

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ *IN VITRO* АНТИГЕРПЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭХИНОХРОМА А И ПРОДУКТА ЕГО ОКИСЛЕНИЯ — ДЕГИДРОЭХИНОХРОМА

О.В.Иунихина¹, Н.В.Крылова¹, Н.П.Мищенко²,
Е.А.Васильева², С.А.Федорев², М.Ю.Щелканов¹

¹ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, РФ; ²ФГБНУ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова ДВО РАН, Владивосток, РФ

В работе представлены результаты изучения способности эхинохрома А — хиноидного пигмента, выделенного из морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, продукта его окисления дегидроэхинохром и структурно близкого противовирусного препарата оксолина ингибировать индуцированное вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) бляшкообразование в клетках Vero. Тестируемые соединения проявляли значительную анти-ВПГ-1 активность, в основном за счёт прямого воздействия на вирусные частицы и на прикрепление вируса к клеткам. Противовирусная эффективность веществ увеличивалась в ряду оксолин → эхинохром А → дегидроэхинохром.

Ключевые слова: эхинохром А; дегидроэхинохром; вирус простого герпеса 1 типа; противовирусное действие

Вирус простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) — один из самых распространённых вирусных патогенов человека [3]. Считается, что 60-90% населения инфицированы ВПГ, при этом проявления инфекции варьируют от поражения слизистых до энцефалита у новорождённых и людей с иммунодефицитами [6]. Периодическая реактивация на фоне пожизненной персистенции ВПГ-1 приводит к необходимости постоянного применения антигерпетических препаратов — аналогов нуклеозидов с последующим возможным формированием лекарственно-устойчивых штаммов. Поэтому поиск новых противовирусных соединений, отличающихся от ацикловира и его аналогов механизмом действия, в настоящее время остаётся актуальной задачей.

Эхинохром А (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) — хиноидный пигмент, выделенный из морского ежа *Scaphechinus mi-*

rabilis, на основе которого разработан препарат "Гистохром", используемый в кардиологии и офтальмологии. Недавно показана активность "Гистохрома" в отношении ВПГ-1 и вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) [5]. При взаимодействии с окислителями, в том числе с кислородом воздуха в водных растворах, эхинохром А легко образует дегидроэхинохром (2,2,3,3,5,6,8-гептагидрокси-7-этил-2,3-дигидро-1,4-нафтохинон) [2,10]. Дегидроэхинохром структурно близок (рисунок) к известному противовирусному соединению оксолин (2,2,3,3-тетрагидрокси-2,3-дигидро-1,4-нафтохинон) [1,2] и, следовательно, он может проявлять противовирусные свойства.

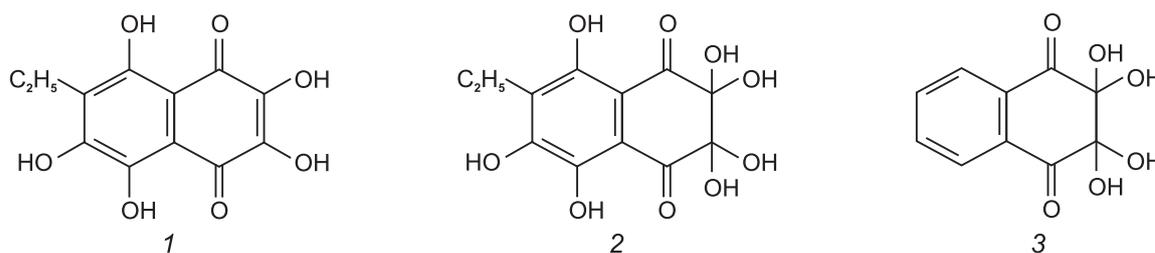
Цель исследования — провести сравнительное изучение антигерпетической активности эхинохрома А, дегидроэхинохрома и оксолина.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Вирус и система его культивирования. Штамм ВПГ-1/L2 был получен из Государственной

Адрес для корреспонденции: olga_iun@inbox.ru. Иунихина О.В.

doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-4-477-480



Структуры исследованных соединений: 1 — эхинохром А, 2 — дегидроэхинохром, 3 — оксолин.

