



УДК 615.281;8:615.012.1

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

ПРОТИВІРУСНА ДІЯ ОФІЦІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ Е-АМІНОКАПРОНОВОЇ КИСЛОТИ Й УНІТІОЛУ ЩОДО ВІРУСУ ГРИПУ ПТАХІВ

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

Вступ

Інфекційні хвороби й досі залишаються однією з основних причин смертності серед населення планети. На їх частку припадає близько 30 % летальних випадків, які щороку реєструються у світі, що становить 14–17 млн чоловік [1; 2]. Грип та інші гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) посідають провідне місце серед усієї інфекційної патології у дітей і дорослих [3; 4]. Ці захворювання характеризуються ушкодженнями верхніх дихальних шляхів або більш глибоких відділів дихального тракту, а нерідко й інших органів і систем, супроводжуються загальною лихоманкою та іншими проявами [5].

Збудники грипу — це РНК-геномні віруси, що належать до родини *Orthomyxoviridae*, яка поділяється на два роди вірусів грипу — рід вірусів А і В і рід вірусів С. Віруси грипу типу А вражають людину, деякі види тварин (коней, свиней та ін.) і птахів [6; 7]. Віруси грипу типу В і С патогенні тільки для людей.

Відповідно до класифікації ВООЗ (1980), до складу віру-

сів грипу людини типу А можуть входити один із трьох гемаглютининів (Н1, Н2, Н3) та одна із двох нейрамінідаз (N1, N2). Велика субодиниця гемаглютиніну (НА1) є лігандом, що відповідає за специфічну сорбцію вірусу на рецепторах чутливої клітини, а мала (НА2) забезпечує проникнення вірусу у клітину. Гемаглютинин має гемаглютинуючі властивості й індукує в організмі створення антигемаглютининів та віруснейтралізуючих антитіл. Нейрамінідаза є ферментом, що відповідає за вихід віріонів із клітин хазяїна. Антитіла до цього глікопротеїду також мають велике значення для протигрипозного імунітету.

До родини *Orthomyxoviridae* зараховують також збудників вірусу грипу птахів, яких підрозділяють на 15 субтипів гемаглютининів (Н1–Н15) і 9 субтипів нейрамінідази (N1–N9), що можуть ресортуватися у різних рекомбінаціях. Три з них (Н₁Н₁, Н₂Н₂, Н₃Н₂) виявилися збудниками грипозних пандемій серед людей у ХХ ст., решта — викликають захворювання серед ссавців і птахів. Серед найбільш патогенних для домашніх птахів виділяють ві-

руси з антигенною формулою Н₇Н₇ (вірус «курячої чуми») та Н₅Н₁, які можуть спричинювати масову загибель курей. Високопатогенні варіанти вірусу грипу Н₇Н₇ викликали у 2003 р. масове ураження фермерських курячих господарств у Нідерландах, тимчасом як віруси Н₅Н₁ виявилися причиною загибелі мільйонів курей у країнах Південно-Східної Азії, починаючи з 1997 р. [8].

Донедавна панувала думка, що віруси грипу птахів не є патогенними для людей і у разі інфікування викликають у них симптоми кон'юнктивіту, легке нездужання, а іноді слабо виражений респіраторний синдром, які швидко минають [9; 10]. Це положення було скасовано у 1997 р., коли віруси грипу птахів спричинили досить тяжкі випадки захворювання серед людей у Гонконгу, кожний третій з яких закінчився летально. Для запобігання подальшому інфікуванню людей було проведено тотальне знищення поголів'я курей у цьому регіоні.

У 2003 р. цим вірусом були інфіковані члени родини, яка подорожувала по Китаю, померли батько і син. Останнім



Загальна кількість випадків захворювань на пташиний грип A/(H₅N₁) за даними ВООЗ на 10 березня 2006 р.

Країни	2003		2004		2005		2006		Усього	
	в	с	в	с	в	с	в	с	в	с
Камбоджа	0	0	0	0	4	4	0	0	4	4
Китай	0	0	0	0	8	5	7	5	15	10
Індонезія	0	0	0	0	17	11	11	10	28	21
Ірак	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
Таїланд	0	0	17	12	5	2	0	0	22	14
Туреччина	0	0	0	0	0	0	12	4	12	4
В'єтнам	3	3	29	20	61	19	0	0	93	42
Усього	3	3	46	32	95	41	32	21	176	97

Примітка: в — випадки захворювання; с — випадки захворювання, які закінчилися летально (ВООЗ реєструє тільки лабораторно підтверджені випадки захворювання на пташиний грип).

