



УДК 615.281;8:615.012.1

Т. Л. Гридiна, В. П. Лозицький, А. С. Федчук, Ю. А. Бощенко

## ПРОТИГРИПОЗНІ ВЛАСТИВОСТІ УНІТІОЛУ

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

### 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 масовою гострою інфекційною хворобою. 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 і засобів боротьби з ним є одним з найважливіших завдань для медичної науки та закладів охорони здоров'я.

Розробка нових фармакологічних засобів є тривалим і фінансово витратним шляхом створення медикаментів. З позицій фармакоeкономiки [1] — нової сучасної фармацевтичної науки, яка оцiнює 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 побiчна дія відомі завдяки багаторічному застосуванню, є дуже перспективним і економічно виправданим напрямком. Такий підхід дає можливість розши-

рити показання для застосування відомих ліків як протівірусних засобів.

Протеолітичне нарізання є універсальним механізмом активації різноманітних специфічних білків, у тому числі вірусних [2]. Гемаглютинін вірусу грипу (ГА) є поверхневим глікопротеїдом, який для набуття вірусом інфекційних властивостей повинен пройти етап протеолітичного нарізання. В результаті створюються дві субодиниці — ГА1, яка забезпечує специфічну адсорбцію вірусу на зовнішній мембрані чутливих клітин, і ГА2, яка відповідає за проникнення вірусу до клітини. Ці субодиниці після нарізання з'єднуються між собою тільки дисульфідним містком. Тому при розриві дисульфідних зв'язків з утворенням сульфгідрильних груп ГА1 видалятиметься з поверхні віріонів, що порушить їх взаємодію з чутливими клітинами.

Офіційний препарат унітіол (2,3-димеркаптопропансульфонат натрію), що використовується у медичній практиці як антидот, має у своїй хімічній структурі дві активні SH-групи і є активним відновником дисульфідних зв'язків. Саме тому можна було сподіватися, що унітіол впливатиме на гемаглютинін вірусу грипу, порушуючи дисульфідні зв'язки між його субодиницями, внаслідок чого гальмуватимуться найбільш

ранні стадії взаємодії вірусів грипу з чутливими клітинами. Це має забезпечити протигрипозний ефект. Тому метою нашого дослідження було підтвердження або заперечення цих теоретичних висновків. Було вивчено протигрипозну активність унітіолу як *in vitro*, так і *in vivo*, а також досліджено деякі механізми його протівірусної дії.

### Матеріали та методи дослідження

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

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

Віруси: високовірулентний для мишей штам вірусу грипу A/PR/8/34 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>), вірус грипу A/Гонконг/1/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) і вірус грипу В/Ленінград/17/86.

Унітіол виробництва ICN «Октябрь» (Санкт-Петербург, Російська Федерація).

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

Очищення та концентрацію вірусу грипу A/PR/8/34 проводили, застосовуючи методи диференційного і градієнтного центрифугування та гельфільтрації на макропористому сілохромі. Плазматичні мембрани виділяли з клітин ХАО 12–14-добових курячих ембріонів,



як описано в [4]. Протеолітичну активність лужних трипсиноподібних протеаз у препаратах очищеного і концентрованого вірусу грипу і плазматичних мембран визначали за гідролізом 1%-го розчину протаміну (метод ґрунтується на реакції розщеплення протамінусульфату з виділенням аргініну) [5].

Грипозну інфекцію у білих мишей моделювали внутрішньоназальним введенням високопатогенного для них штаму A/PR/8/34. Унітіол вводили інтраназально під легким ефірним наркозом за двома схемами:

1) профілактична схема — протягом двох днів до зараження з використанням 10%-го розчину препарату;

2) лікувально-профілактична схема — за день, у день інфікування та три дні по тому (усього п'ять днів) з використанням 5%-го розчину препарату.

Контрольні тварини отримували фізіологічний розчин за відповідними схемами.

В експериментальних тварин у певні терміни після зараження високопатогенним для мишей штамом вірусу A/PR/8/34 (у розведенні  $10^{-5}$ ) визначали рівень інфекційного вірусу методом титрування 10%-х гомогенатів легенів на культурі ХАО [6], а також рівень кислих та лужних протеаз за гідролізом гемоглобіну та казеїну відповідно [5]. До контрольної групи (як і до дослідної) входили

7 тварин, у кожній групі проводили тестування.

