

**УКРАЇНСЬКИЙ ПРОТИЧУМНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ
ІНСТИТУТ імені І.І.Мечникова**

На правах рукопису

ГРИДІНА ТЕТЯНА ЛЕОНІДІВНА

УДК: 615.281; 8:615.012.1

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

03. 00. 06 – вірусологія

Д И С Е Р Т А Ц І Я

на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
ПАЛІЙ ГОРДІЙ КІНДРАТОВИЧ
доктор медичних наук, професор

Одеса - 2008

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.	
ПРОБЛЕМИ РОЗРОБКИ ПРОТИВІРУСНИХ ЗАСОБІВ, АКТИВНИХ ПРИ ГРИПІ ТА ПРОСТОМУ ГЕРПЕСІ	12
1.1. Віруси грипу та грип	12
1.2. Віруси групи герпесу та характеристика захворювань, що викликані цими вірусами	19
1.3. Проблеми пошуку та нові підходи у розробці протівірусних хіміотерапевтичних засобів	24
1.3.1. Характеристика хіміопрепаратів, які застосовуються при грипі	31
1.3.2. Проблема розробки протигерпетичних засобів	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	37
2.1. Фізико-хімічні властивості та фармакологічні характеристики офіційних препаратів: декаметоксину, етонію та унітіолу	38
2.2. Методи визначення токсичності досліджуваних препаратів	42
2.3. Вірусологічні методи	44
2.3.1. Визначення протівірусної активності декаметоксину, етонію та унітіолу у відношенні ВПГ-1 на культурах клітин	44
2.3.2. Визначення протівірусної активності декаметоксину, етонію та унітіолу у відношенні ВПГ-2 на культурах клітин RK13	45
2.3.3. Визначення протівірусної активності досліджуваних препаратів у відношенні вірусів грипу людей на культурі тканини ХАО	46
2.3.4. Визначення протівірусної активності досліджуваних препаратів у відношенні вірусів грипу птахів	47
2.4. Моделювання експериментальної грипозної інфекції у мишей	49
2.5. Визначення впливу досліджуваних препаратів на протеолітичну активність очищеного і концентрованого вірусу грипу, ізольованих плазматичних мембран та	

вірус-мембранного комплексу	49
2.7. Біохімічні методи дослідження	50
2.7.1. Визначення активності лужних та кислих протеаз у гомогенатах легенів мишей	50
2.6.2. Визначення протамінрозщеплювальної активності у зразках очищеного вірусу, плазматичних мембран та вірус-мембранного комплексу	51
2.6. Статистичні методи дослідження	51
2.7. Математичні методи	52
РОЗДІЛ 3. ВИЯВЛЕННЯ ТЕОРЕТИЧНО-ПРОГНОЗОВАНИХ ЗАСАД НАЯВНОСТІ ПРОТИВІРУСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ У ДОСЛІДЖУВАНИХ ПРЕПАРАТІВ	53
3.1. Дослідження потенційних біологічних властивостей препаратів за допомогою комп'ютерної програми PASS	53
3.2. Прогнозування протигрипозної активності за допомогою вирішення задач QSAR	55
РОЗДІЛ 4. РІВЕНЬ ТОКСИЧНОСТІ ДЕКАМЕТОКСИНУ, ЕТОНІЮ ТА УНІТІОЛУ НА ДОСЛІДЖУВАНИХ МОДЕЛЯХ	57
4.1. Рівень токсичності препаратів на культурі <i>Colpoda steinii</i>	57
4.2. Рівень цитотоксичності досліджуваних препаратів	58
4.3. Рівень цитотоксичності препаратів за можливістю декаметоксину, етонію та унітіол пригнічувати життєздатність клітин калориметричним методом	60
4.4. Рівень токсичності досліджуваних препаратів на білих мишах при інтраназальному їх введенні	62
РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ <i>IN VITRO</i>	65
5.1. Протигерпетична активність препаратів	65
5.2. Протигрипозна активність декаметоксину, етонію та унітіолу на культурі тканини ХАО	70
5.2.1. Рівень протигрипозної активності декаметоксину в культурі тканини ХАО	71

5.2.2. Рівень протигрипозної активності етонію в культурі тканини ХАО	75
5.2.3. Рівень протигрипозної активності унітіолу в культурі тканини ХАО	78
РОЗДІЛ 6. ПРОТИВІРУСНА ДІЯ ДОСЛІДЖУВАНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГРИПІ У ТВАРИН	83
6.1. Рівень протигрипозної дії біс-четвертинних солей амонію при інтраназальному способі їх застосування на моделі грипозної інфекції у мишей	83
6.1.1. Захисна дія декаметоксину при інтраназальному способі його застосування під час експериментального грипу	83
6.1.2. Вплив інтраназального застосування декаметоксину на титр інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз в легенях тварин під час експериментального грипу у мишей	86
6.1.3. Захисна дія етонію при інтраназальному способі його застосування під час експериментального грипу	89
6.1.4. Вплив інтраназального застосування етонію на титр інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз в легенях тварин під час експериментального грипу у мишей	91
6.2. Протигрипозної дії унітіолу при інтраназальному способі його застосування на моделі грипозної інфекції у мишей	95
6.2.1. Захисна дія унітіолу при інтраназальному способі його застосування під час експериментального грипу	95
6.1.4. Вплив інтраназального застосування унітіолу на титр інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз в легенях тварин під час експериментального грипу у мишей	97
РОЗДІЛ 7. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ МЕХАНІЗМІВ ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ ПРЕПАРАТІВ	101
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	107
ВИСНОВКИ	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	120

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ВІЛ – вірус імунодефіциту людини

ВПГ – вірус простого герпесу

ВХН - вірус хвороби Ньюкаслу

ВПЛ – вірус папіломи людини

ВЯВ – внутрішньоядерні включення

ГРВІ – гострі респіраторні вірусні інфекції

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

Е-АКК – епсілон-амінокапронова кислота

НА – гемаглютинін

НА - нейрамінідаза

ФЕК – культура курячих фібробластів

ЛД₅₀ – доза, яка викликає 50% летальності у тварин

МАК – мінімальна активна концентрація

МПК – максимальна переносима концентрація

НК – нуклеїнова кислота

ПАМБА – пара-амінометил-бензойна кислота

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

ТІД₅₀ – доза, яка викликає 50% інфікування тканини клітин

ТЦД₅₀ – доза, яка викликає 50% цитотоксичної дії культури клітин

ХАО – хоріоналантоїсна оболонка

ІС – індекс селективності

ЦМВ – цитомегаловірус

ВСТУП

Актуальність дослідження. Інфекційні хвороби залишаються однією з причин смертності серед населення планети. На їх долю щорічно припадає до 30% летальних випадків, що складає 14-17 млн. чоловік. В 2001 році статистика по розподілу смертності через певні інфекції була наступною: грип та пневмонії - 3,87 млн. випадків; інфекція, пов'язана з вірусом імунодефіциту людини - 2,87 млн. випадків; кишкові захворювання - 2 млн.; туберкульоз - 1,67 млн.; малярія - 1,12 млн.; кір - 745 тис.; коклюш - 285 тис.; менінгококова інфекція - 173 тис.; сифіліс - 167 тис. Таким чином, 90% летальних випадків пов'язано з шістьма першими захворюваннями [1, 2].

Герпетична інфекція гостра та хронічна, а також грип є найбільш масовими вірусними інфекціями, які спричиняють значну шкоду здоров'ю населення та призводять до великих економічних збитків. За даними ВООЗ, захворювання, спричинені вірусами простого герпесу, посідають друге місце (15,8%) після грипу (35,8%) як причина смерті від вірусних інфекцій [1-4].

Не дивлячись на те, що за останні десятиріччя всесвітній фармацевтичний ринок насичувався десятками нових противірусних препаратів, питання профілактики і терапії найбільш розповсюджених вірусних інфекцій не вирішене. Тому проблема пошуку активних хіміотерапевтичних засобів проти збудників вірусних інфекцій 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 противірусних властивостей у ліків, які вже використовуються за іншим призначенням, виробництво яких налагоджено, активність та побічна дія яких відома через багаторічне застосування, є дуже перспективним і економічно виправданим напрямком [5]. Такий підхід дає можливість розширювати показання для їх застосування.

Крім того, дуже важливим є пошук засобів з широким спектром протівірусної дії, які будуть ефективні як у відношенні вірусів грипу, так і проти герпесу. Недостатність арсеналу протівірусних засобів з метою використання їх при лікуванні інфекційних захворювань різної етіології є лише одним боком вирішення проблеми. З іншого боку нові препарати з протівірусною активністю можуть спричиняти формування резистентних форм збудників. Завадити цьому можна лише використовуючи засоби з різноманітним механізмом дії. Тому важливим є виявлення прояву протівірусних властивостей у різноманітних сполук, у тому числі і лікарських препаратів, які на цей час використовуються за іншим призначенням з метою визначення залежності їх механізму дії від хімічної структури.

У 2005 р. значно загострилася ситуація з пташиного грипу, викликаного штамом H₅N₁. Ризик подальших випадків захворювання людини не тільки зберігається, але й підвищується. Таким чином, можна вже казати про виникнення панзоотії, особливо, враховуючи можливість розповсюдження інфекційного вірусу перелітними птахами. У зв'язку з цим підвищується і ризик виникнення пандемічного штаму вірусу грипу, що пов'язано з реасортацією.

На сьогодні склалася ситуація можливого спалаху пандемії грипу. Тому ВООЗ розробила Глобальний план підготовки усіх країн на випадок її виникнення, в межах якого рекомендує у кожній країні створити необхідний резерв хіміотерапевтичних засобів, які могли б забезпечити профілактичні та лікувальні заходи у разі виникнення різкого підйому кількості захворілих на грип серед населення.

Останнім часом набув розвитку принцип пошуку протівірусних препаратів, заснований на встановленні взаємозв'язку між хімічною структурою речовин та їх протівірусними властивостями. Розробка цього напрямку привела до можливості створення рекомендацій щодо спрямованого синтезу речовин визначеної структури з прогнозованою

протівірусною активністю. Крім того, цей метод дозволяє прогнозувати протівірусну активність у відомих офіційальних препаратів, які використовуються у медичній практиці за іншим призначенням.

Етоній і декаметоксин є біс-четвертинними солями амонію, та застосовуються як антибактеріальні засоби з широким спектром дії. Відомо, що солі амонію мають лізосомотропні властивості [6], завдяки чому можуть втручатися 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, що 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 сподіватися, що унітіол буде впливати на гемаглютинін вірусу грипу, розриваючи дисульфідні містки, які стабілізують жорсткість структури білків, і, порушуючи дисульфідні зв'язки між субодиницями гемаглютиніну, гальмуватиме найбільш ранні стадії взаємодії вірусів грипу з чутливими клітинами за рахунок порушення процесів взаємодії вірусу з мембраною клітини-хазяїна [7].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалася в межах планових НДР лабораторії біохімії ОНДІВЕ 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 протівірусних засобів” (державний реєстраційний № 0197U000623) та лабораторії хіміотерапевтичних та імунобіологічних препаратів УкрНДПЧІ 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 та завдання дослідження. Метою даної роботи було виявлення та вивчення противірусної дії вітчизняних офіційних 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 курячих фібробластів (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 використовують 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 H_5 і H_7 . Показано, що досліджувані препарати гальмують репродукцію вірусів грипу незалежно від їх антигенної структури. Автором застосовано QSAR підходи з метою виявлення протівірусних властивостей у існуючих офіційальних препаратів, що використовують в медицині за іншим призначенням. Розраховані комп'ютерні прогнози протівірусної 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 протівірусних властивостей у існуючих офіційальних препаратів дозволяє розширити арсенал протівірусних засобів з різним механізмом дії з числа вітчизняних ліків, що використовують в медицині за іншим призначенням.

Особливо важливими є результати щодо виявлення автором протівірусної дії у вітчизняних лікарських препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу по відношенню до вірусів пташиного грипу серопідтипів H_5N_3 і H_7N_3 *in vitro*.

Результати експериментальних досліджень щодо виявленої протівірусної 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 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.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

ПРОБЛЕМИ РОЗРОБКИ ПРОТИВІРУСНИХ ЗАСОБІВ, АКТИВНИХ ПРИ ГРИПІ ТА ГЕРПЕСІ

1.1. Віруси грипу та грип

Грип – гостра антропонозна вірусна інфекція дихального шляху, що реєструється у всіх регіонах планети та проявляється у вигляді сезонних епідемічних спалахів та епідемій [8, 9, 10, 11]. Декілька разів на сторіччя виникають пандемії грипу, які вражають десятки мільйонів людей [12, 13].

У 2001 році віруси грипу включені ВООЗ до третьої категорії потенційних агентів біологічної зброї [14, 1, 2]. 29.09.2005 р. Генеральний секретар ООН призначив співробітника ВООЗ Девіза Наварро на пост координатора з питань боротьби з пташиним грипом [15]. ВООЗ було розповсюджено брошуру „Реагирование на опасность пандемии птичьего гриппа”. Пандемії грипу виникають кожні 38-40 років [16], а остання пандемія була у 1968 році, на думку експертів ВООЗ, слід чекати на нову пандемію вірусу грипу [12, 17, 18].

За даними С.А.Крамарева і Л.А.Палатної грип та ГРВІ є найбільш розповсюдженими на Україні захворюваннями [19]. Економічні втрати тільки від грипу складають біля 400 мільйонів гривень на рік [20]. Щорічно в Україні на протязі першого кварталу за медичною допомогою з приводу захворювань на грип та ГРВІ звертаються до 10 мільйонів осіб, 52% з яких складають діти. Рівень захворюваності дітей на ГРВІ перевищує цей показник серед інших інфекцій у 7-7,5 разів. Кількість дітей, що захворіли на ГРВІ, у 1,5-3,0 рази вище ніж у дорослого населення [21].

Слід підкреслити, що для дітей грип та ГРВІ є найбільш небезпечними [22]. Вірогідність розвитку ускладнень підвищується у відповідності зі зменшенням віку дитини. Цей показник зменшується на 20% кожні наступні 6 років життя дитини [21]. Сучасні противірусні засоби для лікування грипу та ГРВІ мають ряд обмежень у дітей, що часто пов'язано з вузьким спектром їх противірусної активності, швидким розвитком стійкості до цих вірусів, високою вартістю та складнощами при використанні [22].

Пандемії та епідемії грипу завжди викликали великий інтерес до цієї інфекції через значні шкоди, що спричиняються здоров'ю населення [23, 24, 25]. На протязі двадцятого сторіччя було три пандемії грипу А людей: 1918, 1957 та 1968 років, які були викликані різними антигенними підтипами (H_1N_1 , H_2N_2 та H_3N_2 відповідно) [26]. Всі вони призвели до загибелі значної кількості людей, хоча дві останні пандемії (1957 і 1968 років) виникли тоді, коли вірусологія вже мала достатній арсенал засобів для боротьби з вірусними інфекціями.

Грип та інші гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) займають провідне місце серед усієї інфекційної патології у дітей і дорослих [22, 27]. Віруси грипу репродукуються за законами продуктивної інфекції без нахилу до латентності, неоплазматичної індукції або іншої тонкої взаємодії з клітиною [28]. Легкість передачі збудника повітряно-крапельним шляхом, висока чутливість організму призводить до частих захворювань з епідемічним розповсюдженням інфекції у колективах [29]. Ці захворювання характеризуються різними ушкодженнями верхніх дихальних шляхів або більш глибоких відділів дихального тракту, а нерідко й інших органів і систем із загальною лихоманковою реакцією та іншими проявами [30].

Збудники грипу – це РНК-вмісні віруси, що належать до родини *Orthomyxoviridae*, яка містить два роди – рід вірусів А і В та рід вірусів грипу С. Віруси грипу типу А вражають людину, деякі види тварин (коней, свиней та ін.) та птахів [31, 32]. Віруси грипу типу В та С патогенні тільки для людей. Віріони грипу мають відносно великі розміри (80-100 нм) та сфероподібну форму. Геном вірусу містить 8 фрагментів лінійної одноланцюгової молекули негативної РНК (для А і В вірусів грипу), що разом з N-білком утворює рібонуклеопротеїд (NP-білок). До внутрішніх структурних білків відносять також: три полімеразних протеїна (PA, PB₁, PB₂) та матриксний білок (M₁). NP-білок та полімеразні протеїни тісно пов'язані з кожним фрагментом геному, входячи до складу капсиду віріону.

Внутрішні протеїни визначають вірулентність вірусу грипу, з якою значною мірою пов'язані токсичні властивості збудника. Поверхневі

структурні білки ортоміксовірусів розрізняються залежно від роду. Вірусам грипу А і В притаманна наявність гемаглютиніну та нейрамінідази. Докладну характеристику білків вірусу грипу та їх функцій наведено в табл.1.1 [33].

У відповідності з класифікацією ВООЗ (1980), до складу вірусів грипу людини типу А можуть входити один з трьох гемаглютинінів (H_1 , H_2 , H_3) та одна з двох нейрамінідаз (N_1 , N_2) [34]. Гемаглютинін є рецептором, за допомогою якого вірус адсорбується на чутливих клітинах. Він має гемаглютинуючі властивості та індукує в організмі створення віруснейтралізуючих антитіл. Нейрамінідаза є ферментом, що відповідає за вихід віріонів з клітин хазяїна. Антитіла до цього глікопротеїду також мають велике значення для протигрипозного імунітету.

До родини *Orthomyxoviridae* відносять також збудників вірусу грипу птахів, що підрозділяють на 15 субтипів гемаглютиніну (H_1 - H_{15}) и 9 субтипів нейрамінідази (N_1 - N_9), які можуть реасортуватися у різних рекомбінаціях [35]. Три типи вірусів (H_1N_1 , H_2N_2 , H_3N_2) виявилися збудниками грипозних пандемій серед людей у ХХ столітті, інші – викликають захворювання серед ссавців та птахів [36, 37]. Серед найбільш патогенних для домашніх птахів виділяють віруси з антигенною формулою H_7N_7 (вірус «курячої чуми») та H_5N_1 , які викликають масову загибель курей. Високо патогенні варіанти вірусу грипу H_7N_7 викликали у 2003 році масове ураження фермерських курячих господарств у Нідерландах, тоді як віруси H_5N_1 виявилися причиною загибелі мільйонів курей у країнах Південно-Східної Азії, починаючи з 1997 року [38].

До недавнього часу була розповсюджена думка, що віруси грипу птахів не патогенні для людей або викликають у них симптоми кон'юнктивіту, легке недомогання, а іноді, слабо виражений респіраторний синдром, які швидко минають [39, 40]. Це положення було скасовано у 1997 році, коли віруси грипу викликали досить важкі випадки захворювання серед людей у Гонконгу, кожний третій з яких закінчився летально. Для упередження подальшого інфікування людей було проведено знищення поголів'я курей у цьому регіоні [38].

Таблиця 1.1

Характеристика білків вірусу грипу А та їх функції

(За - *Грип* та його профілактика: Навч. посіб. / Дзюблик І.В., Широбоков В.П. та ін. – К., 2005. – 194с.)

Назва	Позначення	Властивості та функції білків
Внутрішні структурні протеїни		
Нуклеокапсидний білок	NP	Фосфорильований протеїн, який в асоціації з кожним фрагментом РНК формує рибонуклеопротеїн вірусу. Разом з полімеразними білками утворює нуклеокапсид віріону.
Полімеразні протеїни	PB ₁	Протеїни-ферменти реплікативно-транскриптазного комплексу: - РНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза);
	PB ₂	- ендонуклеаза;
	PA	- білок-регулятор. Визначають рівень патогенності та вірулентності штамів вірусів.
Матриксний протеїн	M1	Негликозильований протеїн. Формує надсердцевинну оболонку віріону, є білком-медіатором збирання віріонів.
Зовнішні (поверхневі) структурні білки		
Гемаглютинін	HA	Глікопротеїн, який забезпечує прикріплення віріону до чутливої клітини та, після його протеолітичної активації, проникнення в клітину за механізмом рецепторного ендоцитозу. Визначає рівень інфекційності штамів вірусу. Є штамоспецифічним антигеном, основним протективним білком. Неконтрольовано антигенно змінюється.
Нейрамінідаза	NA	Глікопротеїн з функцією рецептор руйнуючого ферменту, вивільняє віріон від клітинних рецепторів, забезпечуючи ефективний вихід віріонів з клітини та попереджаючи їх агрегацію. Звільняє вірус від дії неспецифічних інгібіторів інфекційної активності вірусу, які є у біорідинах хазяїна. Є штамоспецифічним антигеном. Має протективні властивості, антигенно змінюється, але менше, ніж HA.
Мембранний білок	M ₂	Вірогідно гликозильований. Формує іонні канали в суперкапсиді віріону.
Неструктурні білки (негликозильовані)		
Неструктурні протеїни 1-го та 2-го типів	NS ₁ NS ₂	Каналізують певні процеси біосинтезу вірус специфічних макромолекул на пізніх етапах репродукції вірусу. NS1 визначає резистентність вірусу до цитокінів (інтерферону та фактору некрозу пухлин α)

В останні роки у Китаї, окрім H_5N_1 зареєстровані 2 випадки інфікування людей вірусом грипу H_9N_2 , однак клінічна картина захворювання була достатньо м'якою з видужанням [41].

Таким чином, за останні 7 років віруси грипу птахів H_5N_1 і H_7N_7 в результаті мутацій змінили свої біологічні властивості та набули можливості не тільки долати хазяйський бар'єр з безпосереднім інфікування людей (оминаючи проміжного хазяїна), але й викликати дуже тяжкі клінічні форми захворювання, значна частина яких закінчується летально [42, 43]. За даними січня 2004 року 27 осіб були інфіковані від курей вірусом грипу птахів, 20 з яких (у тому числі діти) померли від грипу. Ні одного випадку передачі інфекції від людини до людини не зареєстровано [44]. На сьогодні фактичні дані свідчать про те, що вірус H_5N_1 є ендемічним у окремих частинах Азії через те, що отримав екологічну нишу у середовищі свійської птиці. Ризик подальших випадків захворювання людини не тільки зберігається, але й підвищується (див.табл.1.2).

Також слід враховувати і ризик виникнення пандемічного штаму вірусу грипу внаслідок реасортації. Дикі перелітні птахи, які історично є природним резервуаром усіх вірусів грипу А, й досі гинуть у великій кількості від високо патогенного вірусу H_5N_1 . Домашні качки можуть екскретувати значну кількість високо патогенного вірусу, не виявляючи при цьому ніяких ознак захворювання. Їх роль у підтримці та передачі вірусу серед домашньої птиці ще більш ускладнює ситуацію [38]. Тобто, можна вже казати про можливість виникнення панзоотії, особливо враховуючи можливість передачі захворювання від свійських птахів диким та перенос інфекційного вірусу перелітними птахами [45, 46].

Таким чином, склалася ситуація можливого спалаху пандемії грипу. Тому ВООЗ розробила Глобальний план підготовки усіх країн на випадок її виникнення [47]. На попередній стадії, до виникнення пандемії, усі практичні міри необхідно спрямувати на те, щоб зменшити ризик виникнення пандемічного штаму вірусу грипу, контролюючи інформацію щодо особливостей поведінки циркулюючих штамів вірусу та особливостей перебігу захворювань, викликаних ним.

Таблиця 1.2

Загальна кількість випадків захворювань на пташиний грип А/(H5N1) за даними ВООЗ на 16 листопада 2007 року (інтернет-ресурс WHO | Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO – 16 November 2007:

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2007_11_12/en/index.html

Країни	2003 рік		2004 рік		2005 рік		2006 рік		2007 рік		Усього	
	в	с	в	с	в	с	в	с	в	с	в	с
Азербайджан	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	8	5
Камбоджа	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	7	7
Китай	1	1	0	0	8	5	13	8	3	2	25	16
Джибуті	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Єгипет	0	0	0	0	0	0	18	10	20	5	38	15
Індонезія	0	0	0	0	20	13	55	45	38	33	113	91
Ірак	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	3	2
НДР Лаос	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
Нігерія	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Тайланд	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	25	17
Турція	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	12	4
В'єтнам	3	3	29	20	61	19	0	0	7	4	100	46
Усього	4	4	46	32	98	43	115	79	72	48	335	206

Примітки:

в – випадки захворювання;

с – випадки захворювання, які закінчилися летально;

ВООЗ реєструє тільки випадки захворювання на пташиний грип, що були лабораторно підтверджені.

У разі прояву перших ознак виникнення пандемії, усі зусилля повинні бути спрямовані на неприпустимість поширення інфікування та карантинні заходи. За думкою експертів ВООЗ у кожній країні слід створити необхідний резерв хіміотерапевтичних засобів, які могли б забезпечити профілактичні та лікувальні заходи у разі підвищення кількості захворілих грипом людей [47].

У патогенезі грипу визначають п'ять основних фаз патологічного процесу: I – репродукція вірусу у клітинах дихального шляху; II – вірусемія, токсичні та токсико-алергічні реакції; III – ураження дихального шляху з переважною локалізацією у якомусь з його відділів; IV – можливі бактеріальні ускладнення з боку дихального шляху та інших систем організму; V – зворотній розвиток патологічного процесу. Грип обумовлює

зниження імунологічної реактивності, що призводить до загострення різноманітних хронічних захворювань, а також до виникнення вторинних бактеріальних ускладнень, найбільш частим та серйозним з яких є гостра пневмонія, яка носить при грипі змішаний вірусно-бактеріальний характер [48, 49].

Розпізнавання грипу у період епідемічного спалаху не викликає ускладнень [8, 10, 12, 50], якщо клінічні прояви його типові, а питома вага грипу серед усіх ГРВІ сягає 90%. У міжепідемічний час, коли переважають атипові форми грипу, буває досить важко клінічно диференціювати його від інших ГРВІ, оскільки цей показник знижується до 3-5%.

Грип у дітей відрізняється від захворювання у дорослих більш важким перебігом, частішим розвитком ускладнень, зниженням реактивності дитячого організму, а також може ускладнювати перебіг інших хвороб [51]. Порушення загального стану, прояви лихоманки та ураження дихального шляху більш виражені та тривалі і можуть сягати 5-8 діб [52, 53].

Перебіг захворювання у осіб похилого віку, старших за 60 років, як і у дітей також виявляється більш важким, тривалим, з більшою кількістю ускладнень [54]. У осіб цієї вікової групи на перший план виступають порушення серцево-судинної системи. В цілому, у осіб похилого віку тривалість захворювання неускладненим грипом більше у 1,5 рази у порівнянні з молодими хворими і складає 1-1,5 тижня. Грип у цієї вікової групи ускладнюється у 2 рази частіше пневмоніями, ніж у осіб молодого та середнього віку [55].

Існує концепція відстроченої смерті при грипі, що базується на багатьох клінічних спостереженнях, які свідчать про загострення через грип попередніх хронічних патологій, особливо захворювань серцево-судинної системи, хронічних захворювань легенів, цукрового діабету та інших, що призводить до смерті [56, 57]. Дослідження останніх років демонструють, що відкладена смерть при грипі може суттєво бути зменшеною, якщо пацієнтів групи ризику (передусім осіб, яким більше 65 років), буде провакциновано до початку сезонного підйому захворюваності на грип [56-59]. Крім того, слід підкреслити, що летальність при грипі може бути пов'язаною не тільки із

загостренням хронічних захворювань, але й бути наслідком розвитку пневмоній [60, 61]. Добре аргументована гіпотеза, що вірус грипу індукує виражені вторинні імунодефіцити, які призводять до ушкодження легенів такими різноманітними патогенними-збудниками, як *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitides*, *Aspergillus fumigatus*. [49, 62]. Тому зниження захворюваності на грип та інші ГРВІ є однією з важливих проблем закладів охорони здоров'я. Профілактика грипу та ГРВІ завжди актуальна [62, 63]. Необхідно підвищувати рівень неспецифічної резистентності організму та специфічного захисту від грипу.

Раніше найбільш ефективним заходом захисту населення при грипі була вакцинопрофілактика [63-65]. Але на жаль, ефективних вакцин проти грипу та ГРВІ ще замало, застосування вакцин слід проводити виключно у період до виникнення епідемічного стану. Використання вакцин у період епідемії неприпустимо. Крім того, використання імунобіологічних препаратів може призводити до алергізації організму.

Вакцинопрофілактика при грипі ще й тому не виправдовує себе, що зазвичай вакцини виготовляють із штамів, які викликали попередню епідемію. Але варіабельність зовнішніх глікопротеїдів (гемаглютиніну та нейрамінідази) може призводити до появи антигенно „нових” вірусів, які не будуть нейтралізуватися антитілами до попередніх штамів. Тому доцільним є розробка нових підходів до профілактики і терапії грипу та ГРВІ. Саме використання етіотропних хіміотерапевтичних препаратів дозволить лікувати грип у період епідемії. Розробка методів нетрадиційної терапії і профілактики з використанням офіційних препаратів, які використовуються в медицині за іншим призначенням, дозволяє розширити кількість засобів проти грипу.