часом у Китаї, крім H₅N₁, зареєстровані 2 випадки інфікування людей вірусом грипу H₉N₂, однак клінічна картина захворювання була достатньо м'якою зі сприятливим кінцем [11].

Таким чином, за останні 7 років віруси грипу птахів H₅N₁ і H₇N₇ внаслідок мутацій змінили свої біологічні властивості та набули здатності не тільки долати бар'єр хазяїна з безпосереднім інфікуванням людей (омінаючи проміжного хазяїна), але й викликати дуже тяжкі клінічні форми захворювання, чимала частина яких закінчується летально [12; 13]. Найбільшою мірою це виявилось в грудні 2003—січні 2004 рр., коли за короткий проміжок часу (1,5 міс) вірус розповсюдився по 10 країнах Південно-Східної Азії, уражаючи господарства, що займаються розведенням не тільки курей, але й качок, які проявляли стійкість до більш ранніх варіантів вірусу грипу птахів. За даними січня 2004 р., 27 осіб були інфіковані від курей вірусом грипу птахів, 20 з яких (у тому числі діти) померли [14].

Згідно з інформацією ВООЗ, за даними на 29.01.2004 р. було зареєстровано 11 випадків захворювання на грип птахів (H₅N₁) серед людей: 8 випадків у В'єтнамі, 3 — в Таїланді. Вісім з одинадцяти захворілих померли (шість осіб у В'єтнамі та дві — в Таїланді). Всі вони були інфіковані від птахів. Жодного випадку передачі інфекції від людини до людини не зареєстровано.

У 2005 р. ситуація з пташиним грипом, викликаним штамом H₅N₁, значно загострилася. Сьогодні фактичні дані свідчать про те, що вірус H₅N₁ є ендемічним в окремих частинах Азії через те, що отримав екологічну нішу у середовищі свійської птиці. Ризик подальших випадків захворювання людини не тільки зберігається, а й підвищується (таблиця).

Також слід урахувати і ризик виникнення пандемічного штаму вірусу грипу. Спалахи захворювання продовжують повторюватися, не зважаючи на активні заходи, у тому числі знищення понад 140 млн голів свійської птиці. Дикі перелітні птахи, які історично є природним резервуаром усіх вірусів грипу А, й досі гинуть у великій кількості від високопатогенного для них вірусу H₅N₁. Свійські качки можуть екскретувати чималу кількість високопатогенного вірусу, не виявляючи при цьому ніяких ознак захворювання. Їх роль у підтримці та передачі вірусу серед свійської птиці ще більш ускладнює ситуацію [13]. Таким чином, можна вже казати про виникнення панзоотії, особливо враховуючи можливість передавання захворювання від свійських птахів диким та перенесення інфекційного вірусу перелітними птахами [15; 16].

У 2001 р. віруси грипу включені ВООЗ до третьої категорії потенційних агентів біологічної зброї [1; 2]. Нещодавно ВООЗ розповсюджено брошуру «Реагування на опасність пандемії птичьего гриппа». Виходячи з того, що пандемії грипу виникають кожні 38–40 років, а остання пандемія була у 1968 р., на думку експертів ВООЗ, слід чекати на нову пандемію вірусу грипу [17].

Пандемії та епідемії грипу завжди завдавали великих збитків економіці та чималой шкоди здоров'ю населення. Протягом двадцятого сторіччя сталося три пандемії грипу А людей: 1918, 1957 та 1968 рр., викликані різними антигенними підтипами (H₁N₁, H₂N₂ і H₃N₂ відповідно) [18]. Усі вони призвели до загибелі багатьох людей, хоча дві останні пандемії (1957 і 1968 рр.) виникли тоді, коли вірусологія вже мала значний арсенал засобів для боротьби з вірусними інфекціями.

Оскільки нині склалася ситуація можливого спалаху пандемії грипу, ВООЗ розробила Глобальний план підготовки усіх країн на випадок її виникнення [19], згідно з яким рекомендується у кожній країні створити необхідний резерв хіміотерапевтичних засобів, які могли б забезпечити профілактичні та лікувальні заходи у разі різкого зростання кількості захворювань на грип серед населення. Практичні заходи у цей момент повинні бути спрямовані на зменшення захворюваності, летальності та соціальної дезорганізації [19].

Не дивлячись на те, що за останні десятиріччя всесвітній фармацевтичний ринок насичувався десятками нових противірусних препаратів, питан-



ня профілактики та терапії найбільш розповсюджених вірусних інфекцій не вирішене. Тому проблема пошуку активних хіміотерапевтичних засобів проти збудників вірусних інфекцій була і на цей час залишається актуальною і перспективною.

