

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ім.Д.К.ЗАБОЛОТНОГО**

ГРИДІНА ТЕТЯНА ЛЕОНІДІВНА

УДК: 615.281; 8:615.012.1

**ПРОТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ ОФІЦІАЛЬНИХ
ПРЕПАРАТІВ ДЕКАМЕТОКСИНУ, ЕТОНІО ТА УНІТІОЛУ ПО
ВІДНОШЕННЮ ДО ВІРУСІВ ГРИПУ ТА ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ**

03. 00. 06 – вірусологія

**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Українському науково-дослідному протичумному інституті ім. І.І.Мечникова МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
ПАЛІЙ Гордій Кіндратович,
Вінницький національний державний
медичний університет ім.М.І.Пирогова МОЗ України,
завідувач кафедри мікробіології, вірусології
та імунології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, **РУДЕНКО Адель Вікторівна**, Державна Установа «Інститут урології АМН України», завідувач лабораторії мікробіології, вірусології та мікології

доктор медичних наук, професор **ДЗЮБЛИК Ірина Володимирівна**, Київська медична академія післядипломної освіти ім.П.Л.Шупика МОЗ України, завідувач кафедри вірусології

Захист дисертації відбудеться “ 17 ” вересня 2008 р. о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.233.01 Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України за адресою: Д03680, м.Київ ДСП, вул.Заболотного, 154, зал засідань.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України за адресою: Д03680, м.Київ ДСП, вул.Заболотного, 154.

Автореферат розісланий “ ___ ” _____ 2008 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук, с.н.с.

Пуріш Л.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність дослідження. Інфекційні хвороби залишаються однією з основних причин смертності серед населення планети (World health Report 1996, 1996; World health Report 2002, 2002). Гостра та хронічна герпетична інфекція, а також грип є найбільш масовими вірусними інфекціями, які спричиняють значну шкоду здоров'ю населення та призводять до величезних економічних збитків. У 2005 р. значно загострилася ситуація з пташиного грипу, викликаного штамом H₅N₁. Ризик подальших випадків захворювання людини не тільки зберігається, а й підвищується. Більш того, склалася ситуація можливого спалаху пандемії грипу і ВООЗ розробила Глобальний план підготовки усіх країн на випадок виникнення цієї пандемії, в межах якого рекомендує у кожній країні створити необхідний резерв хіміотерапевтичних засобів, які могли б забезпечити профілактичні та лікувальні заходи.

За останні десятиріччя всесвітній фармацевтичний ринок насичувався десятками нових противірусних препаратів, але проблема профілактики і терапії найбільш розповсюджених вірусних інфекцій не вирішена. Тому пошук активних хіміотерапевтичних засобів проти збудників вірусних інфекцій залишається актуальним і перспективним завданням. Розробка нових фармацевтичних засобів є досить тривалим і фінансово витратним шляхом створення медикаментів. З позицій фармакоеконіміки – нової сучасної фармацевтичної науки, яка оцінює співвідношення між ефективністю, безпечністю та вартістю лікарських засобів при різних схемах лікування, - виявлення противірусних властивостей у ліків, які вже використовують за іншим призначенням, виробництво яких налагоджено, активність та побічна дія яких відома через багаторічне застосування, є дуже перспективним і економічно виправданим напрямком (Заліська О.М., 2003). Такий підхід дає можливість розширювати показання для їх застосування.

В останній час набув розвитку принцип пошуку противірусних препаратів, який базується на встановленні зв'язку між хімічною структурою речовин та їх противірусними властивостями (кількісний зв'язок структура – активність – Quantitative – Structure Activity Relationship - QSAR) (Lozitsky V. et al., 2003). Розробка цього напрямку привела до можливості створення рекомендацій щодо спрямованого синтезу речовин визначеної структури з прогнозованою противірусною активністю. Крім того, цей *метод дозволяє прогнозувати противірусну активність у відомих офіційальних препаратів, які використовують у медичній практиці за іншим призначенням.*

Декаметоксин, етоній є біс-четвертинними солями амонію та застосовуються як антибактеріальні засоби з широким спектром дії (Палій Г.К. (ред.), 1997). Вони мають лізосомотропні властивості, завдяки чому можуть втручатись у процес репродукції вірусу в клітині. Можна розраховувати також, що властивості цих препаратів як катіонних поверхнево активних речовин будуть впливати на найбільш ранні етапи взаємодії вірусу з клітиною хазяїна. Це призведе до гальмування процесу вірусної репродукції.

Препарат унітіол, який застосовують у медичній практиці як антидот, має у своїй хімічній структурі дві SH-групи і є активним відновлювачем дисульфідних зв'язків. Саме тому можна сподіватись, що унітіол буде впливати на гемаглютинін вірусу грипу, і, порушуючи дисульфідні зв'язки між його субодиницями, гальмуватиме найбільш ранні

стадії взаємодії вірусу грипу з чутливими клітинами (Лозицкий В.П. и др., 1987). Це буде інгібувати весь процес вірусної репродукції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась в межах планових НДР лабораторії біохімії Одеського науково-дослідного інституту вірусології та епідеміології ім. І.І.Мечникова „Дослідження протигрипозної та протигерпетичної ефективності деяких офіційальних препаратів (амбен, унітіол, етоній, декаметоксин) для обґрунтування їх застосування у терапії масових вірусних інфекцій” (державний реєстраційний № 0194U022684), „Обґрунтування розширення показань до застосування деяких препаратів як противірусних засобів” (державний реєстраційний № 0197U000623) і лабораторії хіміотерапевтичних та імунобіологічних препаратів Українського науково-дослідного протичумного інституту ім. І.І.Мечникова „Дослідження антивірусної дії нових перспективних сполук та удосконалення деяких імунобіологічних препаратів” (державний реєстраційний № 0101U000768), „Розробка імунобіологічних препаратів та дослідження антивірусних властивостей хіміопрепаратів” (державний реєстраційний № 0103U001461).

Мета і завдання дослідження Метою даної роботи було виявлення та вивчення противірусної дії вітчизняних офіційальних препаратів декаметоксину, етонію і унітіолу у відношенні вірусів простого герпесу (ВПГ) 1 та 2 типів, вірусів грипу людини і птахів, та дослідження деяких механізмів противірусної дії цих препаратів.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

-визначити токсичність декаметоксину, етонію і унітіолу на культурі інфузорій *Colpoda steinii*, на клітинних культурах RK13, Нер-2, первинно трипсинізованій культурі фібробластів курячих ембріонів (ФЕК), культурі тканини хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) 11-14-добових курячих ембріонів, а також вивчити гостру токсичність досліджуваних препаратів при інтраназальному способі застосування на мишах;

-дослідити специфічну противірусну активність декаметоксину, етонію і унітіолу у відношенні ВПГ-1 та ВПГ-2, вірусів грипу людини і птахів *in vitro*;

-вивчити захисну дію препаратів при моделюванні експериментальної грипозної інфекції у мишей *in vivo*;

-дослідити деякі механізми противірусної дії препаратів.

Об'єкт дослідження: віруси простого герпесу 1 та 2 типів, віруси грипу людини і птахів, препарати декаметоксин, етоній та унітіол.

Предмет дослідження: противірусні властивості препаратів, які використовуються у медичній практиці за іншим призначенням.

Методи дослідження: вірусологічні, біологічні, математичні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що вперше у вітчизняних лікарських препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу, виявлені противірусні властивості щодо збудників вірусних

інфекцій - грипу та герпесу *in vitro* та *in vivo*; доведено, що одним з механізмів реалізації противірусної дії цих препаратів слід вважати зниження протеолітичної активності під час вірус-мембранної взаємодії. Вперше виявлено гальмування репродукції вірусів грипу птахів з гемаглютинінами H₅ і H₇. Показано, що досліджувані препарати гальмують репродукцію вірусів грипу незалежно від їх антигенної структури. Автором застосовано QSAR підходи з метою виявлення противірусних властивостей у існуючих офіційних препаратів, що використовують в медицині за іншим призначенням. Розраховані комп'ютерні прогнози противірусної активності препаратів корелюють з результатами проведених експериментів, що свідчить про доцільність їх використання дослідниками.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблена та запатентована у співавторстві нова корисна модель „Спосіб оцінки ступеня цитотоксичності біологічно активних сполук та фармакологічних препаратів” (патент №15629 А Україна, МПК (2006) G01N 33/15, C12Q 1/18) дозволяє визначати рівень цитотоксичності різних об'єктів, у тому числі, хімічних сполук за допомогою культури інфузорій *Colpoda steinii*.