1.2. Віруси групи герпесу та характеристика захворювань, що викликані цими вірусами

Герпетична інфекція також є найбільш розповсюдженою серед вірусних захворювань людини. За даними ВООЗ біля 95% населення планети є інфікованими вірусами герпесу [3, 4]. Внаслідок погіршення екологічної ситуації, зниженням компенсаторних можливостей організму та розвитком

вторинних імунодефіцитів кожного року невпинно зростає кількість осіб, інфікованих герпес-вірусами. Асоціація вірусів обумовлює дифузність і ступінь ураження органів і систем, розвиток хронічних форм захворювань. Відомо, що наявність в організмі вірусу простого герпесу 2 типу є одним з найважливіших факторів, який підвищує ризик ВІЛ інфікування [66].

Герпес-віруси дуже поширені в природі. Їх налічується близько 80 видів, враховуючи віруси хребетних тварин (коней, собак, великої рогатої худоби, свиней, кролів, кішок...) і людини. Для людини серйозну небезпеку представляють 8 типів герпесу (див.табл.1.3) [67], серед яких провідне місце займають віруси простого герпесу (типи 1, 2), вірус вітряної віспи і оперізуючого лишая (тип 3), а також віруси Епштейна-Барр і цитомегалії (типи 4, 5) [68, 69]. Рідше визначаються захворювання, викликані вірусами 6-го, 7-го і 8-го типів (синдрому хронічної втоми, інфекційної еритеми) [69, 70].

Основними шляхами інфікування людини вірусами герпесу є: повітряно-краплинний (через ротову і носову порожнину при розмові, кашлі, поцілунку); статевий шлях; трансплацентарний у період вагітності від матері до плоду; парентеральний (через ушкоджені шкіряні покрови, при медичних маніпуляціях); контактнo-побутовий (через інфікований матеріал з навколишнього середовища). Широка розповсюдженість герпетичної інфекції обумовлена високою схильністю людини до інфікування вірусами простого герпесу 1 та 2 типу (ВПГ 1 і 2). Контакт зі збудниками цієї інфекції відбувається у більшості людей, що підтверджено наявністю анатител до ВПГ 1 і 2 у 80-90% дорослого населення [71]. Це обумовлено різноманітністю шляхів передачі та здатністю вірусу до тривалого персистування у клітинах нервової тканини. В останні роки реєструється певний підйом кількості хворих на рецидивуючі форми ВПГ різної локалізації (орофаренгіальний, лабіальний герпес, герпетичне ураження уrogenітального шляху, офтальмогерпес, герпес шкіри, герпетичний енцефаліт та ін.) [72].

Інфікування людини пов'язане з персистенцією вірусу в організмі й інтеграцією до геному клітини [73, 74]. При нормальному функціонуванні

імунної системи організму вірус елімінується з більшості уражених органів і тканин за винятком паравертебральних сенсорних гангліїв, де він зберігається в латентній персистуючій формі протягом всього життя і звідки, при несприятливих для організму умовах, може дисемінувати гематогенно і/чи нейронально в органи.

Таблиця 1.3

Характеристика герпес-вірусів людини і захворювань, викликаних ними (за Баринським І.Ф -Баринский И.О. Герпесвирусная инфекция. М., 1990.– 67с.)

Типи герпес-вірусів	Класифікація	Органи, що найбільш часто вражаються та можливі захворювання
Вірус герпесу тип 1 (вірус простого герпесу)	Альфа-вірус	Шкіра, слизові. Органи травлення. Нервова система. Ендотелій судин. Клітини крові.
Вірус герпесу тип 2 (вірус простого герпесу)	Альфа-вірус	Слизові, шкіра. Сечостатева система. Внутрішні органи. Периферична та ЦНС.
Вірус герпесу тип 3	Альфа вірус	Шкіра, слизові. Нервова система. Вітряна віспа. Оперізуючий лишай.
Вірус герпесу тип 4 (Епштейна-Барр)	Гама-вірус	Мононуклеоз. Лімфоїдна система. Органи травлення. Нервова система. Серцево-судинна система. Синдром хронічної втоми. Лімфома Беркітта.
Вірус герпесу тип 5 (цитомегаловірус)	Бета-вірус	Органи зору. Органи травлення. Нервова система. Серцево-судинна система. Акушерська патологія.
Вірус герпесу тип 6	Гама-вірус	Раптова екзантема. Синдром хронічної втоми.
Вірус герпесу тип 7	Бета-вірус	Лімфопроліферативні захворювання. Імунодефіцитні стани. Ураження крові.
Вірус герпесу тип 8	Гама-вірус	Лімфопроліферативні захворювання. Саркома Капоши

У патологічний процес можуть бути втягнуті практично всі органи людини, що обумовлює різні нозологічні форми захворювань:

- шкіра, слизові (дерматит, тонзиліт ...);
- органи травлення (стоматит, гінгівіт, фарингіт, гастрит, ентерит, коліт, гепатит, панкреатит, проктит...);

- сечостатева система (вагініт, уретрит, цистит, цервіцит, ендометрит, сальпінгіт...);
- нервова система (неврит, енцефаліт, менінгіт, мієліт...);
- серцево-судинна система (міокардіодістрофія, міокардит, судинна дистонія);
- органи дихального шляху (риніт, бронхіт, трахеїт, пневмонія...);
- органи зору (кон'юнктивіт, кератит, іридоцикліт, увеїт...);
- опорно-руховий апарат (артрит, міозит...);
- онкологічні й аутоімунні захворювання (лімфогранулематоз, В-клітинна лімфома, саркоїдоз, синдром Шегрена, хвороба Крона, аутоімунний тиреоїдіт, саркома Капоши, назофаренгіальна карцинома, лімфома Беркитта, рак шийки матки) [75, 76]. Особливістю майже всіх типів вірусів групи герпесу є те, що лише одного разу потрапивши до організму, ці віруси залишаються там назавжди. Однак, при будь-яких порушеннях імунної системи відбувається активація латентної форми з подальшим розвитком інфекції та характерними клінічними проявами [70].

Вірус простого герпесу відноситься до родини *Herpesviridae*, підродини α -*Herpesviridae*, роду *Simplexvirus*, виду ВПГ. Це ДНК-вмісні віруси складної будови [77]. У структурі віріону розрізняють ДНК-вміщуюче ядро, розташоване в ікосаедричному капсомері, який у свою чергу вкритий білковою оболонкою та тегументом. Геном представляє собою дволанцюгову молекулу ДНК. Реплікація вірусів цієї родини відбувається в ядрі з утворенням ДНК-вмісних тілець-включень і проходить типові етапи: транскрипцію вірусної ДНК з утворенням інформаційної РНК і подальшу трансляцію з утворенням вірусних білків [77].

При вивченні великої кількості штамів вірусу були виділені дві основні антигенні групи інфекції – типи ВПГ 1 і 2, які дещо відрізняються за вірулентністю та патогенністю. Інфікування одним типом ВПГ не виключає можливості перехресного інфікування іншим типом збудника.

Нуклеокапсид та зовнішня оболонка вірусу несуть ряд рецепторів, завдяки яким ВПГ має пантропізм, тобто властивість приєднуватися до клітин

шкіри, слизових, центральної та периферичної нервової системи, печінки, ендотелію судин, клітин крові. ВПГ передається головним чином контактним шляхом [67]. Хронізація інфекції пов'язана з персистенцією вірусу в організмі та його інтеграцією до геному клітини. Трансплацентарне інфікування клітин плоду призводить до розвитку вроджених уражень з боку нервової системи та інших внутрішніх органів [78, 79, 80].

Під впливом різних екзогенних та ендогенних факторів, через які пригнічується імунна система, можливе послаблення контролюючих механізмів „хазяїна” та реактивація вірусу, тобто перехід до фази активної реплікації вірусу та розвитку рецидиву [81, 82]. При генералізації інфекції у хворого спостерігається вірусемія, інфікування від такого пацієнта можливе трансфузійним та парентеральним шляхами через інструментарій під час оперативного втручання, лікуванні карієсу і т.ін.

Важливим фактом є те, що хронічна, часто рецидивуюча, ВПГ-інфекція може провокувати розвиток аутоімунних станів. Крім того, під час інтеграції ВПГ до генетичного апарату клітин можлива неопластична трансформація клітин. Так, ВПГ є одним з факторів підвищення ризику розвитку раку тіла та шийки матки. Крім того, герпесвірусна інфекція є однією з провідних причин абортів, передчасних пологів, народження дітей з патологією нервової системи та внутрішніх органів [83].

У патогенезі рецидивуючої ВПГ-інфекції провідну роль грають порушення стану імунної системи, які носять неоднорідний характер і потребують диференційованого підходу до їх корекції. Як показали дослідження останніх років, віруси герпесу можуть бути причиною передракових станів та ряду онкологічних захворювань (саркома Капоши, назофарингеальна карцинома, лімфома Беркітта, рак шийки матки та інші) [84]. Ураження внутрішніх органів, головного мозку може продовжуватися роками, часто прогресуючи та призводячи до інвалідизації і навіть до летального кінця. Тому проблеми профілактики та лікування герпес-вірусних захворювань є дуже важливими та актуальними.

1.3. Проблеми пошуку та нові підходи у розробці протівірусних хіміотерапевтичних засобів

Хіміотерапія – це лікування інфекційних, інвазійних захворювань, злоякісних новоутворень за допомогою хіміотерапевтичних засобів, тобто лікарських речовин, що вибірково пригнічують в організмі людини розвиток та розмноження збудників інфекційних захворювань або пригнічують проліферацію пухлинних клітин, знешкоджуючи ці клітини.

Терміном „хіміотерапія” позначають також галузь медичної науки, до завдань якої входить пошук хіміотерапевтичних препаратів, розробка способів їх отримання, вивчення спектру, механізмів та умов дії цих засобів на збудників інфекційних хвороб та пухлинні клітини, а також розробка раціональних методів використання вказаних засобів. Хіміотерапія – це етіотропний метод лікування з обов’язковим встановленням етіології захворювання з метою вибору адекватного хіміотерапевтичного препарату, який має найбільш високу активність по відношенню до збудника даного захворювання. Недотримання цього принципу свідомо є причиною неефективності хіміотерапії.

Важливим принципом хіміотерапії є також дотримання умов використання препарату: дозування, способу введення, інтервалів між введенням та ін. Їх встановлюють заздалегідь у процесі доклінічного дослідження і клінічних іспитів, а потім наводять в інструкції по застосуванню препарату. У разі розвитку в процесі хіміотерапії резистентності збудника до використаного препарату виникає необхідність у заміні його іншим, до якого даний збудник ще нечутливий, з урахуванням можливості виникнення так званої перехресної стійкості збудника, що проявляється у резистентності не тільки до використаного препарату але й до всіх сполук, близьких за структурою або механізмом дії.

З метою підвищення ефективності лікування інфекцій, а також для попередження формування резистентності збудника, використовують так звану комбіновану хіміотерапію: одночасне застосування двох або більше хіміотерапевтичних засобів з різним механізмом дії [85]. Комбінувати можна тільки такі препарати, які по відношенню до збудника діють синергічно.

Необхідність у комбінованій хіміотерапії виникає ще й тоді, коли використані препарати діють не на всі генерації збудника в організмі. Слід уникати комбінації препаратів, які під час дії на збудника можуть вести себе антагоністично. Крім того, доцільно враховувати загальні принципи використання лікарських засобів, наприклад, можливість розвитку побічних ефектів, наявність генетично обумовленої підвищеної чутливості до препаратів тощо [86, 87].

Противірусна терапія, на відміну від протибактеріальної, має значно меншу кількість лікувальних засобів. Хіміотерапія вірусних інфекцій – це самостійний розділ вірусології, основним завданням якого є пошук, іспити та відбір противірусних лікарських засобів синтетичного або природного походження. Ефективність багатьох противірусних сполук встановлена в експериментальних дослідженнях і у клінічних випробуваннях, однак не всі ці препарати можна використовувати у широкій практиці. Розробка нових лікарських засобів, спрямованих на лікування інфекційних захворювань, особливо вірусної етіології, тривалий час залишається у центрі уваги медичної науки.

Згідно з сучасними уявленнями, віруси тварин та людини проникають до клітин-мішеней таким чином. По-перше, відбувається процес адсорбції вірусу на поверхні клітин та взаємодія з поверхневими клітинними структурами – вірусними рецепторами. Далі відбувається етап проникнення шляхом рецепторного ендоцитозу з наступним злиттям з мембраною ендоцитарних вакуолей при їхньому закисненні або шляхом безпосереднього злиття вірусної оболонки з плазматичною мембраною клітини [88]. Оскільки віруси еволюціонують незалежно один від одного, то у якості клітинних рецепторів вони можуть використовувати різні молекули, експоновані на поверхні клітин, - структурні білки, ліпіди, антигени гістосумісності, рецептори імуноглобулінів та ін. [89-91].

Клітинні рецептори розпізнаються активними центрами вірусного капсиду, які зазвичай локалізовані на поверхні одного з капсидних білків вірусу, наприклад, гемагглютиніну вірусу грипу [92, 93]. Для деяких вірусів наявність специфічних ферментів у значній мірі визначає коло чутливих до

вірусу хазяїв та тканьовий тропізм. Для вірусів, що використовують убіквітарні рецептори, зокрема ортоміксовіруси, чутливість клітин лімітується іншими факторами, наприклад, можливістю специфічного процесінгу вірусних білків.

Тому можливі два підходи: вплив на клітинний рецептор, що використовується вірусом для проникнення в клітину, а також на рецепторозв'язуючі детермінанти вірусу. Так у роботі Паулсона [91] наведено, що руйнування клітинних рецепторів ферментами та їх конкурентне інгібування моноклональними антитілами, природними або синтетичними пептидними лігандами, призводить до зниження або повного гальмування чутливості клітин до вірусу. Але більшість дослідників відносяться до неї скептично щодо ідеї блокування рецепції вірусу шляхом впливу на клітинний рецептор. По-перше, вплив на поверхневі структури клітини, що виконують в нормі певні функції, може вплинути і на її нормальну фізіологію. Крім того, логічнішим здається вплив не на клітини хазяїна, а на сам патоген.

Відомі приклади інгібування рецепції вірусів шляхом конкурентного блокування їх рецепторозв'язуючих детермінант природними або синтетичними аналогами клітинного рецептору. Так, віруси грипу зв'язуються з клітинами через взаємодію вірусного гемаглютиніну з термальними залишками сіалових кислот, які входять до складу різних клітинних сіалопротеїнів [91-93].

Особливості перебігу вірусної інфекції передбачають такі терапевтичні положення:

- препарати повинні мати надійну противірусну дію при мінімальному ушкоджувальному впливі на клітини організму-хазяїна;
- методи використання противірусних засобів обмежені недостатнім знанням фармакокінетики;
- ефективність противірусних хіміопрепаратів залежить від захисних сил організму; напруженості імунітету;
- для практичної медицини фактично недосяжні методи визначення чутливості вірусів до застосованих препаратів [94].

Перший принцип заснований на впливі препаратів безпосередньо або опосередковано на функції геному вірусів: спрямоване (селективне) інгібування одного або декількох етапів вірусної репродукції та опосередкована дія через клітину, яка є клітиною-хазяїном. У цьому випадку говорять про інгібітори пенетрації та депротейнізації вірусу, транскрипції вірусного геному, вірус специфічних ДНК- та РНК-полімераз, вірусних поліпептидів або біформації комплексних вірусних антигенів; у другому – йдеться про речовини, що впливають на біологічно активні субстанції, які приймають участь у механізмі внутрішньоклітинної репродукції вірусу. Сюди ж можна віднести речовини, які впливають на уражені вірусом клітини, сприяючи їх елімінації організмом [95].

Противірусні речовини – це препарати синтетичного або природного походження, які упереджують та/або пригнічують життєдіяльність усієї мікропопуляції вірусу у біологічній системі [96, 97]. Такі препарати, за думкою російських вчених [98], які були розроблені раніше, можна розділити за хімічним складом, механізмом дії, спектром активності та подовженістю клінічної дії на три великі групи: 1. хіміопрепарати; 2. інтерферони та індуктори інтерферону [99]; 3. імуномодулятори [100].

У процесі пошуку та створення противірусних препаратів досліджують та випробовують значну кількість сполук [101-103]. Основні класи противірусних препаратів представлені аномальними нуклеозидами, похідними адамантану і тіосемікарбазонів, синтетичними амінокислотами, аналогами пірофосфату та іншими вірусцидними препаратами [104].

Загальний механізм дії аномальних нуклеозидів полягає у тому, що вони гальмують синтез нуклеїнових кислот згідно принципу антиметаболізму, тобто внаслідок властивостей взаємодіяти у біохімічних реакціях, аналогічно природним продуктам, які вони імітують. Для виявлення противірусної дії необхідна метаболізація цих препаратів до нуклеотидів. Антиметаболічна дія більшості цих сполук у клітині починається на стадії фосфорилування їх вірус-специфічною тимідинкіназою (щодо вірусів герпесу та віспи), яка має більшу спорідненість до них, ніж до тимідину. Фосфорилування відносно інших представників цього класу може

здійснюватися клітинними ензимами, що також призводить до селективної інгібуючої дії на віруси. До аномальних аналогів нуклеозидів відносять 5-йод-2 дезоксиуридин (йодоксуридин, еманіл, герплекс) протівірусний препарат для місцевого використання при герпес-вірусних кератитах [105, 106].

Інгібуючу дію у відношенні до ДНК-геномних вірусів (герпес-, покс- та аденовірусів) проявляє 5-трифторметил-2-дезоксуридин (5-трифторметилтимидін), який є аналогічним до йодоксуридину [107, 108]. Відміна полягає у тому, що цей препарат фосфорилується у 12-15 разів швидше, ніж йодоксуридин. Крім того, більшість вірусіндукованих білків не синтезуються у присутності цього препарату.

Ефективним відносно вірусів простого герпесу 1-го та 2-го типів, зостеру та псевдосказу є (Е)-5-(2-Бромвініл)-2 дезоксиурідин [109]. Він має високу ефективність при місцевому (у вигляді мазі) та системному (підшкірно, перорально) застосуванні.

Інгібуючу дію відносно ДНК-геномних вірусів (герпес вірусів, вакцини, аденовірусів 2-го, 7-го та 12-го типів та ін.) проявляє 1-бета-D-арабінофуранозилцитозин, який використовують також у хіміотерапії пухлин як цитотоксичний препарат. Його дія може бути пояснена впливом цього препарату на вірус специфічну ДНК-полімеразу [110].

Досить виражену протівірусну дію мають також пуринові аналоги нуклеозидів. Широкий спектр протівірусної активності відносно ДНК-геномних вірусів (герпес вірусів, осповакцини, цитомегаловірусу, аденовірусу 3-го типу) має 9-бета-D-арабінофуранозиладенін (відарабін) [106]. У США він використовується для лікування герпетичних енцефалітів.

Ще один препарат цієї групи – 1-бета-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбосамід (рибавірин або віразол) характеризується досить широким спектром протівірусної активності [111]. Клінічні спостереження показали ефективність рибавірину при корі, при лікуванні герпетичних інфекцій: генітального герпесу, оперізуючого лишая [112].

Найбільш відомим з цієї групи є ациклічний нуклеозидний аналог гуаніну – 9-(2-гідроксиетоксиметил)-гуанін (ацикловір або зовіракс), який у медичній практиці використовують як протигерпетичний засіб [113-115].

Ацикловір проникає переважно у інфіковану вірусом клітину, де під впливом вірус специфічної тимідин-кінази фосфорилується з утворенням моно-, ди- та трифосфату, що є активними формами. Цей препарат використовують для лікування усіх форм герпетичної інфекції [116]. Його виражена протигерпетична активність, мала токсичність, наявність декількох лікарських форм дозволяють широко та ефективно використовувати препарат в медичній практиці [117]. До недоліків препарату слід віднести досить швидке формування резистентних до нього штамів вірусу герпесу [118, 119].

Безсумнівним досягненням хіміотерапії вірусних інфекцій є відкриття протівірусної активності серед сполук класу адамантану. Найбільш дослідженими представниками цього класу є хіміопрепарати амантадин (1-аміноадамантан) та ремантадин (альфа-метил-1-адамантанметиламін гідрохлорид) [120-122]. Ці препарати є селективними інгібіторами вірусу грипу А. Встановлено, що гальмуюча дія сполук адамантану відбувається на ранніх етапах взаємодії вірусу з клітиною. Ні адамантан, ні ремантадин не спричиняли віруліцидної дії на вірус грипу, а також не впливали на адсорбційну властивість вірусу у чутливих клітинах [120].

Деякі сполуки класу тіосемікарбозонів мають інгібуючу активність щодо вірусів групи віспи. Найбільш дослідженим є N-метилізатин-бета-тіосемікарбазон (метисазон), який є універсальним інгібітором репродукції поксвірусів та використовується як засіб екстреної профілактики віспи та лікування поствакцинальних ускладнень [123]. Метисазон впливає на пізню стадію репродукції вірусу, інгібуючи синтез пізніх інформаційних РНК та утворення полірібосом [123].

Протівірусну активність мають також аналоги пірофосфату, зокрема, фосфоноацетат, фосфоноформат, які виявляють протівірусну активність щодо вірусів герпесу [124].

Аналоги бензімідазолу: 2-(альфа-Осибензил)-бензімідазол та 2-аміно-1 (ізопропілсульфонія)-6-бензімідазол-феніл-кетон-окси активно інгібують реплікацію пікорнавірусів [125, 126].

Арілдон (4-[6- (2-хлоро-4-метокси) фенокис] –гексил- 3, 5 - гентадіон) та його піразольний похідний (4-[6- (2-хлоро-4-метокси) фенокис] –гексил- 3,

5 – диетіл-1-Н-піразолметон-сульфонат) у розчині диметилсульфоксиду виявляли виражену терапевтичну дію при місцевому застосуванні на лабораторних тваринах щодо вірусів герпесу першого та другого типу [104].

Широко відомі також противірусні препарати оксиліт, теброфен, флореналь, які використовують для місцевого лікування вірусних захворювань очей та шкіри. Особливістю механізму дії цих препаратів є те, що вони мають віруліцидну дію, тобто інактивують позаклітинний вірус, тому їх неможна віднести до дійсно противірусних препаратів [104].

Інший перспективний напрямок пошуку противірусних препаратів полягає у створенні науково обґрунтованої технології, яка дозволить послідовно проводити конструювання сполук, спрямований їх синтез і раціональний відбір перспективних речовин з високою противірусною активністю на основі аналізу кількісного зв'язку “структура-активність” (QSAR). Більшість нових претендентів в лікарські засоби виявляють за допомогою одного з трьох підходів:

- хімічної модифікації відомих молекул;
- скринінгу біологічної активності великої кількості природних сполук та їх модифікацій;
- спрямованого синтезу (раціональний дизайн), що ґрунтується на розумінні біологічних механізмів, а також хімічній структурі та фізико-хімічних властивостях досліджуваних сполук.

Останній підхід є найбільш ефективним і перспективним. Він базується на QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) дослідженнях, які реалізуються через ряд етапів:

- Формування навчальної вибірки – підбір сполук з відомими характеристиками досліджуваної біологічної активності.
- Опис та верифікація параметрів біологічної активності (використовують номінальну, рангову або інтервальну шкалу).
- Розрахунок структурних характеристик досліджуваних сполук – оцінка параметрів, які описують склад, будову (топологію), просторову та електронну структуру молекул.

- Розробка моделей “структура - активність” на основі різноманітних методів математичної статистики.
- Оцінка адекватності отриманих моделей методами ковзного контролю та на основі екзаменаційної вибірки (сполуки відомої активності, які не входили до навчаючої вибірки).
- Виявлення закономірностей впливу структурних параметрів молекул на виявлену специфічну біологічну активність.
- Молекулярний дизайн нових перспективних сполук на основі виявлених закономірностей.

Підсумком усього процесу конструювання є нові молекулярні структури, які потенційно мають комплекс необхідних властивостей (зокрема, противірусну активність). Після спрямованого синтезу експериментально досліджують рівень специфічної активності, який у 90% відповідає прогнозованій [127]. Таким чином, значно скорочується термін пошуку речовин з певною противірусною активністю, а також економічні витрати, пов’язані з цим.

Крім того, доцільним є пошук речовин з противірусними властивостями і серед відомих фармакологічних препаратів. Слід підкреслити, що медикаментозні засоби, які зазвичай використовуються за іншим призначенням, при виявленні їх противірусної активності, можна застосовувати при лікуванні вірусної патології як при монотерапії, так і при комбінуванні їх з іншими засобами [128]. У цьому випадку для скорочення термінів відбору перспективних сполук також дуже перспективним є використання QSAR технологій.

1.3.1. Характеристика хіміопрепаратів, які застосовуються при грипі

Заклади охорони здоров’я розробили систему заходів у боротьбі з грипом, яка містить профілактичні щеплення, протиепідемічні міри в осередках грипу, ранню терапію грипу, організацію допомоги вдома, госпіталізацію за клінічними показниками тощо [8, 16, 48, 54, 62, 129]. Серед лікарських засобів, що використовуються при грипі, пріоритет належить етіотропним препаратам, дія яких спрямована безпосередньо на збудника

інфекції. Ці препарати доцільно розглядати з урахуванням місця втручання їх у цикл репродукції вірусу грипу.

Найбільш поширені хіміотерапевтичні препарати, що застосовують при грипі, це речовини, які є блокаторами M_2 - каналів (наприклад, амантадин, ремантадин). Противірусний ефект цих препаратів реалізується шляхом гальмування процесу синтезу M -білку вірусу грипу, що призводить до порушення усього процесу репродукції та збирання повноцінних віріонів [130]. Відомо, що для ациклічних похідних, які є аналогами амантадину та ремантадину, противірусна активність зростає з ускладненням будови карбоциклу [127, 131]. На базі ремантадина створений новий препарат „Полірем”, який представляє його полімеризовану форму. Однак, ці препарати є досить токсичними, а, крім того, до них швидко розвивається резистентність вірусів, що обмежує їх використання [132-134].

Інша група - інгібітори нейрамінідази (озельтамівір, занамівір або таміфлю), які блокуючи ключовий фермент сіалідазу, руйнують можливість проникнення вірусу до здорових клітин хазяїна, а також вихід віріонів з інфікованих клітин, що гальмує процеси розвитку інфекції [135-137].

При етіотропному лікуванні грипу та інших ГРВІ часто використовують хіміопрепарати, які є активними й при інших вірусних патологіях – це рибавірин, плеконарол, аміксин.

Аміксин (тилорону дигідрохлорид) – це вітчизняний препарат, що був синтезований в Одеському фізико-хімічному інституті ім.Богатського, відноситься до класу флуоренів і є першим пероральним індуктором ендогенного інтерферону. Він впливає на Т-клітини, стимулюючи в них синтез пізнього інтерферону (16-18 годин), який підтримується в терапевтичних концентраціях у крові на протязі тривалого часу. Водночас з м'яким імуностимулюючим ефектом, аміксин безпосередньо спричиняє пряму противірусну дію, тобто є полімодальним противірусним препаратом широкого спектру дії, у тому числі при грипі, ГРВІ, герпесі, гепатитах В і С та ін. [99].

Оскільки протеолітичне нарізання є універсальним механізмом активації різноманітних специфічних білків, у тому числі – вірусних [7], а для набуття

вірусом інфекційних властивостей гемаглютинін вірусу грипу (НА) повинен пройти етап протеолітичного нарізання, в медичній практиці при лікуванні грипу знайшли використання інгібітори протеолізу. Дія цих препаратів пов'язана з гальмуванням протеолітичних процесів, до них відносяться апротинін, Е-амінокапронова кислота (Е-АКК), пара-амінобензойна кислота (амбен) та інші. Інгібітори протеолізу можуть використовуватись при лікуванні інфекцій, що спричинені не тільки вірусом грипу, але й іншими ортоміксовірусами, а також параміксо-, ретро-, герпес-, флаві-, пікорна-, тогавірусами, оскільки для їх циклу репродукції також притаманний протеолітичний процесінг. Протигрипозна активність інгібіторів протеолізу Е-АКК та амбену була продемонстрована у багатьох дослідженнях, проведених в лабораторії біохімії Одеського науково-дослідного інституту вірусології та епідеміології ім.І.І.Мечникова.

Відомо, що субодиниця гемаглютиніну – НА1, яка забезпечує специфічну адсорбцію вірусу на зовнішній мембрані чутливих клітин, та НА2, яка відповідає за проникнення вірусу до клітини, - після нарізання поєднані між собою тільки дисульфідним містком [62]. Оскільки офіційний препарат унітіол (2,3-дімеркаптопропансульфонат натрію), що використовується у медичній практиці як антидот, має у своїй хімічній структурі дві активні SH-групи і є активним відновлювачем дисульфідних зв'язків, можна сподіватись, що він буде впливати на гемаглютинін вірусу грипу, що може забезпечити протигрипозний ефект.

Інтерес до декаметоксину і етонію як до противірусних засобів пов'язаний з низкою міркувань. По-перше, обидва препарати є біс-четвертинними солями амонію. Відомо, що солям амонію, зокрема хлориду амонію, притаманна антивірусна активність, яка обумовлена їхніми лізосомотропними властивостями [6]. Такі речовини, зокрема хлорид амонію, можуть накопичуватися у лізосомах та піднімати рівень рН вище рівня, при якому можливе „роздягання” вірусу грипу. При додаванні цих речовин на ранніх стадіях інфекції не спостерігається гальмування ані зв'язування вірусу, ані його проникнення до клітин, але врожай вірусу суттєво зменшується [6]. Такий механізм притаманний, наприклад, мірамістину. Окрім того,

протівірусну активність можна передбачати через їхні детергентні властивості, які будуть перешкоджати взаємодії вірусу з клітинною поверхнею та/або руйнувати віруси.

