



УДК 615.281;8:615.012.1

Т. Л. Гридiна

ПРОТИГРИПОЗНА ДIЯ ЕТОНIЮ IN VITRO TA IN VIVO

Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І. І. Мечникова

Вступ

Боротьба з вірусними захворюваннями була і залишається у центрі уваги медичної науки і практичної медицини. Грип посiдає особливе місце серед вірусних захворювань, тому що він є найбільш масовим гострим інфекційним захворюванням. Епідемії грипу завдають значної шкоди здоров'ю людей, призводять до великих економічних втрат. Згідно з даними ВООЗ, грип посiдає перше місце як причина смерті від вірусних інфекцій (35,8 %). Тому розробка методів та засобів боротьби з ним є одним з найважливіших завдань для медичної науки та закладів охорони здоров'я.

Проблема пошуку активних хіміотерапевтичних засобів проти збудників вірусних інфекцій була і на цей час залишається актуальною. Розробка нових фармакологічних засобів є тривалим і фінансово витратним шляхом створення медикаментів. З позицій фармакоеконіміки [1] — нової сучасної фармацевтичної науки, яка оцінює співвідношення між ефективністю, безпечністю та вартістю лікарських засобів при різних схемах лікування, — виявлення протівірусних властивостей у ліків, що вже використовуються за іншим призначенням, виробництво яких налагоджено, а активність і побічна дія відомі завдяки багаторічному застосуванню, є дуже перспективним і економічно виправда-

ним напрямком. Такий підхід дає можливість розширяти показання до застосування відомих ліків як протівірусних засобів.

Відомо, що деякі солі амонію є лізосомотропними препаратами і можуть сповільнювати процес вірусної репродукції. Тому здається логічним припущення, що протимікробний лікарський препарат етоній, який є біс-четвертинною сіллю амонію, катіонною поверхнево-активною речовиною [2], використовується в композиції зі сполуками силіцію як раноцілюючий препарат [3], може мати протівірусні властивості.

Виходячи з викладеного вище, метою цього дослідження було вивчення протівірусної активності етонію щодо вірусів грипу серотипів А і В, а також виявлення деяких механізмів протівірусної дії цього препарату.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні тварини: білі безпородні миші масою 10–12 г.

Тканинні культури: фрагменти хоріон-алантоїсної оболонки 11–14-добових курячих ембріонів (ХАО).

Віруси: високовірулентний для мишей штам вірусу грипу А/PR/8/34 (H₁N₁), вірус грипу А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) і вірус грипу В/Ленінград/17/86.

Етоній виробництва експериментального заводу при Інституті органічної хімії НАНУ.

Ефективність протівірусної дії етонію щодо вірусів грипу *in vitro* досліджували, використовуючи культуру ХАО [3].

Очищення та концентрацію вірусу грипу А/PR/8/34 проводили, використовуючи методи диференційного і градієнтного центрифугування та гель-фільтрації на макропористому сілохромі. Плазматичні мембрани виділяли з клітин хоріон-алантоїсних оболонок 12–14-добових курячих ембріонів [4; 5]. Протеолітичну активність лужних трипсиноподібних протеаз у препаратах очищеного і концентрованого вірусу грипу і плазматичних мембран визначали за гідролізом 1%-го розчину протаміну (в основі методу лежить реакція розщеплення протамін-сульфату з виділенням аргініну) [6].

Протигрипозну дію етонію на моделі експериментального грипу визначали за зниженням летальності тварин протягом 14 днів після інфікування. Грипозну інфекцію у білих мишей моделювали внутрішньоназальним введенням штаму А/PR/8/34, використовуючи 4 миші на кожне логарифмічне розведення вірусу. Етоній (0,05 мл 0,2%-го розчину) вводили інтраназально під легким ефірним наркозом згідно з трьома схемами:

— профілактичною — протягом 2 днів до зараження і в день інфікування (усього три дні);

— лікувально-профілактичною — двічі на добу за день, в



день інфікування та 3 дні по тому (усього 5 днів);

— лікувальною — протягом 4 днів після інфікування, починаючи введення препарату з наступного дня після зараження (усього 4 дні).

