

УДК 615.281+578.828.6/001.891.51

# Порівняльне дослідження анти-ВІЛ дії нуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази зидовудину та ламівудину (ЗАТ «ФФ «Дарниця», Україна), їх аналогів ретровіру і епівіру («Glaxo Wellcome», Великобританія)

С.А. РИБАЛКО<sup>1</sup>, Л.М. НОСАЧ<sup>2</sup>, О.Ю. ПОВНИЦЯ<sup>2</sup>, С.Т. ДЯДЮН<sup>1</sup>, О.В. МАКСИМЕНОК<sup>1</sup>, Т.Ю. ТРОХИМЧУК<sup>2</sup>, Л.М. СОКУРЕНКО<sup>1</sup>, Ю.Б. ЧАЙКОВСЬКИЙ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут епідеміології і інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України», Київ

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Київ

<sup>3</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, Київ/

## Резюме

**Сравнительное исследование анти-ВИЧ действия нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы зидовудина и ламивудина (ЗАО «ФФ «Дарниця», Украина), их аналогов ретровира и эпивира («Glaxo Wellcome» (Великобритания))**

С.А. Рыбалко, Л.Н. Носач, О.Ю. Повниця, С.Т. Дядюн, Е.В. Максименок, Т.Ю. Трохимчук, Л.М. Сокуренок, Ю.Б. Чайковский

Проведено сравнительное исследование анти-ВИЧ активности ингибиторов обратной транскриптазы: зидовудина и ламивудина производства ЗАО «ФФ»Дарниця», Украина, и их аналогов ретровира и эпивира производства «Glaxo Wellcome», Великобритания.

Установлено, что препараты, изготовленные в Украине, угнетали репродукцию ВИЧ-1 в одинаковой степени в таких же концентрациях, как и соответствующие препараты сравнения ретровир и эпивир фирмы «Glaxo Wellcome» (Великобритания).

**Ключевые слова:** нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, препараты зидовудина и ламивудина производства ЗАО «ФФ»Дарниця», Украина

## Summary

**Comparative Study of anti-HIV Efficacy Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitory: Zidovudine and Lamivudine (FF Darnitsa JSC, Ukraine) vs. its Analogue Retrovir and Epivir (Glaxo Wellcome, Great Britain)**

S.L. Rybalko, L.N. Nosach, O.Yu. Povnitsa, S.T. Diadiun, E.V. Maksimenok, T.Yu. Trochimchuk, L.M. Sokurenko, Yu.B. Tchaikovskiy

Anti-HIV activity of several drugs was assessed in comparative in vitro study. Lamivudine and zidovudine manufactured by FF Darnitsa JSC Ukraine was compared with the reference drug retrovir and epivir manufactured by Glaxo Wellcome, Great Britain. Either zidovudine FF Darnitsa, Ukraine and retrovir Glaxo Wellcome is equally effective in inhibiting HIV reproduction at non-toxic concentrations of the drugs. Lamivudine FF Darnitsa demonstrates the same efficacy in inhibiting HIV reproduction in MT-4 cell culture as the reference drug epivir Glaxo Wellcome, Great Britain.

**Key word:** Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, zidovudine and lamivudine manufactured by DARNITSA, PHARMACEUTICAL FIRM, CJSC, Ukraine

Одна із проблем сучасної медицини пов'язана з ВІЛ-інфекцією, яку викликають два лімфотропних віруси – ВІЛ-1 та ВІЛ-2. Віруси імунodefіциту людини викликають прогресуючу імунопатологічну дисфункцію лімфоцитів, що призводить до збільшення ризику розвитку опортуністичних інфекцій і злоякісних пухлин. Захворюваність на ВІЛ постійно зростає, тому насиченість ринку антиретровірусними препаратами є необхідною. В реплікативному циклі ВІЛ існує декілька етапів, які можуть бути мішенями дії хіміопрепаратів. Поки що відсутні препарати, які діяли б на всі етапи репродукції ВІЛ. Відомі анти-ВІЛ речовини різного походження, які блокують при-

кріплення вірусу до клітини, зв'язування ВІЛ з клітиною, інтерферують з транскрипцією і трансляцією вірусного геному, інгібітори глікозилювання, інгібітори протеази, нуклеозидні і нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази.