Тому для дослідження протигрипозної дії були обрані саме декаметоксин, етоній та унітіол, які зазвичай в медичній практиці використовуються за іншим призначенням.

1.3.2. Проблема розробки протигерпетичних засобів

Не дивлячись на значні успіхи в розробці протигерпетичних препаратів, до цього часу не знайдені лікарські засоби радикального лікування герпетичних інфекцій. Тому проблема створення антивірусних засобів для терапії герпетичної інфекції залишається важливим завданням біомедичної науки сучасності [138, 139]. Жоден з сучасних протигерпетичних препаратів не запобігає ані переходові вірусу до латентного стану, ані виникненню рецидивів після їх приймання, ані передачі інфекції. Однак, зменшення гостроти захворювання та подовження періодів ремісії захворювання безперечно є досягненням протигерпетичних препаратів [73].

У зв'язку із здатністю ВПГ-інфекції до персистування в організмі, лікувальні заходи, спрямовані на гальмування репродукції ВПГ у період загострення, а також на формування адекватної імунної відповіді з метою профілактики рецидивів. Таким чином, виходячи з основних клінічних задач, які полягають у: скороченні строків реепітелізації; профілактиці рецидивів, зменшення їх частоти і важкості та у попередженні передачі інфекції статевому партнеру або новонародженому, - при лікуванні ВПГ-інфекції використовують такі групи лікарських засобів:

- препарати, що гальмують реплікацію вірусу (ацикловір та його аналоги, гліцирзінова кислота);
- інтерферони;
- індуктори інтерферону (аміксин);
- імуномодулятори з урахуванням результатів імунологічного дослідження (глутаміл-триптофан, поліоксидоній та ін.);

- препарати для місцевого використання (мазі, які містять ацикловір, фоскавір; гліцирзінова кислота, бонафтон);
- антиоксиданти, полівітаміни, ентеросорбенти.

Значним досягненням було створення препаратів протигерпетичної спрямованості, які відносяться до класу модифікованих нуклеозидів, а саме ациклических пуриновмісних нуклеозидів. На сьогодні у клінічній практиці використовують як протигерпетичні засоби ацикловір, валцикловір, фамцикловір (пенцикловір), ганцикловір, ефективність яких була продемонстрована у численних рандомізованих клінічних дослідженнях [73, 140].

Механізм дії ацикловіра та його аналогів полягає у інгібуванні тимідинкінази вірусу, що призводить до гальмування процесу реплікації взагалі [141]. Але ацикловір має погану біодоступність, та в процесі лікування може виникати резистентність до препарату. Механізм виникнення резистентності пов'язаний із модифікацією структури тимідинкінази і мутацією генів, які кодують структури ДНК-полімерази [106, 142-146], а також із зниженням активності або відсутністю вірусної тимідинкінази, ушкодженням субстратної специфічності цього ферменту [147].

Ці вади намагалися вирішити під час синтезу похідних ацикловіру (валцикловіру, ганцикловіру та інших), підвищуючи їх біодоступність та знижуючи формування резистентності [148]. На основі ацикловіру розроблений препарат другого покоління валцикловір, який є L-валіновим ефіром ацикловіру. Перевагою валцикловіру у порівнянні з ацикловіром є те, що його оральний прийом утворює концентрації ацикловіру у сироватці крові та інших внутрішніх середовищах еквівалентні до тих, що можна досягти тільки внутрішньовенним введенням ацикловіру. Саме це дозволяє пацієнту зменшити кількість прийомів препарату під час рецидиву до 2-х разів на добу (у протилежність до ацикловіру, який приймають 5 разів на день), а під час супресивної терапії валцикловір приймають 1 раз на день.

Фамцикловір трансформується в організмі у активну противірусну сполуку – пенцикловір, який проявляє ефект у відношенні до ВПГ-1, ВПГ-2

та інших герпес-вірусів. Пенцикловір потрапляє до інфікованих ВПГ клітин, де під впливом вірусної тимідинкінази він перетворюється на трифосфат.

Ацикловір, валцикловір та фамцикловір є засобами „швидкої допомоги” при будь-яких формах герпесу. Однак ці препарати під час взаємодії з тимідинкіназою герпесвірусів, спричиняють опосередкований вірус-остаточний ефект, обмежуючи універсальність їх дії на штами ВПГ з генетично зміненою тимідинкіназою. Тому цей список слід доповнити фоскарнетом, який є конкурентним інгібітором пірофосфату, що має широкий спектр протівірусної активності, пригнічуючи ДНК-полімеразу герпесвірусів [149]. Разом з тим, необхідно підкреслити, що цей фосфорвміщуючий препарат має більшу токсичність, ніж ацикловір, що, можливо, буде обмежувати його використання.

Відомий цілий ряд препаратів з різним механізмом протівірусної дії, які можна використовувати при герпесі: бривудін, рібамідил, метисазон. Але вони значно поступаються в терапевтичній ефективності ацикловіру.

Добре відомо, що ВПГ має в своєму складі вірус-специфічну протеазу, яка здійснює нарізання деяких вірусних білків. При вивченні протигерпетичної дії інгібіторів протеолізу Е-амінокапронової (Е-АКК) та пара-амінометилбензойної (ПАМБА) кислот, ці препарати виявили протигерпетичну активність [150, 151].

Існує патент на винахід, в якому виявлено протигерпетичну активність 1,2-дитіол-3-пропілсульфонат натрію на культурі клітин *Vero* та протівірусну активність цього препарату у відношенні до ВІЛ на клітинах COS [152]. Тому, ми вважали за доцільне дослідження протигерпетичної активності, як у офіційного препарату унітіолу, який по суті є розчином 1,2-дитіол-3-пропілсульфонат натрію, так і препаратів декаметоксину та етонію, що використовуються за іншим призначенням.

Таким чином, результати проведеного аналізу літературних даних свідчать про доцільність дослідження протівірусної активності по відношенню до вірусів грипу та герпесу фармакологічно відомих препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу, що використовуються за іншим призначенням.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Культури клітин: фрагменти хоріон-алантоїсної оболонки 11-14-добових курячих ембріонів (ХАО), первинно-трипсинізована культура клітин курячих фібробластів (ФЕК); перещеплювана культура Нер-2 – клітин карциноми гортані людей, високочутлива до герпесвірусів, отримана з Банку клітин культур лабораторії репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України; перещеплювана культура клітин нирок кролів RK13, високочутлива до герпесвірусів, отримана з Банку клітин культур лабораторії якості біологічних препаратів Державної установи Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім.Л.В.Громашевського.

Експериментальні тварини: самці білих безпородних мишей вагою 10-12г та 18-22г загальною кількістю 704.

Віруси: в роботі використані високо вірулентний для мишей штам вірусу грипу А/PR/8/34 (H₁N₁), штам вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) та штам вірусу грипу В/Ленінград/17/86 з колекції музею лабораторії імунобіологічних та хіміотерапевтичних препаратів Українського науково-дослідного протичумного інституту ім.І.І.Мечникова, який є правонаступником музею лабораторії біохімії Одеського науково-дослідного інституту вірусології та епідеміології ім.І.І.Мечникова, надані Всесоюзним інститутом грипу (Санкт-Петербург, Росія).

Використані в роботі віруси грипу птахів H₅N₃ і H₇N₃, які були надані в колекцію музею лабораторії імунобіологічних та хіміотерапевтичних препаратів Українського науково-дослідного протичумного інституту ім.І.І.Мечникова ООО “Відродження М”, м. Одеса, задепоновані сектором депонування наукового центру штамів мікроорганізму Державного науково-контрольного інституту біології штамів мікроорганізмів (Київ, Україна).

Використані в роботі віруси простого герпесу (ВПГ) 1 та 2 типів з колекції музею Українського науково-дослідного протичумного інституту ім.І.І.Мечникова були отримані з колекції заводу „Біопром - Одеса”.

Препарати: в роботі були використані декаметоксин (ФС 42У-46-152-97) і етоній [153] виробництва експериментального заводу при Інституті органічної хімії НАН України та унітіол [153] виробництва ICN “Октябрь” (Санкт-Петербург, Російська Федерація).

2.1. Фізико-хімічні властивості та фармакологічні характеристики офіційних препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу

Декаметоксин (Decamethoxinum).

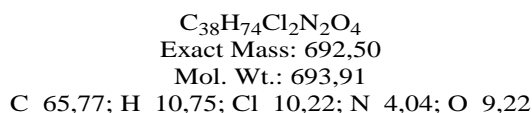
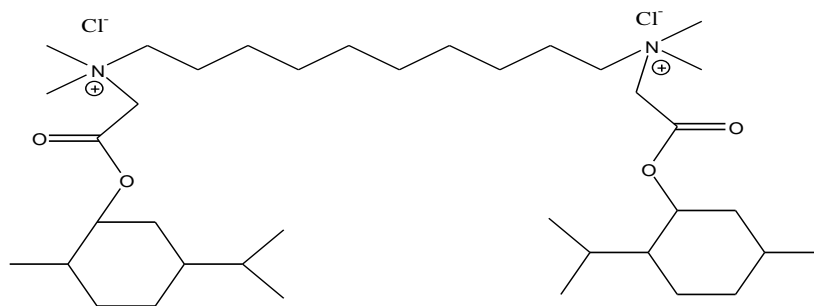


Рис.2.1. Хімічна структура декаметоксину

Сучасний високоактивний і швидкодіючий препарат. Застосовується у вигляді водних, спиртових, водно-спиртових та гліцеринових розчинів. Не подразнює шкіру і слизові оболонки. Приємний і зручний для використання.

Опис активної речовини. Білий дрібнокристалічний порошок зі слабким характерним запахом, 1% розчини безбарвні і прозорі; рН 1% розчину – від 5,5 до 7,5.

Характеристика активної речовини. Декаметоксин 1, 10-декаметилен-біс (N, N-диметил-ментоксикарбонілметил) - амонію дихлорид належить до четвертинних амонієвих сполук. Він є катіонною поверхнево активною речовиною (ПАР), містить L-ментол, який одержують з м'яти.

Особливі вказівки. Декаметоксин є катіонною ПАР і тому він несумісний з милами та іншими аніонними сполуками. В концентрованих розчинах хлориду натрію не розчиняється.

Фармакологічні властивості. Антибактеріальний та противогрибковий препарат. Справляє виражений бактерицидний вплив на стафілококи, стрептококи, дифтерійну та синьогнійну палички, капсульні бактерії та фунгіцидну дію на дріжджі, дріжджоподібні гриби, збудники епідермофітії, трихофітії, мікроспорії, деякі види міксоміцетів (аспергіли, пеніцили). Високоактивний відносно мікроорганізмів, стійких до пеніциліну, левоміцетину, стрептоміцину, мономіцину, канаміцину, неоміцинів, новобіоцину, еритроміцину та олеандоміцину. Утворення стійких до декаметоксину форм відбувається дуже повільно і не перевищує ефективних концентрацій препарату в лікарських формах. Концентрації, в яких препарат проявляє бактериостатичні (фунгістатичні) властивості, близькі до його бактерицидних (фунгіцидних) концентрацій. В процесі лікування декаметоксином підвищується чутливість антибіотикорезистентних мікроорганізмів до антибіотиків.

Показання до застосування. Препарат широко застосовують з метою профілактики та в лікувальній практиці для антисептичного оброблення в хірургії, анестезіології, інтенсивній терапії, гінекології, акушерстві, урології, дерматології, стоматології, отоларингології, офтальмології.

Спиртові розчини використовуються для знезаражування операційного поля і шкіри рук медичного персоналу, який оперує. Водні й спиртові розчини можна застосовувати перед стоматологічними процедурами.

Водні розчини придатні для антисептичного оброблення ран і опіків, для промивання порожнин тіла. Вони знаходять широке застосування в профілактиці інфекцій сечових шляхів, при акушерських та гінекологічних операціях.

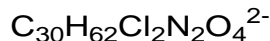
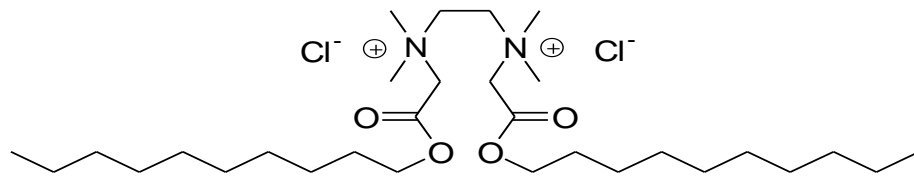
Побічні явища. Декаметоксин в концентраціях, які застосовують в медичній практиці, нетоксичний. Середня летальна доза для пацюків при

пероральному введенні становить 420 мг/кг маси. Тривале застосування препарату не викликає будь-яких алергічних реакцій. Дуже рідко можлива індивідуальна несприйнятливність.

Протипоказання. Індивідуальна надчутливість.

Форми випуску – різні: таблетки септефріл, у вигляді 0,02% і 0,05% водних розчинів, у вигляді мазі – палісепту, присипки та ін. [154].

Етоній (Aethonium).



Exact Mass: 584,41

Mol. Wt.: 585,73

C 61,52; H 10,67; Cl 12,11; N 4,78; O 10,93

Рис.2.2. Хімічна структура етонію

Біс-четвертинна амонієва сполука. Має солюбілізуючі та емульгуючі властивості.

Опис активної речовини. Етоній – білий легкий порошок, не гігроскопічний у повітрі, добре розчинюється у воді, спирті, важко – у бензолі, ефірі, ацетоні, хлороформі.

Фармакологічні властивості. Бактеріостатичний і бактерицидний засіб, що детоксикує діє на стафілококовий токсин, сприяє регенерації ушкоджених тканин. Має також місцево анельгізуючу дію.

Показання до застосування. Опіки шкіри і слизової оболонки; тріщини сосків, прямої кишки та промежини, сверблячі дерматози, трофічні виразки, карієс, пародонтит, пульпіт.

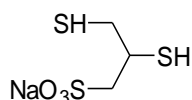
Спосіб застосування та дози. Зовнішньо у вигляді 0,02-1% розчинів або 0,5-1% мазей. Пасту використовують при пломбуванні зубних каналів і порожнин. Для лікування виразок рогівки, кератитів застосовують 0,1% розчин етонію по 1-2 краплі 3 рази на день протягом не більше ніж 10 днів.

Побічна дія. Гіперемія, свербіж.

Протипоказання. Гіперчутливість, гнійні та гангренозні форми пульпіту.

Форма випуску. Порошок; 0,5% та 1% мазь, 7% паста [154].

Унітіол (Unithilum).



Exact Mass: 209,95

Mol. Wt.: 210,27

C 17,14; H 3,36; Na 10,93; O 22,83; S 45,75

Рис.2.3. Хімічна структура унітіолу

Опис активної речовини. Білий або дещо жовтуватий дрібно кристалічний порошок з легким запахом меркаптану. Легко розчиняється у воді, слабше у спирті. Розчин препарату – незабарвлена або слабо рожева прозора рідина з легким запахом меркаптану; рН 5% розчину складає 3,1-5,5.

Характеристика активної речовини. 2, 3-Димеркаптопропансульфонат натрію – синтетичний препарат, який як антидот призначений для лікування при отруєнні сполуками миш'яку та ртуті. За будовою та фармакологічними властивостями є близьким до дитіогліцерину або 2,3-димеркаптопропанолу, що відомий як британський антилюїзит.

Протипоказання. Препарат протипоказаний при тяжких захворюваннях печінки, стійкому підвищенні артеріального тиску та гіпертонічній хворобі.

Фармакологічні властивості. Препарат малотоксичний та має великий спектр терапевтичної дії. При місцевому використанні не викликає подразнень. Серед механізмів лікувальної дії унітіолу при отруєннях головне значення має зв'язування отрути, що циркулює в крові, та витіснення її з тканинних білків шляхом утворення нетоксичних сполук та подальшого видалення їх з організму.

Показання до застосування. Використовують для лікування гострих та хронічних отруєнь сполуками миш'яку (препарати групи новарсенол, осарол, миш'яковистоокислий та миш'яковоокислий натрій та інші), ртуті, хрому, вісмуту та інших металів, які можуть реагувати з сульфгідрильними (тіоловими) групами ферментів та інактивувати їх. Менш активний при отруєнні свинцем.

Побічні явища. Зазвичай унітіол добре переноситься. В окремих випадках може виникати нудота, тахікардія, блідість обличчя, запаморочення. Ці явища проходять самі по собі.

Протипоказання. Препарат протипоказаний при тяжких захворюваннях печінки, стійкому підвищенні артеріального тиску та гіпертонічній хворобі.

Форма випуску. 5% розчин в ампулах по 5 мл [153].

2.2. Методи визначення токсичності досліджуваних препаратів

Токсичність досліджуваних препаратів визначали за їх впливом на життєдіяльність культури інфузорій *Colpoda steinii* виробництва підприємства „Відродження-М”. Цитотоксичну дію декаметоксину, етонію та унітіолу вивчали на перещеплюваних культурах клітин RK13 і Нер-2, первинно трипсинізованій культурі курячих фібробластів (ФЕК) за впливом на моношар культури клітин. Через 48 годин після засівання первинно-трипсинізованих клітин, або пересіву перещеплюваних культур клітин (RK13 і Нер-2) до флаконів із сформованим моношаром клітин вносили певні розведення досліджуваних препаратів на середовищі, на якому культивували дані клітини. У контрольних зразках до клітин додавали тільки середовище підтримки. Через 24, 48 та 72 години у світловому мікроскопі визначали цитотоксичну дію речовин, оцінюючи її за порушенням цілісності моношару, появою вогнищ дегенерації клітин. Ступінь токсичності визначали через 72 години за 4-хрестовою системою і знаходили максимально переносиму концентрацію препаратів (МПК), що не проявляє токсичної дії [155].

Визначення цитотоксичної дії декаметоксину, етонію та унітіолу проводили також за визначенням здатності досліджуваних препаратів пригнічувати життєздатність клітин калориметричним методом [156]. До моношару культури клітин ФЕК у флаконах додавали двократні розведення препаратів на підтримуючому середовищі 199 та інкубували при 37°C на протязі 48-72 годин. У якості контролю використовували флакони з моношаром культури клітин ФЕК з підтримуючим середовищем 199 без препаратів. Через певний термін (48 або 72 години) проводили підрахунок життєздатності клітин, використовуючи нейтральний червоний, який додавали після інкубації культури клітин з препаратом до підтримуючого середовища, що містило (дослід) або не містило (контроль) препарат, у кінцевій концентрації $1,5 \times 10^{-5}$ г/мл. Після 2 годин інкубації при 37°C середовище з флаконів видаляли, клітини двічі промивали розчином Хенксу. При відсутності токсичного ефекту клітини засвоювали вітальний барвник. Далі флакони з культурою екстрагували спиртом, а після доведення рН до 4,2 визначали вміст нейтрального червоного в контрольних та дослідних зразках у фотоелектрокалориметрі при 540 нм. Концентрація препарату, що викликала засвоєння барвника на 50% у порівнянні з контролем, вважалася цитотоксичною дозою ЦТД₅₀.

Крім того, проводили визначення токсичності досліджуваних препаратів на культурі тканини хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) 11-14-добових курячих ембріонів. Для розведення препаратів на глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі вносили до лунок полістиролових панелей, де розміщували фрагменти хоріон-алантоїсних оболонок на шкаралупі, використовуючи по 4 лунки на одне розведення. Контролем були лунки, що містили фрагменти хоріон-алантоїсних оболонок на шкаралупі і глюкозо-желатинове підтримуюче середовище. Панелі розміщували в термостаті при 37°C та перевіряли стан клітинного шару на протязі 48 годин, відмічаючи наявність чи відсутність дегенерації клітин ХАО візуально. Мінімальною

токсичною дозою була найменша концентрація препарату, що викликала загибель 50 та більше відсотків фрагментів ХАО [157].

Гостру токсичність досліджуваних препаратів визначали при інтраназальному введенні їх під легким ефірним наркозом білим безпородним мишам.

2.3. Вірусологічні методи

2.3.1. Визначення противірусної активності декаметоксину, етонію та унітіолу у відношенні ВПГ-1 на культурах клітин

Ефективність протигерпетичної дії препаратів у відношенні вірусу простого герпесу 1 типу вивчали *in vitro* на культурі клітин Нер-2 з використанням цитоморфологічного методу за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Цей метод заснований на визначенні зменшення під впливом препарату проценту клітин, що містять внутрішньоядерні вірус-специфічні включення.

ВПГ-1 розводили таким чином, щоб у клітинах Нер-2 утворювалось не менше 50-80% вірус-специфічних внутрішньоядерних включень. Концентрацію інфекційного вірусу розраховували методом Weber (1972) в модифікації Л.М.Носач і Н.С.Дяченко [158]. Препарати розчиняли в стерильних умовах у середовищі 199. На цьому середовищі, що містило (дослід) або не містило препарат (контроль) розводили вірусвміщуючу рідину. Контрольні та дослідні зразки витримували в термостаті при 37°C на протязі 48 годин, після чого скельця фіксували 96° етиловим спиртом. Далі їх фарбували розчином акридинового оранжевого у кінцевій концентрації 0,01% та підраховували відсоток клітин з внутрішньоядерними включеннями під люмінесцентним мікроскопом зі збільшенням 40x8.

Відсоток інгібування утворення внутрішньоядерних включень розраховували за формулою:

$$AII = \frac{K - D}{K} \times 100\% ,$$

де AP - % інгібування препаратом утворення внутрішньоядерних включень (ВЯВ);

K – кількість внутрішньоядерних включень у контрольних зразках;

D – кількість внутрішньоядерних включень в присутності препарату (дослід).

Дослідження протигерпетичної активності препаратів *in vitro* у відношенні до ВПГ-1 проводили на культурі первинно-трипсинізованих клітин фібробластів курячих ембріонів (ФЕК). Культуру клітин готували стандартним методом [159].

Для визначення мінімальної активної концентрації (МАК) 2-добову культуру клітин ФЕК інфікували розведенням ВПГ-1 100 ТЦД₅₀/0,1 мл в розчині робочої дози досліджуваного препарату, інкубували на протязі 1 години при 37°C. Після цього додавали підтримуюче середовище 199 з 2% сироватки рогатої худоби, що містила (дослід) або не містила (контроль) відповідну концентрацію досліджуваних речовин. Через 48 годин інкубування при 37°C контрольні та дослідні флакони з тканиною заморожували при -20°C, та після розморожування у надосадовій рідині визначали інфекційний титр матеріалу. Для цього 10-кратними розведеннями матеріалу інфікували 2-добову культуру клітин ФЕК. На протязі 48 годин реєстрували цитопатичну дію через дегенерацію клітин та розраховували титр вірусвміщуючого матеріалу методом Кербера:

$$\lg TID_{50} = L - d(S - 0,5),$$

де L – початкове розведення у досліді;

d – різниця між послідовними \lg розведень;

S – сума пропорцій тест-об'єктів, які дали позитивний результат.

Індекс селективності (індекс селективності) визначали за співвіднесенням мінімальної активної концентрації препаратів до максимальної нетоксичної концентрації.

2.3.2. Визначення противірусної активності декаметоксину, етонію та унітіолу у відношенні ВПГ-2 на культурах клітин RK13

Противірусну активність досліджуваних препаратів по відношенню до вірусу простого герпесу 2 типу вивчали *in vitro* на культурі клітин RK13 (клітини нирок кролів), що перевивається [160].

Для розрахунку індексу селективності досліджуваних препаратів спочатку визначали їх максимально переносиму концентрацію МПК на культурі клітин RK13, після чого проводили визначення мінімально активної концентрації (МАК) препаратів. З цією метою тест-вірус ВПГ-2 у дозі 100 ТІД₅₀/0,1 мл вносили до культури клітин нирок кролика RK13, що перевиваються, та інкубували на протязі 1 години при 37° С. Після адсорбції вірусу на клітинах його видаляли, клітини відмивали живильним середовищем 199, після чого до підтримуючого середовища (RPMI-1640 + 2% фетальної сироватки великої рогатої худоби) вносили препарати. Відсутність ЦПД у дослідних зразках, при наявності її у контролі, дозволяло виявити МАК – концентрацію препаратів, додавання якої гальмувало репродукцію вірусу герпесу у дослідних зразках на 2,0 Іg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем.

2.3.3. Визначення противірусної активності досліджуваних препаратів у відношенні вірусів грипу людей на культурі тканини ХАО

Противірусну 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 [160, 161], оскільки цю культуру можна вважати найбільш наближеною до рівня цілого організму, яким є курячий ембріон, ніж клітинна культура. Крім того, використання культури тканини ХАО є більш економічним методом у порівнянні з використанням курячих ембріонів для визначення противірусної дії препаратів.

Вплив досліджуваних препаратів на *репродукцію вірусів* грипу досліджували, розчинюючи їх у глюкозо-желатиновому підтримуючому середовищі. Вірус-вміщуючу рідину, з попередньо визначеним інфекційним титром, розводили у глюкозо-желатиновому середовищі, що містила (дослід),

або не містила (контроль) препарат. При цьому вміст вірусу повинен бути не нижчим за 100 ТІД₅₀. Середовище з розведенням вірусу додавали до фрагментів ХАО, яка прикріплена до шкарлупи, та розміщена у лунках полістиролових панелей. Після термостатування на протязі 72 годин при 34°C для вірусу грипу В у контрольних та дослідних зразках визначали кількість вірусу за реакцією гемаглютинації (РГА). Для вірусів грипу А після термостатування на протязі 24 годин при 37°C контрольні та дослідні зразки окремо поєднувалися, і в них визначали титр інфекційного вірусу. Тобто, десятикратними розведеннями цих зразків інфікували фрагменти ХАО, а після 48 годин термостатування при 37°C визначали титр вірусу за результатами РГА.

Віруліцидну дію препаратів на позаклітинний вірус грипу А визначали наступним чином. Вірус-вміщуючу рідину розводили до 10⁻⁴ на глюкозо-желатиновому середовищі, яке містило (дослід), або не містило (контроль) препарат у певній концентрації. Після цього зразки витримували при +4°C на протязі 20 годин, термостатували 2 години при 37°C і в них визначали інфекційний титр, заражаючи десятикратними розведеннями фрагменти ХАО, розташовані у полістирольних панелях. Після 48 годин термостатування при 37°C визначали титр вірусу в РГА. Для вірусу грипу В процедура була аналогічною, тільки температура термостатування складала 34°C.

Вплив препаратів на здатність культури тканини підтримувати репродукцію вірусів грипу А проводили таким чином. Фрагменти ХАО розташовували у полістиролових панелях та заливали глюкозо-желатиновим середовищем, що містило (дослід), або не містило (контроль) певну кількість препарату. Через 24 години термостатування при 37°C фрагменти тканини відмивали теплим глюкозо-желатиновим середовищем та інфікували вірусом в дозах 100-1000 ТІД₅₀. Ще через 24 години термостатування при 37°C вірус-вміщуючу рідину збирали, об'єднували окремо контрольні й окремо дослідні зразки і в них визначали титри інфекційного вірусу А, як це описано вище. Для вірусу грипу В схема була дещо інша. Після термостатування фрагментів ХАО при 34°C в присутності препарату (дослід) або без нього (контроль), їх відмивали теплим глюкозо-желатиновим середовищем та інфікували 10-

кратними розведеннями вірус-вміщуючої рідини від 10^{-1} до 10^{-6} . Після 72 годин термостатування при 34°C визначали титр вірусу в РГА.

2.4. Моделювання експериментальної грипозної інфекції у мишей

Протигрипозну дію препаратів на моделі експериментального грипу визначали за зниженням загибелі тварин на протязі 14 днів після інфікування [162]. Грипозну інфекцію у білих мишей моделювали внутрішньо назальним введенням по 0,05 мл вірус-вміщуючої рідини в 10-кратних логарифмічних розведеннях від 1×10^{-3} до 1×10^{-8} (штам А/PR/8/34). На кожне розведення вірусу використовували 4 миші. Тобто, кількість тварин в контрольних та дослідних групах була по 24 за кожною схемою використання препаратів.

Препарати вводили інтраназально під легким ефірним наркозом в об'ємі 0,05 мл згідно трьом схемам:

- профілактичній – на протязі двох днів до інфікування і в день інфікування (усього три дні);
- лікувально-профілактичній – за день, в день інфікування та три дні потому (усього п'ять днів);
- лікувальній – на протязі чотирьох днів після інфікування, починаючи введення препарату з наступного дня після зараження (усього чотири дні).

Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин (0,85% розчин NaCl) за відповідними схемами.

Після реєстрації кількості загиблих тварин у кожній групі розраховували ЛД₅₀ за формулою:

$$\lg \text{ЛД}_{50} = L - d(S - 0,5),$$

де L – початкове розведення інфікуючої дози;

d – різниця між послідовними \lg розведень;

S – сума пропорцій тест-об'єктів, які дали позитивний результат (тобто кількість загиблих тварин у відношенні до інфікованих однією дозою).