Розрахунок  $TID_{50}$  в експериментах *in vitro* та гомогенатах легенів, а також  $LD_{50}$  у дослідях на мишах проводили за методом Кербера в модифікації Ашмаріна [7]. Статистичну значущість результатів вивчення антивірусної дії унітіолу *in vitro*, а також його впливу на активність трипсиноподібних протеаз вірусу, плазматичних мембран та вірус-мембранного комплексу визначали за непараметричним критерієм знаків (P за K. 3.) [8]. Статистичну вірогідність впливу унітіолу на показники, отримані в експериментах *in vivo*, було проаналізовано за допомогою t-критерію Стьюдента [7; 9].

#### Результати дослідження та їх обговорення

Вивчення впливу унітіолу на репродукцію вірусів грипу *in vitro* показало, що препарат у нетоксичній для клітин ХАО дозі 0,1 % статистично вірогідно сповільнював репродукцію вірусів грипу A/PR/8/34 ( $H_1N_1$ ), A/Гонгконг/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 досліджено вплив унітіолу 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 з використанням непараметричного критерію знаків [8] показав, що унітіол дозою 0,1 % статистично вірогідно сповільнював репродукцію вірусів A/PR/8/34, A/Гонгконг/1/68 і В/Ленінград/17/86 (P за K. 3. < 0,05). Крім того, препарат у цій дозі виявляв віруліцидну дію (статистично значущу лише щодо штаму A/PR/8/34), а також знижував здатність клітин культури ХАО підтримувати репродукцію вірусів.

Для виявлення деяких механізмів протигрипозної дії унітіолу вивчали його вплив на протеолітичні процеси під час вірус-мембранної взаємодії, які відіграють важливу роль 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 короткочасної взаємодії вірусу грипу з мембранами, під час якої утворювався вірус-мембранний комплекс.

Вірус-мембранний комплекс отримували адсорбцією протягом години при 0 °C очищеного концентрованого препарату вірусу на ізольованих плазматичних мембранах. Унітіол додавали до експериментальних зразків у кінцевій концентрації 5,0 мг/мл (0,5 %) та

Таблиця 1

Протигрипозна активність унітіолу в культурі ХАО

Штам вірусу	Група	Репродукція вірусів	Здатність культури тканини підтримувати репродукцію вірусів	Позаклітинний вірус
A/PR/8/34	Контроль	4,20±0,27	3,05±0,74	6,05±0,22
	Дослід	3,75±0,15*	1,10±0,54*	4,70±0,26*
A/Гонгконг/1/68	Контроль	5,56±0,14	4,26±0,21	2,62±0,15
	Дослід	4,86±0,21*	2,98±0,12*	2,36±0,36
В/Ленінград/17/86	Контроль	5,3±0,8	4,50±0,54	3,30±0,38
	Дослід	2,85±0,21*	2,60±0,34*	3,55±0,10

Примітка. Активність наводиться в логарифмах 50%-ї тканинної інфікуючої дози ( $\lg TID_{50}$ );

\* — різниця з контролем є статистично значущою (P за K. 3. < 0,05).



інкубували 30–40 хв при 37 °С — це час, який потрібний для проникнення вірусу крізь мембрану чутливої клітини. Контрольним був препарат з додаванням аналогічного об'єму ізотонічного розчину хлориду натрію. Активність трипсиноподібних протеаз (протамінрозщеплювальну) визначали за гідролізом 1%-го розчину протамінсульфату натрію при рН 7,6.

Середні показники результатів 5 експериментів свідчать, що інгібіція протеолітичної активності унітіолом була регулярною у всіх системах, що вивчалися: вірус, мембрани та вірус-мембранний комплекс (рис. 1). Оскільки такий результат отримано у всіх дослідах, він є статистично значущим за непараметричним критерієм знаків ( $P$  по К. З.  $<0,05$ )