На даний час в лікуванні інфекцій, спричинених ВІЛ, використовують антиретровірусні препарати 3-х класів речовин: нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази, нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази та інгібітори протеази ВІЛ.

**Метою роботи** було проведення порівняльного дослідження цитотоксичності і специфічної анти-ВІЛ активності двох препара-

тів із класу нуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази вітчизняного виробництва ЗАТ «ФФ «Дарниця», а саме, зидовудину та ламівудину відносно аналогічних препаратів ретровіру та епівіру, які виготовлені у Великобританії фірмою «GlaxoWellcome» і застосовуються в установах України при лікуванні ВІА-інфекцій.

Зидовудин / ретровір – це синтетичний аналог нуклеозиду тимідину, 3'-азидо-2,3'-дидезокситимідин (азидотимідин, AZT); ламівудин / епівір – нуклеозидний аналог цитидину - 3'-дидезокси-3'-тіацидин (ЗТС).

## Матеріали та методи дослідження

**Вірус імунодефіциту людини** (референс-штам ВІА-1RF) – у вигляді продукуючої культури МТ4/ВІІІ ЛБК – Т-лейкоцити людини – продуцента вірусу імунодефіциту І типу, отриманий з музею вірусів Інституту вірусології імені Д.І. Івановського. Вірус імунодефіциту людини культивували як в суспензійній культурі клітин МТ-4, так і в перещеплюваній культурі клітин НГУК. Характеристика вірусу ВІА-1 наведена в таблиці 1. Вірус зберігався при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Таблиця 1.** Характеристика вірусу імунодефіциту людини

Культура клітин	Експресія р24 (оптична густина при 492 нм, ОГ)	Інфекційний титр ВІА в Іg ID <sub>50</sub>
МТ-4	3,069	6,0
НГУК	3,024	4,5

За даними непрямой імунофлюоресценції з моноклональними антитілами до антигену р24 ВІА-1 інфікованість цих клітин досягала практично 100%. Тотожність ВІА-1 було підтверджено в реакції нейтралізації з використанням діагностичного набору «Genetic Systems™ HIV-1 Confirmatory Assay» (BioRad, USA).

**Культура клітин.** Лімфобластоїдна лінія клітини МТ-4 отримана з банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України. Живильне середовище складалось із 88% середовища RPMI 1640 («Sigma») з додаванням 12% інактивованої прогріваною сироватки ембріона корови («ПанЕко», Москва) і антибіотиків. Клітини вирощували в пластикових флаконах («Nunc») об'ємом 50 мл при  $37^{\circ}\text{C}$  та 5%  $\text{CO}_2$ . Кожні 3–4 дні живі клітини підраховували за допомогою трипанового синього та розсівали в початковій концентрації  $2,5 \times 10^5$  клітин на 1 мл.

Лінія клітин НГУК – неврунином гасерова вузла шкура, одержана в НДІ морфології людини РАМН. Живильне середовище складалось із 88% середовища RPMI 1640 («Sigma») з додаванням 12% інактивованої прогріваною сироватки ембріона корови («ПанЕко», Москва) і антибіотиків.

**Препарати.** Зидовудин (капсули, що містять 250 мг речовини) виробництва ЗАТ «ФФ «Дарниця»; препарат порівняння – ретровір (капсули, що містять 250 мг зидовудину), виробництва «Glaxo Wellcome», Великобританія;

Ламівудин (таблетки, 150 мг) виробництва ЗАТ «ФФ «Дарниця» та препарат порівняння – епівір (таблетки, що містять 150 мг ламівудину) виробництва «Glaxo Wellcome», Великобританія.

Вміст капсул чи таблетки розчиняли в 2 мл DMSO, доводили до об'єму 10 мл середовищем RPMI 1640, фільтрували через стерилізуючі фільтри фірми «Millipore» з розміром пор 0,22 мкм. На ростовому середовищі (88% середовища RPMI1640 та 12% сироватки ембріона теляти) готували робочі розведення препаратів. Початкова концентрація препаратів 100 мкг/мл.