Розробка нових фармакологічних засобів є досить тривалим і фінансово витратним шляхом створення медикаментів. З позицій фармакоекономіки — 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, активність і побічна дія їх відома завдяки багаторічному застосуванню, є дуже перспективним і економічно виправданим напрямком [20]. Такий підхід дає можливість розширювати показання для застосування цих препаратів. Тому важливим є виявлення протівірусних властивостей у різноманітних сполук, у тому числі й офіційних лікарських препаратів, що сьогодні використовуються за іншим призначенням.

Препарат унітіол, який застосовується у медичній практиці як антидот, має у своїй хімічній структурі дві активні SH-групи і є активним відновником дисульфідних зв'язків. Саме тому унітіол впливає на гемаглютинін вірусу грипу: порушуючи дисульфідні зв'язки між його субодинацями він гальмує найбільш ранні стадії репродукції за рахунок втручання в процеси взаємодії вірусу з мембраною клітини-хазяїна [21]. У наших дослідженнях, проведених раніше, виявлена протівірусна дія препарату унітіол щодо вірусів грипу людини як серотипу А (серопідтипів H_1N_1 і H_3N_2), так і серотипу В *in vitro*, а також при

експериментальному грипу у мишей.

Синтетичний інгібітор фібринолізу Е-амінокапронова кислота (Е-АКК) гальмує набуття віріонами інфекційної активності, обмежуючи протеолітичне розщеплення попередника НА на НА-1 і НА-2. Гальмуючи процеси протеолітичного процесингу віріонів вірусу грипу, вона знижує врожай інфекційного вірусу грипу, запобігає проникненню віріонів у клітину і таким чином впливає на процеси репродукції вірусу в клітинах організму [22]. Нашими попередніми дослідженнями була показана протівірусна дія Е-АКК відносно вірусів грипу людини як серотипу А (серопідтипів H_1N_1 і H_3N_2), так і серотипу В *in vitro* на культурі тканини хоріон-алантоїсної оболонки (ХАО), а також при моделюванні експериментального грипу в мишей та у клініці [23].

Тому ми вважали за доцільне дослідити протівірусну дію унітіолу та Е-АКК щодо вірусів грипу птахів на культурі тканини ХАО. Вивчення цього питання є надзвичайно актуальним на цей час.

Матеріали та методи дослідження

Тканинні культури: фрагменти ХАО 11-14-добових курячих ембріонів.

Віруси: штами вірусів пташиного грипу з антигенними формулами H_5N_3 і H_7N_3 .

Препарати: амінокапронова кислота виробництва ТОВ «Фармацевтична компанія "Здоров'я"», Харків; унітіол виробництва ІСН «Октябрь» (Санкт-Петербург, Російська Федерація).

Ефективність протівірусної дії препаратів щодо вірусів пташиного грипу *in vitro* досліджували, використовуючи культуру ХАО 11-14-добових курячих ембріонів [24].

Розрахунок TID_{50} в експериментах *in vitro* проводили за методом Кербера в модифі-

кації Ашмаріна [25]. Статистичну значущість антивірусної дії препаратів *in vitro* визначали за непараметричним критерієм знаків для пов'язаних виборок (Р за К. З.) [26]. У разі, коли очікуваний результат спостерігався у п'яти випадках з п'яти пар дослідів, він вважався статистично значущим.

Результати дослідження та їх обговорення

Вплив досліджуваних препаратів на репродукцію вірусів грипу вивчали, розчинюючи їх у глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі. Вірусвмісну рідину, з попередньо визначеним інфекційним титром, розводили на глюкозо-желатиновому середовищі, що містило (дослід) або не містило препарат (контроль). При цьому вміст інфекційного вірусу був не нижче 100 TID_{50} . Середовище з різними розведеннями вірусу додавали до фрагментів ХАО, прикріпленої до шкаралупи та розміщеної в ямках полістиролових панелей. Після термостатування протягом 24 год при 37 °С контрольні та дослідні зразки окремо поєднувалися, і в них визначали титр інфекційного вірусу, тобто десятикратними розведеннями цих зразків інфікували фрагменти ХАО, а після 48 год термостатування при 37 °С визначали титр вірусу за результатами реакції гемаглютинації (РГА). З кожним із штамів вірусів і кожною концентрацією препаратів проведено по п'ять окремих парних дослідів.