Застосування QSAR підходів з метою виявлення противірусних властивостей у існуючих офіційних препаратів дозволяє розширити арсенал противірусних засобів з різним механізмом дії з числа вітчизняних ліків, що використовують в медицині за іншим призначенням.

Особливо важливими є результати щодо виявлення автором противірусної дії у вітчизняних лікарських препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу по відношенню до вірусів пташиного грипу серопідтипів H₅N₃ і H₇N₃ *in vitro*.

Результати експериментальних досліджень щодо виявленої противірусної активності декаметоксину, етонію та унітіолу використовують в навчальному процесі на кафедрі шкірних та венеричних хвороб Одеського Державного медичного університету, кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова.

Особистий внесок здобувача. Основний об'єм експериментальної роботи, статистична обробка та аналіз отриманих результатів виконано безпосередньо здобувачем. Автором проаналізована сучасна наукова література за темою роботи, визначено основні підходи хіміотерапії грипу та герпесу. Планування основних напрямків роботи, обговорення отриманих результатів та їх узагальнення було здійснено під керівництвом завідувача кафедрою мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного державного медичного університету ім. М.І.Пирогова, заслуженого діяча науки і техніки України, доктора медичних наук, професора Палія Гордія Кіндратовича.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на Міжнародній науковій конференції „Стратегія і тактика

боротьби з інфекційними захворюваннями” (Суми, 2001), Міжнародних науково-практичних конференціях „Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антисептиків, антибіотиків” (Вінниця, 2002, 2004, 2006), науково-практичній конференції „Актуальные проблемы дерматовенерологии и косметологии” (Одеса, 2004), а також на 12-й (Єрусалим, Ізраїль, 1999), 16-й (Саванна, США, 2003) та 19-й (Барселона, Іспанія, 2005) Міжнародних конференціях з антивірусних досліджень.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 14 робіт, з них 6 статей у фахових виданнях, 1 патент України і 8 тез доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду даних літератури, експериментальної частини, яка налічує 6 розділів, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел літератури, що охоплює 198 найменувань. Дисертацію викладено на 139 сторінках машинописного тексту (основна частина на 119 сторінках). Робота проілюстрована 28 таблицями та 15 малюнками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Потенційні противірусні властивості досліджуваних офіційальних препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу досліджували за допомогою відомих комп’ютерних технологій: PASS (Prediction of Activity Spectra for Substance) та QSAR (Poroikov V. et al., 2000; Лагунин А. с соавт., 2001; Кузьмин В.Е. с соавт., 2002; Kuz'min V.E. et al., 2005).

Ефективність протигерпетичної дії препаратів у відношенні ВПГ-1 вивчали *in vitro* на культурі клітин Нер-2 з використанням цитоморфологічного методу за допомогою флуоресцентної мікроскопії (Носач Л.Н., Дяченко Н.С., 1982), а також на культурі первинно-трипсинізованих клітин ФЕК (Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н., 1976). Протигерпетичну активність досліджуваних препаратів по відношенню до ВПГ-2 вивчали *in vitro* на культурі клітин RK13 (клітини нирок кролів), що переважається.

Ефективність противірусної дії препаратів по відношенню до вірусів грипу *in vitro* досліджували, використовуючи культуру тканини ХАО 11-14-добових курячих ембріонів (Доклинические исследования лекарственных средств / Под ред. А.В. Стефанова. 2002).

При моделюванні експериментальної грипозної інфекції були використані самці білих безпородних мишей вагою 10-12 г загальною кількістю 704. Грипозну інфекцію у білих мишей моделювали внутрішньоназальним введенням логарифмічних розведень вірусу грипу (штам А/PR/8/34), визначаючи загибель тварин на протязі 14 днів після інфікування. *Препарати вводили інтраназально* під легким ефірним наркозом в об’ємі 0,05 мл за трьома схемами: профілактичній (на протязі двох днів до інфікування і в день інфікування), лікувально-профілактичній (за день, в день інфікування та три дні потому), лікувальної (на протязі чотирьох днів після інфікування). Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин (0,85% розчин NaCl) за відповідними схемами

(Lozitsky V.P. et al., 1988). Противірусну дію препаратів визначали за зниженням кількості загиблих тварин при моделюванні експериментальної грипозної інфекції, розраховували відсоток загибелі тварин у контрольних та дослідних групах, коефіцієнт захисту та індекс ефективності використання препаратів. Крім того, у певні строки після інфікування (2-3, 4-5 доба) у контрольних та дослідних тварин визначали рівень кислих і лужних протеаз та титр інфекційного вірусу в легенях.

Розрахунок ТІД₅₀ в експериментах *in vitro*, а також ЛД₅₀ у дослідах на мишах проводили методом Кербера в модифікації Ашмаріна (Ашмарин И.П., 1959). Статистичну значущість результатів вивчення антивірусної дії препаратів *in vitro*, а також його впливу на активність трипсиноподібних протеаз вірусу, плазматичних мембран та вірус-мембранного комплексу визначали за непараметричним критерієм знаків для пов'язаних виборок (Р за К.З.) (Гублер Е.В., Генкін А.А., 1973).

Вивчення впливу досліджуваних препаратів на протеолітичні процеси під час вірус-мембранної взаємодії проводили на модельних експериментах з очищеним і концентрованим вірусом грипу А/PR/8/34 та ізольованими плазматичними мембранами чутливих клітин ХАО курячих ембріонів. Очищення та концентрацію вірусу грипу А/PR/8/34 проводили, використовуючи методи диференційного і градієнтного центрифугування та гель-фільтрації на макропористому сілохромі (Дегтяренко В.И., 1977). Плазматичні мембрани виділяли з клітин ХАО 12-14-добових курячих ембріонів (Pristašova S., 1981). Протеолітичну активність лужних протеаз, як окремо у препаратах вірусу і мембран, так і у вірус-мембранного комплексу визначали за гідролізом 1% розчину протаміну (у основі методу лежить реакція розщеплення протамін сульфату з виділенням аргініну) (Вовчук С.В., 1976).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для попередньої оцінки токсичності досліджуваних препаратів використовували біотестування за допомогою інфузорій *Colpoda steinii* (препарат виробництва ТОВ "Відродження М", м. Одеса), оскільки у цьому випадку визначали рівень токсичності водночас як на клітинному рівні, так і на рівні цілого організму (Pozdnyakova L.I. et al., 2005). Даний метод був уперше запропонований нами для визначення ступеню цитотоксичності біологічно активних препаратів і фармакологічних сполук та запатентований в якості корисної моделі (патент №15629 А Україна, 2006). Отримані дані свідчать, що для культури *Colpoda steinii* декаметоксин є нетоксичним у дозі нижчій за 25 мкг/мл, етоній – нижчій за 125 мкг/мл, а унітіол був нетоксичний у концентрації нижчій за 50 мг/мл.

На основі експериментально отриманих статистичних моделей «структура-активність» з використанням QSAR-підходів був розрахований прогноз протигрипозної та протигерпетичної активності для молекул

декаметоксину, етонію та унітіолу, який свідчив про наявність певного ступеня специфічної активності у досліджуваних препаратів.

Противірусну активність досліджуваних препаратів по відношенню до ВПГ-1, штаму УС вивчали *in vitro* на первинно трипсинізованій культурі ФЕК та цитоморфологічним методом на перещеплюваній культурі клітин Нер-2. Етоній у концентраціях 20 і 35 мкг/мл виявився неефективним у відношенні ВПГ-1 на культурі клітин ФЕК. Декаметоксин у максимально переносимій концентрації (МПК) 4 мкг/мл гальмував репродукцію ВПГ-1 на первинно-трипсинізованій культурі ФЕК на 1,75 lg ТІД₅₀. Унітіол виявляв аналогічну активність у дозах 5,0 і 2,5 мг/мл, гальмуючи репродукцію вірусу на 3,0 і 2,17 lg ТІД₅₀ відповідно. Індекс селективності (ІС) на культурі ФЕК для декаметоксину складав 1, оскільки мінімальна активна концентрація препарату (МАК) співпадала з МПК, а для унітіолу складав 5 (табл.1). На цій моделі ацикловір, що був використаний як референс-препарат, у кінцевій концентрації 1 мкг/мл гальмував репродукцію ВПГ-1 на 3,5 lg ТІД₅₀, а його індекс селективності складав 200. Ці дані значно відрізняються від результатів, отриманих на перещеплюваній культурі клітин RK13 у відношенні до ВПГ-2 (табл.1).

