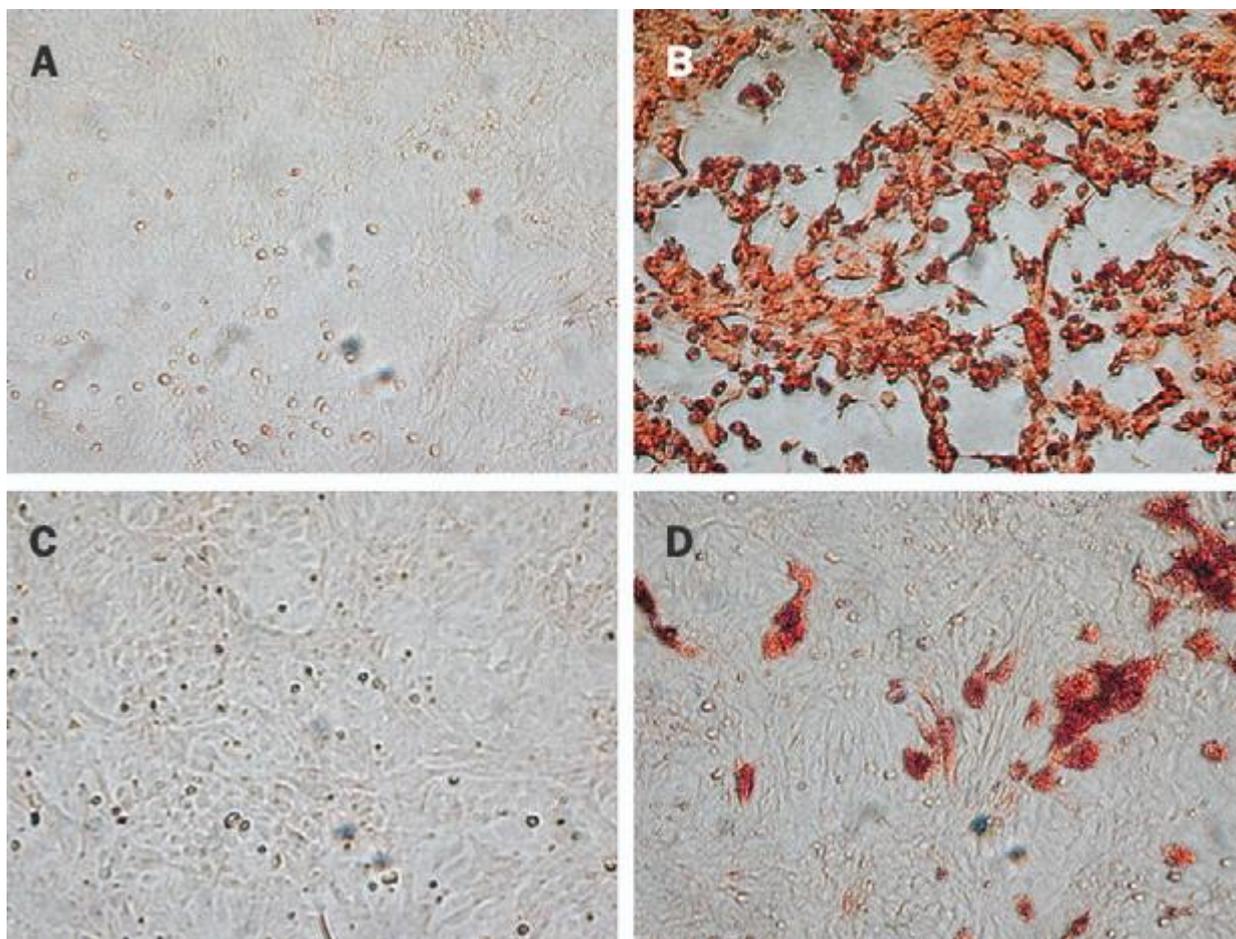
	EC ₅₀ * (мг/л)	CC ₅₀ * (мг/л)	Индекс селективности
Соединение			
6-азауридин	16·8 (2·9)	104 (18)	6
пиразофурин	4·2 (0·57)	52 (9·6)	12
Микофеноловая кислота	>50	>50	NC
Рибавирин	>1000	>1000	NC
Глицирризин	600 (72)	>20 000†	>33
После вирусной адсорбции			
Во время и после вирусной адсорбции	300 (51)	>20 000	>67
Во время вирусной адсорбции	2400 (410)	>20 000	>8·3

EC₅₀ = эффективная концентрация соединения, необходимая для подавления цитопатического эффекта, до 50% от контрольного значения. CC₅₀ = цитотоксическая концентрация соединения, которая снижает жизнеспособность клеток до 50%. NC = не рассчитывается.

* Среднее (SD) из восьми проб. † При максимальной использованной концентрации (20 000 мг/л) было отмечено снижение жизнеспособности клеток на 20–30%.

Рибавирин и микофеноловая кислота, ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы, не воздействовали на репликацию SARS-ассоциированных коронавирусов (SARS-CV) (таблица). Ингибиторы оротидинмонофосфатдекарбоксилазы, 6-азауридин и пиразофуридин ингибировали репликацию SARS-CV в нетоксичных дозах с индексами селективности 5 и 12 соответственно. Наиболее сильным ингибитором репликации SARS-CV в клетках Vero был глицирризин с индексом селективности 67.