коллекции вирусов РФ (НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи). Вирус пассировали на перевиваемой культуре эпителиальных клеток почки африканской зелёной мартышки Vero с использованием среды DMEM (БиолоТ), с 10% ЭТС (БиолоТ) и 100 Ед/мл гентамицина при 37°C, 5% CO₂. В поддерживающей среде концентрация сыворотки была снижена до 1%. Концентрация клеток во всех опытах составляла 10⁴ клеток/мл. Инфекционный титр ВПГ-1 в культуре клеток Vero составил 5.5-6.0 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл.

Исследуемые соединения. Эхинохром А, выделенный из морского ежа *S. mirabilis* [8]; дегидроэхинохром, полученный окислением эхинохрома А оксидом серебра (Ag₂O) в растворе обезвоженного диэтилового эфира [2, 10]; оксолин ("Оксонафтилин"; НТК Институт монокристаллов). Исследуемые соединения растворяли в DMSO (БиолоТ) в концентрации 10 мг/мл и хранили при -20°C. Стоковые растворы разводили средой DMEM, и конечная концентрация DMSO не превышала 0.5%. В качестве референс-препарата использовали "Ацикловир" для инъекций (GlaxoSmithKline).

Цитотоксичность исследуемых соединений. Цитотоксичность субстанций определяли с помощью МТТ-теста [4]. Для этого монослой клеток, выращенных в 96-луночных планшетах, инкубировали с исследуемыми соединениями в концентрациях 1-200 мкг/мл в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем добавляли раствор МТТ (Sigma-Aldrich) в концентрации 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37°C, осадок растворяли изопропанолом. Оптическую плотность измеряли при λ=540 нм на планшетном ридере (LabSystems). В качестве 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) использовали концентрацию соединения (мкг/мл), снижающую жизнеспособность клеточной культуры на 50% по сравнению с контролем.

Изучение противовирусных свойств исследуемых соединений. Влияние исследуемых соединений на разные стадии жизненного цикла

ВПГ-1 изучали с помощью метода ингибирования бляшкообразования [3, 7]. Монослой клеток Vero, выращенный в 24-луночных планшетах, инфицировали 100 БОЕ/мл ВПГ-1, а тестируемые соединения добавляли в концентрациях 1-100 мкг/мл по нескольким схемам (табл. 1).

Во всех опытах монослой клеток после инкубации с ВПГ-1 промывали ФСБ рН 7.4, вносили поддерживающую среду, содержащую 1% карбоксиметилцеллюлозы (Sigma-Aldrich), и культивировали в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем клетки фиксировали 96% этанолом и окрашивали 0.5% спиртовым раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich) для подсчёта образовавшихся бляшек и вычисления коэффициента ингибирования бляшкообразования (PIC):

$$PIC = (1 - P_T / P_C) \times 100\%$$

где P_T и P_C — количество вирусиндуцированных бляшек в обработанных соединением клетках и в контроле соответственно.

Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC₅₀) оценивали как концентрацию соединения (мкг/мл), при которой PIC=50%. Индекс селективности (SI) соединения рассчитывали как отношение CC₅₀ к IC₅₀.