Таблиця 1

Противірусна активність офіційних препаратів

Препарати	Активність препаратів у відношенні					
	ВПГ-1 на культурі клітин ФЕК			ВПГ-2 на культурі клітин RK13		
	МПК (в мкг/мл)	МАК (в мкг/мл)	ІС	МПК (в мкг/мл)	МАК (в мкг/мл)	ІС
Декаметоксин	4	4	1	7,75	1,25	5,7
Етоній	35	0	0	125	3,85	33,0
Унітіол	12500	2500	5	500	7,5	66,6

Препарати етоній та унітіол на культурі клітин RK13 мали досить високий ІС - 33 та 66,6 відповідно. Індекс селективності ацикловіру, який також використовували як референс-препарат на цій моделі, складав 200. Таким чином, активність етонію та унітіолу у відношенні до ВПГ-2 на культурі клітин RK13 у порівнянні з ацикловіром була у 6 і 3 разів менша відповідно. Індекс селективності декаметоксину виявився нижчим через незначну різницю між максимально переносимою та мінімальною ефективною дозами, але стабільне гальмування репродукції ВПГ-2 на культурі клітин RK13 свідчить про наявність у цього препарату антивірусних властивостей.

На перещеплюваній культурі клітин Нер-2 декаметоксин був нетоксичним у дозах, нижчих за 5 мкг/мл. У концентраціях 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл та 0,5 мкг/мл він гальмував процес утворення специфічних

внутрішньоядерних включень на 52, 45, 21 та 21% відповідно. На цій моделі ацикловір (референс-препарат) у концентрації 2,47 мкг/мл гальмував утворення вірус-специфічних внутрішньоядерних включень на 87%. Таким чином, можна констатувати, що декаметоксин у співставлюваних дозах гальмував процес утворення вірус-специфічних внутрішньоядерних включень на культурі клітин Нер-2 в 1,9 разів менше ніж ацикловір. Це свідчить про можливий вплив препарату на такі стадії репродукції вірусу герпесу, як етап проникнення вірусу до клітини та реплікації вірусної нуклеїнової кислоти, що пояснюється хімічною природою декаметоксину, який є поверхнево активною речовиною. Унітіол в дозі 25 мг/мл та етоній у дозі 250 мкг/мл спричиняли цитотоксичну дію на культуру клітин Нер-2, а у нижчих дозах були неактивними.

Таким чином, досліджувані препарати декаметоксин, етоній та унітіол мали противірусні властивості щодо вірусів простого герпесу 1 та 2 типу, але вони були нижчі, ніж у ацикловіру

Противірусна активність препаратів *in vitro* вивчали у відношенні вірусів грипу людини А/PR/8/34 (H₁N₁), А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) та В/Ленінград/17/86, а також вірусів грипу птахів H₅N₃ і H₇N₃, використовуючи культуру тканини ХАО 11-12 добових курячих ембріонів. Цю культуру можна вважати більш наближеною до рівня цілого організму, яким є курячий ембріон, ніж клітинна культура. При цьому визначали вплив досліджуваних препаратів на репродукцію вірусів грипу, на здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів, а також віруліцидну дію препаратів на позаклітинний вірус.

Унітіол у дозі 1 мг/мл стабільно пригнічував репродукцію вірусів грипу людини А/PR/8/34 (H₁N₁), А/Гонгконг/1/68 (H₃N₂) та В/Ленінград/17/86 на 0,5, 0,7 та 2,45 lg ТІД₅₀ відповідно (рис. 1).

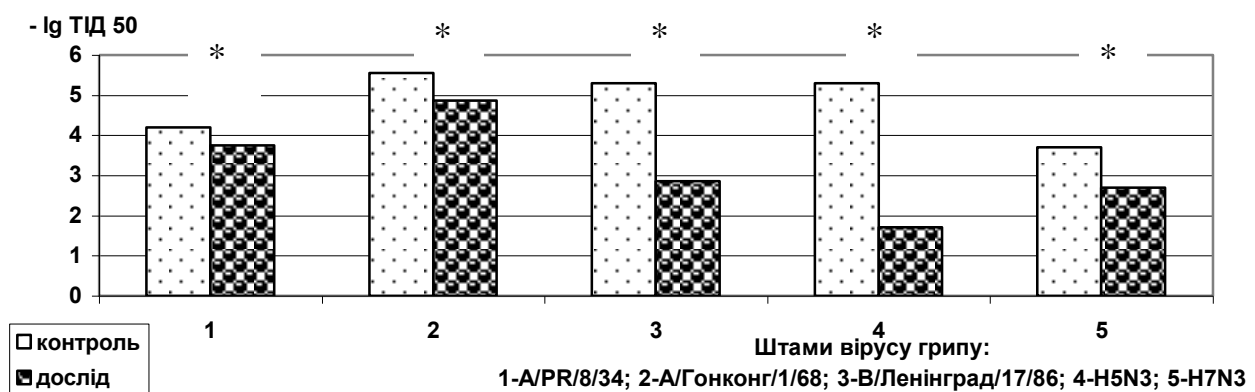


Рис. 1. Вплив унітіолу на репродукцію вірусів грипу на культурі клітин ХАО

Умовні позначення: * - P за К.З. < 0,05

Крім того, препарат у цій дозі виявляв віруліцидну дію (статистично значущу лише у відношенні до штаму А/PR/8/34 (H₁N₁)), а також знижував здатність клітин культури ХАО підтримувати репродукцію вірусів. Оскільки вплив на репродукцію вірусу грипу людини рибавіріну (референс-

препарату) у відношенні штаму А/PR/8/34 (H₁N₁) був 1,37 lg ТІД₅₀, для штаму А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) - 0,37 lg, а для штаму В/Ленінград/17/86 – 1,4 lg ТІД₅₀, можна зазначити, що унітіол у мінімальній ефективній дозі спричиняв вплив, порівняний з референс-препаратом за ефектом дії.

Унітіол у концентрації 1 мг/мл, в якій був ефективний у відношенні до вірусів грипу людини, не спричиняв регулярного гальмування репродукції вірусів грипу птахів штамів H₅N₃ та H₇N₃ *in vitro* на культурі тканини ХАО. У концентрації 10 мг/мл цей препарат стабільно пригнічував репродукцію вірусів грипу птахів штамів H₅N₃ та H₇N₃ на 3,6 і 1,0 lg ТІД₅₀ відповідно (рис. 1). Ці показники майже не відрізняються від активності Е-амінокапронової кислоти (Е-АКК) (3,07 та 1,2 lg ТІД₅₀), яку використовували в якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу птахів.

Крім того, унітіол у кінцевій концентрації 10 мг/мл знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу птахів та виявляв віруліцидну дію, впливаючи на позаклітинний вірус.

Аналіз результатів з використанням непараметричного критерію знаків показав, що **декаметоксин** у дозі 25 мкг/мл стабільно спричиняв пригнічення репродукції всіх досліджуваних штамів вірусу грипу людини. Так для штаму А/PR/8/34 (H₁N₁) цей показник зменшувався в середньому на 2,0 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем, для А/Гонгконг/1/68 (H₃N₂) на 1,5 lg ТІД₅₀ і для В/Ленінград/17/86 на 1,9 lg ТІД₅₀ (рис. 2). Таким чином, можна зазначити, що декаметоксин у мінімальній ефективній дозі стабільно гальмував репродукцію досліджуваних штамів вірусу грипу людини аналогічно до дії референс-препарату – рибавіріну.