Тварини контрольної групи отримували фізіологічний розчин за відповідними схемами.

В експериментальній групі тварин на 2–3-й та 4-5-й день після зараження високопатогенним для мишей штамом вірусу A/PR/8/34 (у розведенні 10^{-5}) визначали рівень інфекційного вірусу методом титрування 10 % гомогенатів на культурі ХАО [7], а також рівень кислих і лужних протеаз за гідролізом гемоглобіну та казеїну відповідно [6]. До контрольної групи (як і до дослідної) входили 7 тварин, кожна з яких теж тестували.

Розрахунок TID_{50} в експериментах *in vitro* та гомогенатах легенів, а також LD_{50} у дослідках на мишах проводили за методом Кербера в модифікації Ашмаріна [8].

Результати дослідження та їх обговорення

Вивчення впливу етонію на репродукцію вірусів грипу *in vitro* показало, що препарат у нетоксичній для клітин ХАО дозі 125 мкг/мл статистично вірогідно сповільнював репродукцію вірусів грипу A/PR/8/34 (H_1N_1), A/Гонконг/1/68 (H_3N_2) і В/Ленінград/17/86. Крім того, було вивчено віруліцидну дію препарату щодо тих самих

штамів вірусу грипу, а також вплив етонію на здатність клітин культури тканини ХАО підтримувати репродукцію цих вірусів. Отримані результати наведені в табл. 1 у вигляді середньої арифметичної показників \pm середньоквадратична помилка.

Аналіз результатів показав, що етоній дозою 125 мкг/мл статистично вірогідно сповільнював репродукцію як вірусів A/PR/8/34 та A/Гонконг/1/68, так і В/Ленінград/17/86 у середньому на 4,35 $Ig TID_{50}$, 1,6 $Ig TID_{50}$ та 1,6 $Ig TID_{50}$ відповідно для кожного зі штамів. Крім того, препарат у цій дозі виявляв високу статистично значущу віруліцидну дію, а також знижував здатність клітин культури ХАО підтримувати репродукцію вірусів.

Під час дослідження механізму противірусної дії етонію при грипі нами вивчено його вплив на протеолітичні процеси протягом вірус-мембранних взаємодій, які є дуже важливими на ранніх етапах репродукції вірусу грипу. З цією метою у модельних експериментах з очищеним і концентрованим вірусом грипу A/PR/8/34 та ізольованими плазматичними мембранами чутливих клітин ХАО курячих ембріонів визначали протеолітичну активність як окремо у препаратах вірусу і мембран, так і після короточасної взаємодії вірусу грипу з мембранами, під час якої утворювався вірус-мембранний комплекс.

Вірус-мембранний комплекс отримували адсорбцією протягом 1 год при $0^\circ C$ очищеного концентрованого препарату вірусу на ізольованих плазматичних мембранах. Етоній додавали до експериментальних зразків у кінцевій концентрації 0,05 мг/мл та інкубували 30–40 хв при $37^\circ C$ — це час, який потрібен для проникнення вірусу крізь мембрану чутливої клітини. Контролем був препарат з додаванням фізіологічного розчину. Протамінрозщеплювальну активність визначали через гідроліз 1%-го розчину протамін-сульфу натрію при рН 7,6. У табл. 2 наведено результати 3 експериментів, які свідчать, що інгібіція протеолітичної активності мембран етонієм не була регулярною, на відміну від його впливу на ензиматичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу. Таким чином, етоній може впливати на протеолітичні процеси, які відбуваються на найбільш ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною.