Статистическая обработка. Полученные результаты статистически обрабатывали в программе Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Значения CC₅₀ и IC₅₀ рассчитывали с использованием линейного регрессионного анализа кривой "доза—эффект". Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение в трёх или более независимых экспериментах. Сравнение различий между показателями контрольной и опытной групп осуществляли с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Различия считали достоверными при вероятности альтернативной гипотезы p ≤ 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование цитотоксичности тестируемых соединений выявило, что CC₅₀ для эхинохрома

Таблица 1. Схемы применения исследуемых соединений для оценки их противовирусного действия

Схема	Цель	Описание
1	Оценка профилактического действия	Монослой клеток обрабатывали соединениями 1 ч при 37°C, затем инфицировали вирусом в течение 1 ч
2	Оценка вирулицидного действия	Вирусную суспензию инкубировали с соединениями (1:1, v/v) в течение 1 ч при 37°C, затем этой смесью инфицировали монослой клеток 1 ч при 37°C
3	Оценка одновременного действия	Монослой клеток инфицировали вирусом и одновременно вносили соединения (1:1, v/v) в течение 1 ч при 37°C
4	Оценка прикрепления вируса к клеткам	Предварительно охлаждённый в течение 1 ч при 4°C монослой клеток инфицировали вирусом и одновременно вносили соединения (1:1, v/v) с последующей инкубацией в течение 3 ч при 4°C
5	Оценка проникновения вируса в клетки	Монослой клеток, охлаждённый в течение 1 ч при 4°C, инфицировали вирусом и инкубировали 3 ч при 4°C, после чего вносили соединения и культивировали 1 ч при 37°C
6	Оценка вирусингибирующего действия	Монослой клеток инкубировали с вирусом 1 ч при 37°C, удаляли неадсорбированный вирус и вносили среду DMEM, содержащую разные концентрации исследуемых соединений

А, дегидроэхинохрома и оксолина значимо не различались (табл. 2), поэтому для изучения антигерпетического действия этих соединений использовали концентрации менее 100 мкг/мл.

Ранее было показано, что основным механизмом противовирусного действия эхинохрома А в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 и ВКЭ является непосредственная инактивация вирусных частиц [5,9]. В настоящей работе также показано, что наиболее высокую противовирусную активность соединения проявляли при предварительной обработке ВПГ-1 (прямое вирулицидное действие) (табл. 2). Дегидроэхинохром проявлял более высокую вирулицидную активность по сравнению с эхинохромом А и оксолином ($p \leq 0.05$). В то же время все исследуемые соединения не подавляли репликацию ВПГ-1 при обработке ими инфицированных клеток (вирусингибирующее действие) и при предварительной обработке неинфицированных клеток (профилактическое действие).

При одновременном воздействии исследуемых соединений и ВПГ-1 на клетки Vero (ранние стадии вирусной инфекции) была отмечена умеренная ингибирующая активность эхинохрома А и дегидроэхинохрома, в то время как оксолин был неэффективен. Результаты предварительной обработки вируса соединениями и результаты одновременной обработки клеток вирусом и соединениями позволили предположить, что эти соединения влияют на самые ранние стадии жизненного цикла ВПГ-1 — на прикрепление и проникновение вируса в клетки.

Стадию прикрепления вируса к клеткам исследовали при температуре 4°C, которая позволяет оболочечным вирусам (в том числе и ВПГ-1) прикрепляться к клеткам, но не проникать в них [11]. Установлено, что тестируемые соединения умеренно ингибировали связывание вируса с клетками (табл. 2). Результаты анализа проникновения вируса, когда клетки были инфицированы ВПГ-1 при 4°C, а затем обработаны

Таблица 2. Влияние исследуемых соединений на ранние стадии ВПГ-1 инфекции

Соединения	CC ₅₀	Вирулицидное действие		Одновременное действие		Прикрепление вируса		Проникновение вируса	
		IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI
Эхинохром А	142±6	4.1±0.6*	35.0	35±6	4.0	33±6	4.3	59±10	2.4
Дегидроэхинохром	140±5	1.8±0.3	78.0	29±4	4.8	32±8	4.4	57±9	2.4
Оксолин	172±12	33±6*	5.2	89±17*	1.9	55±11	3.1	93±19	1.8
Ацикловир	>1000	Н.а.		2.1±0.4	476	Н.а.		Н.а.	