## Визначення цитотоксичної дії речовин в культурі клітин.

Дослідження антивірусної дії потенційних лікарських засобів включає визначення їх цитотоксичної дії. Цей показник необхідний для характеристики препарату, визначення хіміотерапевтичного індексу (ХТІ) чи, як прийнято в міжнародній практиці, індексу селективності (selectivity index, SI). За міжнародним протоколом показником цитотоксичності є  $\text{CC}_{50}$  – цитотоксична концентрація, в якій препарат зменшує кількість живих клітин на 50% у порівнянні з контролем в разі використання трипанового синього або цієї концентрації, за якої оптична густина зразка зменшуються на 50%, в разі застосування колориметричного автоматизованого МТ-методу [1,2]. Клітини вирощували в 96-лункових плашках і через 24 години росту інкубували з препаратами в різних концентраціях, зазвичай протягом 5 діб, на кожну концентрацію препарату використовували 4 лунки з клітинами. Для визначення показника  $\text{CC}_{50}$  використовували програму лінійної регресії «Microsoft Excel 2007».

**Визначення мітотичного індексу та патологічних мітозів.** Для цитологічного аналізу використовували моношарову лінію клітин НГУК, чутливу до ВІА. Клітини вирощували на накривних скельцях, через 24 год росту клітин до них додавали препарати в концентрації 0,25 мкг/мл і інкубували 24 год, потім клітини фіксували та фарбували гематоксилин-еозином за загальноприйнятою методикою. Мітотичний індекс визначали шляхом обчислення 3000–10000 клітин і виражали у проміллі (%) – число мітозів на 1000 клітин. Одночасно визначали наявність патологічних форм мітозів [3].

**Визначення мутагенної дії препарату.** Всього у дослід було взято 6 груп мишей по 5 тварин в кожній групі: 1 – інтактні миші (контроль); 2 – введення внутрішньочеревинно циклофосфаміду в дозі 20 мг/кг (позитивний контроль); 3 – одноразове введення зидовудину в дозі 0,25 мкг (внутрішньочеревинно); 4 – введення зидовудину 1 раз на добу протягом 3 днів, кожне введення в дозі 0,25 мкг (внутрішньочеревинно); 5 – введення препарату ретровір в дозі 0,25 мкг 1 раз на добу (внутрішньочеревинно); 6 – введення препарату ретровір 1 раз на добу протягом 3 днів, кожне введення в дозі 0,25 мкг (внутрішньочеревинно). Для досліджень препарати готували з кісткового мозку мишей за методикою [4]. Цитогенетичний аналіз стану хромосом проводили на стадії метафази. Для цього мишам внутрішньочеревинно вводили колхіцин двічі з інтервалом 1,5 години. Потім тварин забивали та із стегнової кістки за допомогою 1% розчину цитрату натрію вивили кістковий мозок і проводили 4-разову фіксацію в суміші етилового (або метилового) спирту та льодяної оцтової кислоти (3:1). Одержані препарати фарбували протягом 30 хвилин азур-еозином. В кожній групі було проаналізовано по 2 скельця від кожної тварини, в кожній групі було проаналізовано по 500 метафазних пластинок. Цитологічні та цитогенетичні дослідження проводили при об'єктиві  $\times 100$  та  $\times 40$ , окулярі  $\times 10$  (мікроскоп Standard 20, Zeiss).

**Визначення анти-ВІА активності препаратів.** Для визначення анти-ВІА активності досліджуваних препаратів використовували традиційну модель первинно-інфікованих вірусом імунодефіциту людини суспензійних клітин МТ-4. Інфікування клітин МТ-4 штамом ВІА-1 проводили шляхом додаванням вірусу до клітинної суспензії в концентрації  $4\text{--}5 \times 10^5$  кл/мл. Множинність зараження 100 ІD<sub>50</sub>/лунку. Інгібуючий ефект препаратів оцінювали на 5 добу інкубування ВІА-інфікованих клітин в присутності препаратів в різних концентраціях, визначаючи наявність вірусного антигену імуноферментним методом. Контролем були ВІА-інфіковані клітини, які інкубували в середовищі при відсутності досліджуваних препаратів.

Інфекційний титр ВІЛ-1 визначали таким чином: десятикратні розведення зразка вносили в лунки планшету з клітинами МТ-4 і культивували при 37°C протягом 5 діб в атмосфері 5% CO<sub>2</sub>. Потім з кожної лунки відбирали середовище і визначали наявність в ньому антигену р24 ВІЛ-1. Визначення антигену р24 ВІЛ-1 у відібраних зразках проводили методом ІФА за допомогою тест-системи «Genetic Systems™ HIV-1 Ag EIA» (BioRad). За ефективну інгібуючу концентрацію EC50 приймали таку, в якій препарат зменшував кількість антигену р24 ВІЛ за показниками ІФА на 50% та інфекційний титр вірусу не менш ніж 1,7–2,0 Іg ІD50 [5].

