

УДК: 615.281; 8:615.012.1

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ МЕХАНІЗМІВ ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА ЕТОНІУ¹Гридіна Т.Л., ²Палій Г.К., ¹Лозицький В.П., ¹Федчук А.С.¹Український науково-дослідний протичумний інститут ім. І.І. Мечнікова МОЗ України (вул. Церковна, 2/4, м. Одеса, Україна, 65003), ²Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Резюме. В результаті проведеного дослідження встановлений механізм противірусної дії біс-четвертинних солей амонію, який полягав у гальмуючому впливі на протеолітичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу. Вплив декаметоксину та етонію на позаклітинний вірус пов'язаний з можливим ушкодженням або інгібіцією вірусної протеази. Властивості цих препаратів як поверхнево активних речовин перешкоджали взаємодії вірусних поверхневих протеїнів та клітинних рецепторів, що й призвело до інгібування протеолітичної активності вірус-мембранного комплексу. Декаметоксин та етоній впливали на ранні етапи взаємодії вірусу з чутливою клітиною такі, як адсорбція, проникнення та депротейнізація вірусу грипу. Отримані дані співпадають з результатами, одержаними раніше в дослідженнях *in vitro* на культурі тканини ХАО.

Ключові слова: біс-четвертинні солі амонію, декаметоксин, етоній, протеолітична активність, вірус-мембранні взаємодії.

Вступ

Гемаглютинін вірусу грипу (ГА) є поверхневим глікопротеїдом, який для набуття вірусом інфекційних властивостей повинен пройти етап протеолітичного нарізання. В результаті утворюються дві субодиниці: ГА1, яка забезпечує специфічну адсорбцію вірусу на зовнішній мембрані чутливих клітин, та ГА2, що відповідає за проникнення вірусу до клітини. Ці субодиниці після протеолітичного нарізання (процесингу) поєднані між собою тільки дисульфідним містком.

Раніше було доведено, що протеолітичні системи відіграють важливу роль у взаємодії вірусів грипу з хазяїном взагалі [Лозицький, 1977]. Саме трипсиноподібні протеази клітин хазяїна приймають участь у вірусному процесингу, який є невід'ємною частиною набуття вірусом інфекційності, оскільки відомо, що вірус з "ненарізаним" гемаглютиніном, у вигляді єдиної молекули ГА, є неінфекційним. Таким чином, гальмування протеолітичних ферментів клітин хазяїна буде призводити до того, що вірус хоча і буде розмножуватись, його інфекційні властивості будуть низькими. Тому будуть гальмуватися подальші процеси адсорбції, проникнення та "роздягання" (депротейнізації) вірусу, що призведе до зниження репродукції вірусу в цілому.

Було також показано, що препарати очищеного і концентрованого вірусу грипу проявляють протамін-розщеплюючу протеолітичну активність [Федчук, 1980], оскільки вірус грипу має власну трипсиноподібну протеазу. Крім того, під час взаємодії вірусу грипу з плазматичними мембранами чутливих клітин спостерігається активація протеолітичної активності утвореного вірус-мембранного комплексу [Федчук, 1980]. Тобто, стан системи протеолізу на ранніх етапах репродукції вірусу грипу має вагоме значення.

Етоній і декаметоксин є біс-четвертинними солями амонію, їх застосовують як антибактеріальні засоби з широким спектром дії. Відомо, що солі амонію мають лізосомотропні властивості [Matlin et al., 1982]. Такі речовини, знижуючи рівень рН, гальмують процес депротейнізації вірусу в клітині, що призводить до гальмування процесу репродукції вірусу взагалі. Можна розраховувати також, що властивості цих препаратів як катіонних поверхнево активних речовин будуть впливати на структуру та взаємодію рецепторів вірусу та клітин хазяїна, втручаючись у найбільш ранні етапи взаємодії

вірусу з клітиною, що також призведе до гальмування процесу вірусної репродукції.

Тому, з метою визначення деяких механізмів проти-вірусної дії декаметоксину та етонію ми вважали за доцільне дослідити їх вплив на протеолітичну активність під час вірус-мембранної взаємодії.

Матеріали та методи

Вивчення впливу декаметоксину та етонію на протеолітичні процеси під час вірус-мембранної взаємодії проводили на модельних експериментах з очищеним і концентрованим вірусом грипу А/PR/8/34 (H1N1) та ізольованими плазматичними мембранами чутливих клітин хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) курячих ембріонів. Очищення та концентрацію вірусу грипу А/PR/8/34 проводили, використовуючи методи диференційного і градієнтного центрифугування у градієнті концентрацій сахарози та гель-фільтрації на макропористому силоромі [Отчет о НИР, 1980]. Контроль очищення вірусного матеріалу проводили спектрофотометричним методом по співвідношенню оптичної щільності при довжині хвилі 260 нм, визначаючи кількість білку у пробі, та 280 нм, визначаючи кількість нуклеїнових кислот. Цей показник повинен бути нижчим за 1,25, що відповідає високому ступеню чистоти вірусного матеріалу.

Ізольовані плазматичні мембрани виділяли з клітин хоріон-алантоїсних оболонок 12-14-добових курячих ембріонів методом S. Pristasova [1981].

Вірус-мембранний комплекс отримували адсорбцією на протязі години при 0°C очищеного концентрованого препарату вірусу на ізольованих плазматичних мембранах. Препарати додавали до експериментальних зразків та інкубували 30-40 хвилин при 37°C - це час, який потрібен для проникнення вірусу крізь мембрану чутливої клітини. Контролем був препарат з додаванням фізіологічного розчину. Протеолітичну активність трипсиноподібних протеаз визначали за розщепленням 1% розчину протамін сульфату натрію під впливом трипсиноподібних протеаз при рН 7,6 до аргініну, кількість якого реєстрували фотоколориметричним методом [Вовчук, 1976]. Протамінрозщеплювальну активність визначали як окремо у препаратах вірусу і мембран, так і у вірус-мембранному комплексі.