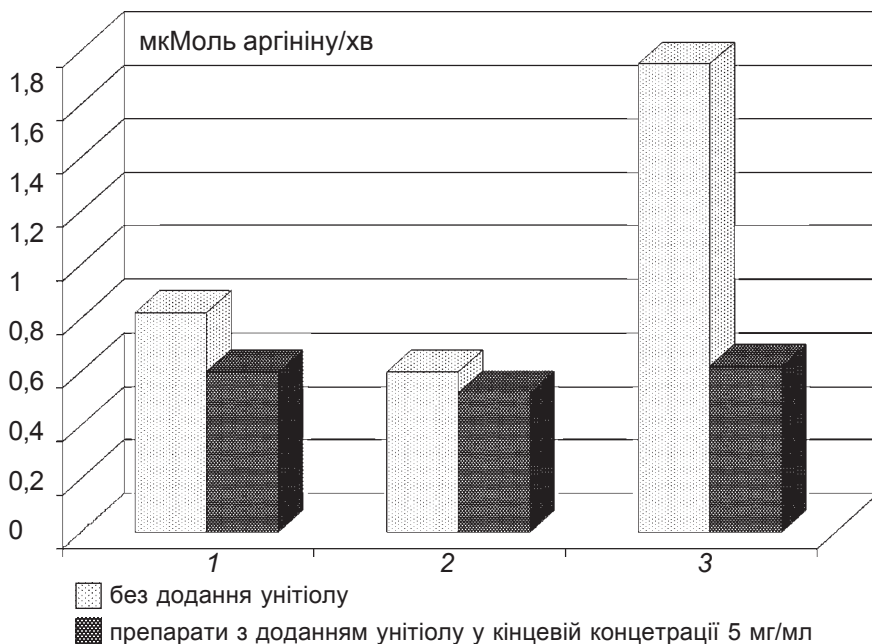


Рис. 1. Вплив унітіолу на рівень протамін-розщеплювальної активності вірусу грипу A/PR/8/34 (1), плазматичних мембран (2) і вірус-мембранного комплексу (3); різниця між контрольними та дослідними групами статистично значуща в усіх випадках ( $P$  за К. З.  $<0,05$ )

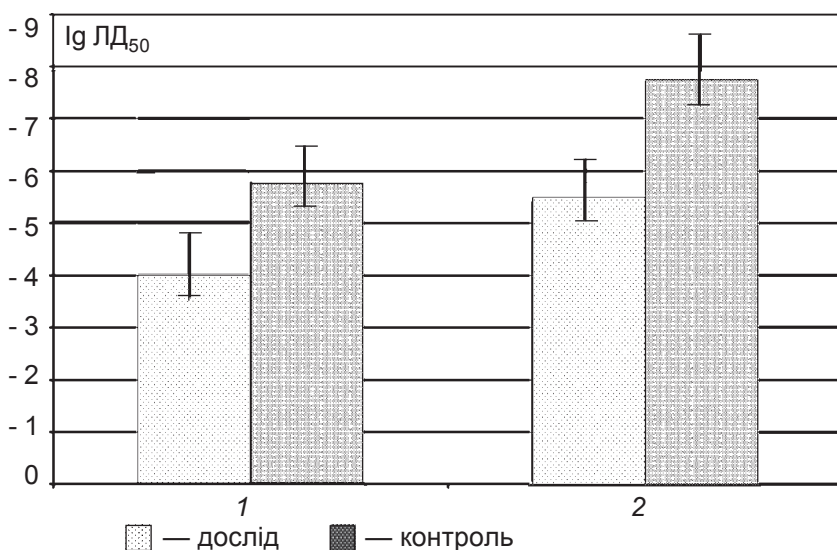


Рис. 2. Захисна дія унітіолу при експериментальній грипозній інфекції у мишей. Схеми введення препарату: 1 — профілактична; 2 — лікувально-профілактична

[8]. Таким чином встановлено, що унітіол сповільнює протеолітичні процеси, які беруть участь у найбільш ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною. Це може бути одним з механізмів його протигрипозної дії.

Протигрипозну дію унітіолу 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 вірусмісної рідини в розведеннях від  $10^{-3}$  до  $10^{-8}$ , на кожне розведення брали не менше 4 мишей; 0,05 мл 10 або 5%-го розчину унітіолу вводили тваринам інтраназально за профілактичною або лікувально-профілактичною схемами відповідно. Захисну дію препарату визначали за зниженням загинелі тварин протягом 14 діб після інфікування (рис. 2).

Результати досліджень свідчать, що захисна дія унітіолу була статистично значущою при обох схемах його застосування. Різниця між контрольною та дослідною групами становила 1,5 lg LD<sub>50</sub> при профілактичному використанні 10%-го розчину препарату та 2,0 lg LD<sub>50</sub> при застосуванні 5%-го розчину унітіолу за лікувально-профілактичною схемою. Відомо, що різниця 1,25 lg і вище між рівнями LD<sub>50</sub> свідчить про значущість розбіжностей між дослідною та контрольною групами і є показником протівірусної ефективності препарату [10].