## Результати та їх обговорення

### Дослідження цитотоксичності зидовудину та ретровіру

Через 5 діб після інкубування клітин МТ-4 з препаратами в різних концентраціях і визначення їх життєздатності при фарбуванні трипановим синім, було виявлено значну цитотоксичність зидовудину і ретровіру. В концентраціях 1 мкМ та 0,5 мкМ вони пригнічували здатність клітин до росту. Зидовудин зменшував кількість життєздатних клітин на 91%, а ретровір – на 73%. Зі зниженням концентрацій препаратів цитотоксична дія зменшувалась, збільшувався приріст клітин. Показники життєздатності клітин були подібними для обох препаратів (табл. 2).

Для визначення показника цитотоксичності CC<sub>50</sub> зидовудину та ретровіру застосовували МТТ-метод, який включає кількісне колориметричне дослідження життєздатності клітин та найчастіше використовується за кордоном при оцінці цитотоксичності антивірусних речовин в культурі клітин 1, зокрема, анти-ВІЛ речовин [1, 2, 6]. CC<sub>50</sub> препаратів, тобто концентрацію, в якій препарат зменшує життєздатність клітин на 50%, визначали через 5 діб інкубування клітин з ними.

Наведені в таблиці 3 результати досліджень свідчать, що обидва препарати залежно від концентрації майже в однаковій мірі зменшують життєздатність клітин. Лінійний регресійний аналіз дозволив визначити для кожного CC<sub>50</sub>, яка для зидовудину становила 0,24 мкМ, для ретровіру 0,42 мкМ. Різниця не вважається суттєвою, бо знаходиться в межах 2-разового розведення речовин.

Було проведено дослідження впливу препаратів на мітотичну активність неінфікованих та інфікованих ВІЛ клітин моношарової лінії клітин НГУК. Клітини досліджували через 24 години інкубування з препаратами в концентрації 0,25 мкМ.

Зидовудин і ретровір не впливали суттєво на мітотичну активність клітин НГУК. Показники мітотичного індексу, визначені в групі інтактних клітин, ВІЛ-інфікованих клітин та не інфікованих, інкубованих з препаратами, близькі (t=0,8). Але вони достовірно відрізняються від показника, встановленого в групі клітин, заражених ВІЛ, який значно вищий (48,6±0,9%), t=8,5 (табличне значення t=3,0). Зниження його в разі додавання до клітин, інфікованих ВІЛ, зидовудину та ретровіру опосередковано свідчить про пригнічення репродукції ВІЛ. Обидва препарати не викликали збільшення кількості аномальних мітозів (табл. 4).

Було досліджено вплив зидовудину та ретровіру на хромосоми клітин кісткового мозку мишей. При одноразовому введенні зидовудину кількість метафаз з порушеннями хромосом складала 2,4±0,3%, при триразовому введенні препарату – 2,9±0,3%, у інтактних тварин – 2,2±0,3%. Введення ретровіру також не призводило до збільшення кількості хромосом з абераціями. Показник позитивного контролю в разі введення циклофосфаміду становив 14,6±1,3 і достовірно (t=11,6) перевищував показники, визначені в дослідних та контрольній групах.

### Визначення анти-ВІЛ активності зидовудину «ФФ «Дарниця» в культурі клітин МТ-4.

В дослідженнях анти-ВІЛ активності використовували препарат зидовудин в концентраціях: 2,5 мкМ, 0,25 мкМ, 0,025 мкМ і 0,0025 мкМ. Як препарат порівняння використовували ретровір «Glaxo Wellcome» в таких самих концентраціях. У кожний зразок вносили вірус імунодефіциту людини і культивували його в культурі клітин МТ-4 протягом 5 діб, потім визначали інфекційний титр вірусу. Препарати зидовудин та ретровір залишались в середовищі впродовж всього циклу дослідження. Результати досліджень наведені в таблицях 5 та 6. Встановлено, що зидовудин «ФФ «Дарниця» і ретровір «Glaxo Wellcome» пригнічували репродукцію ВІЛ в дозах від 2,5 мкМ до 0,025 мкМ, про що свідчить зниження інфекційного титру вірусу в порівнянні з контролем.