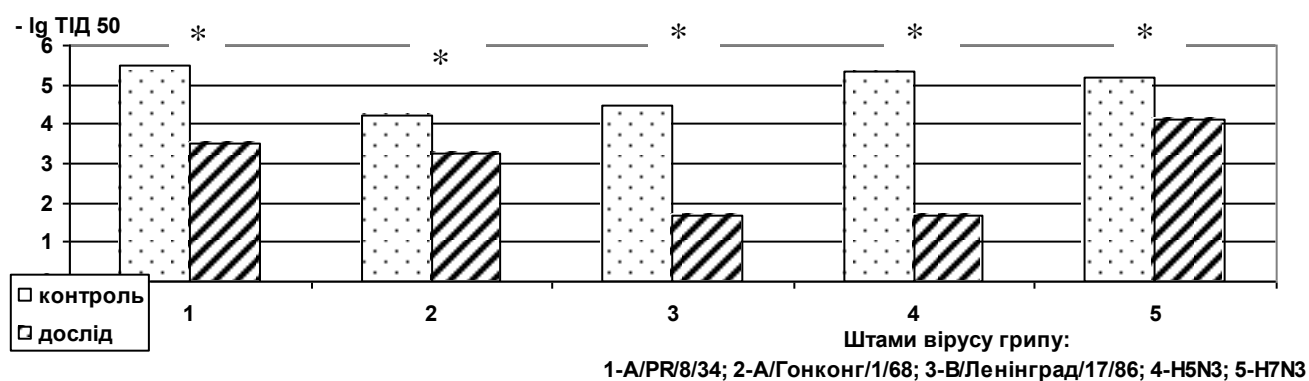


Рис.2. Вплив декаметоксину на репродукцію вірусів грипу на культурі клітин ХАО

Умовні позначення: * - Р за К.З. < 0,05

Вивчення впливу **декаметоксину** на репродукцію вірусу грипу птахів штаму H₅N₃ *in vitro* показало, що препарат у дозі 25 мкг/мл вірогідно пригнічував репродукцію вірусу H₅N₃ на 3,6 lg ТІД₅₀, тобто значно активніше, ніж вірусів грипу людини. Гальмування репродукції було виявлено і стосовно іншого штаму вірусу грипу птахів - H₇N₃ на 1,1 lg ТІД₅₀ (рис. 2). Регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу

грипу птахів декаметоксином було аналогічним до дії референс-препарату (Е-АКК), але у концентрації значно нижчій. Крім того, декаметоксин у дозі 25 мкг/мл проявляв статистично значущу віруліцидну дію, впливаючи на позаклітинний вірус.

Етоній у дозі 125 мкг/мл, нетоксичній для клітин тканини ХАО, вірогідно гальмував репродукцію вірусу грипу людини штамів А/PR/8/34 (H₁N₁), А/Гонгконг/1/68 (H₃N₂) і В/Ленінград/17/86 в середньому на 4,35 lg ТІД₅₀, 1,6 lg ТІД₅₀ та 1,6 lg ТІД₅₀ відповідно(рис. 3).

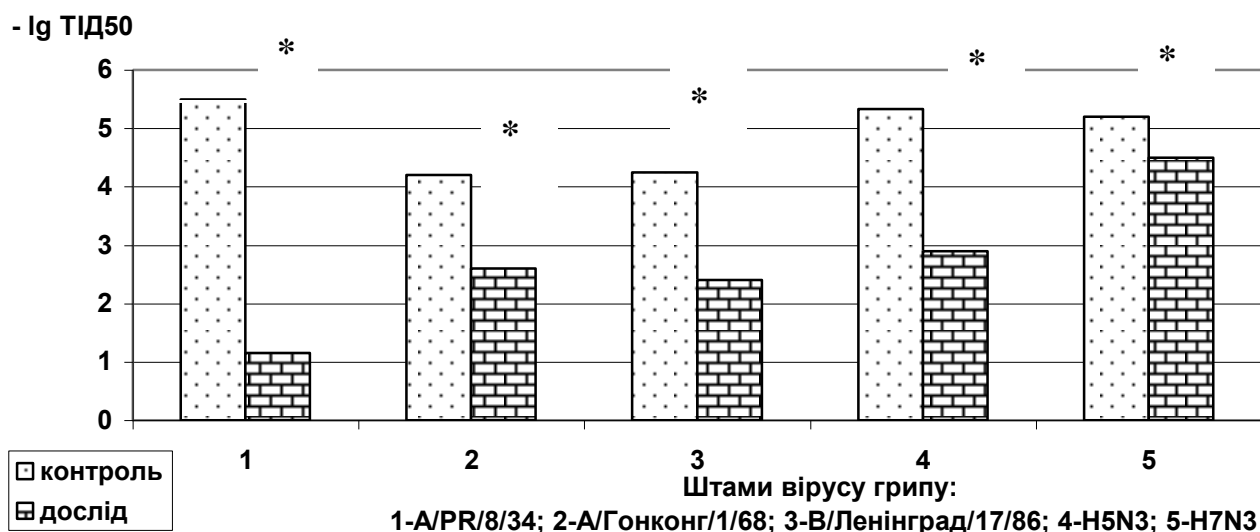


Рис.3. Вплив етонію на репродукцію вірусів грипу на культурі клітин ХАО
Умовні позначення: * - Р за К.З. < 0,05

Етоній у мінімальній ефективній дозі стабільно гальмував репродукцію досліджуваних штамів вірусу грипу людини аналогічно рибавіріну. Препарат у цій же дозі вірогідно гальмував репродукцію вірусів грипу птахів штаму H₅N₃ на 2,4 lg ТІД₅₀, а штаму H₇N₃ - на 0,7 lg ТІД₅₀ (рис. 3). Ці показники дещо нижчі (на 0,67 lg ТІД₅₀ у відношенні штаму H₅N₃ та 0,5 lg ТІД₅₀ у відношенні штаму H₇N₃) ніж у Е-АКК. Але етоній стабільно гальмував репродукцію досліджуваних штамів вірусу грипу у концентрації значно нижчій, ніж Е-АКК. Крім того, етоній у дозі 125 мкг/мл проявляв високу статистично значущу віруліцидну дію, впливаючи на позаклітинний вірус.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що чутливими до декаметоксину, етонію та унітіолу є віруси грипу людини А (серопідтипи H₁N₁ та H₃N₂) і В, віруси грипу птахів (серопідтипи H₅N₃ та H₇N₃), незалежно від їх антигенної структури. Противірусна дія препаратів не зводилась тільки до втручання у процес репродукції. Декаметоксин та етоній проявляли певну віруліцидну дію, впливаючи на позаклітинний вірус. Унітіол крім віруліцидної дії знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію цих вірусів. Отже, можна вважати, що одним з механізмів противірусної дії біс-четвертинних солей амонію є вплив

на позаклітинний вірус. Для унітіолу таким механізмом може бути як вплив на здатність клітин культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу, так і вплив на позаклітинний вірус.

Протигрипозну дію унітіолу в експерименті на тваринах вивчали при моделюванні інфекції шляхом інтраназального зараження білих безпородних мишей під легким ефірним наркозом вірусом грипу А/PR/8/34 (H₁N₁), адаптованим до мишей. 0,05 мл 10%-ного розчину унітіолу (5 мг/мишу) вводили тваринам інтраназально за профілактичною, а 5%-ного розчину препарату (2,5 мг/мишу) за лікувально-профілактичною схемами. Захисну дію препарату визначали за зниженням кількості тварин, що загинули на протязі 14 діб після інфікування. Отримані результати, наведені на рис. 4, свідчать, що захисна дія унітіолу була статистично значущою при обох схемах його застосування. Різниця ЛД₅₀ між контрольною та дослідною групами складала 1,5 Іg при профілактичному використанні препарату у дозі 5 мг/мишу, різниця показника загибелі тварин була 30%, індекс ефективності застосування препарату складала 42,9%. Ця тенденція зберігалася і при застосуванні унітіолу у дозі 2,5 мг/мишу за лікувально-профілактичною схемою, коли різниця ЛД₅₀ в контрольній та дослідній групах була 2,0 Іg ЛД₅₀ (рис. 4). Різниця показника загибелі тварин між контрольною та дослідною групами становила 50%, індекс ефективності – 53%.