Порівнюючи летальність в групах контрольних та дослідних тварин розраховували середню тривалість життя у перерахунку на усіх піддослідних

тварин, коефіцієнт захисту дослідних мишей та індекс ефективності досліджуваних препаратів [160, 161].

У певні строки після інфікування у легенях експериментальних тварин визначали титр інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз [163]. Для цього тварин під ефірним наркозом знекровлювали, легені стерильно видаляли, готували з них 10% гомогенат, в якому визначали вищезазначені показники.

Титр інфекційного вірусу визначали на культурі тканин ХАО. З цією метою фрагменти тканини ХАО у полістиролових панелях інфікували 10-кратними розведеннями кожного з гомогенатів легенів, а через 48 годин термостатування при 37°C наявність вірусу грипу реєстрували за допомогою реакції аглютинації.

2.5. Визначення впливу досліджуваних препаратів на протеолітичну активність очищеного і концентрованого вірусу грипу, ізольованих плазматичних мембран та вірус-мембранного комплексу

Вивчення впливу декаметоксину, етонію та унітіолу на протеолітичні процеси під час вірус-мембранної взаємодії проводили на модельних експериментах з очищеним і концентрованим вірусом грипу A/PR/8/34 та ізольованими плазматичними мембранами чутливих клітин ХАО курячих ембріонів.

Очищення та концентрацію вірусу грипу A/PR/8/34 проводили, використовуючи методи диференційного і градієнтного центрифугування у градієнті концентрацій сахарози та гель-фільтрації на макропористому силохромі [163]. Контроль очищення вірусного матеріалу проводили спектрофотометричним методом за співвідношенням 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 Pristašova S. [164].

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. Протамінрозщеплювальну активність визначали шляхом розщеплення 1% розчину протамін сульфату натрію з виділенням вільного аргініну при рН 7,6 [165], як окремо у препаратах вірусу і мембран, так і після короткочасної взаємодії вірусу грипу з мембранами, під час якої утворювався вірус-мембранний комплекс.

2.6. Біохімічні методи дослідження

2.6.1. Визначення активності лужних та кислих протеаз у гомогенатах легенів мишей

Активність лужних протеаз визначали за стандартною методикою [165], використовуючи як субстрат 2% розчин казеїну на 0,2 М фосфатному буфері (рН 7,6). Термін інкубації при 37°C 4 години. Після чого проводили осаджування білків трихлоруксусною кислотою, центрифугували та в надосадовій рідині визначали наявність тирозин-вміщуючих продуктів гідролізу за стандартною методикою [166]. Калібрувальну криву будували, використовуючи розчин тирозину.

Активність кислих протеаз у гомогенатах легенів мишей визначали за стандартною методикою [165], використовуючи як субстрат 2% розчин гемоглобіну на 0,01 М ацетатному буфері (рН 5,0), який денатурують шляхом прогрівання на водяній бані при 100°C на протязі 5 хвилин безпосередньо перед проведенням досліду. Термін інкубації при 37°C 20 годин. Після чого проводили осаджування білків трихлоруксусною кислотою, центрифугували та в надосадовій рідині визначали наявність тирозин-вміщуючих продуктів

гідролізу аналогічно до визначенню активності лужних протеаз за стандартною методикою [166], використовуючи розчин тирозину для побудови калібрувальної кривої.

2.6.2. Визначення протамін-розщеплювальної активності у зразках очищеного вірусу, плазматичних мембран та вірус-мембранного комплексу

Протамін-розщеплювальну активність визначали за стандартною методикою [165] розщеплення 1% розчину протамін-сульфату на 0,05 М мєдиналовому буфері (рН 7,6) на протязі 30 хвилин при 37°C. Після цього терміну реакцію гальмували шляхом осаджування білків трихлоруксусною кислотою, центрифугували проби, додаючи послідовно розчини оксихіноліну, NaOH, NaBrO, сечовини, та визначали оптичну щільність фотокалориметрично при 508 нм. Кількість вільного аргініну визначали за допомогою калібрувальної кривої. Активність ферментів визначали з використанням формули:

$$A = \frac{(\text{дослід} - \text{контроль}) \cdot n \cdot 2}{0,1 \cdot T},$$

де A – активність ферменту в одиницях/мл (1 одиниця= 1 мкМоль),

n – розведення ферменту,

2 – коефіцієнт перерахунку усієї інкубаційної суміші,

0,1 – об'єм ферментативного зразку,

T – час інкубації у хвилинах.

2.7. Статистичні методи дослідження

Розрахунок ТІД₅₀ в експериментах *in vitro* та гомогенатах легенів, а також ЛД₅₀ у дослідях на мишах проводили за методом Кербера в модифікації Ашмаріна [167]. 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 вибірок (Р за К.З.) [168]. У разі, коли очікуваний результат спостерігався у п'яти випадках з п'яти пар дослідів, він вважався статистично значущим.

Статистична вірогідність впливу препаратів на біохімічні показники, отримані в експериментах *in vivo*, була проаналізована за допомогою t-критерію Стьюдента [169].

2.8. Математичні методи

Потенційні біологічні властивості у досліджуваних офіціальних препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу досліджували за допомогою відомих комп'ютерних технологій: PASS і QSAR. Для прогнозування противірусної активності досліджуваних препаратів був використаний 4D-QSAR підхід [170].

РОЗДІЛ 3. ВИЯВЛЕННЯ ТЕОРЕТИЧНО-ПРОГНОЗОВАНИХ ЗАСАД НАЯВНОСТІ ПРОТИВІРУСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ У ДОСЛІДЖУВАНИХ ПРЕПАРАТІВ

Для того, щоб знайти біологічний препарат з потенціальними лікарськими властивостями необхідно відібрати та вивчити значну кількість хімічних сполук. За статистикою, для створення нового лікарського засобу необхідно синтезувати та дослідити більш 10000 хімічних сполук. Пошук нових лікарських препаратів з використанням широкого „сліпого” скринінгу на сьогодні є не тільки економічно необґрунтованим, але й не ефективним. До того ж, багато синтезованих сполук, що мають певну біологічну активність виявляються в значній мірі токсичними. Тому визначення нових, досі не вивчених властивостей, зокрема противірусних, у лікарських препаратів, які вже застосовуються за іншим призначенням, певною мірою скоротить їх дослідження і дозволить використовувати їх як противірусні засоби.

Зараз для визначення потенційно перспективних препаратів широко використовуються комп'ютерні технології. Тому ми визнали за доцільне визначити ці потенційні біологічні властивості у досліджуваних офіційальних препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу за допомогою відомих комп'ютерних технологій: PASS та QSAR.

3.1. Дослідження потенційних біологічних властивостей препаратів за допомогою комп'ютерної програми PASS

З метою прогнозування можливих біологічних властивостей досліджуваних препаратів у роботі було використано комп'ютерний аналіз за допомогою системи PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), розробленої В.В.Поройковим із співробітниками для прогнозування спектру біологічної активності за структурною формулою хімічної сполуки [171-176].

Робота цієї програми заснована на аналізі зв'язку структура-активність. База даних містила показники біологічної активності 565 видів сполук. Опис

структури хімічних сполук у системі PASS заснований на уявленні молекули структурних формул сполук за допомогою MNA (Multilevel Neighbourhoods of Atoms) дескрипторів [172]. Введення структурних формул сполук навчальної вибірки до комп'ютеру проводили за допомогою редактора структурних формул ISIS/Draw 2.4 (MDL Inf.Systems., Inc). Під час подальшої комп'ютерної обробки структурні формули надавалися у вигляді списку атомів, що утворюють молекулу, та списку зв'язку між ними. Таким чином, для кожної хімічної сполуки складався набір структурних дескрипторів, який утворювався наступним чином: список доповнювався усіма приєднаними атомами гідрогену у відповідності до правил валентності; виявлялися цикли і атоми, які входили до них і помічалися. При цьому для кожного атома рекурсивно будувався дескриптор, який характеризував його оточення (MNA) [176].

В результаті, кожна сполука навчальної вибірки у системі PASS була представлена списком номерів дескрипторів та переліком номерів біологічної активності, які вона виявляла. Дані про зв'язок структура-властивість знаходяться у базі даних "SAR Base" програми PASS. Усі сполуки, які входять до навчальної вибірки, представлені у вигляді набору MNA дескрипторів та переліку видів біологічної активності, що проявляють дані сполуки.

Слід відзначити, що навчальна вибірка PASS 1.41 містить 35154 хімічних сполук, які представляють собою або субстанції лікарських засобів, вже введених до медичної практики, або фармакологічні речовини, які запатентовані за кордоном. Результат прогнозу надавався у вигляді назви виду біологічної активності з відповідними значеннями вірогідності – проявиться (P_a) або не проявиться (P_i) відповідний вид активності. Оцінка якості прогнозу в наданій програмі була виконана на основі змінного контролю за виключенням по одному (leave-one-out cross-validation) і складала 83,4%.

Для досліджуваних сполук (декаметоксину, етонію та унітіолу), у відповідності з набором їх дескрипторів, були розраховані вірогідності

приналежності до класу сполук, які проявляли або не проявляли визначені види біологічної активності. Фактично структуру наших препаратів співставляли зі структурами молекул, що знаходились в базі даних, та розраховувались при цьому характеристики структурної відповідності. Вихідні дані були оцінені відповідно вірогідності приналежності досліджуваних препаратів до того чи іншого класу активності.

Так, декаметоксин мав високу вірогідність антисептичної, протигрибкової, імуностимулюючої, протибактеріальної, спазмолітичної та гепатопротекторної дії. Етоній прогнозувався як препарат з антисептичною, сперміцидною, спазмолітичною, імуностимулюючою та противірусною дією (у відношенні до гепатитів). А унітіол окрім антитоксичної, радіопротекторної дії мав також високу вірогідність наявності антисептичної і противірусної (у відношенні до гепатиту С) дії. Таким чином, результати докладного комп'ютерного аналізу за допомогою системи PASS дозволили передбачити наявність і противірусної активності досліджуваних препаратів.

3.2. Прогнозування противірусної активності за допомогою вирішення задач QSAR

Для визначення прогнозованих противірусних властивостей досліджуваних препаратів (декаметоксину, етонію та унітіолу) нами були використані розрахунки, проведені в Одеському фізико-хімічному інституті ім.О.В.Богатського НАН України групою вчених під керівництвом В.Є.Кузьміна, з використанням розроблених ними сучасних програм [177, 178]. Ймовірність прояву протигрипозної та протигерпетичної активності у досліджуваних препаратів вивчали також за допомогою методу QSAR, що базується на симплексному представленні молекулярної структури [178]. В цьому методі для опису молекулярної структури використовуються симплексні дескриптори, які відображають кількість чотирьох-атомних фрагментів (симплексів) фіксованого складу та топології. Важливою перевагою методу є можливість аналізу в межах однієї вибірки молекул, що значно відрізняються за структурою.

Статистичні моделі протигрипозної та протигерпетичної активності [177, 178] були розроблені на основі отриманих нами даних про протівірусну дію ряду гетероциклічних сполук та добре відомих протівірусних препаратів (ацикловір, ϵ -амінокапронова кислота, дейтифорин та ін.). Модель протигрипозної активності враховувала дані щодо гальмування репродукції вірусу грипу А/Гонконг/1/68 на культурі тканини ХАО досліджуваними речовинами. Модель протигерпетичної активності базувалася на отриманих експериментально показниках гальмування утворення вірус-специфічних внутрішньоядерних включень на перещеплюваній культурі Нер-2 під впливом досліджуваних речовин.

Використання розроблених статистичних моделей «структура-активність» дозволило розрахувати прогнозовану протигрипозну та протигерпетичну активність для молекул 20 офіційних препаратів, у тому числі декаметоксину, етонію та унітіолу (табл.3.1).

Таблиця 3.1

**Прогноз активності досліджуваних препаратів на основі
проведених QSAR досліджень**

Препарати	Прогнозована протигрипозна активність (у lg ТІД ₅₀)	Прогнозована протигерпетична активність (у %)
Декаметоксин	3,2	41
Етоній	2,8	43
Унітіол	2,6	15

Таким чином, комп'ютерні прогнози, зроблені на основі QSAR підходів, свідчать про значний ступінь вірогідності наявності специфічної протигрипозної та протигерпетичної активності у досліджуваних препаратів.

4. РІВЕНЬ ТОКСИЧНОСТІ ДЕКАМЕТОКСИНУ, ЕТОНІО ТА УНІТІОЛУ НА ДОСЛІДЖУВАНИХ МОДЕЛЯХ

4.1. Рівень токсичності препаратів на культурі інфузорій *Colpoda steinii*

Для попередньої оцінки токсичності досліджуваних препаратів використовували біотестування за допомогою інфузорій *Colpoda steinii* (препарат виробництва ООО “Відродження М”, м. Одеса), оскільки у цьому випадку визначається можливий рівень токсичності водночас як на клітинному, так і на рівні цілого організму [180]. Даний метод був уперше запропонований нами для визначення ступеня цитотоксичності біологічно активних препаратів і фармакологічних сполук та запатентований в якості корисної моделі [181].

Для проведення досліджень використовували два флакони з сухою культурою *C. steinii* та один флакон з живильним середовищем. У кожний флакон з *C. steinii* додавали по 2 мл живильного середовища, флакони закривали пробками та розташовували у термостаті при температурі 26°-28°C на 24 години. Перед дослідженням культуру *C. steinii* витримували на протязі 15 хвилин при денному світлі, а потім роздивлялися під світловим мікроскопом методом провислої або розчавленої краплі. Для підтвердження життєздатності культури (при збільшенні 10x8) повинно бути не менше 6 клітин *C. steinii*, які активно рухаються у полі зору.

У флакон з активною культурою *C. steinii* вносили 1 мл розчину досліджуваного препарату і ретельно перемішували. У контрольний флакон вносили 1 мл води. Флакони витримували у термостаті при (28±1)°C на протязі усього досліду. Через 3 і 10 хвилин відбирали по одній краплі суміші з дослідного і контрольного флаконів і переглядали під мікроскопом методом провислої або розчавленої краплі весь об'єм краплі (збільшення 80x), враховуючи кількість живих та загиблих інфузорій. Якщо у досліджуваній

пробі загинула більшість (90% і більше) інфузорій подальше дослідження припиняли. За наявності більшості живих інфузорій продовжували термостатування до 3 годин. Критерієм визначення токсичності був час від початку дії розчину препарату, що досліджується, до загибелі більшості (90% і більше) колпод, яка констатується на підставі повного припинення руху колпод та наявності їх розпаду. У контрольній пробі всі колподи повинні були залишатися рухливими. Якщо й через 3 години усі простіші рухалися, речовини вважалися нетоксичними.

За допомогою культури інфузорій *C. steinii* визначали токсичність декаметоксину і етонію у кінцевій концентрації 250, 125, 50, 25, 12,5 мкг/мл. Унітіол розводили таким чином, щоб кінцева концентрація препарату була 100, 50, 25, 10 та 5 мг/мл. Виявилося, що етоній спричиняв токсичну дію на культуру колподи у кінцевій концентрації 250 мкг/мл, у інших досліджуваних концентраціях він виявився нетоксичним. Декаметоксин впливав на рухливість інфузорій, спричиняючи токсичну дію у розведеннях з кінцевою концентрацією 250-50 мкг/мл. У концентраціях 25 і 12,5 мкг/мл препарат не виявляв токсичної дії. Унітіол спричиняв токсичну дію лише у кінцевій концентрації 100 мг/мл. У концентраціях 50-5 мг/мл унітіол не пригнічував життєдіяльності культури *C. steinii*

Таким чином, отримані дані дозволяють стверджувати, що для культури *C. steinii* декаметоксин був нетоксичним у дозі нижче за 25 мкг/мл, етоній – нижчий за 125 мкг/мл, а унітіол був нетоксичний у концентрації нижче за 5% (50 мг/мл).

4.2. Рівень цитотоксичності досліджуваних препаратів за дією на моношар клітин

Цитотоксичність декаметоксину, етонію та унітіолу вивчали на культурах клітин RK13 і Нер-2, що перевиваються, первинно трипсинізованій культурі курячих фібробластів (ФЕК) [156], а також на культурі тканини хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) 11-14-добових курячих ембріонів.

Максимально переносиму концентрацію (МПК) досліджуваних препаратів на перещеплюваних культурах клітин RK13 і Нер-2, а також на первинно-трипсинізованій культурі ФЕК визначали використовуючи не менше десяти рядків лунок у пластинці з культурою клітин для кожного розведення препаратів на живильному середовищі. Пластинки з культурою клітин інкубували при 37 °С з подачею 5 % CO₂ на протязі 3 днів. Кожного дня проводили перегляд дослідних та контрольних зразків з метою виявлення наявності або відсутності цитотоксичної дії (ЦТД) на клітини. Цитотоксичну дію декаметоксину визначали у кінцевій концентрації препарату 30, 25, 15, 10, 7,5, 5, 4, 3 мкг/мл. Цитотоксичність етонію визначали у розведеннях препарату у кінцевій концентрації 250, 125, 100, 75, 50, 40, 35, 25, 17,5 та 10 мкг/мл. Для унітіолу ці розведення були - 25 мг/мл, 12,5 мг/мл, 2500 мкг/мл, 1250 мкг/мл, 500, 250 та 125 мкг/мл. Ступінь ЦТД визначали за змінами морфології клітин (округлювання або зморщення клітин, відторгнення від поверхні лунок клітин, які вже дегенерували) за 4-х плюсовою системою. За максимально переносиму концентрацію (МПК) препарату приймали його найбільшу кількість, яка не спричиняла дегенерації клітин. Результати визначеної МПК препаратів на досліджуваних культурах клітин наведені в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Цитотоксичність досліджуваних препаратів

Препарат	RK13	Нер-2	ФЕК
	Максимальна переносима (нетоксична) концентрація препаратів на різних клітинних культурах (в мкг/мл)		
Декаметоксин	7,75	5	4
Етоній	125	125	35
Унітіол	500	12,5	12500

Крім того, було проведено порівняльне визначення токсичності цих препаратів на культурі первинно-трипсинізованих клітин курячих фібробластів (ФЕК) та з використанням інфузорій *C. steinii*. Результати наведені в табл.4.2.

Результати порівняльного визначення токсичності досліджуваних препаратів на *Colpoda steinii* та ФЕК

№№ п/п	Препарат	<i>Colpoda steinii</i>	ФЕК
		Максимальна переносима (нетоксична) концентрація (мкг/мл)	
1	Декаметоксин	30	4
2	Етоній	125	35
3	Унітіол	50000	12500

В результаті проведеного порівняльного дослідження можна стверджувати, що сполуки, які виявляють високу або низьку токсичність на інфузоріях, аналогічним чином впливають і на клітинну культуру ФЕК, тобто класифікуються в результаті досліджень як високо або низько токсичні. На підставі цих досліджень нами було розроблено новий спосіб оцінки цитотоксичності біологічно активних сполук і фармакологічних препаратів, який дозволяє спростити методику визначення цитотоксичності у порівнянні зі стандартними способами визначення цього показника на культурах клітин та скоротити строки дослідження більше, ніж у 5 разів. Так, на визначення цитотоксичності біологічно активних сполук за допомогою культури первинно-трипсинізованих клітин витрачається до 4-5 діб (123-125 годин). На визначення цитотоксичності за допомогою запропонованого нами методу на культурі *C. steinii* витрачається до 21 години, а крім того ця процедура може проводитись не у суворо стерильних умовах. Це значно прискорює і спрощує процес визначення токсичності біологічно активних сполук та фармакологічних препаратів.

4.3. Рівень цитотоксичності препаратів за можливістю декаметоксину, етонію та унітіолу пригнічувати життєздатність клітин калориметричним методом

Цитотоксичну дію декаметоксину, етонію та унітіолу визначали також за можливістю досліджуваних препаратів пригнічувати життєздатність культури клітин ФЕК калориметричним методом, як наведено у матеріалах і методах

[156]. Для цього готували розведення препаратів на поживному середовищі, враховуючи максимальну переносимо концентрацію препаратів, отриману раніше. Декаметоксин розводили у кінцевій концентрації 10, 8, 5, 4, 3, 2 мкг/мл, етоній – 100, 80, 60, 40, 20, 10 мкг/мл, а унітіол - 50000, 25000, 12500, 250, 125 мкг/мл. Після 48 або 72 годин інкубації моношару клітин ФЕК у присутності препарату або з підтримуючим середовищем 199 без препаратів проводили підрахунок життєздатності клітин за допомогою нейтрального червоного. Вміст барвника визначали у контрольних та дослідних зразках після лізису клітин у фотоелектрокалориметрі при 540 нм. Концентрація препарату, яка викликала засвоєння нейтрального червоного на 50% у порівнянні з контролем, вважалася цитотоксичною дозою ЦТД₅₀. Отримані результати наведені у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Цитотоксичність досліджуваних препаратів

№№ п/п	Препарати	48 годин	72 години	72 години
		ЦТД ₅₀ у мкг/мл		МПК у мкг/мл
1	Декаметоксин	10	5	4
2	Етоній	80	40	35
3	Унітіол	25000	12500	12500

Як видно з таблиці, 50% цитотоксична доза, що пригнічує життєздатність культури клітин ФЕК через 72 години, для декаметоксину складала 5 мкг/мл, для етонію – 80 мкг/мл, а для унітіолу – 25000 мкг/мл. Ці показники є співставлюваними з максимально переносимою концентрацією цих препаратів на моношарі клітин ФЕК.

Оскільки в різних клітинних культурах рівень цитотоксичності не був однаковим, токсичність досліджуваних препаратів визначали і на тканьовій культурі ХАО 11-14-добових курячих ембріонів стандартним методом за візуальною оцінкою [157]. Готували розведення препаратів на поживному середовищі, враховуючи максимальну переносимо концентрацію препаратів, отриману раніше на культурах клітин та культурі інфузорій. Декаметоксин

розводили у кінцевій концентрації 50, 40, 30, 25, 20, 10 мкг/мл, етоній – 250, 125, 75, 50, 25, 12,5 мкг/мл, а унітіол - 100, 50, 40, 25, 20 та 10 мг/мл. В результаті проведених досліджень виявилось, що на культурі клітин ХАО декаметоксин був нетоксичним у дозі 30 мкг/мл і нижче, етоній – 125 мкг/мл і нижче, а унітіол був нетоксичний у концентрації нижче за 2% (20 мг/мл).

4.4. Рівень токсичності досліджуваних препаратів на білих мишах при інтраназальному їх введенні

Перед тим, як досліджувати протівірусну дію декаметоксину, етонію та унітіолу при експериментальному грипі у мишей, було вивчено гостру токсичність цих препаратів. З цією метою білим безпородним мишам масою тіла 18-20 г, що перебували на стандартному раціоні віварію, інтраназально під легким ефірним наркозом вводили препарати у концентраціях, які перевищували використані у досліді дози у 8, 10, 16 та 100 разів [181]. Таким чином, декаметоксин вводили у концентраціях 400, 500, 800 та 5000 мкг/мишу, що становило 20, 25, 40 та 250 мг/кг живої ваги. Етоній відповідно вводили у концентраціях 800, 1000, 1600 та 100000 мкг/мишу, що складало 40, 50, 80 та 500 мг/кг. На кожне розведення препарату використовували по 6 тварин. Спостереження та реєстрацію загибелі тварин проводили на протязі 14 діб. У тварин, що вижили, після наркотизації проводили розтин та визначали наявність морфологічних змін у легенях. Отримані результати наведені в таблицях 4.4 і 4.5.

Таблиця 4.4

Визначення гострої токсичності декаметоксину на білих мишах

	20 мг/кг	25 мг/кг	40 мг/кг	250 мг/кг
Загальна кількість тварин	6	6	6	6
Кількість тварин, що вижили	6	6	6	0

Декаметоксин у концентраціях 20, 25, 40 мг/кг живої ваги білих мишей був нетоксичним при інтраназальному способі застосування. При цьому в легенях тварин, що вижили, не спостерігалось морфологічних змін. У

концентрації 250 мг/кг препарат спричиняв токсичну дію, що призводила до загибелі тварин на 1-3 добу спостереження. При розтині морфологічних змін у легенях тварин не спостерігалось.

Таблиця 4.5

Визначення гострої токсичності етонію на білих мишах

	40 мг/кг	50 мг/кг	80 мг/кг	500 мг/кг
Загальна кількість тварин	6	6	6	6
Кількість тварин, що вижили	6	6	6	0

Етоній у концентраціях 40, 50, 80 мг/кг живої ваги білих мишей був нетоксичним при інтраназальному способі аплікації. Застосування препарату у дозі 500 мг/кг призводило до загибелі експериментальних тварин, що свідчить про токсичну дію етонію у цій дозі. Під час розтину усіх тварин, які вижили та загинули, в їх легенях не спостерігалось ніяких морфологічних змін.

Аналізуючи отримані результати, можна з упевненістю стверджувати, що препарати декаметоксин та етоній у дозах, які використовували у подальшому під час дослідів на тваринах були нетоксичними. Крім того, вони були нетоксичними при їх інтраназальному застосуванні і у дозах, що у 8, 10 і 16 разів перевищували ефективну дозу при експериментальному грипі. У дозах, які у 100 разів перевищували ефективну дозу препаратів при експериментальному грипі у мишей, декаметоксин та етоній виявили токсичність при їх інтраназальному застосуванні, викликаючи загибель.

Оскільки препарат унітіол виробляється і застосовується у вигляді 5% розчину і його концентрування викликає певні ускладнення, його гостру токсичність досліджували у відношенні концентрацій, які були використані в експерименті – 5 мг/мишу і 2,5 мг/мишу, що складало 125 та 250 мг/кг живої ваги. Визначення гострої токсичності унітіолу проводили аналогічним чином: білим безпородним мишам масою тіла 18-20 г, що перебували на стандартному раціоні віварію, інтраназально під легким ефірним наркозом вводили препарат, використовуючи по 6 тварин на кожне розведення.

Спостереження та реєстрацію загибелі тварин проводили на протязі 14 діб. Отримані результати наведені в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6

Визначення гострої токсичності унітіолу на білих мишах

	125 мг/кг	250 мг/кг
Загальна кількість тварин	6	6
Кількість тварин, що вижили	6	6

Отримані результати свідчать, що унітіол не виявляв токсичної дії при інтраназальному застосуванні у мишей у концентраціях 125 і 250 мг/кг. Під час розтину тварин в їх легенях не спостерігалось ніяких морфологічних змін, що свідчить про відсутність токсичної дії.

Таким чином, визначення рівня токсичності досліджуваних препаратів на різних моделях дозволило виявити діапазон їх концентрацій, які можуть бути використані для пошуку ефективних доз препаратів.

РОЗДІЛ 5. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ *IN VITRO*

5.1. Протигерпетична активність препаратів

Протигерпетичну активність досліджуваних препаратів по відношенню до вірусу простого герпесу 1 типу (ВПГ-1), штаму УС вивчали *in vitro* на первинно трипсинізованій культурі курячих фібробластів (ФЕК) та перещеплюваній культурі клітин Нер-2 (з використанням цитоморфологічного методу – [158]). Протигерпетичну активність досліджуваних препаратів по відношенню до вірусу простого герпесу 2 типу (ВПГ-2) вивчали *in vitro* на перещеплюваній культурі клітин RK13 (клітини нирок кролів) [155].

Для розрахунку індексу селективності досліджуваних препаратів визначали їх максимально переносиму концентрацію (МПК) на культурі клітин RK13, яка наведена в розділі 4.2. Після цього проводили визначення мінімально активної концентрації (МАК) препаратів як наведено в матеріалах і методах. Після визначення МПК і МАК розраховували індекс селективності препаратів (ІС), який є відношенням МПК до мінімально активної концентрації (МАК) препаратів (дані наведені в табл.5.1).

Таблиця 5.1

Активність досліджуваних препаратів у відношенні ВПГ-2

Препарати	МПК (в мкг/мл)	МАК (в мкг/мл)	ІС
Декаметоксин	7,75	1,25	5,7
Етоній	125	3,85	33,0
Унітіол	500	7,5	66,6
Ацикловір	200	1	200

З даних, наведених у таблиці, видно, що усі досліджувані препарати мали певну протигерпетичну активність у відношенні ВПГ-2. Препарати етоній та унітіол мали досить високий індекс селективності – 33 та 66,6 відповідно. В якості референс-препарату на цій моделі використовували

ацикловір. Його максимальна переносима концентрація складала 0,2 мг/мл, мінімальна активна концентрація була 1 мкг/мл, а індекс селективності ацикловіру на цій моделі складав 200. Таким чином, етоній та унітіол у порівнянні з ацикловіром виявили активність у відношенні до ВПГ-2 у 6 і 3 рази меншу, що говорить про можливість вважати їх потенційними протигерпетичними засобами. Індекс селективності декаметоксину виявився нижчим через незначну різницю між максимально переносимою та мінімальною ефективною дозами, але його гальмування репродукції ВПГ-2 на культурі клітин RK13 було регулярним, що свідчить про наявність у цього препарату антивірусних властивостей.

Методологія вивчення протигерпетичної активності досліджуваних препаратів відносно ВПГ-1 була спрямована на вивчення їх впливу як на етап проникнення вірусу до клітини, так і на гальмування процесів виходу віріонів з клітини та утворення вірусного дочірнього потомства.