Таким чином, зидовудин «ФФ «Дарниця» та препарат порівняння ретровір «Glaxo Wellcome» не відрізняються за специфічною актив-

**Таблиця 2.** Визначення цитотоксичної дії зидовудину в порівнянні з ретровіром на життєздатність клітин МТ-4 при застосуванні трипанового синього

Концентрація препарату, мкМ	Життєздатність клітин *		Приріст клітин **	
	Зидовудин	Ретровір	Зидовудин	Ретровір
1	9	27	-82	-47
0,5	37	46	-27	-9
0,25	66	50	30	0
0,125	66	56	31	11
0,062	66	54	30	7
0,031	73	73	44	44
0 (контроль)	100	100	98	98

Примітки: \* – Кількість живих клітин по відношенню до контролю, %; \*\* – Приріст клітин відносно «0» точки на час додавання речовин, %.

**Таблиця 3.** Вплив зидовудину та ретровіру на життєздатність клітин (МТТ-метод)

Концентрація препарату, мкМ	Оптична щільність зразків при інкубуванні клітин з препаратами	
	Зидовудин	Ретровір
1	0,038	0,048
0,5	0,075	0,070
0,25	0,085	0,176
0,125	0,189	0,250
0,062	0,232	0,249
0,031	0,241	0,241
0	0,242	0,244

**Таблиця 4.** Вплив зидовудину та ретровіру на мітотичну активність неінфікованих та інфікованих ВІЛ клітин НГУК

Клітини НГУК	Мітотичний індекс, в %	Аномальні мітози, %
Інтактні	28,6±1,4	33,8±5,1
+ Зидовудин	31,6±1,4	21,7±4,1
+ Ретровір	30,1±1,4	26,6±4,2
+ ВІЛ	48,6±1,5	37,9±5,3
+ВІЛ+Зидовудин	30,0±1,4	28,8±4,2
+ВІЛ+Ретровір	30,9±1,4	29,8±4,2

Таблиця 5. Анти-ВІЛ активність зидовудину в культурі клітин МТ-4

Концентрації препарату, мкМ	Показники оптичної густини при 492 нм при розведенні зразків						Інфекційний титр ВІЛ, -lg ID <sub>50</sub>
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
2,5	3,023	0,357	0,257	0,111	0,097		3,2
0,25	3,046	0,340	0,255	0,120	0,077		3,2
0,025	3,057	0,420	0,384	0,123	0,077		3,6
0,0025	3,115	1,150	0,878	0,540	0,317	0,150	5,5
0 (контроль ВІЛ)	3,069	1,200	0,894	0,517	0,317	0,180	6,0

Таблиця 6. Анти-ВІЛ активність ретровіру в культурі клітин МТ-4

Концентрації препарату, мкМ	Показники оптичної густини при 492 нм при розведенні зразків						Інфекційний титр ВІЛ, -lg ID <sub>50</sub>
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
2,5	3,049	0,450	0,237	0,115	0,077		3,2
0,25	3,029	0,310	0,359	0,129	0,065		3,5
0,025	3,052	0,490	0,297	0,132	0,119		3,3
0,0025	3,105	1,000	0,736	0,292	0,198	0,135	5,2
0 (контроль ВІЛ)	3,069	1,200	0,894	0,517	0,317	0,180	6,0

Таблиця 7. Вплив ламівудину на мітотичну активність клітин НГУК

Обробка клітин	Мітотичний індекс, %	Аномальні мітози, %
Інтактні	28,6±1,4	33,8±5,1
+ Ламівудин	31,3±1,4	30,8±4,1
+Епівір	29,0±1,4	27,9±4,2
+ВІЛ	48,6±1,5	37,9±5,3
+ВІЛ+ламівудин	32,4±1,4	31,2±4,2
+ВІЛ+епівір	30,8±1,4	27,0±4,2

ністю в культурі клітин. Визначена величина EC<sub>50</sub> (ефективна інгібуюча концентрація, яка пригнічує репродукцію ВІЛ не менше, як на 1,7–2,0 lg ID<sub>50</sub>) становить 0,025 мкМ як для зидовудину «ФФ «Дарниця», так і для ретровіру «Glaxo Wellcome», що погоджується з даними літератури [7, 8].