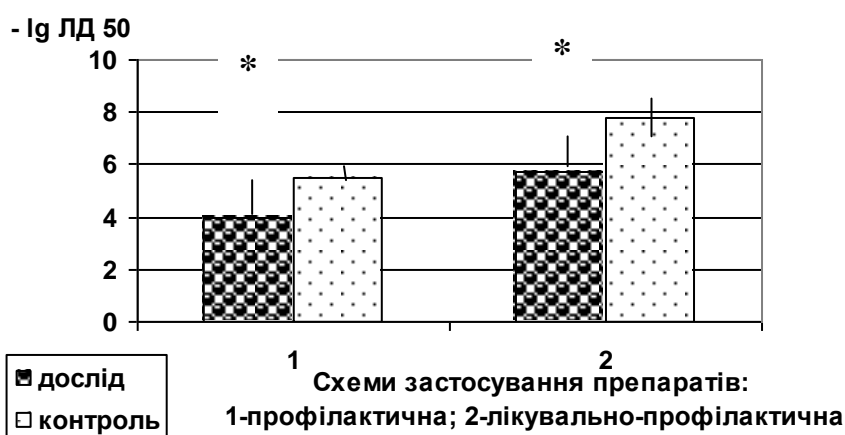


Рис. 4. Захисна дія унітіолу при його інтраназальному використанні при експериментальному грипі у мишей

Використання унітіолу за профілактичною та лікувально-профілактичною схемами призводило до зменшення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин на 5 добу після інфікування, а також мала місце тенденція до зниження ензиматичної активності лужних протеаз.

Протигрипозну дію декаметоксину в експерименті на тваринах вивчали на моделі інфекції, яку отримували шляхом інтраназального зараження білих безпородних мишей під легким ефірним наркозом вірусом грипу А/PR/8/34 (H₁N₁), адаптованим до мишей. Розчин декаметоксину

вводили інтраназально у дозі 50 мкг/мишу, яка була у 16 разів нижче за токсичну, за профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами. Захисну дію препарату визначали по зниженню кількості тварин, що загинули на протязі 14 діб після інфікування. Наведені на рис. 5 дані свідчать, що захисна дія декаметоксину при його застосуванні за профілактичною схемою була незначною, хоча різниця показника відсотку загибелі тварин у контрольній та дослідній групі складала 15%, індекс ефективності застосування препарату – 18,7%.

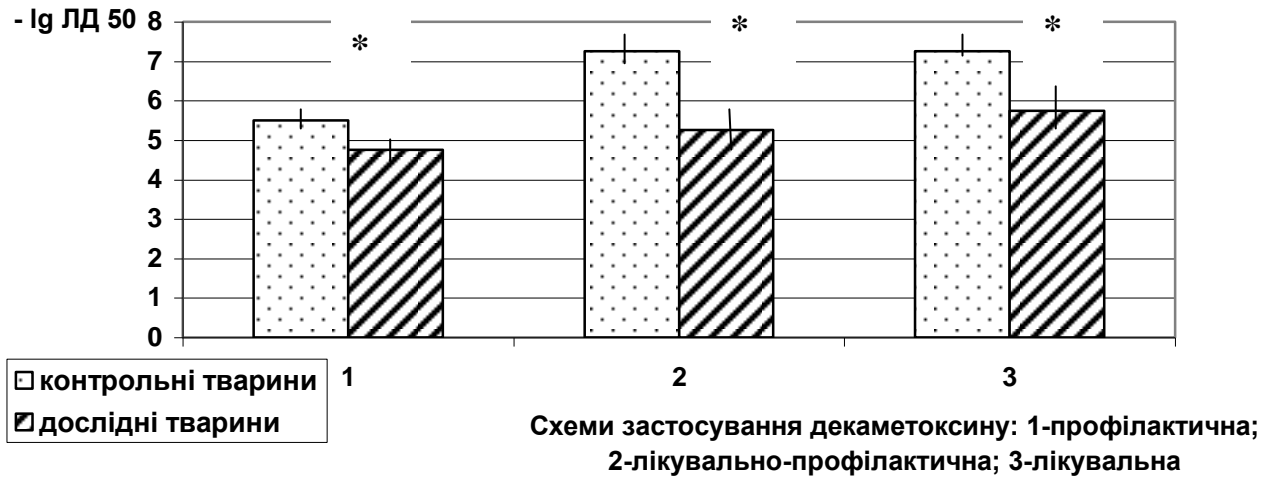


Рис.5. Захисна дія декаметоксину при його інтраназальному введенні за різними схемами при експериментальному грипі у мишей

На відміну від цього різниця ЛД₅₀ між контрольною та дослідною групами при застосуванні декаметоксину за лікувально-профілактичною схемою складала 2,0 lg (рис. 5), різниця показника відсотку загибелі тварин – 45%, індекс ефективності – 45%. При лікувальній схемі введення препарату різниця ЛД₅₀ у контрольних та дослідних тварин була 1,5 lg, різниця відсотку загибелі тварин – 25%, індекс ефективності – 33%. Тобто можна стверджувати, що інтраназальне введення декаметоксину за лікувально-профілактичною та лікувальною схемами статистично вірогідно захищало мишей, інфікованих вірусом грипу А/PR/8/34 (H₁N₁), знижуючи кількість загинув тварин. Застосування препарату за всіма схемами супроводжувалось зниженням активності лужних протеаз в легенях інфікованих тварин, що співпадає з даними літератури стосовно дії інших противірусних препаратів. Титр інфекційного вірусу в гомогенатах легенів експериментальних тварин, що отримували декаметоксин, був нижчим ніж у контрольних мишей при всіх схемах введення на 4-5 добу після інфікування.

Аналогічним чином вивчали **протигрипозну дію етонію в експерименті на тваринах**, використовуючи розчин препарату у дозі 100 мкг/мишу, який був у 16 разів нижчим за токсичний. Наведені на рис. 6 результати свідчать, що захисна дія етонію при всіх схемах його застосування була суттєвою. Різниця ЛД₅₀ між контрольною та дослідною групами складала 1,0 lg при профілактичному використанні препарату, 2,25

Ig при застосуванні етонію за лікувально-профілактичною схемою та 1,5 Ig при лікувальній схемі його введення. Різниця показника загибелі тварин у контрольній та дослідній групах при цих схемах застосування препарату складала 20%, 45% і 30% відповідно, а індекс застосування препарату був 24,8%, 45%, 42%.

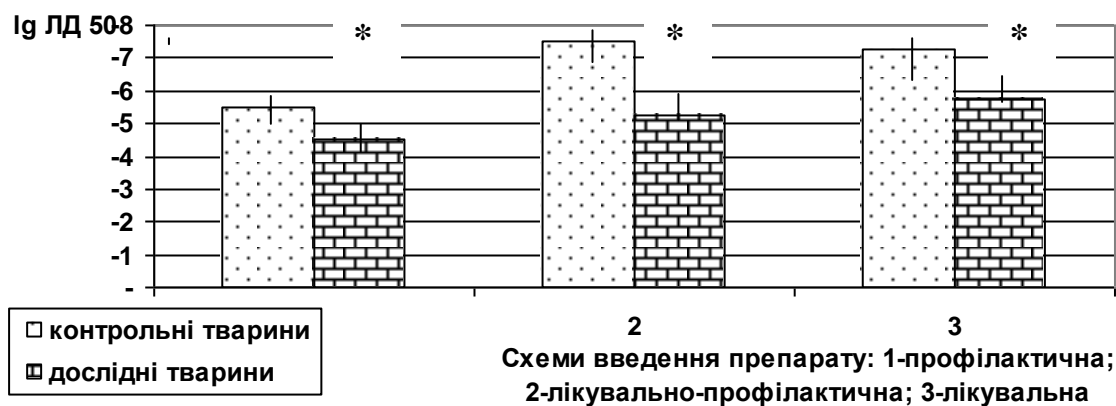


Рис. 6. Захисна дія етонію при його інтраназальному введенні за різними схемами при грипі у мишей

Таким чином, можна стверджувати, що інтраназальне введення етонію у дозі 100 мкг/мишу за всіма схемами застосування суттєво захищало мишей, інфікованих вірусом грипу A/PR/8/34 (H₁N₁), знижуючи кількість загиблих тварин (рис. 6). Титр інфекційного вірусу в гомогенатах легень експериментальних тварин був нижчим при лікувально-профілактичній та лікувальній схемах введення етонію. При профілактичній схемі застосування препарату спостерігалась тенденція до зниження титру інфекційного вірусу в легенях дослідних мишей на 4-5 добу після зараження. Використання етонію за всіма схемами супроводжувалось зниженням активності лужних протеаз в легенях інфікованих тварин, що співпадає з даними, отриманими при застосуванні декаметоксину і унітіолу, а також з даними літератури щодо дії інших противірусних препаратів.