З цією метою проводили цитоморфологічне вивчення впливу декаметоксину, етонію та унітіолу на утворення вірус-специфічних внутрішньоядерних включень. Ці включення утворюються у ядрах клітин культури Нер-2 на ранніх стадіях репродукції ВПГ-1. Зниження кількості вірус-специфічних включень під впливом препаратів (на протязі 48 годин) свідчить про ефективність досліджуваних сполук на ранніх стадіях репродукції вірусу.

Вплив досліджуваних препаратів на репродукцію вакцинного штаму вірусу простого герпесу першого типу штаму УС вивчали методом Weber (1972) в модифікації Л.М.Носач і Н.С.Дяченко [158]. Оскільки, унітіол в дозі 25 мкг/мл та етоній у дозі 250 мкг/мл спричиняли цитотоксичну дію на перещеплюваній культурі клітин Нер-2 (див.табл.4.1), ми визначали їх противірусну активність у нижчих дозах (відповідно 12,5 та 125 мкг/мл). У цих дозах унітіол та етоній були неактивними. Декаметоксин був нетоксичним у дозах, нижчих за 5 мкг/мл. Протигерпетична активність цього препарату наведена в табл.5.2.

**Протигерпетична активність декаметоксину,
виявлена на культурі клітин Нер-2**

Концентрація декаметоксину	% інгібування внутрішньоядерних включень
4 мкг/мл	52
2 мкг/мл	45
1 мкг/мл	21
0,5 мкг/мл	21

З таблиці 5.2 видно, що декаметоксин у концентраціях 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл та 0,5 мкг/мл гальмував процес утворення вірус-специфічних внутрішньоядерних включень на культурі клітин Нер-2 (рис.5.1-5.4).

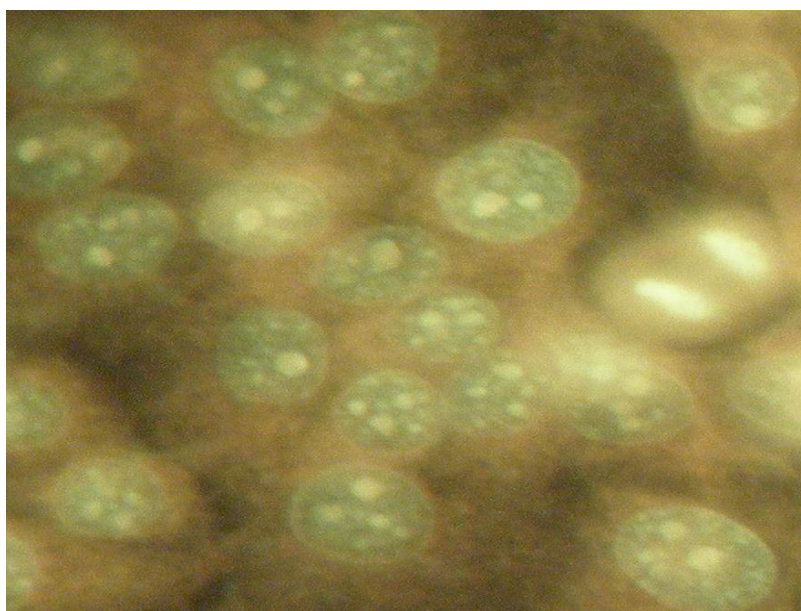


Рис.5.1. Неінфіковані клітини Нер-2

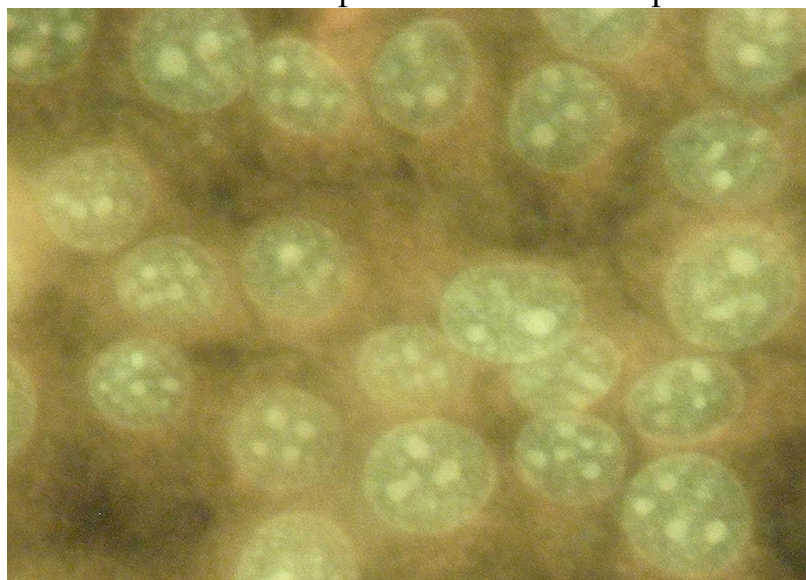


Рис.5.2. Клітини Нер-2, оброблені декаметоксином у дозі 4 мкг/мл

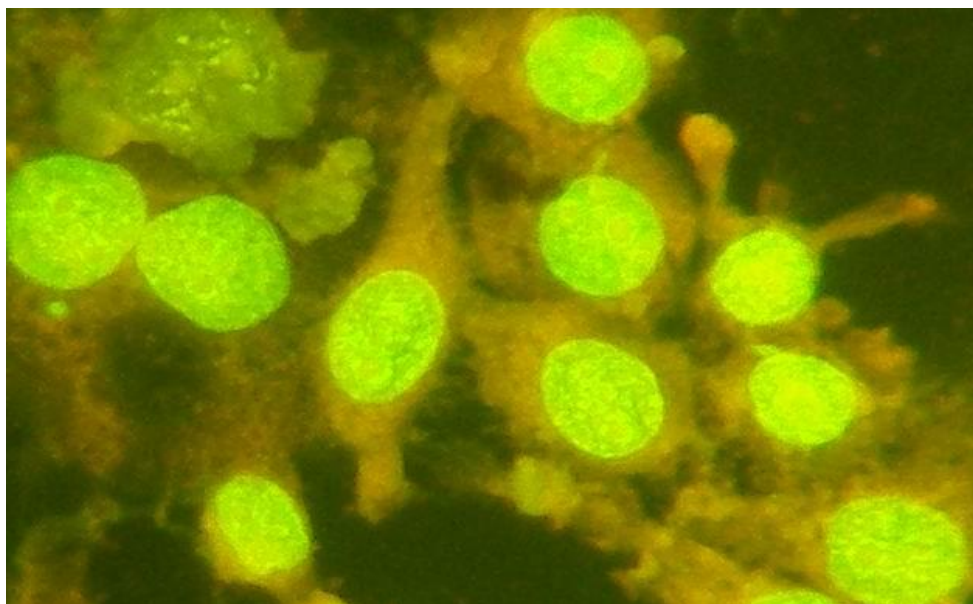


Рис.5.3. Клітини Her-2, інфіковані ВПГ-1

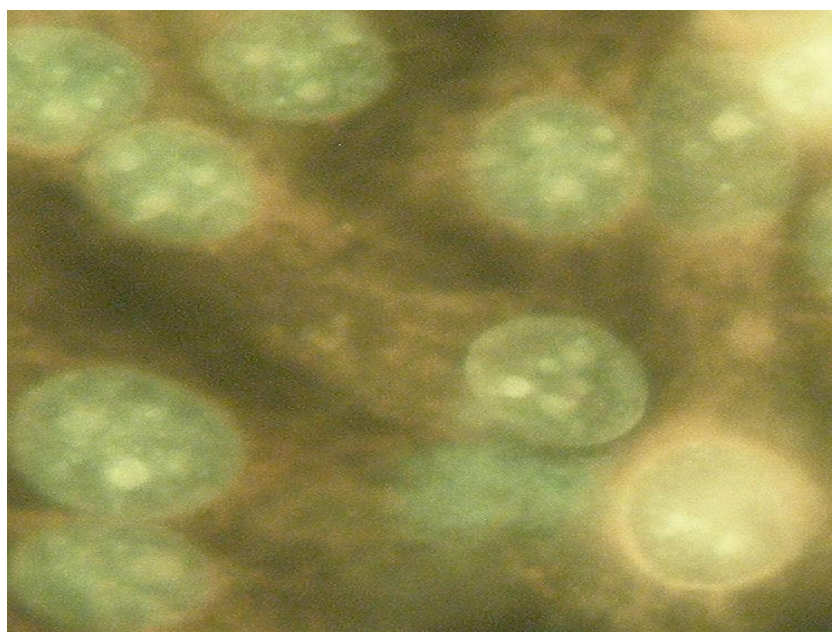
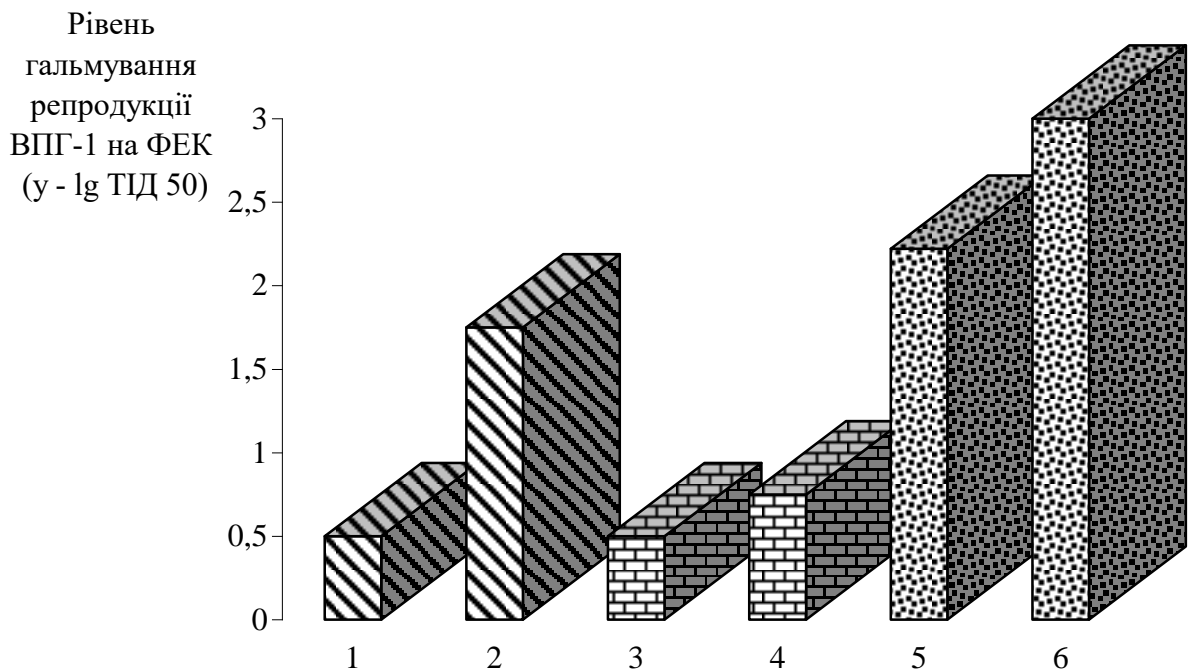


Рис.5.4. Клітини Her-2, інфіковані ВПГ-1 та оброблені декаметоксином (у кінцевій концентрації 4 мкг/мл)

В якості референс-препарату на цій моделі також використовували ацикловір, який у концентрації 2,47 мкг/мл гальмував утворення внутрішньоядерних включень на 87%. Таким чином, можна констатувати, що декаметоксин у співставлюваних дозах гальмував процес утворення внутрішньоядерних включень ВПГ-1 на культурі клітин Her-2 в 1,9 разів менше ніж ацикловір. Отримані дані свідчать про можливий вплив декаметоксину на такі стадії репродукції ВПГ-1, як етап проникнення вірусу

до клітини та реплікації вірусної нуклеїнової кислоти, що пояснюється його хімічною природою як поверхнево активної речовини.

Дослідження впливу декаметоксину, етонію та унітіолу на гальмування утворення вірусного потомства ВПГ-1 проводили за визначенням інфекційних титрів дочірнього вірусу на первинно-трипсинізованій культурі клітин курячих фібробластів (ФЕК) [159]. Отримані результати визначення протівірусної активності декаметоксину, етонію та унітіолу на культурі клітин ФЕК наведені на рис.5.5.



Концентрації досліджуваних препаратів:

- 1 – декаметоксин - 2 мкг/мл; 3 – етоній - 20 мкг/мл; 5 – унітіол – 2,5 мг/мл;
 2 – декаметоксин - 4 мкг/мл; 4 – етоній - 35 мкг/мл; 6 – унітіол – 5,0 мг/мл

Рис. 5.5. Вплив досліджуваних препаратів на процес гальмування репродукції ВПГ-1 на культурі клітин курячих фібробластів

Аналізуючи дані, наведені на рис.5.5, можна стверджувати, що декаметоксин лише у дозі 4 мкг/мл гальмував репродукцію вірусу простого

герпесу 1 типу на первинно-трипсинізованій культурі клітин курячих фіброblastів на $1,75 \lg \text{TID}_{50}$, а унітіол у дозах 2,5 і 5,0 мг/мл знижував цей показник на 2,17 і 3,0 $\lg \text{TID}_{50}$ відповідно. Етоній у концентраціях 20 і 35 мкг/мл виявився неефективним. Максимально переносима концентрація декаметоксину не відрізнялась від мінімальної активної дози – 4 мкг/мл, а для унітіолу на цій моделі індекс селективності складав 5, оскільки мінімальна ефективна доза препарату складала 2,5 мг/мл, а максимальна переносима – 12,5 мг/мл (див.таб.4.1, 4.2). Протигерпетична активність унітіолу, отримана на цій моделі, значно відрізняється від результатів, отриманих на перещеплюваних клітинах RK13 стосовно гальмування репродукції ВПГ-2, де індекс селективності був 66,6 (див.таб.5.2).

Слід зазначити, що ацикловір, який застосовувався на цій моделі в якості референс-препарату, у кінцевій концентрації 1 мкг/мл гальмував репродукцію ВПГ-1 на $3,5 \lg \text{TID}_{50}$. Тобто, декаметоксин проявив на цій моделі активність нижчу, ніж у референс-препарату, тоді як активність унітіолу була порівняна, хоча доза унітіолу при цьому була у 500 разів вищою. Таким чином, можна констатувати, що досліджувані препарати декаметоксин, етоній та унітіол безперечно мають протівірусні властивості у відношенні вірусів простого герпесу 1 та 2 типу, але вони нижчі, ніж у ацикловіру.

Наведені результати представлені у публікаціях [183-185, 187, 188].

5.2. Рівень протигрипозної активності декаметоксину, етонію та унітіолу в культурі тканини ХАО

Протигрипозну активність препаратів *in vitro* вивчали у відношенні вірусів грипу людини штамів А/PR/8/34 (H₁N₁), А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) та В/Ленінград/17/86, а також вірусів грипу птахів штамів H₅N₃ і H₇N₃, використовуючи культуру тканини ХАО 11-12 добових курячих ембріонів [160, 161], оскільки цю культуру можна вважати найбільш 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 через вплив на позаклітинний вірус.

5.2.1. Рівень протигрипозної активності декаметоксину в культурі тканини ХАО

Рівень гальмування декаметоксином репродукції вірусу грипу людини відпрацьовували на моделі штаму А/Гонконг/1/68 (H₃N₂), використовуючи для інфікування дослідних зразків розведення вірусу в дозах 100-1000 ТІД₅₀ на глюкозо-желатиновому середовищі, що містило препарат у кінцевій концентрації 30, 25, 20, 15, 10 мкг/мл. Декаметоксин у дозі 20, 15 і 10 мкг/мл не спричиняв регулярного гальмування репродукції вірусу А/Гонконг/1/68 (H₃N₂). Різниця гальмування репродукції цього штаму у разі використання доз препарату 30 та 25 мкг/мл була незначною (0,2 lg ТІД₅₀). Таким чином, мінімальною ефективною дозою декаметоксину ми вважали 25 мкг/мл і використовували її для подальших досліджень на моделях з іншими штамми вірусів грипу людини і птахів.

В якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу людини використовували відомий противірусний препарат рибавірин. У дозі 244 мкг/мл він повністю гальмував репродукцію штаму вірусу грипу А/Гонконг/1/68 (H₃N₂). Мінімальна ефективна доза, яка ще спричиняла регулярний вплив на гальмування репродукції цього штаму вірусу грипу, для рибавірину була в кінцевій концентрації 0,024 мкг/мл. У цій концентрації препарат статистично вірогідно гальмував репродукцію всіх досліджуваних штамів вірусу грипу людини. У відношенні штаму А/PR/8/34 (H₁N₁) різниця ТІД₅₀ між контрольними та дослідними зразками складала 1,37 lg, для штаму А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) цей показник становив 0,37 lg, а для штаму В/Ленінград/17/86 – 1,4 lg ТІД₅₀.

Аналіз отриманих результатів щодо гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусів грипу людини декаметоксином з

використанням непараметричного критерію знаків показав, що цей препарат у дозі 25 мкг/мл статистично вірогідно гальмував репродукцію всіх досліджуваних штамів. 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.5.2).

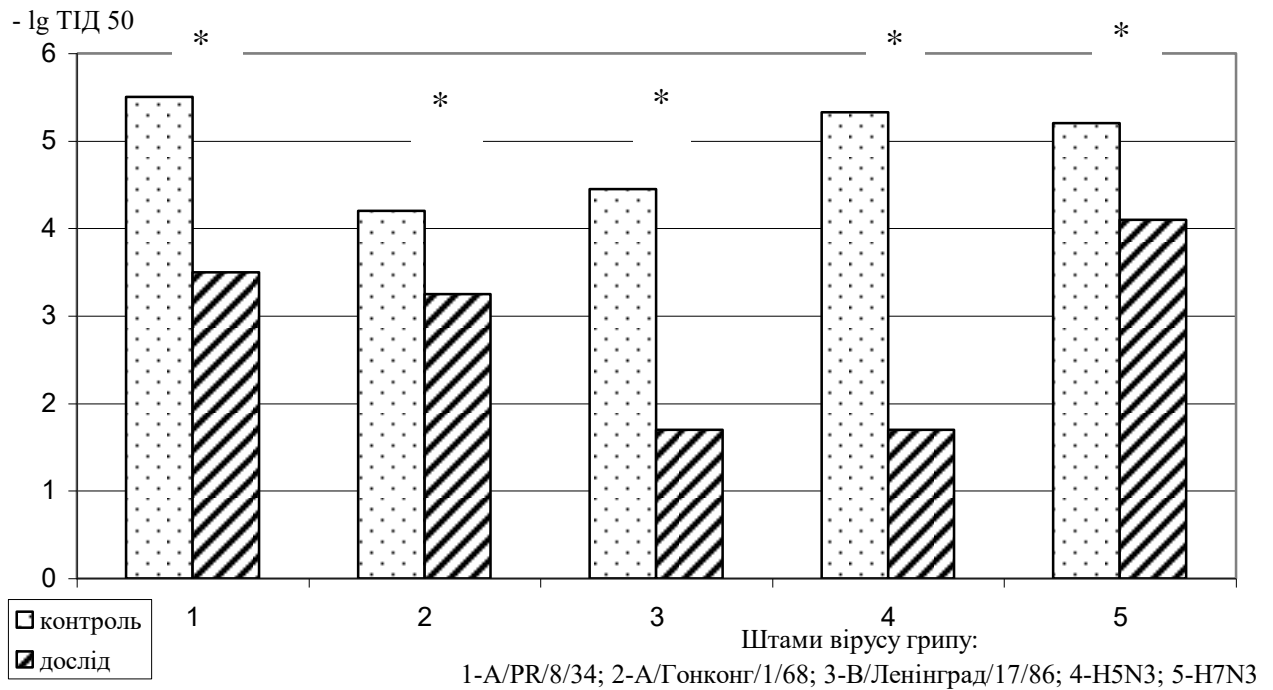


Рис.5.2. Вплив декаметоксину на репродукцію вірусів грипу на культурі тканини ХАО

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

Таким чином, можна зазначити, що декаметоксин у мінімальній ефективній дозі спричиняв регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу людини аналогічне до дії референс-препарату – рибавірину, хоча ця доза була значно вищою (у 1000 разів).

Вивчення впливу декаметоксину на репродукцію пташиного вірусу грипу штаму H₅N₃ *in vitro* показало, що препарат у дозі 25 мкг/мл статистично вірогідно гальмував репродукцію вірусу H₅N₃ на 3,6 lg ТІД₅₀, тобто значно більше, ніж вірусів грипу людини А. Гальмування репродукції було виявлено і відносно штаму вірусу пташиного грипу H₇N₃ (на 1,1 lg ТІД₅₀) (рис.5.2).

В якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу птахів використовували Е-амінокапронову кислоту, яка у мінімальній ефективній концентрації 15 мг/мл гальмувала репродукцію штаму H₅N₃ на 3,07 lg ТІД₅₀, а штаму H₇N₃ 1,2 lg ТІД₅₀. Таким чином можна констатувати, що декаметоксин спричиняв регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу птахів аналогічне до дії референс-препарату, але у значно нижчій концентрації, ніж Е-амінокапронова кислота (у 600 разів).

Крім того, проведені дослідження показали, що декаметоксин у мінімальній ефективній дозі (25 мкг/мл) проявляв високу статистично значущу віруліцидну дію, а також знижував здатність клітин культури тканини ХАО підтримувати репродукцію усіх досліджуваних штамів вірусу грипу (табл.5.3).

Таблиця 5.3

Вплив декаметоксину (у дозі 25 мкг/мл) на позаклітинний вірус та здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу

Штами вірусу	Вплив на здатність культури тканини підтримувати репродукцію вірусів		Вплив на позаклітинний вірус	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
А/PR/8/34 (H ₁ N ₁)	4,20±0,13	3,25±0,38	4,45±0,08	1,70±0,25
А/Гонконг/1/68 (H ₂ N ₂)	4,28±0,18	3,63±0,03	4,45±0,08	2,15±0,16
В/Ленінград/17/86	4,00±0,38	2,40±0,14	4,75±0,34	2,80±0,18
H ₅ N ₃	3,40±0,53	2,50±0,38	2,80±0,42	1,15±0,25
H ₇ N ₃	4,15±0,18	3,70±0,04	4,55±0,18	3,90±0,26

Примітка: активність наводиться в логарифмах 50%-ної тканинної інфікуючої дози (lg ТІД₅₀).

Для штаму А/PR/8/34 (H₁N₁) вплив на позаклітинний вірус становив 2,75 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем, а вплив на здатність культури тканини

ХАО підтримувати репродукцію вірусу - 1,0 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем.

Для іншого штаму вірусу грипу А серопідтипу Н₃Н₂ - А/Гонконг/1/68 ця тенденція зберігається. Декаметоксин у дозі 25 мкг/мл впливав на позаклітинний вірус (на 2,3 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем), а також незначною мірою знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусу (на 0,65 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем).

Тенденції впливу декаметоксину у ефективній дозі на вірусну репродукцію, характерні для вірусів грипу А, зберігалися і для штаму вірусу грипу В/Ленінград/17/86. Препарат не тільки гальмував репродукцію цього вірусу, але й впливав на позаклітинний вірус (на 1,95 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем) та на здатність культури клітин підтримувати репродукцію вірусу (на 1,6 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем). Причому цей вплив у всіх випадках був хоча й регулярним, але незначним.

При визначенні впливу декаметоксину у ефективній дозі 25 мкг/мл на здатність культури тканини підтримувати репродукцію вірусів грипу птахів штамів Н₅Н₃ та Н₇Н₃ та позаклітинний вірус, що проводили аналогічно до вірусів грипу людини серотипу А, були отримані результати, які свідчать про те, що препарат у досліджуваній концентрації знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу птахів та виявляв незначну віруліцидну дію.

Таким чином, отримані дані дозволяють стверджувати, що декаметоксин має певні противірусні властивості у відношенні всіх досліджуваних штамів вірусу грипу не залежно від їх антигенних властивостей. Оскільки спостерігається регулярний вплив препарату не тільки на процес репродукції вірусу грипу, але і його віруліцидна дія, можна стверджувати, що вплив на позаклітинний вірус грипу є одним з механізмів противірусної дії декаметоксину. Вплив декаметоксину на здатність культури тканин ХАО підтримувати репродукцію досліджуваних штамів вірусу грипу був регулярним, але незначним.

5.2.2. Рівень протигрипозної активності етонію в культурі тканини ХАО

Аналогічним чином відпрацьовували й рівень гальмування репродукції вірусу грипу людини на моделі штаму А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) етонієм. Для цього проводили інфікування тканини ХАО розведеннями вірусу в дозі 100-1000 ТІД₅₀ на глюкозо-желатиновому середовищі, яке у дослідних зразках містило препарат у кінцевій концентрації 125, 75, 50, 25, 12,5 мкг/мл. У дозах 75, 50, 25, 12,5 мкг/мл етоній не спричиняв регулярного гальмування репродукції вірусу А/Гонконг/1/68 (H₃N₂). Таким чином, ми працювали з максимальною нетоксичною і водночас мінімальною ефективною дозою етонію – 125 мкг/мл. В подальшому на моделях з іншими штамами вірусів грипу людини і птахів ми використовували саме цю дозу препарату.

Етоній у нетоксичній для клітин ХАО дозі 125 мкг/мл статистично 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, 1,6 та 1,6 lg ТІД₅₀ відповідно (рис.5.3).

В якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу людини використовували відомий противірусний препарат рибавірин у дозі 0,024 мкг/мл. Як зазначено вище, його вплив на репродукцію вірусу грипу людини у відношенні штаму А/PR/8/34 (H₁N₁) був 1,37 lg ТІД₅₀, для штаму А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) цей показник становив 0,37 lg, а для штаму В/Ленінград/17/86 – 1,4 lg ТІД₅₀. Таким чином можна констатувати, що етоній у мінімальній ефективній дозі спричиняв регулярний вплив на гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу людини аналогічний до впливу рибавірину, але у концентрації в 5000 разів вище.

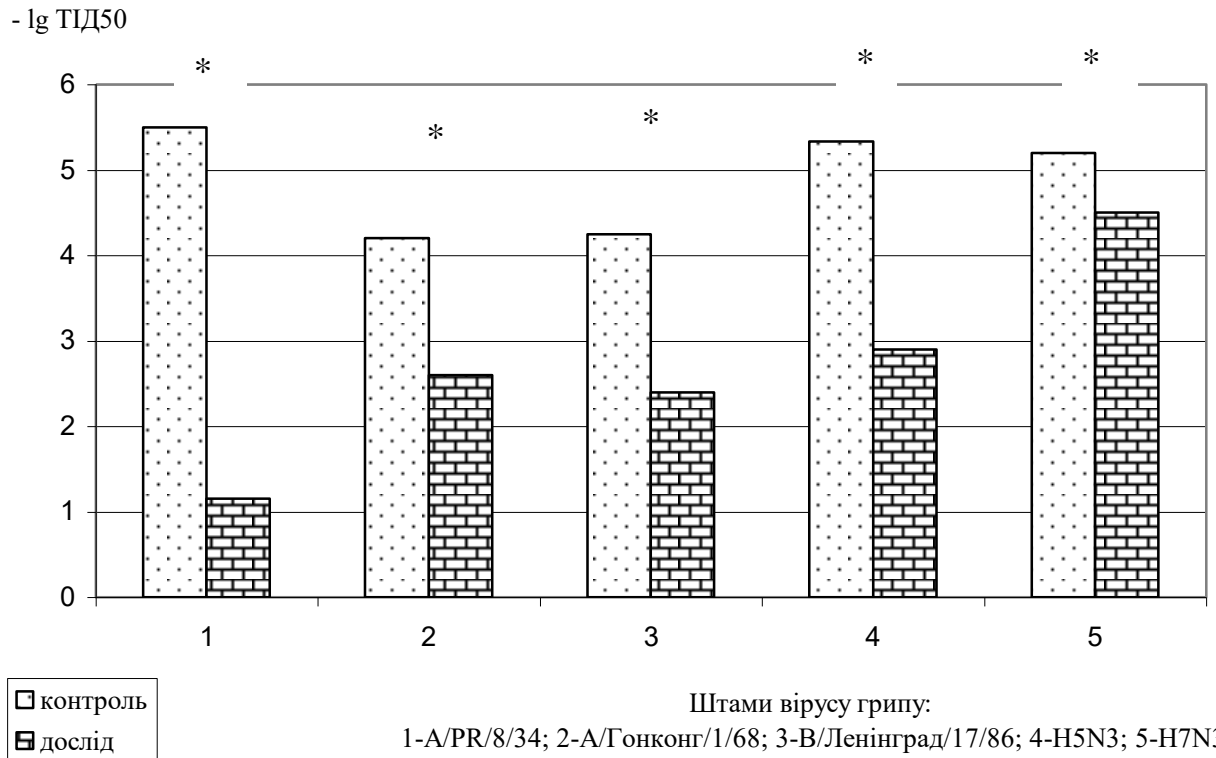


Рис.5.3. Вплив етонію на репродукцію вірусів грипу на культурі клітин ХАО
Умовні позначення: * - Р за К.З. < 0,05

У дозі 125 мкг/мл етоній статистично вірогідно гальмував і репродукцію вірусів грипу птахів Н₅Н₃ на 2,4 lg ТІД₅₀, а Н₇Н₃ - на 0,7 lg ТІД₅₀ (рис.5.3). Ці показники дещо нижчі (на 0,67 lg ТІД₅₀ у відношенні штаму Н₅Н₃ та 0,5 lg ТІД₅₀ у відношенні штаму Н₇Н₃), ніж у Е-амінокапронової кислоти, яку використовували в якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу птахів. Але етоній спричиняв регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу птахів у концентрації значно нижче, ніж Е-амінокапронова кислота (у 120 разів).