Примечание. Н.а. — нет активности. * $p \leq 0.05$ по сравнению с дегидроэхинохромом.

соединениями при температуре 37°C, которая облегчала проникновение вируса, показали, что влияние тестируемых соединений на проникновение вируса было незначительным (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антигерпетическая активность исследованных соединений, проявляющаяся в основном за счёт прямого вирулицидного действия, увеличивалась в ряду: оксолин→эхинохром А→дегидроэхинохром. Таким образом, структурные особенности молекул исследованных соединений мало влияют на их цитотоксичность, в то же время увеличение количества электронодонорных гидроксильных групп в молекуле дегидроэхинохрома, способствует более эффективному связыванию этого соединения с оболочечными белками ВПГ-1, тем самым препятствуя прикреплению и проникновению вируса в клетки-мишени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левина В.И., Бурцев А.С., Арзамасцев А.П., Григорьев Н.Б., Граник В.Г. Полярографическое исследование окислительно-восстановительных и гидролитических превращений противовирусного препарата "Оксолин" // *Вопр. биол. мед. фарм. химии*. 2003. № 1. С. 40-45.
2. Новиков В.Л., Шестак О.П., Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Федорев С.А., Глазун В.П., Артюков А.А. Окисление 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона (эхинохрома А) атмосферным кислородом сообщение 1. Структура дегидроэхинохрома // *Изв. АН. Сер. хим.* 2018. № 2. С. 282-290.
3. *Руководство по вирусологии: вирусы и вирусные инфекции человека и животных* / под ред. Д.К.Львова. Москва, 2013.
4. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction // *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005. Vol. 11. P. 127-152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7
5. Fedoreyev S.A., Krylova N.V., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Pislyagin E.A., Iunikhina O.V., Lavrov V.F., Svitich O.A., Ebralidze L.K., Leonova G.N. Antiviral and Antioxidant Properties of Echinochrome A // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 12. ID 509. doi: 10.3390/md16120509.
6. James C., Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M.E., Abu-Raddad L.J., Gottlieb S.L., Looker K.J. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016 // *Bull. WHO*. 2020. Vol. 98. P. 315-329. doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
7. Marocci M.E., Amatore D., Villa S., Casciaro B., Aimola P., Franci G., Grieco P., Galdiero M., Palamara A.T., Mangoni M.L., Nencioni L. The Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin B Inhibits In Vitro Herpes Simplex Virus 1 Infection // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. Vol. 62, N 5. ID e02367-17. doi: 10.1128/AAC.02367-17
8. Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Pokhilo N.D., Anufriev V.P., Denisenko V.A., Glazunov V.P. Echinamines A and B, first aminated hydroxynaphthazarins from the sea urchin *Scaphechinus mirabilis* // *J. Nat. Prod.* 2005. Vol. 68, N 9. P. 1390-1393. doi: 10.1021/np049585r
9. Mishchenko N.P., Krylova N.V., Iunikhina O.V., Vasileva E.A., Likhatskaya G.N., Pislyagin E.A., Tarbeeva D.V., Dmitrenok P.S., Fedoreyev S.A. Antiviral Potential of Sea Urchin Aminated Spinochromes against Herpes Simplex Virus Type 1 // *Mar. Drugs*. 2020. Vol. 18, N 11. ID 550. doi: 10.3390/md18110550
10. Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Gerasimenko A.V., Grigorchuk V.P., Dmitrenok P.S., Fedoreyev S.A. Isolation and Structure Determination of Echinochrome A Oxidative Degradation Products // *Molecules*. 2020. Vol. 25, N 20. ID 4778. doi: 10.3390/molecules25204778.
11. Tai C.J., Li C.L., Tai C.J., Wang C.K., Lin L.T. Early Viral Entry Assays for the Identification and Evaluation of Antiviral Compounds // *J. Vis. Exp.* 2015. N 105. ID e53124. doi: 10.3791/53124

Получено 11.01.21