Таким чином, досліджувані препарати декаметоксин, етоній та унітіол при їх інтраназальному застосуванні за профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами при моделюванні експериментального грипу у мишей проявляли захисну дію. Крім того, в легенях експериментальних тварин, які отримували препарати, спостерігалось зменшення титру інфекційного вірусу та мала місце тенденція до зниження ензиматичної активності лужних протеаз. Це співпадає з даними літератури щодо використання препаратів з різним механізмом дії, які, знижуючи активність протеолітичних ферментів в легенях дослідних тварин, гальмували розвиток інфекційного процесу.

Визначення можливих механізмів противірусної дії досліджуваних препаратів. Гемаглютинін вірусу грипу (ГА) є поверхневим глікопротеїдом, який для набуття вірусом інфекційних властивостей

повинен пройти етап протеолітичного нарізання. В результаті утворюються дві субодиниці: ГА1, що забезпечує специфічну адсорбцію вірусу на зовнішній мембрані чутливих клітин, та ГА2, яка відповідає за проникнення вірусу до клітини. Ці субодиниці після протеолітичного процесінгу поєднані між собою тільки дисульфідним містком. При розриві дисульфідних зв'язків з утворенням сульфгідрильних груп ГА1 буде видалятися з поверхні віріонів, що порушить їх взаємодію з чутливими клітинами. Унітіол, який використовується у медичній практиці як антидот, має у своїй хімічній структурі дві активні SH-групи і є активним відновлювачем дисульфідних зв'язків. Він буде порушувати дисульфідні зв'язки між субодиницями ГА, розриваючи їх, і впливати на поверхневий глікопротеїн вірусу грипу, внаслідок чого будуть пригнічуватись найбільш ранні стадії взаємодії вірусу грипу з чутливими клітинами хазяїна, що повинно забезпечити протівірусний ефект.

Раніш в нашій лабораторії було встановлено, що взаємодія вірусу грипу з плазматичними мембранами чутливих клітин призводить до підвищення протеолізу, що може привести до підвищення ефективності нарізання гемаглютиніну (Лозицький В.П. і співавт., 1987). Трипсиноподібні протеази клітин хазяїна також приймають участь у вірусному процесінгу. Інгібітори протеолізу та деякі інші протигрипозні засоби, наприклад, ремантадин, можуть гальмувати цей процес. Пригнічення протеолітичних процесів під час взаємодії вірусу з мембранами чутливих клітин буде призводити до того, що навіть при наявності процесу вірусної репродукції, інфекційні властивості вірусу будуть низькими. Тому будуть гальмуватись подальші процеси адсорбції, проникнення та роздягання вірусу, що призведе до зниження репродукції вірусу в цілому.

З метою вивчення механізмів протівірусної дії декаметоксину, етонію та унітіолу ми вважали за доцільне дослідити їх вплив на протеолітичну активність під час вірус-мембранної взаємодії. Для цього у модельних експериментах з очищеним і концентрованим вірусом грипу А/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 віріонів вірусу грипу з мембранами, під час якої утворювався вірус-мембранний комплекс.

Встановлено, що декаметоксин, етоній та унітіол гальмували протеолітичні процеси на ранніх етапах репродукції вірусу грипу під час взаємодії вірусу з мембранами чутливих клітин.

Біс-четвертинні солі амонію (декаметоксин та етоній) спричиняли регулярний вплив на ензиматичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу (табл.2). Однак, інгібіція протеолітичної активності мембран декаметоксином та етонієм була нерегулярною. Отримані дані співпадають з результатами, одержаними на культурі тканини ХАО *in vitro*. Механізм дії

цих препаратів пов'язаний із впливом на позаклітинний вірус та можливим ушкодженням вірусної протеази.

Таблиця 2

Вплив декаметоксину та етонію на протамін-розщеплювальну активність вірусу грипу, плазматичних мембран та вірус-мембранного комплексу

Рівень протамін-розщеплюваної активності декаметоксину (у мкМоль аргініну/хв.)						
	контр. ₁	дослід ₁	контр. ₂	дослід ₂	контр. ₃	дослід ₃
Вірус	$4,7 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-2}$	$7,3 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$
Мембрани	$2,3 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-2}$
Вірус-мембранний комплекс	$5,0 \times 10^{-2}$	$0,8 \times 10^{-2}$	$15,6 \times 10^{-2}$	$10,0 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$
Рівень протамін-розщеплюваної активності етонію (у мкМоль аргініну / хв.)						
	контр. ₁	дослід ₁	контр. ₂	дослід ₂	контр. ₃	дослід ₃
Вірус	$4,7 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-2}$	$7,3 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$
Мембрани	$2,3 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$
Вірус-мембранний комплекс	$5,0 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-2}$	$15,6 \times 10^{-2}$	$10,0 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-2}$

Крім того, властивості цих препаратів як поверхнево активних речовин перешкождали взаємодії вірусних та клітинних рецепторів, що й призводило до інгібування протеолітичної активності вірус-мембранного комплексу. Тобто, іншим механізмом дії декаметоксину та етонію можна вважати їх вплив на ранні етапи взаємодії вірусу з клітиною-хазяїна такі, як адсорбція, проникнення та депротейнізація вірусу грипу.

Унітіол статистично вірогідно знижував ензиматичну активність препаратів вірусу, плазматичних мембран чутливих клітин та вірус-мембранного комплексу, гальмуючи протеолітичні процеси на ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною (рис.7).

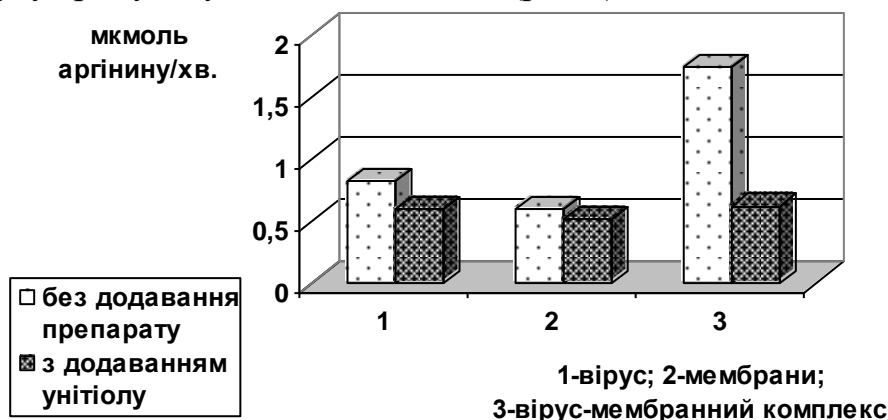


Рис.7. Вплив унітіолу на протамін-розщеплювану активність вірусу грипу, плазматичних мембран клітин ХАО та вірус-мембранного комплексу

Ці дані доводять, що унітіол гальмує протеолітичні процеси на ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною. Він інгібує активність не тільки вірусної протеази, але й знижує ензиматичну активність протеаз клітини хазяїна, а також вірус-мембранного комплексу. Слід підкреслити, що ці результати цілком узгоджуються з даними щодо впливу цього препарату на здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусу грипу та позаклітинний вірус, отриманими на моделі *in vitro*. Крім того, гальмування репродукції вірусів грипу, яке спостерігалось на моделі тканини ХАО, на нашу думку, відбувається саме за рахунок відновлення дисульфідних зв'язків та зниження інфекційності вірусу.