Противірусну дію етонію в експерименті на тваринах вивчали на моделі інфекції, яку моделювали шляхом інтраназального зараження білих безпородних мишей під легким ефірним наркозом вірусом грипу A/PR/8/34. Тваринам вводили по 0,05 мл вірусвмісної рідини в розведеннях від 10^{-3} до 10^{-8} , на кожне розведення брали не менше 4 мишей; 0,2%-й розчин етонію вводили інтрана-

Таблиця 1

Противірусна активність етонію в культурі ХАО

Штам вірусу	Репродукція вірусів	Здатність культури тканини підтримувати репродукцію вірусів	Позаклітинний вірус
A/PR/8/34	Контроль	5,50 \pm 0,24	4,20 \pm 0,13
	Дослід	1,15 \pm 0,33	2,60 \pm 0,33
A/Гонконг/1/68	Контроль	5,30 \pm 0,11	4,28 \pm 0,18
	Дослід	3,70 \pm 0,08	3,00 \pm 0,32
В/Ленінград/17/86	Контроль	4,10 \pm 0,27	4,00 \pm 0,38
	Дослід	2,50 \pm 0,24	1,90 \pm 1,04

Примітка. Активність наведено в логарифмах 50%-ї тканинної інфікуючої дози ($Ig TID_{50}$).



Таблиця 2

Вплив етонію на протамінрозщеплювальну активність вірусу грипу, плазматичних мембран клітин ХАО та вірус-мембранного комплексу

Об'єкт впливу	Протамінрозщеплювальна активність, (мкМоль аргініну/хв×10 ⁻²)					
	Контр. ₁	Дослід ₁	Контр. ₂	Дослід ₂	Контр. ₃	Дослід ₃
Вірус	4,7	2,3	6,3	5,3	7,3	3,5
Мембрани	2,3	4,0	6,3	1,5	3,3	2,5
Вірус-мембранний комплекс	5,0	3,1	15,6	10,0	4,1	3,1

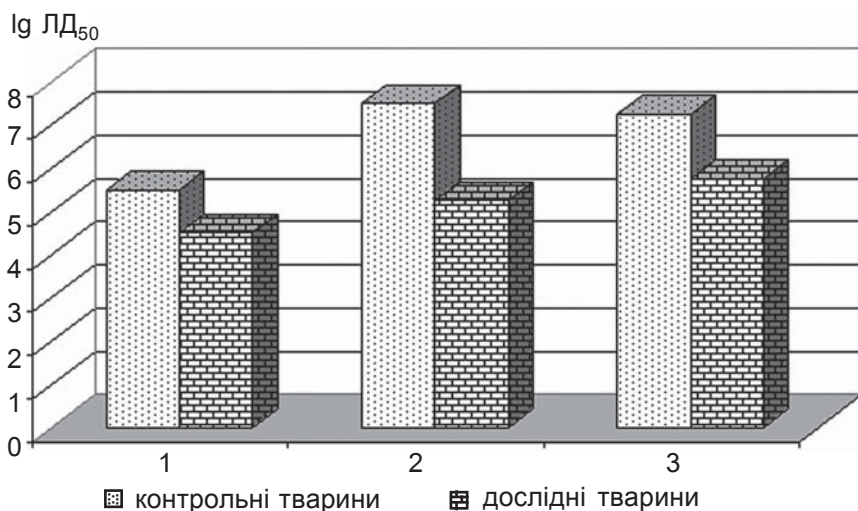


Рис. 1. Захисна дія етонію при експериментальному грипі у мишей. Схеми введення препарату: 1 — профілактична; 2 — лікувально-профілактична; 3 — лікувальна