Таблиця 1. Вплив декаметоксину на протеолітичну активність вірусу грипу, плазматичних мембран та вірус-мембранного комплексу.

	Рівень протамін-розщеплюваної активності (у мкМоль аргініну / хв.)					
	Контр. ₁	Дослід ₁	Контр. ₂	Дослід ₂	Контр. ₃	Дослід ₃
Вірус	4,7 x10 ⁻²	1,2 x10 ⁻²	6,3 x10 ⁻²	5,3 x10 ⁻²	7,3 x10 ⁻²	2,5 x10 ⁻²
Мембрани	2,3 x10 ⁻²	0,2 x10 ⁻²	6,3 x10 ⁻²	5,3 x10 ⁻²	3,3 x10 ⁻²	3,8 x10 ⁻²
Вірус-мембранний комплекс	5,0 x10 ⁻²	0,8 x10 ⁻²	15,6 x10 ⁻²	10,0 x10 ⁻²	4,1 x10 ⁻²	3,3 x10 ⁻²

Таблиця 2. Вплив етонію на протеолітичну активність вірусу грипу, плазматичних мембран клітин ХАО та вірус-мембранного комплексу.

	Рівень протамін-розщеплюваної активності (у мкМоль аргініну / хв.)					
	Контр. ₁	Дослід ₁	Контр. ₂	Дослід ₂	Контр. ₃	Дослід ₃
Вірус	4,7x10 ⁻²	2,3 x10 ⁻²	6,3 x10 ⁻²	5,3 x10 ⁻²	7,3 x10 ⁻²	3,5 x10 ⁻²
Мембрани	2,3 x10 ⁻²	4,0 x10 ⁻²	6,3 x10 ⁻²	1,5 x10 ⁻²	3,3 x10 ⁻²	2,5 x10 ⁻²
Вірус-мембранний комплекс	5,0 x10 ⁻²	3,1 x10 ⁻²	15,6 x10 ⁻²	10,0 x10 ⁻²	4,1 x10 ⁻²	3,1 x10 ⁻²

Результати. Обговорення

Отримані результати свідчать, що декаметоксин у кінцевій концентрації 25 мкг/мл впливав на протеолітичну активність як окремо вірусу грипу й ізольованих плазматичних мембран чутливих клітин ХАО, так і на активність вірус-мембранного комплексу (табл. 1).

Однак, інгібування протеолітичної активності мембран декаметоксином не було регулярним, на відміну від його впливу на ензиматичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу. Тобто, декаметоксин впливав на протеолітичні процеси, які відбуваються на найбільш ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною, знижуючи ферментативну активність протеаз, зокрема вірусних, що і можна вважати одним з механізмів його протигрипозної дії.

Аналогічним чином досліджували вплив етонію на ранні етапи вірус-клітинної взаємодії. В таблиці 2 наведено результати експериментів. Отримані результати свідчать, що етоній впливав на протеолітичну активність вірусу, ізольованих плазматичних мембран ХАО ції 125 мкг/мл.

Інгібування протеолітичної активності мембран етонієм не було регулярним, на відміну від його впливу на ензиматичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу. Таким чином, етоній аналогічно декаметоксину впливає на протеолітичні процеси, які відбуваються на найбільш ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною, інгібуючи активність протеаз, особливо вірусної, що й можна вважати одним з механізмів його протигрипозної дії.

Дані, щодо регулярного інгібуючого впливу декаметоксину та етонію на ензиматичну активність вірусу співпадають з результатами, отриманими раніше *in vitro* [Гридіна та ін., 2004; Лозицький та ін., 2004; Гридіна, 2004]. Досліджувані препарати проявляли певні протівірусні властивості у відношенні вірусів грипу на культурі тканини ХАО. Чутливими до декаметоксину та ето-

нію були як віруси грипу людини А (серопідтипи Н₁Н₁ і Н₃Н₂) та В, так і віруси грипу птахів (серопідтипи Н₅Н₃ і Н₇Н₃). При цьому протівірусна дія препаратів не зводилась тільки до втручання у процес репродукції. Декаметоксин та етоній проявляли певну віруліцидну дію. Отже, можна вважати, що одним з механізмів протівірусної дії біс-четвертинних солей амонію є вплив на позаклітинний вірус. Вплив препаратів на здатність культури тканин ХАО підтримувати репродукцію досліджуваних штамів вірусу грипу був не завжди регулярним.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Встановлено, що біс-четвертинні солі амонію (декаметоксин та етоній) спричиняли регулярний вплив на ензиматичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу. Інгібіція протеолітичної активності ними мембран була нерегулярною. Отримані дані співпадають з результатами, одержаними раніше в дослідженнях *in vitro* на культурі тканини ХАО.

2. Механізм дії цих препаратів пов'язаний із впливом на позаклітинний вірус та можливим ушкодженням або гальмуванням вірусної протеази.

3. Властивості цих препаратів як поверхнево активних речовин можуть перешкоджати взаємодії вірусних поверхневих протеїнів з клітинними рецепторами, що й призводить до інгібування протеолітичної активності вірус-мембранного комплексу.

4. Декаметоксин та етоній впливають на ранні етапи взаємодії вірусу з клітиною-хазяїна такі, як адсорбція, проникнення та депротейнізація вірусу грипу.

Заслугує на увагу подальше вивчення механізмів протівірусної дії нових антисептиків для створення ефективних протівірусних засобів.

Література: в редакції.