Крім того, етоній у мінімальній ефективній концентрації (125 мкг/мл) виявляв високу статистично значущу віруліцидну дію, а також знижував здатність клітин культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів (табл.5.4).

Препарат у цій концентрації статистично вірогідно, за критерієм знаків, гальмував процес репродукції вірусу грипу А/PR/8/34 (Н₁Н₁) і впливав на позаклітинний вірус (в середньому на 2,05 lg ТІД₅₀), а також зменшував

здатність культури тканин ХАО підтримувати репродукцію вірусу (в середньому на $1,6 \lg \text{TID}_{50}$).

Аналогічним чином етоній впливав на позаклітинний вірус грипу А/Гонконг/1/68 (H_3N_2) (в середньому на $1,95 \lg \text{TID}_{50}$) і зменшував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусу грипу (в середньому на $1,28 \lg \text{TID}_{50}$).

Таблиця 5.4

Вплив етонію (у дозі 125 мкг/мл) на позаклітинний вірус та здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу

Штами вірусу	Вплив на здатність культури тканини підтримувати репродукцію вірусів		Вплив на позаклітинний вірус	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
А/PR/8/34 (H_1N_1)	$4,20 \pm 0,13$	$2,60 \pm 0,33$	$4,45 \pm 0,08$	$2,40 \pm 0,39$
А/Гонконг/1/68 (H_2N_2)	$4,28 \pm 0,18$	$3,00 \pm 0,32$	$4,45 \pm 0,08$	$2,50 \pm 0,31$
В/Ленінград/17/86	$4,00 \pm 0,38$	$1,90 \pm 0,04$	$4,75 \pm 0,34$	$2,80 \pm 0,18$
H_5N_3	$3,40 \pm 0,53$	$4,25 \pm 0,18$	$2,80 \pm 0,42$	$0,60 \pm 0,25$
H_7N_3	$4,15 \pm 0,18$	$4,25 \pm 0,05$	$4,55 \pm 0,18$	$0,65 \pm 0,11$

Примітка: активність наводиться в логарифмах 50%-ної тканинної інфікуючої дози ($\lg \text{TID}_{50}$).

Такі ж тенденції зберігалися щодо штаму вірусу грипу В/Ленінград/17/86. Препарат у досліджуваній концентрації 125 мкг/мл впливав на позаклітинний вірус грипу В/Ленінград/17/86 (в середньому на $1,95 \lg \text{TID}_{50}$ у порівнянні з контролем) і знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію цього вірусу (в середньому на $2,1 \lg \text{TID}_{50}$).

Стосовно вірусу грипу птахів спостерігається дещо інша тенденція. З таблиці 5.4 видно, що етоній у концентрації 125 мкг/мл впливав на позаклітинний вірус грипу як штаму H_5N_3 , так і H_7N_3 , але не знижував при

цьому здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу птахів.

Таким чином, отримані на культурі тканини ХАО результати свідчать, що етоній має певні противірусні властивості у відношенні всіх досліджуваних штамів вірусу грипу, як людини, так і птахів, незалежно від їх антигенної структури. Виявлене не тільки гальмування репродукції досліджуваних штамів, але й регулярний вплив препарату на позаклітинний вірус, що можна вважати одним з механізмів його противірусної дії. Вплив етонію на здатність культури тканин ХАО підтримувати репродукцію досліджуваних штамів вірусу грипу був не завжди значним і регулярним.

5.2.3. Рівень протигрипозної активності унітіолу в культурі тканини ХАО

Рівень гальмування репродукції вірусу грипу людини унітіолом також відпрацьовували на моделі штаму А/Гонконг/1/68 (H₃N₂). Фрагменти тканини ХАО інфікували розведеннями вірусу в дозі 100-1000 ТІД₅₀ на глюкозо-желатиновому середовищі, яке у дослідних зразках містило препарату у кінцевій концентрації 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 мг/мл. У дозі 0,5 мг/мл унітіол не спричиняв регулярного гальмування репродукції вірусу А/Гонконг/1/68 (H₃N₂). Таким чином мінімальна ефективна доза для унітіолу у відношенні вірусів грипу людини була 1 мг/мл.

У цій дозі (1 мг/мл або 0,1%) унітіол статистично вірогідно гальмував 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.5.4).

Як вже зазначалось вище, в якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу людини використовували рибавірин у дозі 0,024 мкг/мл. Оскільки його вплив на репродукцію вірусу грипу людини штаму А/PR/8/34 (H₁N₁) склав 1,37 lg ТІД₅₀, для штаму А/Гонконг/1/68 (H₃N₂) цей показник становив 0,37 lg, а для штаму В/Ленінград/17/86 – 1,4 lg ТІД₅₀, можна зазначити, що унітіол у

мінімальній ефективній дозі спричиняв регулярний вплив, порівняний з референс-препаратом, але у концентрації в 40000 разів вище.

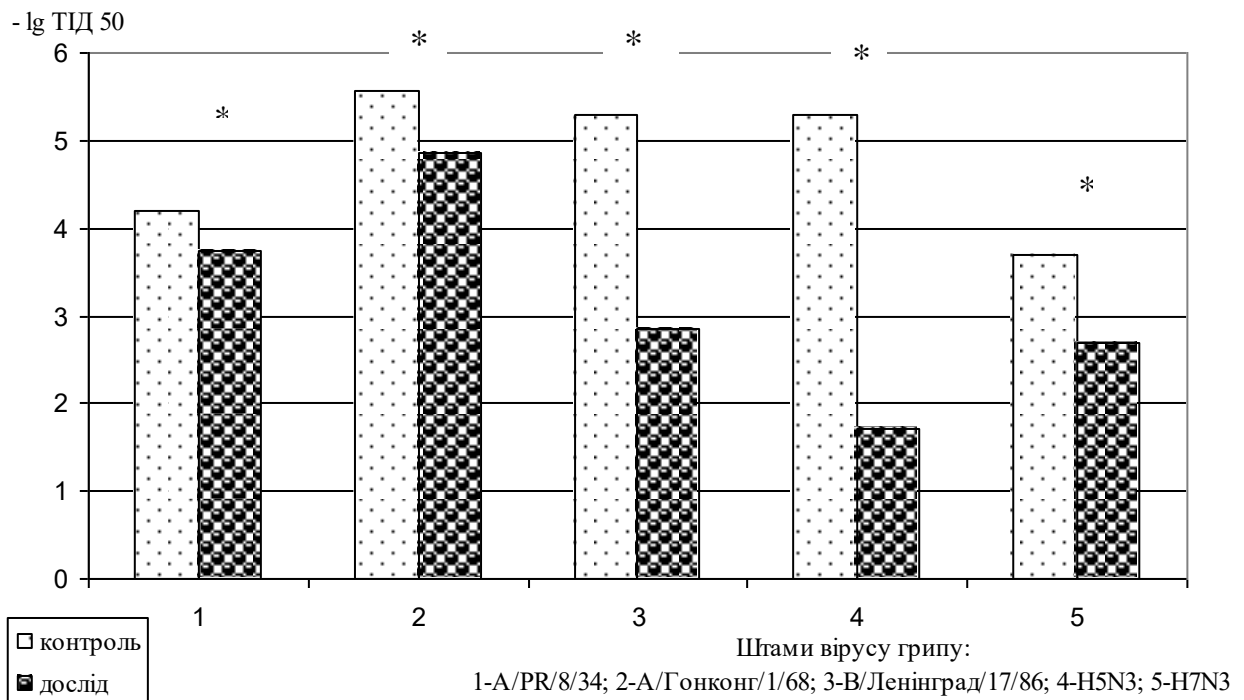


Рис.5.4. Вплив унітіолу на репродукцію вірусів грипу на культурі клітин ХАО
Умовні позначення: * - Р за К.З. < 0,05

Оскільки на моделях з штамми вірусів грипу птахів доза унітіолу у кінцевій концентрації 1 мг/мл виявилась неефективною, була визначена мінімальна ефективна доза, яка призводила до регулярного гальмування репродукції штамів вірусу грипу птахів Н₅Н₃ та Н₇Н₃ *in vitro* на культурі клітин ХАО. Вона була в 10 разів вища, ніж мінімальна ефективна доза для штамів вірусу грипу людини. Тобто, унітіол гальмував репродукцію вірусів грипу птахів Н₅Н₃ та Н₇Н₃ у концентрації 10 мг/мл (1%) на 3,6 і 1,0 lg ТІД₅₀ відповідно (рис.5.4). Ці показники майже не відрізняються від активності Е-амінокапронової кислоти (3,07 та 1,2 lg ТІД₅₀), яку використовували в якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу птахів. Таким чином, унітіол спричиняв регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу у концентрації у 1,5 нижче, ніж референс-препарат.

Була досліджена віруліцидна дія унітіолу по відношенню до штамів вірусу грипу А/PR/8/34, А/Гонконг/1/68, В/Ленінград/17/86, Н₅Н₃ та Н₇Н₃, а також вплив препарату на здатність клітин культури тканини ХАО підтримувати репродукцію цих вірусів у відповідних концентраціях. Отримані результати наведені в таблиці 5.5.

Таблиця 5.5

Вплив унітіолу на позаклітинний вірус та здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу

Штами вірусу	Вплив на здатність культури тканини підтримувати репродукцію вірусів		Вплив на позаклітинний вірус	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
А/PR/8/34 (Н ₁ Н ₁)	3,05±0,74	1,10±0,54	6,05±0,22	4,70±0,26
А/Гонконг/1/68 (Н ₂ Н ₂)	4,26±0,21	2,98±0,12	2,62±0,15	2,36±0,36
В/Ленінград/17/86	4,50±0,54	2,60±0,34	3,30±0,38	3,55±0,10
Н ₅ Н ₃	3,40±0,53	0,50±0,01	2,80±0,42	2,05±0,33
Н ₇ Н ₃	4,15±0,18	3,60±0,03	4,55±0,18	4,2±0,16

Примітка: активність наводиться в логарифмах 50%-ної тканинної інфікуючої дози (lg ТІД₅₀).

З таблиці видно, що препарат у дозі 1 мг/мл впливав на позаклітинний вірус А/PR/8/34 (Н₁Н₁) (в середньому на 1,95 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем) та знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію цього вірусу (в середньому на 1,35 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем).

Аналогічним чином унітіол у дозі 1 мг/мл впливав на інший штам вірусу грипу А серопідтипу Н₃Н₂ - А/Гонконг/1/68. Значною мірою знижувалась здатність тканини підтримувати репродукцію вірусу (в середньому на 1,28 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем), а віруліцидна дія була незначною (в середньому на 0,26 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем), та за непараметричним критерієм знаків ці показники були статистично значущими.

Що стосується впливу 0,1% унітіолу (1 мг/мл) на репродукцію вірусу грипу В/Ленінград/17/86, здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію цього вірусу та позаклітинний вірус (див.табл.5.5), то закономірності, виявлені для вірусів грипу А обох серопідтипів (H_1N_1 та H_3N_2), були дещо іншими відносно вірусу грипу В. Препарат впливав на здатність культури клітин підтримувати репродукцію цього вірусу (в середньому на $1,9 \lg TID_{50}$ у порівнянні з контролем), не впливаючи на позаклітинний вірус. За непараметричним критерієм знаків всі ці показники були статистично значущими.

При вивченні впливу унітіолу у кінцевій концентрації 10 мг/мл на здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу птахів H_5N_3 та H_7N_3 та позаклітинний вірус були отримані результати, які свідчать, що унітіол у досліджуваній концентрації знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу птахів та виявляв незначну віруліцидну дію (табл.5.5).

Отримані дані дозволяють стверджувати, що унітіол має певні противірусні властивості у відношенні всіх досліджуваних штамів вірусу грипу не залежно від їх антигенних властивостей. Спостерігався вплив унітіолу у досліджуваних дозах на здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів, як штамів вірусу грипу людини, так і штамів вірусу грипу птахів, а також незначний але регулярний вплив препарату на позаклітинний вірус. Тобто, можна вважати, механізм противірусної дії унітіолу пов'язаний з впливом як на чутливі клітини організму хазяїна, так і на позаклітинний вірус.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що всі досліджувані препарати проявили певні противірусні властивості у відношенні вірусів грипу на культурі тканини ХАО. Чутливими до декаметоксину, етонію та унітіолу були всі досліджувані віруси грипу – як віруси грипу людини А (серопідтипи H_1N_1 і H_3N_2) та В, так і віруси грипу птахів (серопідтипи H_5N_3 і H_7N_3). При цьому противірусна дія препаратів не зводилась тільки до втручання у процес репродукції. Декаметоксин та етоній проявляли певну

віруліцидну дію, а унітіол окрім віруліцидної дії знижував здатність клітин культури тканин ХАО підтримувати репродукцію цих вірусів. Отже, можна вважати, що одним з механізмів протівірусної дії біс-четвертинних солей амонію є вплив на позаклітинний вірус. Вплив декаметоксину та етонію на здатність культури тканин ХАО підтримувати репродукцію досліджуваних штамів вірусу грипу був не завжди регулярним. Для унітіолу таким механізмом може бути як вплив на здатність клітин культури тканин ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу, так і на позаклітинний вірус.

Наведені результати представлені у публікаціях [183, 185-193].

РОЗДІЛ 6. ПРОТИВІРУСНА ДІЯ ДОСЛІДЖУВАНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГРИПІ У ТВАРИН

6.1. Рівень протигрипозної активності біс-четвертинних солей амонію при їх застосуванні на моделі грипозної інфекції у мишей

6.1.1. Захисна дія декаметоксину при інтраназальному способі його застосування під час експериментального грипу

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

0,1% розчин декаметоксину (50 мкг/мишу) вводили інтраназально за профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами, які докладно наведені вище у розділі матеріали та методи. Захисну дію препарату визначали по зниженню загибелі тварин на протязі 14 діб після інфікування, розраховували ЛД₅₀ для кожної групи. Результати визначення захисної дії декаметоксину при експериментальній грипозній інфекції відображені на рис.6.1.

Наведені на рис.6.1 показники свідчать, що захисна дія декаметоксину при його застосуванні за профілактичною схемою була незначною (0,5 lg ЛД₅₀). На відміну від цього різниця ЛД₅₀ між контрольною та дослідною групами при застосуванні декаметоксину за лікувально-профілактичною схемою складала 2,0 lg ЛД₅₀, а при лікувальній схемі введення препарату вона була 1,5 lg ЛД₅₀. Тобто можна стверджувати, що інтраназальне введення декаметоксину у дозі 50 мкг/мишу за лікувально-профілактичною та лікувальною схемами статистично вірогідно захищало мишей, інфікованих вірусом грипу A/PR/8/34 (H₁N₁), знижуючи кількість загиблих тварин.

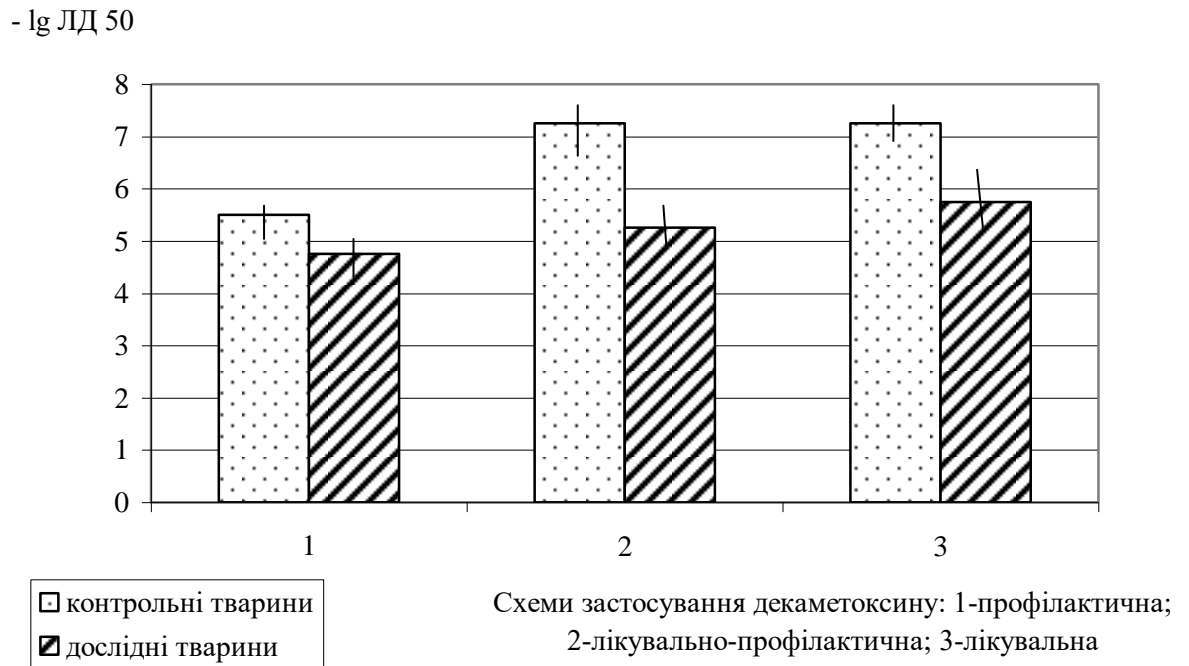


Рис.6.1. Захисна дія декаметоксину при його інтраназальному введенні за різними схемами при експериментальному грипі у мишей

Порівнюючи летальність в групах контрольних та дослідних тварин, розраховували середню тривалість життя у перерахунку на всіх піддослідних тварин, коефіцієнт захисту дослідних мишей та індекс ефективності досліджуваного препарату (табл.6.1).

Наведені в таблиці 6.1 дані свідчать, що застосування декаметоксину за всіма наведеними схемами призводило до захисту тварин, зменшуючи % загибелі та подовжуючи середню тривалість життя тварин у дослідній групі у порівнянні з контролем.

Використання декаметоксину у дозі 50 мкг/мишу за профілактичною схемою знижувало кількість загиблих тварин на 15%, подовжуючи середню тривалість життя на 0,6 дня у перерахунку на всіх тварин. Індекс ефективності використання препарату за профілактичною схемою склав 18,7%.

Застосування препарату за лікувально-профілактичною схемою ефективніше захищало піддослідних тварин, зменшуючи кількості загиблих тварин у дослідній групі на 45%. При цій схемі застосування середню

тривалість життя у піддослідних мишей подовжувалась на 2,6 дня у перерахунку на всіх тварин, а індекс ефективності використання препарату був 45%.

Таблиця 6.1

Показники захисних властивостей декаметоксину (у дозі 50 мкг/мишу) на моделі летальної експериментальної грипозної інфекції у мишей

Показники	Схеми застосування препарату		
	профілактична	лікувально-профілактична	лікувальна
% загиблих тварин у контролі	80,00	100,00	75,00
% загиблих тварин у досліді	65,00	55,00	50,00
Різниця % загиблих тварин	15,00	45,00	25,00
Коефіцієнт захисту	1,23	1,82	1,50
Індекс ефективності %	18,70	45,00	33,00
Середня тривалість життя у контролі у перерахунку на всіх тварин (у днях)	12,10	7,25	8,25
Середня тривалість життя у досліді у перерахунку на всіх тварин (у днях)	12,70	9,85	11,00

Використання декаметоксину у дозі 50 мкг/мишу за лікувальною схемою зменшувало летальність у дослідній групі тварин на 25%, подовжуючи середню тривалість життя на 2,75 дня у перерахунку на всіх тварин. При цьому індекс ефективності застосування препарату за лікувальною схемою був 33%.

Таким чином, інтраназальне застосування декаметоксину у дозі 50 мкг/мишу за лікувально-профілактичною та лікувальною схемами призводило до статистично значущого захисту тварин на моделі експериментального грипу у мишей, зменшуючи відсоток їх загибелі та подовжуючи середню тривалість життя у дослідній групі у порівнянні з контролем. Порівнюючи досліджувані показники слід підкреслити, що найефективнішим виявилось застосування декаметоксину за лікувально-профілактичною схемою.

6.1.2. Вплив інтраназального застосування декаметоксину на титр інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз в легенях тварин під час експериментального грипу у мишей

Відомо, що інфікування вірусом грипу експериментальних тварин призводить до підвищення активності протеолітичних ферментів в легенях [7]. При лікуванні експериментальної грипозної інфекції препаратами різної природи з різними механізмами дії протеолітична активність ферментів в легенях дослідних тварин була нижчою, ніж у контрольних інфікованих мишей [162]. У зв'язку з вищенаведеним нами був вивчений вплив введення декаметоксину у дозі 50 мкг/мишу за описаними вище схемами (профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною) на титри інфекційного вірусу грипу і рівень кислих та лужних протеаз в легенях експериментальних тварин.

Для визначення цих показників при моделюванні експериментального грипу у мишей по 7 тварин з контрольної та дослідної груп у 2-3 та 4-5 добу під легким ефірним наркозом знекровлювали, розтинали та вилучали легені. З легенів готували 10% гомогенат, в якому і визначали рівень біохімічних показників. Титр інфекційного вірусу визначали, інфікуючи 10-кратними розведеннями гомогенатів культуру тканини ХАО. Результати дослідження наведені в табл.6.2-6.4.

Таблиця 6.2

Вплив використання декаметоксину за профілактичною схемою на рівень кислих та лужних протеаз і титр інфекційного вірусу в легенях білих мишей при експериментальному грипі

Показники	Група	3 доба після інфікування	5 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,022 \pm 0,001	0,023 \pm 0,002
	Декаметоксин	0,023 \pm 0,008	0,020 \pm 0,001
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,024 \pm 0,007	0,033 \pm 0,010
	Декаметоксин	0,015 \pm 0,004	0,023 \pm 0,001
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	3,430 \pm 0,090	3,780 \pm 0,275
	Декаметоксин	3,790 \pm 0,143	2,960 \pm 0,391

Примітка

* - $P > 0,05$ – достовірність різниці між контролем та дослідом

Аналіз вивчення протеолітичної активності свідчить про те, що рівень катептичної активності суттєво не відрізнявся у контрольних та дослідних тварин усіх груп в усі досліджувані строки. Активність лужних протеаз при застосуванні декаметоксину за профілактичною схемою мала виражену тенденцію до зниження як на 3, так і на 5 добу після інфікування.

Таблиця 6.3

Вплив використання декаметоксину за лікувально-профілактичною схемою на рівень кислих та лужних протеаз і титр інфекційного вірусу в легенях білих мишей при експериментальному грипі

Показники	Група	2 доба після інфікування	4 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,019±0,001	0,020±0,001
	Декаметоксин	0,018±0,002	0,020±0,001
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,014±0,006	0,024±0,001*
	Декаметоксин	0,008±0,001	0,010±0,002
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	2,420±0,876	4,50±0,479
	Декаметоксин	2,960±0,360	3,820±0,499

Примітка

* - $P > 0,05$ – достовірність різниці між контролем та дослідом

Таблиця 6.4

Вплив використання декаметоксину за лікувальною схемою на рівень кислих та лужних протеаз і титр інфекційного вірусу в легенях білих мишей при експериментальному грипі

Показники	Група	3 доба після інфікування	5 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,018±0,001	0,018±0,001
	Декаметоксин	0,019±0,001	0,017±0,005
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,013±0,002*	0,011±0,002
	Декаметоксин	0,009±0,005	0,009±0,002
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	5,040±0,325	4,710±0,145
	Декаметоксин	4,820±0,645	3,670±0,248*

Примітка

* - $P > 0,05$ – достовірність різниці між контролем та дослідом

Така ж тенденція спостерігалася й при застосуванні декаметоксину за лікувально-профілактичною схемою через 2 доби після інфікування, і була

статистично значущою через 4 доби. При введенні препарату за лікувальною схемою така тенденція мала місце на 3 добу після інфікування.

В табл. 6.2-6.4 наведені і результати титрування гомогенатів легенів мишей, що отримували декаметоксин інтраназально за різними схемами введення при експериментальній грипоznій інфекції.

Аналізуючи результати титрування інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин, які отримували препарат за профілактичною схемою, наведені в табл.6.2, слід підкреслити наступне. На третю добу після інфікування кількість вірусу в легенях дослідних та контрольних тварин суттєво не відрізнялась і була $0,36 \text{ lg TID}_{50}$, що можна розглядати на рівні похибки. На п'яту добу титр інфекційного вірусу в легенях дослідних тварин був на $0,86 \text{ lg TID}_{50}$ нижчим, ніж титр вірусу в легенях контрольних мишей.

При застосуванні декаметоксину за лікувально-профілактичною схемою (табл.6.3) титр інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин мав коливання, аналогічні до тих, що мали місце при профілактичній схемі застосування препарату. На другу добу після інфікування кількість вірусу в легенях дослідних та контрольних тварин відрізнялась на $0,54 \text{ lg TID}_{50}$. На 4 добу після інфікування в легенях дослідних мишей титр інфекційного вірусу був нижчим на $0,68 \text{ lg TID}_{50}$.

В табл.6.4 наведені результати визначення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин, які отримували $0,1\%$ декаметоксин інтраназально за лікувальною схемою. Аналіз цих даних свідчить, що в легенях мишей, які отримували препарат за лікувальною схемою, титр інфекційного вірусу був нижчим. На третю добу після інфікування цей показник в легенях дослідних та контрольних тварин відрізнявся на рівні похибки ($0,22 \text{ lg TID}_{50}$), на п'яту добу титр інфекційного вірусу в легенях дослідних тварин був на $1,04 \text{ lg TID}_{50}$ нижче ніж у контрольних.

Таким чином, аналіз наведених результатів свідчить, що титр інфекційного вірусу в гомогенатах легенів експериментальних тварин при всіх схемах введення декаметоксину зменшувався лише на 4-5 добу після

інфікування експериментальних тварин. У ранні строки спостерігалось незначне підвищення (на рівні похибки – $0,5 \lg \text{ТІД}_{50}$) титру інфекційного вірусу в легенях білих мишей дослідної групи у порівнянні з контролем. Застосування декаметоксину за профілактично, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами супроводжувалось зниженням активності лужних протеаз в легенях інфікованих тварин, що співпадає з даними літератури у відношенні до інших противірусних препаратів.

Наведені результати представлені у публікаціях [185, 186, 188].

6.1.3. Захисна дія етонію при інтраназальному способі його застосування під час експериментального грипу

Аналогічним чином вивчали протигрипозну дію етонію в експерименті на тваринах. Інфекцію моделювали шляхом інтраназального зараження білих безпородних мишей під легким ефірним наркозом вірусом грипу А/PR/8/34.

0,2% розчин етонію (100 мкг/мишу) вводили інтраназально за профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами під легким ефірним наркозом. Захисну дію препарату визначали за зниженням загибелі тварин на протязі 14 діб після інфікування, розраховуючи ЛД₅₀. Результати цих досліджень відображені на рис.6.5.

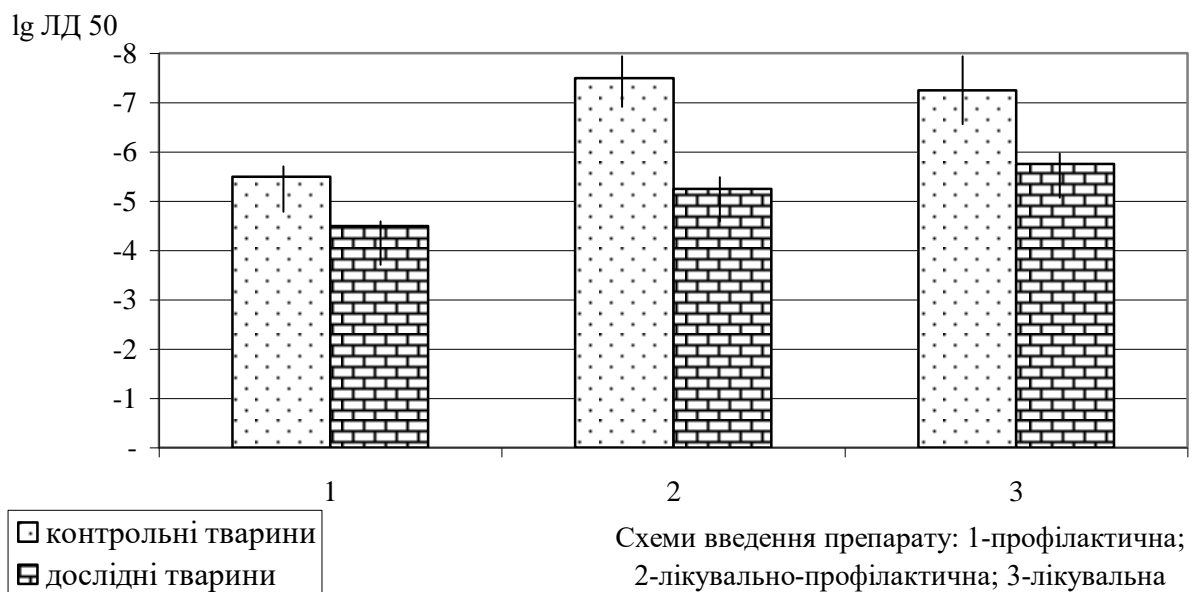


Рис.6.5. Захисна дія етонію при його інтраназальному введенні за різними схемами при грипі у мишей

Наведені результати свідчать, що захисна дія етонію при всіх схемах його застосування була значною. Різниця ЛД₅₀ між контрольною та дослідною групами складала 1,0 Іg при профілактичному використанні препарату, 2,25 Іg при застосуванні етонію за лікувально-профілактичною схемою та 1,5 Іg ЛД₅₀ при лікувальній схемі його введення.