Вивчення впливу Е-АКК на репродукцію вірусів грипу птахів з антигенними формулами H_5N_3 і H_7N_3 *in vitro* показало, що віруси пташиного грипу є чутливими до неї, при цьому більш чутливим є вірус H_5N_3 . Препарат у концентрації 10 мг/мл впливав на репродукцію цих вірусів, але його дія не була регулярною. У концентраціях 30, 20 і 15 мг/мл Е-АКК гальмувала репродукцію віру-



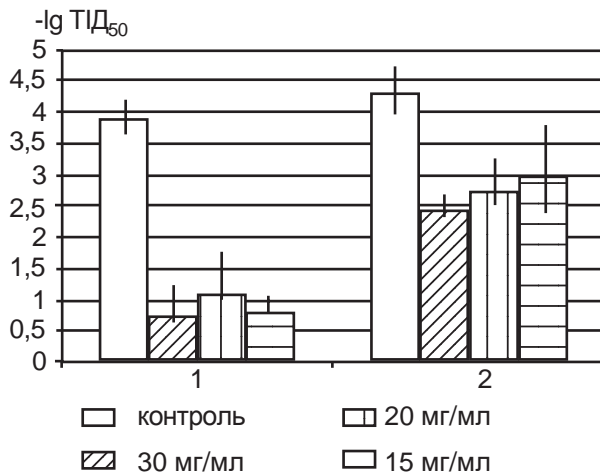


Рис. 1. Вплив Е-АКК на репродукцію вірусів грипу птахів у культурі тканини ХАО

Примітка. На рис. 1 і 2: штами вірусу грипу птахів: 1 — H₅N₃; 2 — H₇N₃.

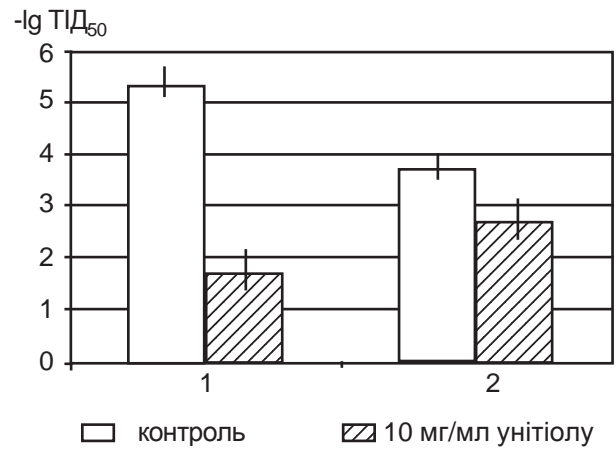


Рис. 2. Вплив унітіолу на репродукцію вірусів грипу птахів у культурі тканини ХАО

су H₅N₃ на 3,15; 2,82; 3,07 lg TID₅₀ відповідно (рис. 1), а H₇N₃ на 1,88; 1,5; 1,2 lg TID₅₀ відповідно (рис. 1).

Унітіол у концентрації 10 мг/мл на культурі клітин ХАО гальмував репродукцію вірусів грипу птахів H₅N₃ та H₇N₃ на 3,6 і 1,0 lg TID₅₀ відповідно (рис. 2). Це свідчить, що вірус із гемаглютиніном H₅ був більш чутливим і до цього препарату. У концентрації 1 мг/мл унітіол не спричиняв регулярного гальмування репродукції вірусів грипу птахів *in vitro*. На рисунках наведені розрахунки середніх арифметичних та середніх помилок.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження підтвердили наші припущення про наявність противірусних властивостей у офіційних препаратів Е-АКК та унітіолу щодо вірусів пташиного грипу серопідтипів H₅N₃ і H₇N₃. Враховуючи результати наших досліджень, проведених раніше [21; 23], та зважаючи на механізми дії Е-АКК (гальмування протеолітичного процесингу гемаглютиніну) й унітіолу (структурні порушення цього глікопротеїду), можна розраховувати на ефективність цих препаратів *in vivo*.

Висновки

Встановлена чутливість вірусів грипу птахів з гемаглюти-

нінами H₅ і H₇ до офіційних препаратів унітіолу й Е-АКК. Отримані результати свідчать про доцільність застосування Е-амінокапронової кислоти та унітіолу у боротьбі з пташиним грипом.