ВИСНОВКИ

В роботі наведено теоретичне узагальнення і вирішення наукового завдання щодо визначення противірусної активності вітчизняних офіційних препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу щодо збудників вірусних інфекцій - грипу та герпесу *in vitro* та *in vivo*. Досліджено деякі механізми їх противірусної дії. Вперше виявлено гальмування репродукції вірусів грипу птахів з гемаглютинінами Н₅ і Н₇. Встановлено, що досліджувані препарати гальмують репродукцію вірусів грипу незалежно від їх антигенної структури, а також впливають на позаклітинний вірус.

1. Доцільно використання QSAR-аналізу для виявлення противірусних властивостей у сучасних препаратів. Комп'ютерні прогнози показують значний ступінь наявності протигрипозної та протигерпетичної активності у протимікробних препаратів декаметоксину та етонію, а також у препаратів-антидота - унітіола.

2. Доведено, що інфузорія *Colpoda steinii* слугує моделлю для попереднього етапу визначення рівня токсичності декаметоксину, етонію, унітіолу та інших препаратів. Визначено рівень токсичності препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу для клітинних культур RK13, Нер-2, ФЕК, культури тканини ХАО з метою використання при вивченні противірусної ефективності ліків.

3. Офіційні препарати декаметоксин, етоній і унітіол мають протигерпетичну активність щодо ВПГ-1 та ВПГ-2. Протимікробні препарати декаметоксин і етоній гальмують репродукцію вірусу грипу людини А і В на культурі тканини ХАО, проявляючи також віруліцидну дію.

4. Вперше показано на моделі експериментального грипу у білих мишей, що декаметоксин і етоній проявляють профілактичну, лікувально-профілактичну та лікувальну дію і призводять до зменшення титрів вірусу в легенях інфікованих тварин. Застосування декаметоксину у дозі 50 мкг/мишу за відповідними схемами знижує ЛД₅₀ на 0,5, 2,0 і 1,5 lg, а етонію у дозі 100 мкг/мишу - на 1,0, 2,25 і 1,5 lg. Використані дози препаратів були у 16 разів нижчі за токсичні.

5. Вперше виявлено, що препарат унітіол має антивірусну активність до вірусу грипу А серотипів H_1N_1 та H_3N_2 , вірусу грипу В *in vitro*. Доведено, що інтраназальне застосування унітіолу при моделюванні грипу у мишей зменшує титри інфекційного вірусу в легенях тварин і показник летальності. Різниця ЛД₅₀ між контрольною та дослідною групами складає 1,5 lg при профілактичному використанні препарату, а за лікувально-профілактичною схемою 2,0 lg.

6. Офіційні препарати декаметоксин, етоній та унітіол проявляють протівірусну активність по відношенню до вірусу пташиного грипу штамів H_5N_3 і H_7N_3 *in vitro*. Одним з механізмів реалізації протівірусної дії цих препаратів доцільно вважати гальмування протеолітичних процесів під час взаємодії вірусу з мембранами чутливих клітин, оскільки стан системи протеолізу має важливе значення на ранніх етапах вірусної репродукції, а також для патогенезу і розповсюдженні інфекції в організмі.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гридіна Т.Л. Нові властивості декаметоксину: антигрипозна і протигерпетична дія *in vitro* та *in vivo* / Т.Л.Гридіна, В.П.Лозицький, Ю.А.Бощенко, В.Г.Палій // Вісник морфології. – 2004. - №10 (1). – С.166-169. (внесок дисертанта: особисто проводилась робота по вивченню протигрипозної та протигерпетичної активності препарату декаметоксину, аналіз результатів та оформлення публікації).
2. Лозицький В.П. Протівірусна дія біс-четвертинних солей амонію у відношенні збудників масових захворювань людей та птиці з групи міксовірусів / В.П.Лозицький, Т.Л.Гридіна, Ю.А.Бощенко, А.С.Федчук, В.С.Кузьмін, А.Г.Артеменко, М.М.Лебедюк, Г.А.Хорохоріна, В.П.Федчук, В.Г.Палій // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2004. - №8 (2). – С.437-440. (внесок дисертанта: особисто проводилась робота по вивченню протівірусної активності препаратів декаметоксина та етонію на культурі клітин ХАО, аналіз результатів та оформлення публікації).
3. Гридіна Т.Л. Протигрипозна дія етонію *in vitro* та *in vivo* / Т.Л.Гридіна // Одеський медичний журнал. – 2004. - №5 (85). – С.4-7 (внесок дисертанта: особисто проводилась робота по вивченню протівірусної активності препарату етонію, аналіз результатів та оформлення публікації).
4. Гридіна Т.Л. Протигрипозні властивості унітіолу / Т.Л.Гридіна, В.П.Лозицький, А.С.Федчук, Ю.А.Бощенко // Одеський медичний журнал. – 2005. - №1 (87). – С.4-7. (внесок дисертанта: особисто проводилась робота по вивченню протівірусної активності препарату унітіолу, аналіз результатів та оформлення публікації).
5. Лозицький В.П. Протівірусна дія офіційних препаратів Е-амінокапронової кислоти та унітіолу у відношенні вірусу грипу птахів / В.П.Лозицький, Т.Л.Гридіна, А.С.Федчук, Ю.А.Бощенко, І.М.Григорашева // Одеський медичний журнал. – 2006. - №3 (95). – С.4-8. (внесок

дисертанта: особисто проводилась робота по вивченню протигрипозної активності досліджуваних препаратів на культурі клітин ХАО, аналіз результатів та оформлення публікації).

6. Гридіна Т.Л. Противірусна дія біс-четвертинних солей амонію у відношенні збудників вірусу грипу птахів *in vitro* / Т.Л.Гридіна, В.П.Лозицький, А.С.Федчук, Ю.А.Бощенко, В.Г.Палій // Вісник морфології. – 2006. - №12 (1). – С.7-11. (внесок дисертанта: особисто проводилась робота по вивченню протигрипозної активності препаратів етонію та декаметоксину на культурі клітин ХАО, аналіз результатів та оформлення публікації).

7. Патент №15629 А Україна, МПК G01N 33/15, C12Q 1/18. Спосіб оцінки ступеня цитотоксичності біологічно активних сполук та фармакологічних препаратів / Лозицький В.П., Григорашева І.М., Федчук А.С., Т.Л.Гридіна, Ю.А.Бощенко, Л.І.Позднякова, Н.Г.Славина, Д.О.Віноходов, Ф.І.Полежаєв; заявник-патентоутримувач Український наук.-досл. Протичумний ін.-т. - №u2005 12542; заявл. 26.12.2005; опубл. 17.07.2006, Бюл. №7.

8. Lozitsky V.P. Combined apply of some synthetic proteolytic inhibitors with unithiolum *in vitro* as antiviral preparations / V.P.Loizitsky, A.S.Fedchuk, T.L.Gridina // Вісник СумДУ – 2001. - №11 (32). - С. 65-69.

9. Pozdnyakova L.I. Biological method for the water, food, foddors and environment toxic chemical materials contamination indication / L.I.Pozdnyakova, V.P.Loizitsky, A.S.Fedchuk, I.N.Grigorasheva, Y.A.Boschenko, T.L.Gridina, S.V.Pozdnyakov // Medical treatment of intoxications and decontamination of chemical agents in the area of terrorism attack [NATO Security through Science Series] (A: Chemistry and Biology) [Ed.: C.Dishovsky, A.Pivovarov, H.Benschop]. - Dordrecht: Springer, 2006. - p.225-230.

10. Sudakov A.Yu. Therapeutic and profilactic effectivness of Unithiolum during experimental influenza / A.Yu.Sudakov, T.L.Gridina, Yu.I.Girlya // XIIth International Conference of Antiviral Research – 21-25 March 1999, Jerusalem, Israel. – P-122.

11. Лозицкий В.П Противовирусное действие некоторых официальных препаратов ингибиторов протеолиза, тиоловых соединений и бис-четвертичных солей аммония / В.П.Лозицкий, А.С.Федчук, Ю.И.Гирля, Т.Л.Гридина // Вестн. Винницкого Гос. Мед. Университета. - 2002. - №2. - С. 381.

12. Fedchuk A.S. Anti-influenza and anti-herpetic activity of decametoxin / A.S.Fedchuk, V.P.Loizitsky, T.L.Gridina, L.I.Shitikova, G.K.Paliy // Antiviral Research – 2003. - v.57. - N3, p. A82.