Таким чином, можна стверджувати, що інтраназальне введення 0,2% розчину етонію за всіма схемами застосування статистично вірогідно захищало мишей, інфікованих вірусом грипу А/PR/8/34 (H₁N₁), знижуючи кількість загиблих тварин.

Порівнюючи летальність в групах контрольних та дослідних тварин розраховували середню тривалість життя у перерахунку на усіх піддослідних тварин, коефіцієнт захисту дослідних мишей та індекс ефективності досліджуваного препарату (табл.6.5).

Наведені в таблиці 6.5 дані свідчать, що застосування етонію за всіма схемами введення призводило до захисту тварин, зменшуючи відсоток загибелі та подовжуючи середню тривалість життя тварин у дослідній групі у порівнянні з контролем.

Використання препарату у дозі 100 мкг/мишу за профілактичною схемою знижувало кількість загиблих тварин на 20%, подовжуючи середню тривалість життя на 0,35 дня у перерахунку на всіх тварин. Індекс ефективності використання препарату за профілактичною схемою складав 24,8%.

Застосування етонію за лікувально-профілактичною схемою було більш ефективним. Спостерігалось зменшення кількості загиблих тварин у дослідній групі на 45%, середня тривалість життя у дослідних тварин була більшою на 2,8 дня у перерахунку на всіх тварин, а індекс ефективності використання препарату за цією схемою був 45%.

Використання етонію за лікувальною схемою зменшувало летальність у дослідній групі тварин на 30%, подовжуючи середню тривалість життя на 3 дні у перерахунку на всіх тварин. При цьому індекс ефективності застосування препарату за лікувальною схемою був 42%.

Показники захисних властивостей етонію (у дозі 100 мкг/мишу) на моделі летальної експериментальної грипозної інфекції у мишей

Показники	Схема застосування препарату		
	профілактична	лікувально-профілактична	лікувальна
% загиблих тварин у контролі	80,00	100,00	75,00
% загиблих тварин у досліді	60,00	55,00	45,00
Різниця % загиблих тварин	20,00	45,00	30,00
Коефіцієнт захисту	1,33	1,82	1,60
Індекс ефективності %	24,80	45,00	42,00
Середня тривалість життя у контролі у перерахунку на усіх тварин (у днях)	12,10	7,25	8,25
Середня тривалість життя у досліді у перерахунку на усіх тварин (у днях)	12,45	10,05	11,25

Таким чином, інтраназальне застосування етонію у дозі 100 мкг/мишу за всіма схемами призводило до статистично значущого захисту тварин на моделі експериментального грипу у мишей, зменшуючи відсоток їх загибелі та подовжуючи середню тривалість життя у дослідній групі у порівнянні з контролем. Найкращий захист тварин за всіма досліджуваними показниками реєстрували при застосуванні етонію за лікувально-профілактичною схемою, що збігається з даними, отриманими при використанні декаметоксину під час експериментального грипу у мишей.

6.1.4. Вплив інтраназального застосування етонію на титр інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз в легенях тварин під час експериментального грипу у мишей

При дослідженні впливу введення етонію за наданими вище схемами на титр інфекційного вірусу грипу і рівень кислих та лужних протеаз в легенях тварин на 2-3 та 4-5 день після їх зараження проводили аналогічно до умов

проведення дослідів з декаметоксином. Результати дослідження наведені в табл.6.6-6.8.

Аналіз отриманих даних щодо протеолітичної активності в легенях тварин при застосуванні етонію під час експериментального грипу свідчить про те, що рівень катептичної активності суттєво не відрізнявся у контрольних та дослідних тварин в усі досліджувані строки незалежно від схеми застосування препарату.

Таблиця 6.6

Вплив використання етонію за профілактичною схемою на рівень кислих та лужних протеаз у легенях білих мишей при експериментальному грипі

Показники	Група	3 доба після інфікування	5 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,022±0,001	0,023±0,002
	Етоній	0,025±0,002	0,022±0,001
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,024±0,007	0,033±0,010
	Етоній	0,012±0,004	0,025±0,002
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	3,430±0,090	3,780±0,275
	Етоній	3,750±0,349	3,610±0,231

Примітка

- $P > 0,05$ – достовірність різниці між контролем та дослідом

Активність лужних протеаз при застосуванні етонію за профілактичною схемою мала виражену тенденцію до зниження як на 3, так і на 5 добу після інфікування тварин. Така ж тенденція спостерігалась і при застосуванні препарату за лікувально-профілактичною схемою через 2 доби після інфікування. Через 4 доби після інфікування ця різниця була статистично значущою. При застосуванні етонію за лікувальною схемою ця тенденція мала місце лише на 3 добу.

Результати визначення титру інфекційного вірусу в гомогенатах легенів мишей, які були отримані при інфікуванні тканини ХАО, продемонстровані в табл.6.6-6.8.

В табл.6.6 наведені результати визначення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин, які отримували 0,2% етоній інтраназально за профілактичною схемою, які свідчать, що на третю добу після інфікування титр вірусу в легенях контрольних тварин значно не

відрізнявся від цього показника у контрольних тварин і був на рівні похибки (0,32 lg ТІД₅₀). На п'яту добу в легенях мишей, які отримували препарат за профілактичною схемою введення, титр інфекційного вірусу в легенях дослідних тварин був нижчим, але різниця також була незначною - 0,19 lg ТІД₅₀.

Таблиця 6.7

Вплив використання етонію за лікувально-профілактичною схемою на рівень кислих та лужних протеаз у легенях білих мишей при експериментальному грипі

Показники	Група	2 доба після інфікування	4 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,019±0,001	0,020±0,001
	Етоній	0,017±0,001	0,019±0,001
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,014±0,006	0,024±0,001*
	Етоній	0,008±0,002	0,009±0,001
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	2,420±0,876	4,500±0,479*
	Етоній	2,390±0,361	3,250±0,540

Примітка

* - P>0,05 – достовірність різниці між контролем та дослідом

Таблиця 6.8

Вплив використання етонію за лікувальною схемою на рівень кислих та лужних протеаз у легенях білих мишей при експериментальному грипі

Показники	Група	3 доба після інфікування	5 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,018±0,001	0,018±0,001
	Етоній	0,018±0,001	0,019±0,002
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,013±0,002*	0,011±0,002
	Етоній	0,008±0,003	0,007±0,002
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	5,040±0,325	4,710±0,145*
	Етоній	4,850±0,293	3,820±0,282

Примітка

* - P>0,05 – достовірність різниці між контролем та дослідом

Аналізуючи наведені в табл.6.7 дані результатів визначення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин, які отримували 0,2% етоній інтраназально за лікувально-профілактичною схемою, можна констатувати, що в легенях дослідних мишей титр інфекційного вірусу був нижчим. На другу добу після інфікування титр вірусу в легенях дослідних та контрольних тварин відрізнявся не значною мірою і був на рівні похибки ($0,3 \lg \text{ТІД}_{50}$). На п'яту добу у дослідних тварин титр інфекційного вірусу в легенях був нижчим на $1,25 \lg \text{ТІД}_{50}$. Цей показник був статистично значущим.

Аналізуючи результати визначення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин, які отримували інтраназально етоній за лікувальною схемою, наведені в табл.6.8, можемо зазначити, що зберігається тенденція, яка була відзначена при лікувально-профілактичному застосуванні препарату. На третю добу після інфікування титр вірусу в легенях дослідних та контрольних тварин був майже на одному рівні, відрізняючись на $0,19 \lg \text{ТІД}_{50}$. На п'яту добу в легенях мишей, які отримували етоній інтраназально за лікувальною схемою, титр інфекційного вірусу був нижчим на $0,89 \lg \text{ТІД}_{50}$.

Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчить, що кількість інфекційного вірусу в гомогенатах легенів експериментальних тварин помітно зменшується при лікувально-профілактичній та лікувальній схемах введення етонію. При всіх схемах застосування препарату спостерігалось зниження титру інфекційного вірусу в легенях дослідних мишей на 4-5 добу після зараження. На ранніх строках інфікування (1-2 доба) цей показник у контрольних та дослідних тварин був майже на одному рівні (різниця була у межах похибки). Використання етонію за профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами супроводжувалось зниженням активності лужних протеаз в легенях інфікованих тварин, що співпадає з даними отриманими при застосуванні декаметоксину, а також з даними літератури щодо використання інших противірусних препаратів.

Наведені результати представлені у публікаціях [186, 190].

6.2. Протигрипозна дія унітіолу при інтраназальному способі його застосування на моделі грипозної інфекції у мишей

6.2.1. Захисна дія унітіолу при інтраназальному способі його застосування під час експериментального грипу

Протигрипозну дію унітіолу на тваринах вивчали при експериментальній інфекції, яку моделювали шляхом інтраназального зараження білих безпородних мишей під легким ефірним наркозом вірусом грипу A/PR/8/34 (H₁N₁), адаптованим до мишей. Оскільки хімічна структура унітіолу відрізнялась від структури біс-четвертинних солей амонію, то був різним і механізм втручання препаратів у різні стадії циклу репродукції вірусу грипу. Тому ми вважали за доцільне досліджувати захисний вплив унітіолу при експериментальному грипі у мишей лише при профілактичній та лікувально-профілактичній схемах застосування. 0,05 мл 10%-ного або 5%-ного розчину унітіолу вводили тваринам інтраназально за профілактичною або лікувально-профілактичною схемами відповідно. Захисну дію препарату визначали за зниженням загибелі тварин на протязі 14 діб після інфікування. Результати цих досліджень відображені на рис.6.9.

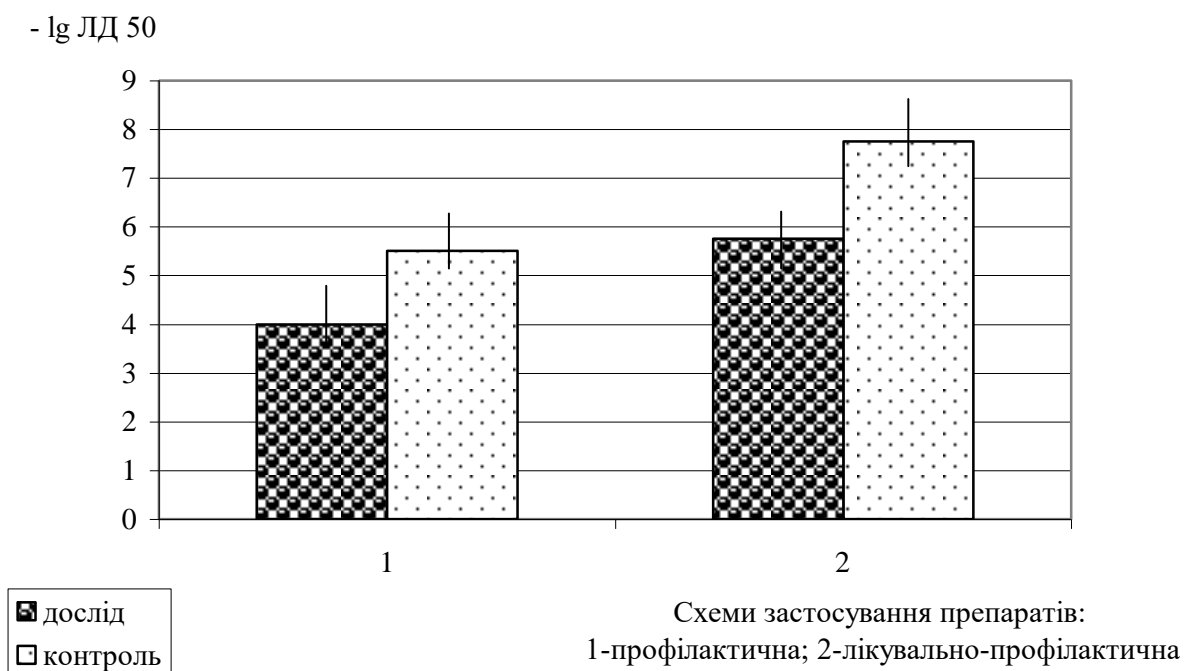


Рис.6.9. Захисна дія унітіолу при його інтраназальному використанні при експериментальному грипі у мишей

Отримані результати свідчать, що захисна дія унітіолу була статистично значущою при обох схемах його застосування. Різниця ЛД₅₀ між контрольною та дослідною групами складала 1,5 lg при профілактичному використанні 10%-ного розчину препарату. Ця тенденція зберігалася і при застосуванні 5%-ного розчину унітіолу за лікувально-профілактичною схемою, коли різниця загибелі в контрольній та дослідній групах була 2,0 lg ЛД₅₀.

Порівнюючи летальність в групах контрольних та дослідних тварин розраховували середню тривалість життя у перерахунку на усіх піддослідних тварин, коефіцієнт захисту дослідних мишей та індекс ефективності досліджуваного препарату (табл.6.6).

Наведені в таблиці 6.6 дані свідчать, що застосування унітіолу за обома наведеними схемами призводило до захисту тварин, зменшуючи відсоток загибелі та подовжуючи середню тривалість життя тварин у дослідній групі у порівнянні з контролем у перерахунку на всіх тварин.

Таблиця 6.6

Показники захисних властивостей унітіолу на моделі летальної експериментальної грипозної інфекції у мишей

Показники	Профілактична схема застосування препарату у дозі 5 мг/мишу	Лікувально-профілактична схема застосування препарату у дозі 2,5 мг/мишу
% загиблих тварин у контролі	70,00	94,40
% загиблих тварин у досліді	40,00	44,40
Різниця % загиблих тварин	30,00	50,00
Коефіцієнт захисту	1,75	2,13
Індекс ефективності %	42,90	53,00
Середня тривалість життя у контролі у перерахунку на усіх тварин (у днях)	12,10	8,15
Середня тривалість життя у досліді у перерахунку на усіх тварин (у днях)	13,10	14,45

Так, використання унітіолу у дозі 5 мг/мишу за профілактичною схемою знижувало кількість загиблих тварин на 30%, подовжуючи середню тривалість на 1 день у перерахунку на всіх тварин. Індекс ефективності використання препарату за профілактичною схемою склав 42,9%.

Застосування препарату у дозі 2,5 мг/мишу за лікувально-профілактичною схемою було ефективнішим. Кількість загиблих у дослідній групі тварин зменшувалась на 50% у порівнянні з контролем, середня тривалість життя у дослідних тварин була довшою на 6,3 дні у перерахунку на всіх тварин, а індекс ефективності використання препарату за цією схемою був 53%.

Таким чином, інтраназальне застосування унітіолу при експериментальному грипі за профілактичною та лікувально-профілактичною схемами статистично значуще гальмувало загибель тварин та подовжувало тривалість життя у дослідних мишей у порівнянні з контрольними. Слід підкреслити, що більш ефективним виявилось застосування унітіолу за лікувально-профілактичною схемою. Це співпадає з результатами дослідження захисної дії біс-четвертинних солей амонію при експериментальному грипі у мишей.

6.1.4. Вплив інтраназального застосування унітіолу на титр інфекційного вірусу та рівень кислих і лужних протеаз в легенях тварин під час експериментального грипу у мишей

При профілактичному застосуванні препарату біохімічні показники та титр інфекційного вірусу визначали на 3 та 5 добу після інфікування, а при лікувально-профілактичній схемі – на 1, 3, 5 та 7 дні. Результати дослідження наведені в табл.6.9-6.10.

Аналіз результатів визначення рівня протеаз в легенях тварин, які отримували унітіол за профілактичною схемою свідчить про те, що рівень як кислих, так і лужних протеаз у визначені терміни в легенях контрольних та дослідних тварин значно не відрізнялися, хоча мала місце тенденція до зниження ензиматичної активності лужних протеаз під впливом унітіолу.

**Вплив унітіолу при застосуванні за профілактичною схемою на рівень
кислих та лужних протеаз у легенях білих мишей при
експериментальному грипі**

Показники	Група	3 доба після інфікування	5 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,022 \pm 0,001	0,023 \pm 0,002
	Дослід	0,022 \pm 0,004	0,023 \pm 0,001
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину/мл за хв.)	Контроль	0,024 \pm 0,007	0,023 \pm 0,001
	Дослід	0,016 \pm 0,004	0,020 \pm 0,004
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	3,630 \pm 0,090	3,780 \pm 0,275
	Дослід	4,360 \pm 0,650	2,210 \pm 0,395

Наведені в табл.6.9 дані свідчать, що застосування 10% розчину унітіолу (5 мг/мишу) за профілактичною схемою впливало на рівень інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин. На третю добу після інфікування цей показник в легенях дослідних та контрольних тварин мав дуже великий рівень відхилення від середнього показника, тому різницю (0,73 lg ТІД₅₀) можна вважати несуттєвою на рівні похибки. На п'яту добу різниця титру інфекційного вірусу на 1,57 lg ТІД₅₀ була нижчою в легенях дослідних мишей, які отримували унітіол інтраназально.

Застосування 5% розчину унітіолу (2,5 мг/мишу) за лікувально-профілактичною схемою не призводило до суттєвих змін показників кислих протеаз (табл.6.10) в легенях експериментальних тварин на ранніх строках після інфікування (1, 3, 5 доби). На 7 добу спостерігалася тенденція до зниження рівня кислих протеаз у легенях дослідних тварин порівняно з контрольними. Що стосується рівня лужних протеаз, то цей показник дещо зменшувався на протязі (з 1 по 7 добу). Крім того, в усі строки спостерігалась тенденція до зниження рівня лужних протеаз в легенях дослідних тварин у порівнянні з контрольними.

Інтраназальне застосування 5% розчину унітіолу за лікувально-профілактичною схемою призводило до зменшення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин майже у всі строки інфекції

(табл.6.10). Тільки на третю добу в легенях дослідних тварин у порівнянні з контрольними було виявлено незначне (на рівні похибки) підвищення кількості інфекційного вірусу на 0,58 lg ТІД₅₀. На 1-у, 5-у та 7-у доби титр інфекційного вірусу був нижчим в легенях мишей, які інтраназально отримували 5% розчин унітіолу, відповідно на 0,29, 1, 29 та 0, 27 lg ТІД₅₀.

Таблиця 6.10

Вплив унітіолу при застосуванні за лікувально-профілактичною схемою на рівень кислих та лужних протеаз у легенях білих мишей при експериментальному грипі

Показники	Група	1 доба після інфікування	3 доба після інфікування	5 доба після інфікування	7 доба після інфікування
Катептична активність (мкМоль тирозину /мл за хв.)	Контроль	0,088±0,004	0,086±0,002	0,076±0,005	0,084±0,001
	Дослід	0,076±0,001	0,097±0,005	0,067±0,002	0,041±0,005
Казеїнолітична активність (мкМоль тирозину /мл за хв.)	Контроль	0,033±0,006	0,042±0,001	0,025±0,004	0,019±0,002
	Дослід	0,020±0,004	0,030±0,002	0,010±0,003	0,012±0,001
Титр інфекційного вірусу (в lg ТІД ₅₀)	Контроль	1,460±0,050	3,170±0,350	4,500±0,300	2,850±0,470
	Дослід	1,170±0,180	3,750±0,580	3,210±0,370	2,580±0,500

Аналіз отриманих даних дозволяє стверджувати, що використання унітіолу за профілактичною та лікувально-профілактичною схемами призводило до зменшення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин на 5 добу після інфікування. Тільки на третю добу виявлялося незначне підвищення кількості інфекційного вірусу (на рівні похибки) в легенях дослідних тварин у порівнянні з контрольними.

Наведені результати представлені у публікації [187, 191].

Таким чином, досліджувані препарати декаметоксин, етоній та унітіол при їх інтраназальній аплікації за профілактичною, лікувальною та

лікувально-профілактичною схемами при моделюванні експериментального грипу у мишей виявляли захисну дію. Застосування всіх досліджуваних препаратів за лікувально-профілактичною схемою було найбільш ефективним. Крім того, в легенях експериментальних тварин, які отримували препарати, спостерігалось зменшення титру інфекційного вірусу на 4-5 добу та мала місце тенденція до зниження ензиматичної активності лужних протеаз.

РОЗДІЛ 7. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ МЕХАНІЗМІВ ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ 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, яка забезпечує специфічну адсорбцію вірусу на зовнішній мембрані чутливих клітин, та ГА2, що відповідає за проникнення вірусу до клітини. Ці субодиниці після протеолітичного нарізання (процесінгу) поєднані між собою тільки дисульфідним містком.

Раніше було доведено, що протеолітичні системи відіграють важливу роль у взаємодії вірусів грипу з хазяїном взагалі [196]. Саме трипсиноподібні протеази клітин хазяїна приймають участь у вірусному процесінгу, 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 вірусу, що призведе до зниження репродукції вірусу в цілому.

Було також показано, що препарати очищеного і концентрованого вірусу грипу проявляють протамін-розщеплювану протеолітичну активність [196], оскільки вірус грипу має власну трипсиноподібну протеазу. Крім того, під час взаємодії вірусу грипу з плазматичними мембранами чутливих клітин спостерігається активація протеолітичної активності утворюваного вірус-мембранного комплексу [197]. Тобто, стан системи протеолізу на ранніх етапах репродукції вірусу грипу має вагоме значення.

Унітіол (2,3 – димеркаптопропансульфонат натрію), який використовується у медичній практиці як антидот, має у своїй хімічній

структурі дві активні SH-групи і є активним відновлювачем дисульфідних зв'язків. Тому можна сподіватися, що унітіол буде впливати на гемаглютинін вірусу грипу, порушуючи дисульфідні зв'язки між його субодиницями. Внаслідок цього дисульфідні зв'язки будуть відновлюватись, розриватись з утворенням сульфгідрильних груп, а GA_1 буде видалятися з поверхні віріонів. Це порушить взаємодію віріонів з чутливими клітинами хазяїна [7], що призведе до гальмування циклу репродукції вірусу в цілому.

Етоній і декаметоксин є біс-четвертинними солями амонію, їх застосовують як антибактеріальні засоби з широким спектром дії. Відомо, що солі амонію мають лізосомотропні властивості [6]. 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 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 A/PR/8/34 та ізольованими плазматичними мембранами чутливих клітин ХАО визначали протамін-розщеплювану активність, як окремо у препаратах вірусу і мембран, так і у препаратах вірус-мембранного комплексу. Результати експериментів наведено в таблиці 7.1.

Наведені 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. Однак, інгібування протеолітичної активності мембран декаметоксином не було регулярним, на відміну від його впливу на ензиматичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу.

Таблиця 7.1

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

	Рівень протамін-розщеплюваної активності (у мкМоль аргініну / хв.)					
	Контр.1	Дослід1	Контр.2	Дослід2	Контр.3	Дослід3
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	$5,0 \times 10^{-2}$	$0,8 \times 10^{-2}$	$15,6 \times 10^{-2}$	$10,0 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$

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 7.2 наведено результати експериментів.

Таблиця 7.2

Вплив етонію на протамін-розщеплювану 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	$4,7 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$	$5,3 \times 10^{-2}$	$7,3 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$
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	$5,0 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-2}$	$15,6 \times 10^{-2}$	$10,0 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-2}$	$3,1 \times 10^{-2}$

Отримані результати свідчать, що етоній впливав на протеолітичну активність вірусу, ізольованих плазматичних мембран ХАО та вірус-мембранного комплексу у кінцевій концентрації 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 на культурі тканин ХАО *in vitro*. Тобто, вплив препаратів на позаклітинний вірус може бути пов'язаним з ушкодженням вірусної протеази. Крім того, як поверхнево активні речовини, ці препарати гальмують взаємодію вірусних та клітинних рецепторів, що й призводить до інгібування протеолітичної активності вірус-мембранного комплексу.

Ми також вивчали вплив унітіолу на протеолітичні процеси під час вірус-мембранної взаємодії. Результати цих досліджень наведені на рис.7.1 у вигляді середніх показників результатів 5 експериментів.

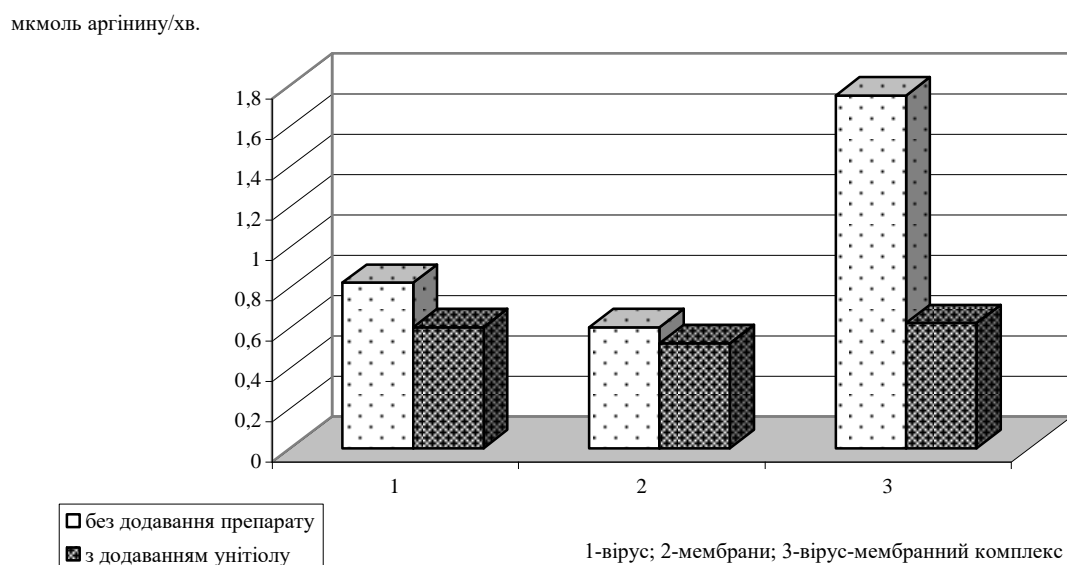


Рис.7.1. Вплив унітіолу на протамін-розщеплювану активність вірусу грипу, плазматичних мембран клітин ХАО та вірус-мембранного комплексу

Отримані результати свідчать, що інгібіція протеолітичної активності унітіолом у кінцевій концентрації 2,5 мг/мл була регулярною у всіх системах, що вивчались, тобто на вірус, ізольовані плазматичні мембрани та вірус-

мембранний комплекс. Оскільки такий результат був отриманий у всіх 5 випадках з 5 дослідів, він є статистично значущим за непараметричним критерієм знаків ($p < 0,05$ за К.З). Ці дані доводять, що унітіол гальмує протеолітичні процеси на ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною. Причому слід зазначити, що він інгібує активність не тільки вірусної протеази, але й знижує ензиматичну активність протеаз клітини хазяїна, а також вірус-мембранного комплексу. Такі показники цілком узгоджуються з результатами протигрипозної активності унітіолу, отриманими на моделі *in vitro*, де спостерігався вплив препарату не тільки на процес вірусної репродукції, але й на здатність культури тканин підтримувати репродукцію вірусу грипу та позаклітинний вірус.

Таким чином встановлено, що декаметоксин, етоній та унітіол гальмували протеолітичні процеси на ранніх етапах репродукції вірусу грипу під час взаємодії вірусу з мембранами чутливих клітин. Причому 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 на культурі тканин ХАО *in vitro*. Тобто механізм дії цих препаратів пов'язаний із впливом на позаклітинний вірус та можливим ушкодженням вірусної протеази. Крім того, властивості цих препаратів як поверхнево активних речовин перешкоджали взаємодії вірусних та клітинних рецепторів, що й призводить 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 вірусу, мембран чутливих клітин та вірус-мембранного комплексу, гальмуючи протеолітичні процеси на ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною. 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.

Наведені результати представлені у публікаціях [188, 190, 191].

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Актуальність теми дисертації обумовлена розповсюдженістю захворювань вірусної етіології та недостатньою кількістю засобів етіотропної терапії. На відміну від бактеріальних інфекцій, збудники більшості з яких чутливі до широкого кола антибіотиків, активність відомих протівірусних препаратів зазвичай обмежена збудниками однієї інфекції. Розширення арсеналу засобів боротьби із збудниками цих захворювань є актуальним завданням для науки та закладів охорони здоров'я.