### Дослідження цитотоксичності ламівудину та епівіру

Показники цитотоксичності ламівудину та речовини порівняння епівіру були визначені через 5 днів інкубування клітин з препаратами за допомогою двох методичних прийомів. Половина цитотоксична доза CC<sub>50</sub>, яка була визначена при підрахунку живих клітин з використанням фарбника трипанового синього і камери Горяєва та обчислена за допомогою регресійного аналізу, становила для ламівудину «ФФ «Дарниця» 4,6 мкМ, для епівіру «Glaxo Wellcome» – 5,6 мкМ. CC<sub>50</sub> препаратів, визначена при застосовуванні МТТ-методу, становила для ламівудину 11,5 мкМ, для епівіру – 8,41 мкМ.

Як свідчать наведені дані, показник цитотоксичності препарату ламівудину «ФФ «Дарниця»

і препарату порівняння епівіру «Glaxo Wellcome» за результатами досліджень обома методами дещо відрізняються, проте близькі в межах 2-разового розведення препарату.

Таким чином, за результатами визначення цитотоксичності досліджуваний препарат ламівудин ЗАТ «ФФ «Дарниця» є низькотоксичним і практично не відрізняється від препарату порівняння епівіру «Glaxo Wellcome».

Ламівудин і препарат порівняння епівір не змінювали мітотичної активності клітин НГУК і не збільшували кількості аномальних мітозів (табл. 7).

Дані, наведені в таблиці 7, свідчать, що мітотичний індекс, визначений в групі інтактних клітин (28,6±1,4), клітин, оброблених ламівудином (31,3±1,4), епівіром (29,0±1,4) та інфікованих клітин, оброблених ламівудином (32,4±1,4) та епівіром (30,8±1,4), статистично не відрізняється (t=0,8–0,9). Але показники мітотичного індексу вищезгаданих груп достовірно відрізняються від показника, встановленого в групі клітин, заражених ВІЛ, який був значно вищим (48,6±1,5), t=8,5 (табличне значення t=3,0). Ламівудин і епівір, які пригнічують репродукцію ВІЛ, знижують мітотичну активність, індуковану вірусом в інфікованій культурі клітин. Також не

виявлено мутагенної дії даних препаратів при дослідженні впливу їх на хромосоми клітин кісткового мозку мишей. При одноразовому введенні ламівудину кількість метафаз з порушеннями хромосом складала 2,8±0,5%, при триразовому введенні препарату – 3,7±0,3%, у інтактних тварин – 2,2±0,3%. Введення епівіру також не призводило до збільшення кількості хромосом з абераціями. Показники позитивного контролю 14,6±1,3% достовірно (t=11,4) перевищували дані, визначені в дослідних та контрольній групах.

Таким чином, за результатами визначення цитотоксичності досліджуваний препарат ламівудин ЗАТ «ФФ «Дарниця» є низькотоксичним і не відрізняється від препарату порівняння епівіру «Glaxo Wellcome». При вивченні цитологічної та цитогенетичної дії препарату ламівудину показано, що він не має мутагенних властивостей.

Таблиця 8. Анти-ВІЛ активність ламівудину «ФФ «Дарниця» в культурі клітин МТ-4

Концентрація, мкМ	Показник оптичної густини при розведенні зразків						Інфекційний титр ВІЛ, -lg ID <sub>50</sub>
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
2,5	3,049	0,430	0,237	0,138	0,075		3,2
1,25	3,057	0,530	0,384	0,158	0,127		3,5
0,25	3,029	0,710	0,359	0,305	0,284	0,180	5,2
0 (контроль ВІЛ)	3,069	1,171	0,894	0,520	0,317	0,195	6,0

Таблиця 9. Анти-ВІЛ активність епівіру «Glaxo Wellcome» в культурі клітин МТ-4

Концентрація, мкМ	Показник оптичної густини при розведенні зразків						Інфекційний титр ВІЛ, -lg ID <sub>50</sub>
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
2,5	3,049	0,470	0,237	0,140	0,111		3,2
1,25	3,046	0,390	0,255	0,138	0,106		3,2
0,25	3,057	0,610	0,384	0,230	0,196		5,0
0 (контроль ВІЛ)	3,069	1,171	0,894	0,520	0,317	0,195	6,0

## Визначення анти-ВІЛ активності ламівудину в культурі клітин МТ-4

Ламівудин досліджували в концентраціях: 2,5; 1,25; 0,25 мкМ. Клітини МТ-4 інфікували вірусом імунодефіциту людини і культивували протягом 5 днів в присутності препарату. В кожній пробі визначали інфекційний титр вірусу. Як препарат порівняння використовували епівір «Glaxo Wellcome» в таких же концентраціях. У таблицях 8 та 9 наведено результати репродукції вірусу при дії досліджуваних препаратів в різних концентраціях.