13. Лозицкий В.П. Противогерпетическое действие официальных препаратов, применяемых в медицине по другому назначению / В.П.Лозицкий, А.С.Федчук, Т.Л.Гридина, М.Н.Лебедюк, П.Г.Веверица, Г.А.Хорохорина, В.П.Федчук : тез. докл. науч.-практ. конф. [“Актуальные

проблемы дерматовенерологии и косметологии”], (Одеса, 22 жовтня, 2004). – Одеса: Астропринт, 2004. – С.68-70.

14. Lozitsky V. Antiviral action of the bis-quarternary ammonium bases / V.Loizitsky, T.Gridina, Yu.Boschenko, A.Fedchuk, M.Lebeduk, G.Khorokhorina, V.Fedchuk, V.Paliy // Antiviral research. - 2005. - v.65. – N3. – p.64.

15. Gridina T. Antiviral activity of 1,2-Dithio-3-Propylsulfonat sodium in vitro and in vivo / T.Gridina, V.Loizitsky, Yu.Boschenko, A.Fedchuk // Antiviral research. - 2005. - v. 65. – N3. – p. 96.

АНОТАЦІЯ

Гридіна Т.Л. Противірусні властивості офіційних препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу по відношенню до вірусів грипу і простого герпесу. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія – Інститут мікробіології та вірусології ім.Д.К.Заболотного Національної Академії наук України, Київ, 2008.

Дисертація присвячена виявленню та дослідженню противірусної активності офіційних препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу щодо збудників вірусних інфекцій - грипу та герпесу *in vitro* та *in vivo*, а також встановленню деяких механізмів їх противірусної дії.

Вперше встановлено, що декаметоксин, етоній та унітіол гальмують репродукцію вірусів грипу людини серотипів А (серопідтипи H_1N_1 та H_3N_2) і В у чутливих клітинах, пригнічуючи протеолітичні процеси на найбільш ранніх етапах взаємодії вірусів з чутливими клітинами. Вперше виявлено, що ці препарати гальмують також репродукцію вірусів грипу птахів з гемаглютинінами H_5 і H_7 у культурі тканини хоріонлантоїсних оболонок курячих ембріонів.

Вперше встановлена захисна дія унітіолу при інтраназальному його введенні за профілактичною та лікувально–профілактичною схемами при моделюванні експериментального грипу у білих мишей. Інтраназальне застосування декаметоксину та етонію за профілактичною, лікувально–профілактичною та лікувальною схемами статистично значуще знижувало загибель інфікованих тварин.

Виявлена активність декаметоксину, етонію та унітіолу у відношенні до ВПГ-1 та ВПГ-2.

Ключові слова: грип, герпес, антивірусна дія, профілактика, лікування, офіційні препарати декаметоксин, етоній та унітіол.

АННОТАЦИЯ

Гридина Т.Л. Противовирусные свойства официальных препаратов декаметоксина, этония и унитиола в отношении вирусов гриппа и простого герпеса. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. Институт микробиологии и вирусологии им.Д.К.Заболотного Национальной Академии наук Украины, Киев, 2008.

Диссертация посвящена выявлению и изучению противовирусной активности официальных препаратов декаметоксина, этония и унитиола в отношении возбудителей вирусных инфекций - гриппа и герпеса *in vitro* и *in vivo*, а также установлению некоторых механизмов их противовирусного действия.

Впервые установлено, что известные катионные поверхностно активные бис-четвертичные соли аммония – декаметоксин и этоний тормозят репродукцию вирусов гриппа человека серотипов А (сероподтипы H_1N_1 и H_3N_2) и В, подавляя протеолитические процессы на ранних этапах взаимодействия вируса гриппа с плазматическими мембранами чувствительных клеток. Впервые выявлено противовирусное действие препарата унитиол, который используется в медицинской практике как антидот, в отношении вирусов гриппа человека серотипов А (сероподтипы H_1N_1 и H_3N_2) и В *in vitro* в культуре ткани хорион-аллантаисных оболочек (ХАО) куриных эмбрионов. Унитиол снижает энзиматическую активность вируса, мембран и вирус-мембранного комплекса, тормозя протеолитические процессы на ранних этапах взаимодействия вируса гриппа с чувствительной клеткой. Снижение протеолитической активности при вирус-мембранных взаимодействиях в присутствии препаратов является одним из механизмов реализации их противовирусных свойств. Впервые установлено, что официальные препараты декаметоксин, этоний и унитиол тормозят репродукцию вирусов гриппа птиц с гемагглютинидами H_5 и H_7 в культуре ткани ХАО.

Впервые выявлено защитное действие декаметоксина и этония при интраназальном способе их введения по профилактической, лечебно-профилактической и лечебной схемам на модели экспериментального гриппа у белых мышей. Интраназальное применение унитиола при профилактической и лечебно-профилактической схемах на модели экспериментального гриппа у белых мышей защищало животных от гибели. Интраназальное использование препаратов при экспериментальном гриппе приводило к снижению уровня протеолитической активности щелочных протеаз и титра инфекционного вируса в легких мышей.

Выявлено, что декаметоксин и унитиол тормозили репродукцию вируса простого герпеса (ВПГ) 1 типа на культуре первично-трипсинизированных куриных фибробластов, хотя индекс селективности их был невысок по сравнению с ацикловиром (референс-препарат). Этоний на этой модели в нетоксичных дозах был неэффективным. На перевиваемой культуре клеток Нер-2 декаметоксин в сопоставимых с ацикловиром дозах тормозил процесс формирования вирус-специфических внутриядерных

включений, но в 1,9 раз меньше. Это свидетельствует о возможном влиянии препарата на такие этапы репродукции ВПГ-1, как проникновение вируса в клетку и репликацию вирусной нуклеиновой кислоты, что объясняется химической природой декаметоксина, который является поверхностно активным веществом. Унитиол и этоний в нетоксичных для клеточной культуры Нер-2 дозах были неэффективны.

В отношении ВПГ-2 на перевиваемой культуре клеток RK13 этоний и унитиол проявили более высокую активность. Индекс селективности препаратов составил 33 и 66,6 соответственно. По сравнению с ацикловиром эти показатели были в 6 и 3 раза ниже. Индекс селективности декаметоксина был ниже из-за незначительной разницы между максимально переносимой и минимальной эффективной дозами, но торможение репродукции ВПГ-2 на культуре RK13 было регулярным, что свидетельствует о наличии у этого препарата противовирусных свойств.

Таким образом, исследуемые препараты декаметоксин, этоний и унитиол обладали противовирусными свойствами в отношении вирусов герпеса 1 и 2 типов, но их активность была ниже, чем у ацикловира.

Ключевые слова: грипп, герпес, противовирусное действие, профилактика, лечение, официальные препараты декаметоксин, этоний и унитиол.

RESUME

Gridina T.L. Antiviral properties of the medicines decamethoxine, aethonium and unitiolum again influenza and herpes simplex viruses. – Manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of biological sciences on speciality 03.00.06 – virology. – D.K.Zabolotny Institute of Microbiology and Virology National Academy Science of Ukraine, Kyiv, 2008.

The work is dedicated to studying antiviral activity of such medicines as decamethoxine, aethonium and unitiolum against influenza and herpes simplex viruses (HSV) both *in vitro* and *in vivo* and some mechanisms of there activity. Unitiolum, aethonium & decamethoxine have inhibited the reproduction of influenza human viruses strains A/Hong Kong/1/68 (H3N2), A/PR/8/34 (H1N1), B/Leningrad/17/86 viruses and avian influenza H₅N₃&H₇N₃ in the tissue culture of 11-14-days ages chicken embryos' choryoallantoic membranes (CAM). It was shown that this preparation decreasing proteolytic activity of the purified and concentrated A/PR/8/34 influenza viruses, of CAM plasmatic membranes and virus-membrane complexes *in vitro*. So, preparations inhibit the proteolysis increasing that take place during virus-membrane interaction. Intranasal application of all studied preparations in different schemes considerably decreased mortality of infected with influenza virus mice. Decamethoxine, aethonium and unitiolum show anti-herpetic activity *in vitro*.

Key words: influenza, herpes, antiviral activity, prevention, treatment, medicines decamethoxine, aethonium and unitiolum.