ЛІТЕРАТУРА

1. World health Report 1996: Fighting disease, fostering development. — Geneva, 1996.
2. World health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. — Geneva, 2002.
3. Whitley R. J., Hayden F. G., Reisinger K. S. Oral oseltamivir treatment in children // *Ped. Inf. Dis.* — 2001. — N 2. — P. 127-133.
4. Burk R. F., Schaffner W., Koenig M. G. Severe influenza virus pneumonia in the pandemic of 1968-1969 // *Arch. Intern. Med.* — 1971. — N 127. — P. 1122-1128.
5. Групп остается непредсказуемой инфекцией / Д. К. Львов, А. Н. Слепушкин, С. С. Ямникова, Е. И. Бурцева // *Вопр. вирусол.* — 1998. — № 3. — С. 141-144.
6. de Jong J. C., Paccaud M. F., DeRonde-Verloop F. M. Isolation of swine-like influenza A(H1N1) viruses from man in Switzerland and the Netherlands // *Ann. Inst. Pasteur. // Virol.* — 1988. — N 139. — P. 429-437.
7. Claas E. C., Jawaoka Y., de Jong J. C. Infection of Children with Avian-Human Reassortant Influenza virus from pigs in Europe // *Virology.* — 1994. — N 204. — P. 453-457.
8. Webster D., Hulse D. J. Microbial adaptation and change: avian influenza // *Res. Sci. Tech.* — 2004. — Vol. 23, N 2. — P. 453-465.

9. Evolution and ecology of influenza A viruses / R. G. Webster, W. J. Bean, O. T. Gorman et al. // *Microbiol. Rev.* — 1992. — N 56. — P. 152-179.

10. Alexander D. J. A review of avian influenza in different bird species // *Vet. Microbiol.* — 2000. — N 74. — P. 3-13.

11. Tang X., Tian G., Zhou K. Y. Isolation and characterization of prevalent strain of avian influenza viruses in China // *Chin. J. Anim. Poul. Inf. Dis.* — 1998. — N 20. — P. 1-5.

12. Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate / H. Chen, K. Subbarao, D. Swayne et al. // *Vaccine.* — 2003. — N 21. — P. 1974-1979.

13. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks / K. M. Sturm-Ramirez, T. Ellis, B. Bousfield et al. // *J. Virol.* — 2004. — N 78. — P. 4892-4901.

14. Avian influenza and human health. Report by the WHO secretariat at EB114/6. — Geneva, 2004. — 5 p.

15. Shortridge K. F. Pandemic influenza: a zoonosis? // *Seminar Respir. Infect.* — 1992. — N 7. — P. 11-12.

16. A pandemic warning? / J. C. de Jong, E. C. Claas, A. D. Osterhaus et al. // *Nature.* — 1997. — N 389. — P. 554.

17. Kuznetsov O. K. Basic assertions on emergence of influenza viruses with pandemic potential / Measures for preventions of their occurrence. Strengthening influenza pandemic preparedness through civil-military cooperation / J. Neville and O. I. Kiselev (Eds.). — 2005. — P. 152-156.



18. Kilbourne E. Influenza Pandemic of the 20th Century // Emerging Inf. Dis. — 2006. — Vol. 12, N 1. — P. 9-14.

19. Weekly epidemiological record. — 2000. — Vol. 75, N 35. — P. 281-288.

20. Заліська О. М. Фармакоекономіка. Фармакоекономічний аналіз «вартість — ефективність» // Фармацевть-практик. — 2003. — № 4. — С. 38-39.

21. Протигрипозні властивості унітіолу / Т. Л. Грідіна, В. П. Лозицький, А. С. Федчук, Ю. А. Бощенко

// Одес. мед. журнал. — 2005. — № 1 (87). — С. 4-7.

22. 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.

23. Lozitsky V. P. Anti-infectious actions of proteolysis inhibitor E-aminopropionic acid (E-ACA) // Вісник Вінниц. нац. мед. ун-ту. — 2004. — № 8 (2). — С. 434-437.

24. Мальцева А. И., Аграновская В. Е., Шварцман Я. С. Репродукция вирусов гриппа в культуре ткани хорион-аллантаической оболочки куриных эмбрионов, прикрепленной к скорлупе // Лаб. дело. — 1973. — № 11. — С. 689-690.

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

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

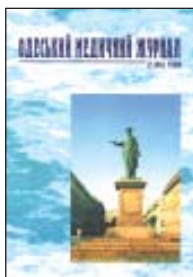
*Передплачуйте
і читайте*

ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Нові технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії



Ціна передплати на півріччя (три номери):

- для підприємств та організацій — 60 грн;
- для індивідуальних передплатників — 30 грн.

Передплатні індекси:

- для підприємств та організацій — 48717;
- для індивідуальних передплатників — 48405.