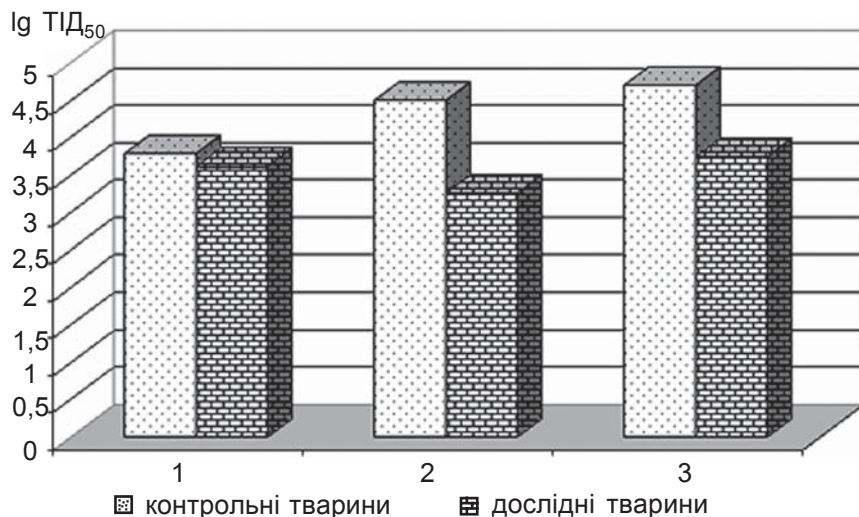


Рис. 2. Вплив етонію на накопичення інфекційного вірусу в легенях білих мишей на 4–5-ту добу після інфікування. Схеми введення етонію: 1 — профілактична; 2 — лікувально-профілактична; 3 — лікувальна

зально за профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами. Захисну дію препарату визначали за зниженням кількості загиблих тварин протягом 14 діб після інфікування (рис. 1). Результати

дослідження свідчать про значну захисну дію етонію при всіх схемах його застосування. Різниця між контрольною та дослідною групами становила 1,0 Ig LD₅₀ при профілактичному використанні препарату, 2,25

Ig LD₅₀ — при застосуванні етонію за лікувально-профілактичною схемою та 2,0 Ig LD₅₀ при лікувальній схемі його введення.

Вивчено також вплив етонію при введенні за наданими вище схемами на кількість інфекційного вірусу грипу і рівень кислих та лужних протеаз у легенях тварин на 2–3-й та 4–5-й день після їх зараження. Рівень як кислих, так і лужних протеаз у певний термін в легенях контрольних і дослідних тварин значно не відрізнявся, і тільки на 4–5-ту добу спостерігалася тенденція до зниження казеїнолітичної активності під впливом етонію. Вміст інфекційного вірусу в легенях контрольних і дослідних тварин на 2–3-й день після інфікування при всіх схемах аплікації етонію також не відрізнявся. Результати титрування гомогенатів легень мишей на 4–5-й день після зараження подано на рис. 2. Їх аналіз свідчить, що кількість інфекційного вірусу в гомогенатах легень експериментальних тварин помітно зменшується при лікувально-профілактичній та лікувальній схемах введення етонію.

Висновки

1. Етоній *in vitro* сповільнює репродукцію вірусів грипу серотипу А (серопідтипів H₁N₁, та H₃N₂) і серотипу В. У тій самій нетоксичній концентрації він також проявляє віруліцидну дію щодо зазначених вище вірусів і знижує здатність чутливих клітин підтримувати їх репродукцію.

2. Препарат етоній здатний до інгібіції протеолітичних процесів, що відбуваються на найбільш ранніх стадіях взаємодії вірусу грипу з плазматичними мембранами чутливих клітин.

3. При інтраназальній його аплікації за лікувальною та лікувально-профілактичною схемами зменшуються титри інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин при моделюванні експериментального грипу у мишей.

4. Етоній статистично значуще знижує загибель інфікованих вірусом грипу тварин при інтраназальній його аплікації за профілактичною, лікувальною та лікувально-профілактичною схемами.

Отримані результати свідчать про протигрипозну дію офіційного препарату етонію *in vitro* та *in vivo*, а також про перспективність його використання в профілактиці та лікуванні грипу.

Автор висловлює щире подяку за допомогу при проведенні досліджень і в роботі над статтею канд. мед. наук В. П. Лозицькому, канд. мед. наук Ю. А. Бощенко і канд. біол. наук А. С. Федчук.

ЛІТЕРАТУРА

1. Заліська О. М. Фармакоэкономика. Фармакоэкономичний аналіз «вартість — ефективність» // Фармацевт-практик. — 2003. — № 4. — С. 38-39.