Ламівудин і епівір пригнічували репродукцію ВІЛ у концентраціях 2,5 та 1,25 мкМ у порівнянні з контролем на 2,8 І<sub>g</sub>. Для визначення величини ЕС<sub>50</sub> – ефективною інгібуючою концентрацією був застосований метод регресивного аналізу. ЕС<sub>50</sub> становила 1,0 мкМ і 0,8 мкМ відповідно для ламівудину «ФФ «Дарниця» та епівіру «Glaxo Wellcome», що узгоджується з даними літератури. Згідно з літературними даними в клітинах МТ-4 ефективна інгібуюча концентрація ламівудину відносно ВІЛ-1 (ЕС<sub>50</sub>) коливається від 0,370 до 1,31 мкМ.

## Висновки

Таким чином, показано специфічну дію зидовудину та ламівудину, виробництво яких налагоджено в Україні (ЗАТ «ФФ «Дарниця»), відносно репродукції ВІЛ-1 в культурі клітин МТ-4. Вони пригнічували репродукцію ВІЛ-1 в однаковій мірі в таких самих концентраціях, як і відповідні препарати порівняння ретровіру та епівіру фірми «Glaxo Wellcome» (Великобританія). Ефективна інгібуюча концентрація ЕС<sub>50</sub> зидовудину і препарату порівняння ретровіру становила 0,025 мкМ (0,00625 мкг/мл). Для ламівудину цей показник становив 1 мкМ, для епівіру (препарат порівняння) – 0,8 мкМ. Препарати вітчизняного виробництва практично не відрізнялись від препаратів порівняння, виготовлених у Великобританії, і за показниками цитотоксичності (СС50), які становили для зидовудину 0,24 мкМ, для препарату порівняння ретровіру – 0,42 мкМ, для ламівудину – 5,6 мкМ і для епівіру – 8,4 мкМ. Крім цього, вони суттєво не впливали на мітотичну активність культури клітин, не збільшували кількість аномальних мітозів і не проявили мутагенної дії *in vivo* при дослідженні впливу їх на хромосоми клітин кісткового мозку мишей.

## Список використаної літератури

1. Щелканов М.Ю., Сахурця И.Б., Бурунова В.В. и др. Дидегидрогеназная активность Вич-инфицированных клеток при анализе результатов МТТ-теста // Иммунология. – 1999. – №1. – С. 37–41.
2. Pauwels R., Balzarini J., Baba M., et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds // J. Virolog. Methods. – 1988. – Vol. 20. – P. 309–321.
3. Блюмкин В.Н., Жданов В.М. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. – М.: Медицина, 1973. – 267 с.
4. Погосянц Е.Е., Платонова Г.М. Основы современных методик приготовления препаратов для изучения хромосом в соматических клетках млекопитающих и человека // Лаб. дело. – 1963. – № 9. – С. 3–9.
5. Доклінічні дослідження лікарських засобів // Методичні рекомендації. – Київ, 2001. – С. 371–396.
6. Tsai Ch., Follis K.E., Yarmall M., et al. In vitro screening for antiretroviral agents against simian immunodeficiency virus (SIV) // Antiviral Res. – 1990. – Vol. 14, №2. – P. 87–98.
7. Miller V., Stark T., Loeliger A.E., Lange J.M. The impact of the M184V substitution in HIV-1 reverse transcriptase on treatment response // HIV Med, 2002. – Vol. 3. – P. 135–45.
8. Sension M.G., Bellos N.C., Johnson J., et al. Lamivudine 300 mg QD versus continued lamivudine 150 mg BID with stavudine and a protease inhibitor in suppressed patients // HIV Clin. Trials. – 2002. – Vol. 3. – P. 361–70.