Помимо ингибирования репликации вируса, глицирризин ингибирует адсорбцию и проникновение вируса – первые этапы репликативного цикла. Глицирризин был менее эффективен при добавлении в течение периода адсорбции, чем при добавлении после адсорбции вируса (EC_{50} 600 мг/л по сравнению с 2400 мг/л соответственно). Глицирризин был наиболее эффективным, когда его вводили как во время, так и после периода адсорбции (EC_{50} 300 мг/л). На рисунке показано воздействие глицирризина на репликацию SARS-CV в клетках Vero. Мы обнаружили репликацию SARS-CV с образцами сыворотки от пациентов с SARS. Экспрессия вирусных антигенов была намного ниже в культурах, обработанных 1000 мг/л глицирризина, чем в любой другой культуре; высокие концентрации глицирризина (4000 мг/л) полностью блокировали репликацию вируса (рисунок).



Воздействие глицирризина на репликацию SARS-ассоциированного коронавируса в клетках Vero

Клетки были зафиксированы смесью метанола и ацетона в соотношении 60:40 через 72 часа после инфицирования. Вирус был обнаружен в сыворотке крови пациента с ТОРС путем окрашивания пероксидазой. (А) макет инфицированных клеток. (Б) инфицированные клетки без обработки. (С) инфицированные клетки, обработанные 4000 мг/л глицирризина. (D) инфицированные клетки, обработанные 1000 м /л глицирризина.

При сравнении противовирусного потенциала 6-азауридина, рибавирина и глицирризина в отношении нескольких патогенных флавивирусов, Crance и коллеги² продемонстрировали, что рибавирин и 6-азауридин были активными, но не селективными

ингибиторами, когда их оценивали в отношении ингибирования роста клеток. Глицирризин имел низкий индекс селективности, но был в значительной степени мощным ингибитором репликации всех протестированных вирусов. EC50 (концентрация, вызывающая 50% подавление вирусной репликации клинических и лабораторных штаммов), о котором сообщают эти авторы для глицирризина, составлял 316–625 мг/л (добавляли дважды в течение периода инкубации, составляющего 7 дней).

Принимая во внимание, что соединения были добавлены дважды в течение всего периода инкубации, EC50 для глицирризина, который мы записали (таблица), указывает на более высокую чувствительность SARS-CV к этому лекарственному средству, чем у Crance и коллег.

Механизм активности глицирризина в отношении SARS-CV неясен. Глицирризин влияет на клеточные сигнальные пути, такие как протеинкиназа C; казеинкиназа II; и факторы транскрипции, такие как белок-активатор 1 и ядерный фактор κB. Кроме того, глицирризин и его метаболит агликон 18β глицирретеновая кислота усиливает экспрессию индуцибельной синтазы закиси азота и продукцию закиси азота в макрофагах³. Закись азота ингибирует репликацию нескольких вирусов, например вирус японского энцефалита⁴ (представитель семейства Flaviviridae), который также может ингибироваться глицирризином.² Наши предварительные результаты показывают, что глицирризин индуцирует синтазу оксида азота в клетках Vero, и что репликация вируса ингибируется при добавлении донора закиси азота (DETA NONOate) к питательной среде.

Глицирризин ранее применялся для лечения пациентов с ВИЧ-1 и хроническим вирусным гепатитом С. Получающиеся в результате низкие концентрации антигена P24 у пациентов с ВИЧ-1, которым давали это соединение, были связаны с активацией хемокинов. Редкие побочные эффекты, такие как повышение артериального давления и гипокалиемия, были зарегистрированы у некоторых пациентов после нескольких месяцев лечения глицирризином. Лечение ТОРС проводится только в течение короткого времени. Поскольку побочные эффекты этого соединения известны и могут контролироваться, надлежащий мониторинг может привести к эффективному использованию глицирризина в качестве средства от ТОРС. Booth и коллеги⁵ сообщили, что рибавирин имел много токсических эффектов при применении у пациентов с ТОРС, включая гемолиз (76% пациентов) и резкое снижение гемоглобина (49% пациентов). Однако, хотя в клинических исследованиях применялись высокие дозы глицирризина, это соединение оказывало мало токсических эффектов по сравнению с другими схемами лечения, и, как сообщалось, препарат был клинически эффективным.

Будущий поиск соединений, представляющих терапевтический интерес в отношении ТОРС (SARS), будет значительно облегчен посредством выращивания SARS-CV в клетках человека.

Список литературы:

- 1 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1967–76.
- 2 Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine, and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* 2003; 58: 73–79.
- 3 Jeong HG, Kim JY. Induction of inducible nitric oxide synthase expression by 18-glycyrrhetic acid in macrophages. *FEBS Lett* 2002; 513: 208–12.
- 4 Lin YL, Huang YL, Ma SH, et al. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol* 1997; 71: 5227–35.
- 5 Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 2003; 289: 1–9.

Institute of Medical Virology, Frankfurt University Medical School, Paul-Ehrlich Str 40, D-60596 Frankfurt, Germany (Prof J Cinatl PhD, B Morgenstern, G Bauer, Prof P Chandra PhD, Prof H Rabenau PhD, Prof H W Doerr MD)

Институт медицинской вирусологии, Медицинская школа Франкфуртского университета, ул. Пауля Эльриха 40, D-60596 Франкфурт, Германия