2. Антисептики у профілактиці й лікуванні інфекцій. Антисептики в профілактике и лечении инфекций // За ред. Г. К. Палія. — К.: Здоров'я, 1997. — 201 с.

3. Патент України. UA 32088A. МКВ 5A61 K 31/695, A 81 K31/14. Раціональний препарат та спосіб його одержання / Ю. М. Шевченко, І. І. Герасченко, О. А. Вільцанюк (Україна). — № 98126795. Опубл. 15.12.2000, Бюл. № 7-11. — 4 с.

4. Репродукция вирусів гриппа в культурі ткани хорион-аллантаїсної оболочкі куриних ембріонів, прикріпленої к скорлупі / А. І. Мальцева, Е. Н. Аграновская, Ю. Н. Зелі-

ченко, Я. С. Шварцман // Лаб. дело. — 1973. — № 11. — С. 689-690.

5. Krizanova O., Svatosova Z. Взаимодействие плазматических мембран с вирусом гриппа IV. Изменение активности креатинфосфокиназы // Acta Virol. — 1975. — N 19. — P. 97-105.

6. Вовчук С. В. Определение активности протеолитических ферментов в зерне злаковых культур // Биохимические методы исследования селекционного материала. — Одесса, 1976. — С. 56-57.

7. Lozitsky V. P., Puzis L. E., Polyak R. Ya. Resistance of mice to reinfection after ϵ -aminocaproic acid treatment of primary influenza virus infection // Acta Virol. — 1988. — N 32. — P. 117-123.

8. Ашмарин И. П. Вычисление ED_{50} при малом числе подопытных животных // Журн. микробиол. — 1959. — № 2. — С. 102-108.

УДК 615.033.07

О. В. Жук, В. Г. Зінковський, С. К. Сумрій, І. Ю. Борисюк

ОЦІНКА ПОВНОТИ ВСМОКТУВАННЯ 3H -АМІКСИНУ ЗІ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ МИШЕЙ І ПРОЦЕСУ ПРЕСИСТЕМНОЇ ЕЛІМІНАЦІЇ НА ПІДСТАВІ ПОЗАМОДЕЛЬНОГО ФАЗОВОГО АНАЛІЗУ

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

Вступ

Останнім часом відбувається зростання поширеності гострих, хронічних інфекційних, особливо вірусних захворювань, що зумовлені зниженням імунологічної реактивності населення. У зв'язку з цим різко підвищився інтерес до препаратів, що діють як на збудника, так і на імунітет.

Найважливіші властивості індукторів інтерферону (ІФН) полягають в універсально широкому діапазоні противірусної активності. Однак, крім етіотропної дії, ці препарати справляють і імуномодулюючий вплив, що визначає їхню ефективність стосовно широкого спектра захворювань [1-3].

Індуктори ІФН після введення в організм спричиняють низку неспецифічних і специфічних ефектів, пов'язаних з інгібуванням росту клітин, модуляцією їх, диференціюванням і синтезом мембранних рецепторів, а також з дією на різні ланки системи імунітету [4].

Підвищена інфекційна захворюваність є головним проявом як первинних, так і вторинних імунодефіцитів. Головною мішенню застосування імуномодулюючих препаратів є вторинні імунодефіцити — інфекційно-запальні процеси різної локалізації, що є частими, рецидивними та важко піддаються лікуванню. В основі будь-якого хронічного інфекційно-запального процесу лежать ті чи інші зміни в імунній системі, що і є однією з причин цього процесу.

Противірусна активність і механізм дії аміксину на імунну систему досить добре вивчено, особливо його вплив на інтерфероновий статус [5; 6].

Метою даної роботи було вивчення процесів розподілу 3H -аміксину і його метаболітів та визначення повноти всмоктування, процесу пресистемної елімінації і ефекту первинного проходження через печінку в організмі мишей при його пероральному і внутрішньовенному введенні.