Також вивчено вплив введення унітіолу за наданими вище схемами на кількість інфекційного вірусу грипу і рівень кислих та лужних протеаз в легенях тварин у певний термін після їх зараження. При профілактичному застосуванні препарату означені показники визначали на 3-тю





**Вплив унітіолу на накопичення інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз у легенях білих мишей при експериментальному грипі**

Показники	Група	Профілактична схема застосування препарату, доба після інфікування		Лікувально-профілактична схема застосування препарату, доба після інфікування			
		3-тя	5-та	1-ша	3-тя	5-та	7-ма
Титр інфекційного вірусу, Іg ТІД <sub>50</sub>	Контр. Дослід	3,43±0,09 4,06±0,65	3,780±0,275 2,210±0,395*	1,46±0,05 1,17±0,18	3,17±0,35 3,75±0,58	4,5±0,3 3,21±0,37*	2,85±0,47 2,58±0,50
Катептична активність, мкМоль тирозину/мл за 1 хв	Контр. Дослід	0,022±0,001 0,022±0,004	0,023±0,002 0,023±0,001	0,088±0,004 0,076±0,001	0,086±0,002 0,097±0,005	0,076±0,005 0,067±0,002	0,084±0,001 0,041±0,005*
Казеїнолітична активність, мкМоль тирозину/мл за 1 хв	Контр. Дослід	0,024±0,007 0,016±0,004	0,023±0,001 0,020±0,004	0,033±0,006 0,020±0,004	0,042±0,001 0,030±0,002	0,025±0,004 0,010±0,003	0,019±0,002 0,012±0,001

Примітка. \* — різниця з контролем є статистично значущою (P<0,05).

та 5-ту добу після інфікування, а при лікувально-профілактичній схемі — на 1, 3, 5 та 7-й день (табл. 2). Вони свідчать, що унітіол при його використанні за обома наведеними схемами приводив до зменшення вмісту інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин у всі терміни дослідження, крім 3-ї доби. Рівні як кислих, так і лужних протеаз у певні терміни в легенях контрольних та дослідних тварин значно не відрізнялися, хоча спостерігалася тенденція до зниження ензиматичної активності під впливом унітіолу.

### Висновки

1. Унітіол виявляє протівірусну дію *in vitro* як щодо вірусів грипу серотипу А (серопідтипів H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> та H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), так і серотипу В.

2. Унітіол здатний до інгібіції протеолітичних процесів, які беруть участь у найбільш ранніх стадіях взаємодії вірусу грипу з плазматичними мембранами чутливих клітин.

3. Унітіол при інтраназальній його аплікації за профілактичною та лікувально-профілактичною схемами при моде-

люванні експериментального грипу у мишей виявляє захисну дію. Препарат зменшує титри інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин і статистично значуще знижує їх загибель.

Отримані результати свідчать про протигрипозну дію офіціального препарату унітіолу *in vitro* та *in vivo*, а також про перспективність його використання для лікування та профілактики грипозної інфекції.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Заліська О. М. Фармакоекономіка. Фармакоекономічний аналіз «вартість-ефективність» // Фармацевт-практик. — 2003. — № 4. — С. 38-39.
2. *Участие* системы протеолиза в реализации вирулентности вируса гриппа и развитии инфекционного процесса. Антивирусное действие ингибиторов протеаз / В. П. Лозицкий, А. С. Федчук, Л. Е. Пузис и др. // *Вопр. вирусол.* — 1987. — Т. 32. — С. 413-419.
3. *Репродукция* вирусов гриппа в культуре ткани хорионаллантоисной оболочки куриных эмбрионов, прикрепленной к скорлупе / А. И. Мальцева, Е. Н. Аграновская, Ю. Н. Зеличенко, Я. С. Шварцман // *Лаб. дело.* — 1973. — № 11. — С. 689-690.
4. Krizanova O., Svatsova Z. Взаимодействие плазматических мембран с вирусом гриппа IV. Измене-

ние активности креатинфосфокиназы // *Acta Virol.* — 1975. — N 19. — P. 97-105.

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

6. 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.

7. Ашмарин И. П. Вычисление ЕД<sub>50</sub> при малом числе подопытных животных // *Журн. микробиол.* — 1959. — № 2. — С. 102-108.

8. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 142 с.

9. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1975. — 295 с.

10. *Программа* экспериментального химиотерапевтического изучения антивирусных (антигриппозных) препаратов и критерии их поэтапной оценки / Г. А. Галегов, Н. Л. Пушкарская, Н. А. Леонтьева и др. // *Вопр. вирусол.* — 1976. — № 4. — С. 503-507.