На сьогодні у світі виробляються біля 300 тисяч лікарських препаратів. Крім того, постійно відкриваються нові, іноді непередбачувані, властивості у давно відомих ліків. Не зважаючи на те, що за останні десятиріччя всесвітній фармацевтичний ринок насичувався десятками нових протівірусних препаратів, питання профілактики і терапії найбільш розповсюджених вірусних інфекцій не вирішене. Тому проблема пошуку активних хіміотерапевтичних засобів проти збудників вірусних інфекцій залишається актуальною і перспективною.

Розробка нових фармакологічних 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 протівірусних властивостей у ліків, які вже використовуються за іншим призначенням, виробництво яких налагоджено, а активність та побічна дія відома (через багаторічне застосування), - є дуже перспективним і економічно виправданим напрямком [5]. Виявлення протівірусних властивостей у різноманітних сполук, у тому числі і у офіційних лікарських препаратів, які на цей час використовують за іншим призначенням, з метою застосування їх як протівірусних засобів, дає можливість розширювати показання для застосування цих препаратів.

До противірусних препаратів відносять не тільки хімічні синтетичні сполуки, але й різні природні речовини та продукти біологічного походження які упереджують та/або пригнічують життєдіяльність усієї популяції вірусу у біологічній системі [96]. Не дивлячись на різну структуру цих препаратів та різноманітність противірусної дії, всіх їх можна поєднати у групу противірусних засобів, що діють на рівні біологічної системи.

Серед лікарських засобів, що використовують при грипі, пріоритет належить етіотропним препаратам, дія яких спрямована безпосередньо на збудника інфекції. Такі препарати доцільно розглядати з урахуванням місця втручання їх у цикл репродукції вірусу грипу.

Оскільки для набуття вірусом грипу інфекційних властивостей гемаглютинін повинен пройти етап протеолітичного нарізання [7], який притаманний й іншим ортоміксовірусам, а також параміксо-, ретро-, герпес-, флаві-, пікорна-, тога вірусами, то активними будуть сполуки, що знижують депротейнізацію вірусу протеолітичними ферментами плазматичних мембран чутливих клітин, підвищують у популяції вірусів кількість неінфекційних віріонів, знижують „врожай” інфекційного вірусу, скорочують період виявлення вірусного антигену.

Відомо, що при грипозній інфекції спостерігається підвищення протеолізу під час вірус-мембранної взаємодії, розвивається геморагічний синдром у хворих; руйнуються структури та наповнюваність легневих судин повітрям, порушується аерогематичний бар'єр; спостерігається деструкція факторів місцевого захисту та ін. Препарати, які будуть попереджати розгортання будь-якої з цих реакцій, безперечно будуть запобігати розповсюдженню інфекції та сприяти одужанню [198]. Можна констатувати, що під час грипу і ГРВІ спостерігається розвиток так званого „хибного кола”: вірус активує протеолітичні системи організму хазяїна, які, у свою чергу, сприяють розвитку, генералізації та поширенню інфекційного процесу [198]. Інгібітори протеолізу та речовини з аналогічною дією можуть розірвати це

„хибне коло” або попередити його формування, впливаючи як на етіологічний фактор, так і на патогенетичні механізми.

Арсенал протівірусних засобів ефективних при герпесі зараз складається з модифікованих нуклеозидів, а саме ациклічних пуриновміщуючих нуклеозидів, таких як ацикловір, валцикловір, фамцикловір (пенцикловір), ганцикловір [73, 140]. Механізм дії цих препаратів полягає у інгібуванні тимідинкінази вірусу, що призводить до гальмування процесу реплікації взагалі [141]. Але ацикловір має погану біодоступність, та в процесі лікування ним у вірусу може формуватись резистентність до цього препарату. Тому виявлення препаратів, які мають протівірусні властивості у відношенні вірусів герпесу з іншим механізмом дії, є перспективним напрямком розвитку хіміотерапії вірусних інфекцій, що дозволить поширити арсенал протигерпетичних засобів.

Останнім часом набув розвитку принцип пошуку протівірусних препаратів, заснований на встановленні взаємозв'язку між хімічною структурою речовин та їх протівірусними властивостями (кількісний зв'язок структура – активність – Quantitative – Structure Activity Relationship - QSAR). Розробка цього напрямку привела на цей час до можливості створення рекомендацій щодо спрямованого синтезу речовин визначеної структури з прогнозованою протівірусною активністю [172]. Цей метод дозволяє також прогнозувати протівірусну активність у відомих ліків, які використовують у медичній практиці за іншим призначенням.

Із застосуванням QSAR підходів та на основі отриманих нами даних про протівірусну дію ряду гетероциклічних сполук та добре відомих протівірусних препаратів були розроблені статистичні моделі протигрипозної та протигерпетичної активності [177, 178]. Модель протигрипозної активності враховувала дані щодо гальмування репродукції вірусу грипу А/Гонконг/1/68 на культурі тканини ХАО досліджуваними речовинами. Модель протигерпетичної активності базувалася на експериментально отриманих показниках гальмування утворення вірус-специфічних внутрішньоядерних включень на перещеплюваній культурі Нер-

2 за допомогою доданих досліджуваних речовин. Комп'ютерні прогнози, зроблені нами на основі QSAR підходів, свідчили про значний ступінь вірогідності наявності специфічної протигрипозної та протигерпетичної активності у досліджуваних препаратів. Розрахована протигрипозна активність для декаметоксину складала 3,2 lg ТІД₅₀, для етонію - 2,8, а для унітіолу - 2,6 lg ТІД₅₀. В експерименті були отримані показники, які дещо відрізнялись від розрахованих, і становили для декаметоксину 1,5, для етонію - 1,6, а для унітіолу - 0,7 lg ТІД₅₀. Рівень прогнозованої протигерпетичної активності, побудований для моделі клітин Нер-2, що становив для декаметоксину 41%, для етонію – 43%, а для унітіолу – 15%, підтвердився експериментально тільки стосовно декаметоксину. Відсоток інгібування утворення вірус-специфічних внутрішньоядерних включень на культурі клітин Нер-2 під впливом цього препарату був 52%. Дослідити активність етонію та унітіолу було неможливо через цитотоксичність препаратів на цій моделі.

Отримані експериментальні дані підтверджують розрахований прогноз наявності протигрипозної активності декаметоксину, етонію та унітіолу, що свідчить про перспективність застосування QSAR підходів з метою виявлення протівірусних властивостей у існуючих лікарських препаратів, що дозволить розширити арсенал протівірусних засобів з різним механізмом дії.

З метою дослідження протівірусної активності лікарських препаратів на клітинних культурах RK13, Нер-2, первинно трипсинізованій культурі ФЕК, культурі тканини ХАО 11-14-добових курячих ембріонів був виявлений рівень їх цитотоксичності, що дозволило визначити мінімальні ефективні дози препаратів.

Проведене порівняльне визначення токсичності досліджуваних препаратів на культурі первинно-трипсинізованих клітин курячих фібробластів (ФЕК) та з використанням інфузорій *Colpoda steinii* показало, що сполуки, які виявляли високу або низьку токсичність на інфузоріях, аналогічним чином впливали і на клітинну культуру ФЕК, тобто

класифікувалися в результаті досліджень як високо або низько токсичні. На підставі цих досліджень нами було розроблено новий спосіб оцінки цитотоксичності біологічно активних сполук і фармакологічних препаратів, який дозволяє спростити методику визначення цитотоксичності у порівнянні зі стандартними способами визначення цього показника на культурах клітин та скоротити строки дослідження більше, ніж у 5 разів. Це значно прискорює і спрощує процес визначення токсичності біологічно активних сполук та фармакологічних препаратів.

Інтерес до етонію і декаметоксину як до противірусних засобів був пов'язаний з низькою міркувань. По-перше, обидва препарати є біс-четвертинними солями амонію. Антивірусна дія таких речовин обумовлена їхніми лізосомотропними властивостями. Відомо, що солі амонію можуть накопичуватися у лізосомах та піднімати рівень рН вище рівня, при якому можливе „роздягання” вірусної частинки, що гальмує репродукцію вірусів, зокрема вірусу грипу, взагалі. Такий механізм притаманний, наприклад, мірамістину. Окрім того, противірусну активність можна передбачати через їхні детергентні властивості, які перешкоджають взаємодії вірусу з клітинною поверхнею, впливаючи на взаємодію клітинних і вірусних рецепторів, та/або руйнують віруси.

Нами були проведені дослідження *in vitro*, в результаті яких було встановлено, що відомі катіонні поверхнево активні біс-четвертинні солі амонію – декаметоксин та етоній гальмують репродукцію вірусів грипу людини, як серотипу А (серопідтипи H_1N_1 та H_3N_2), так і серотипу В у чутливих клітинах, незалежно від їх антигенної структури.

Декаметоксин у дозі 25 мкг/мл статистично вірогідно гальмував репродукцію всіх досліджуваних штамів вірусу грипу людини. Для штаму А/PR/8/34 (H_1N_1) цей показник зменшувався в середньому на 2,0 lg ТІД₅₀ у порівнянні з контролем, для А/Гонгконг/1/68 (H_3N_2) на 1,5 lg ТІД₅₀ і для В/Ленінград/17/86 на 1,9 lg ТІД₅₀. Можна зазначити, що декаметоксин у мінімальній ефективній дозі спричиняв регулярне гальмування репродукції

досліджуваних штамів вірусу грипу людини аналогічне до дії референс-препарату – рибавірину, хоча ця доза була значно вищою (у 1000 разів).

Вивчення впливу декаметоксину на репродукцію пташиного вірусу грипу H_5N_3 *in vitro* показало, що препарат у дозі 25 мкг/мл статистично вірогідно гальмував репродукцію вірусу H_5N_3 на 3,6 lg ТІД₅₀, тобто значно більше, ніж вірусів грипу людини. Гальмування репродукції було виявлено і стосовно вірусу пташиного грипу H_7N_3 (на 1,1 lg ТІД₅₀). Регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу птахів декаметоксином було аналогічним до дії референс-препарату (Е-АКК), але у концентрації значно нижче (у 600 разів). Крім того, препарат у цій дозі проявляв високу статистично значущу віруліцидну дію.

Етоній у нетоксичній для клітин ХАО дозі 125 мкг/мл статистично 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. Етоній у мінімальній ефективній дозі спричиняв регулярний вплив на гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу людини аналогічний до впливу рибавірину, але у концентрації в 5000 разів вище. Препарат у цій дозі статистично вірогідно гальмував репродукцію вірусів грипу птахів штаму H_5N_3 на 2,4 lg ТІД₅₀, а штаму H_7N_3 - на 0,7 lg ТІД₅₀. Ці показники дещо нижчі (на 0,67 lg ТІД₅₀ у відношенні штаму H_5N_3 та 0,5 lg ТІД₅₀ у відношенні штаму H_7N_3), ніж у Е-АКК, яку використовували в якості референс-препарату для визначення протигрипозної активності у відношенні штамів вірусу грипу птахів. Але етоній спричиняв регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу у концентрації значно нижче, ніж Е-АКК (у 120 разів). Крім того, препарат у цій дозі виявляв високу статистично значущу віруліцидну дію.

Декаметоксин та етоній при інтраназальному способі введення мишам не проявляли токсичної дії у дозах, які у 20 разів перевищували використані під час моделювання грипозної інфекції. При моделюванні експериментального

грипу у білих мишей виявлена захисна дія цих препаратів при інтраназальному способі їх використання за профілактичною, лікувально-профілактичною та лікувальною схемами.

Інтраназальне застосування декаметоксину у дозі 50 мкг/мишу за лікувально-профілактичною та лікувальною схемами призводило до статистично значущого захисту тварин на моделі експериментального грипу у мишей, зменшуючи відсоток їх загибелі та подовжуючи середню тривалість життя у дослідній групі у порівнянні з контролем. При всіх схемах введення декаметоксину на 4-5 добу після інфікування експериментальних тварин зменшувався титр інфекційного вірусу в гомогенатах легенів мишей. У ранні строки спостерігали незначне підвищення (на рівні похибки – 0,5 lg ТІД₅₀) титру інфекційного вірусу в легенях білих мишей дослідної групи у порівнянні з контролем.

Інтраназальне застосування етонію (100 мкг/мишу) за всіма схемами призводило до статистично значущого захисту тварин на моделі експериментального грипу у мишей, зменшуючи відсоток їх загибелі та подовжуючи середню тривалість життя у дослідній групі у порівнянні з контролем. При всіх схемах застосування препарату спостерігали зниження титру інфекційного вірусу в легенях дослідних мишей на 4-5 добу після зараження. На ранніх строках інфікування (1-2 доба) цей показник у контрольних та дослідних тварин був майже на одному рівні (різниця була у межах похибки).

Використання декаметоксину та етонію за всіма схемами введення препаратів супроводжувалось зниженням активності лужних протеаз в легенях інфікованих тварин, що співпадає з даними літератури щодо використання противірусних препаратів з іншим механізмом дії.

Показано, що декаметоксин та етоній пригнічували протеолітичні процеси під час взаємодії вірусу грипу з плазматичними мембранами чутливих клітин. Препарати впливали на протеолітичну активність вірусу, ізольованих плазматичних мембран ХАО та вірус-мембранного комплексу.

Інгібування протеолітичної активності мембран досліджуваними препаратами не було регулярним, на відміну від їх впливу на ензиматичну активність вірусу та вірус-мембранного комплексу. Дані, щодо регулярного інгібуючого впливу декаметоксину та етонію на ензиматичну активність вірусу співпадають з результатами, отриманими на культурі тканин ХАО *in vitro*. Вплив на позаклітинний вірус може бути пов'язаним з ушкодженням вірусної протеази. Крім того, як поверхнево активні речовини, ці препарати гальмують взаємодію вірусних та клітинних рецепторів, що й призводить до інгібування протеолітичної активності вірус-мембранного комплексу. Стан системи протеолізу має важливе значення на ранніх етапах вірусної репродукції і для розповсюдження інфекції в організмі. Тому саме таку дію можна розглядати як можливий механізм противірусної дії цих препаратів.

Препарат унітіол (2,3 – дімеркаптопропансульфонат натрію), що використовують у медичній практиці як антидот, має у своїй хімічній структурі дві SH-групи і є активним відновлювачем дисульфідних зв'язків. Відомо, що субодиниця гемаглютиніну – HA_1 , яка забезпечує специфічну адсорбцію вірусу на зовнішній мембрані чутливих клітин, та HA_2 , відповідна за проникнення вірусу до клітини, - після нарізання поєднані між собою тільки дисульфідним містком [62]. Тому при розриві дисульфідних зв'язків з утворенням сульфгідрильних груп HA_1 буде видалятися з поверхні віріонів, що порушить їх взаємодію з чутливими клітинами і призведе до гальмування репродукції вірусу грипу. Унітіол, впливаючи на гемаглютинін вірусу грипу і порушуючи дисульфідні зв'язки між його субодиницями, гальмував процес репродукції вірусу грипу внаслідок блокування взаємодії віріонів з чутливими клітинами.

Показано, що унітіол у дозі 1 мг/мл статистично вірогідно гальмував репродукцію вірусів грипу людини А/PR/8/34 (H_1N_1), А/Гонгконг/1/68 (H_3N_2) та В/Ленінград/17/86 на 0,5, 0,7, та 2,45 lg ТІД₅₀ відповідно. Крім того, препарат у цій дозі виявляв віруліцидну дію (статистично значущу лише у відношенні до штаму А/PR/8/34 (H_1N_1)), а також знижував здатність клітин

культури ХАО підтримувати репродукцію вірусів. Оскільки вплив на репродукцію вірусу грипу людини рибавірину (референс-препарат) 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 регулярний вплив, який можна порівняти з референс-препаратом, але у концентрації в 40000 разів вище.

На культурі тканини ХАО у концентрації 10 мг/мл унітіол гальмував репродукцію вірусів грипу птахів H₅N₃ та H₇N₃ на 3,6 і 1,0 lg ТІД₅₀ відповідно. Ці показники майже не відрізняються від активності 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. Таким чином, унітіол спричиняв регулярне гальмування репродукції досліджуваних штамів вірусу грипу у концентрації у 1,5 нижче, ніж референс-препарат. Крім того, унітіол у кінцевій концентрації 10 мг/мл знижував здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів грипу птахів та виявляв незначну віруліцидну дію.

Відзначено вплив унітіолу у досліджуваних дозах на здатність культури тканини ХАО підтримувати репродукцію вірусів, як штамів вірусу грипу людини, так і штамів вірусу грипу птахів, а також незначний але регулярний вплив препарату на позаклітинний вірус. Можна вважати, що механізм протівірусної дії унітіолу пов'язаний з впливом як на чутливі клітини організму хазяїна, так і на позаклітинний вірус, що забезпечувало протигрипозний ефект незалежно від антигенної структури вірусу [191, 192].

Інтраназальне застосування унітіолу за профілактичною та лікувально-профілактичною схемами призводило до зменшення титру інфекційного вірусу в легенях експериментальних тварин на 5 добу після інфікування. Тільки на третю добу виявляли незначне підвищення кількості інфекційного вірусу (на рівні похибки) в легенях дослідних тварин у порівнянні з контрольними. Мала місце тенденція до зниження ензиматичної активності

лужних протеаз. Застосування унітіолу при експериментальному грипі статистично значуще гальмувало загибель тварин та подовжувало тривалість життя у дослідних мишей у порівнянні з контрольними.

Показано, що унітіол статистично вірогідно знижував ензиматичну активність вірусу, мембран чутливих клітин та вірус-мембранного комплексу, гальмуючи протеолітичні процеси на ранніх етапах взаємодії вірусу грипу з чутливою клітиною. Причому, слід зазначити, що він інгібував активність не тільки вірусної протеази, але й знижував ензиматичну активність протеаз клітини хазяїна, а також вірус-мембранного комплексу. Ці дані цілком узгоджуються з результатами протигрипозної активності унітіолу, отриманими на моделі *in vitro*, де спостерігали вплив препарату на здатність культури тканин підтримувати репродукцію вірусу грипу та позаклітинний вірус. Таким чином, гальмування репродукції вірусів грипу, яке спостерігали на моделі тканини ХАО, на нашу думку відбувалось за рахунок відновлення дисульфідних зв'язків та зниження інфекційності вірусу.

Встановлена протигерпетична активність досліджуваних препаратів по відношенню до ВПГ-2 *in vitro* на перещеплюваній культурі клітин RK13. Препарати етоній та унітіол мали досить високий індекс селективності (ІС) на культурі клітин RK13 – 33 та 66,6 відповідно. В якості референс-препарату на цій моделі використовували ацикловір, індекс селективності якого на цій моделі складав 200. Таким чином, етоній та унітіол у порівнянні з ацикловіром виявили активність у відношенні до ВПГ-2 у 6 і 3 рази меншу, що вказує на можливість вважати їх потенційними протигерпетичними засобами. Індекс селективності декаметоксину виявився нижчим через незначну різницю між максимально переносимою та мінімальною ефективною дозами, але його гальмування репродукції ВПГ-2 на культурі клітин RK13 було регулярним, що свідчить про наявність у цього препарату антивірусних властивостей.

На перещеплюваній культурі клітин Нер-2 унітіол в дозі 25 мг/мл та етоній у дозі 250 мкг/мл спричиняли цитотоксичну дію, а у нижчих дозах були неактивними. Декаметоксин був нетоксичним у дозах, нижчих за 5

мкг/мл на культурі клітин Нер-2, і у концентраціях 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл та 0,5 мкг/мл він гальмував процес утворення специфічних внутрішньоядерних включень. На цій моделі ацикловір (референс-препарат) у концентрації 2,47 мкг/мл гальмував утворення внутрішньоядерних включень на 87%. Таким чином, можна констатувати, що декаметоксин у співставлюваних дозах гальмував процес утворення внутрішньоядерних включень ВПГ-1 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 можливо обумовлено хімічною природою декаметоксину, який є поверхнево активною речовиною.

На первинно-трипсинізованій культурі ФЕК декаметоксин у максимально переносимій концентрації 4 мкг/мл гальмував репродукцію ВПГ-1 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 для унітіолу на культурі ФЕК складав 5, що значно відрізняється від результатів, отриманих на перещеплюваній культурі клітин RK13. Етоній у концентраціях 20 і 35 мкг/мл виявився неефективним. На цій моделі ацикловір (референс-препарат) у кінцевій концентрації 1 мкг/мл гальмував репродукцію ВПГ-1 на 3,5 lg ТІД50. Досліджувані препарати декаметоксин, етоній та унітіол мали противірусні властивості у відношенні вірусів простого герпесу 1 та 2 типу, але вони нижчі, ніж у ацикловіру.

Отже, в результаті проведених досліджень у препаратів декаметоксину, етонію та унітіолу були виявлені противірусні властивості у відношенні вірусів грипу людини та птахів, а також вірусів простого герпесу 1 та 2 типу. Розраховані комп'ютерні прогнози противірусної активності препаратів певним чином корелюють з отриманими експериментальними результатами, що свідчить про доцільність їх використання дослідниками.

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 H_5 і H_7 . 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 препарата-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. Офіційальні 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 LD_{50} на 0,5, 2,0 і 1,5 lg, а етонію у дозі 100

мкг/мишу - на 1,0, 2,25 і 1,5 Іg. 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 LD_{50} між контрольною та дослідною групами складає 1,5 Іg при профілактичному використанні препарату, а за лікувально-профілактичною схемою 2,0 Іg.

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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. World health Report 1996: Fighting disease, fostering development. – Geneva, 1996.
2. World health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. – Geneva, 2002.
3. Weekly epidemiological record. - 2000. - vol.75. - No.47. - P.377-384.
4. Weekly epidemiological record. - 2000. - vol.75. - No.48. - P.385-396.
5. Заліська О.М. Фармакоєкономіка. Фармакоєкономічний аналіз „вартість - ефективність” / О.М.Заліська // Фармацевт-практик. – 2003. - №4. – С.38-39.
6. Matlin K.S. Pathway of vesicular stomatitis entry leading to infection / K.S.Matlin, H.Reggio, A.Helenius, K.Simons // J.Mol.Biol. – 1982. - No.156. – 609-631.
7. Лозицкий В.П. 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, №4. - С.413-419.
8. Карпухин Г.И. Грипп / Г.И.Карпухин (Руководство для врачей) – СПб.: Гиппократ, 2001. – 360с.
9. Литвинова О.М. Этиология современного гриппа / О.М.Литвинова, Е.А.Смородинцева, Э.Г.Деева [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2001. - №1. - С.5-9.
10. Вирусы гриппа и грипп [ред. Э.Д.Кильбурн] : пер. с англ. И.Г.Харитоненкова, А.И.Климова, Н.В.Каверина. - М.: Медицина, 1978. – 585с.
11. Hannoun C. La grippe / C.Hannoun // Annales de l'Institut Pasteur. – 1995. – Vol.6, N1. – P.30-36.
12. Слепушкин А.Н. Грипп и другие ОРВИ / А.Н.Слепушкин // Эволюция инфекционных болезней в России в XX веке [ред. В.Н.Покровский, Г.Г.Онищенко, Б.Л.Черкасский]. – М.: Медицина, 2003. – С. 184–214.

13. Слепушкин А. Н. Эпидемиологические особенности гриппа последних лет / А. Н.Слепушкин, Д. К.Львов, И. Г.Маринич [и др.] // *Вопр. Вирусологии.* – 1998. - №2. – С.59-60.
14. Zambon M. Sentinel surveillance of influenza in Europe, 1997/1998 / M.Zambon // *Eurosurveillance.* – 1998. - vol.3, N3.
15. Кузнецов О.К. Пандемии гриппа пока не будет? / О.К.Кузнецов, Д.Б.Голубев // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2005. - №6. – С.3-5.
16. Грипп и другие вирусные респираторные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия [ред.О.И.Киселев, А.А.Соминина, И.Г.Маринич]. – М.: Боргес, 2003. – 244с.
17. Гендон Ю.З. Пандемия гриппа: можно ли с ней бороться? / Ю.З. Гендон // *Вопр. вирусологии.* – 1998. - №1. – С.43—46.
18. Kuznetsov O.K. Basic assertions on emergence of influenza viruses with pandemic potential. Measures for preventions of their occurrence / O.K.Kuznetsov. Strengthening influenza pandemic preparedness through civil-military cooperation [Eds. J.Neville, O.I.Kiselev]. - 2005. – P.152-156.
19. Крамарев С.А. Опыт применения арбидола при лечении и профилактике гриппа и ОРВИ у детей на Украине / С.А.Крамарев, Л.А.Палатная // *РМЖ.* - 2003. – Т.11., № 21. - С.4-7.
20. Мироненко А.П. Стан специфічної профілактики грипу в Україні та деякі її економічні аспекти / А.П.Мироненко // *Сучасні інфекції.* – 2001.– №2. – С. 117–119.
21. Бобильова О.О. Щодо ситуації з гострих респіраторних інфекцій та грипу в сезон 2001/2002 років, прогноз, рекомендації та необхідність вжиття термінових заходів / О.О.Бобильова // *Медицина світу.* – 2001. – Приложение. – С. 2–3.
22. Whitley R. J. Oral oseltamivir treatment in children / R. J.Whitley, F.G.Hayden, K.S.Reisinger // *Ped. Inf. Dis.* – 2001. – N 2. – P. 127–133.

23. Collins S.D. Excess deaths from influenza and pneumonia and from important chronic diseases during epidemic periods, 1918-51 / S.D.Collins, J.Lehman. - Public Health monographs, 1953 - N10. – P.1-21.
24. La Force F.M. Influenza: virology, epidemiology, disease, and prevention / F.M.La Force, K.L.Nichol, N.J.Cox // Am. J. Prev. Med. – 1994. - N10. – P.31-44.
25. Ghendon Y. Introduction to Pandemic Influenza through History / Y.Ghendon // Euro. J. Epidemiol. – 1994. - N10. – P.451-453.
26. Kilbourne E. Influenza Pandemic of the 20th Century / E.Kilbourne // Emerging Inf.Dis. – 2006. – vol.12, N1. – P.9-14.
27. Burk R.F. Severe influenza virus pneumonia in the pandemic of 1968-1969 / R.F.Burk, W.Schaffner, M.G.Koenig // Arch. Intern. Med. - 1971. - N127. – P.1122-1128.
28. Webster R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G.Webster, W.J.Bean, T.O.Gorman // Microbiol. – 1992. - N56. – P.159-179.
29. Кузнецов О.К. Условия, способствующие появлению вируса гриппа с пандемическими потенциями. Профилактические меры / О.К.Кузнецов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – Т.3, №2. – С.5-11
30. Львов Д. К. Грипп остается непредсказуемой инфекцией / Д.К.Львов, А.Н.Слепушкин, С.С.Ямникова, Е.И.Бурцева // Вопр. вирусологии. – 1998. - №3. – С.141—144.
31. de Jong J.C. Isolation of swine-like influenza A(H1N1) viruses from man in Switzerland and the Netherlands / J.C.de Jong, M.F.Paccaud, F.M. DeRonde-Verloop // Ann. Inst. Pasteur. (Virolog.) – 1988. - N139. – P.429-437.
32. Claas E.C. Infection of Children with Avian-Human Reassortant Influenza virus from pigs in Europe / E.C.Claas, Y.Jawaoka, J.C. de Jong // Virology. – 1994. - N204. – P.453-457.
33. Грип та його профілактика: [навч.посібн.] / [І.В.Дзюблик, В.П.Широбоков, С.Г.Вороненко та ін.]; за ред. Дзюблик І.В., Широбокова В.П. – К., 2005. – 194с.

34. Пейлз П. Генетика вирусов гриппа [ред. П.Пейлз, Д.У.Кингсбери] : пер. с англ. – М.: Медицина, 1986. – 333с.
35. Wright P.F. Orthomyxoviruses / P.F.Wright, R.G.Webster. Fields virology / [Ed. D.M.Knipe, P.M.Howly]. - Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. -P.1533-1579.
36. Harimoto T. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses / T.Harimoto, Y.Kawaka // Clinical Microbiology Reviews. – 2003. – v.14. – P.129-140.
37. Кузнецов О.К. Вирус гриппа с пандемическими потенциями и меры по предотвращению его появления / О.К.Кузнецов, О.И.Киселев // Медицинский академический журнал. – 2003. - №2. – С.112-121.
38. Webster D. Microbial adaptation and change: avian influenza / D.Webster, D.J. Hulse // Res.Sci.Tech. – 2004. – Vol.23, N2. – P.453-465.
39. Webster R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G.Webster, W.J.Bean, O.T.Gorman [et al.] // Microbiol.Rev. – 1992. - N56. – P.152-79.
40. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species | D.J.Alexander // Vet. Microbiol. – 2000. - N74. – P.3-13.
41. Tang X. Isolation and characterization of prevalent strain of avian influenza viruses in China / X.Tang, G.Tian, K.Y.Zhou // Chin.J.Anim.Poul.Inf.Dis. – 1998. - N20. – P.1-5.
42. Chen H. Generation and evaluation of a high-growth reassortant H9N2 influenza A virus as a pandemic vaccine candidate / H.Chen, K.Subbarao, D. [et al.] // Vaccine. – 2003. – N21. – P.1974-1979.
43. Sturm-Ramirez K.M. Re-emerging 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. - N78. - 4892-4901.
44. Avian influenza and human health: Report by the WHO secretariat EB114|6. – Geneva, 2004. - 5p.
45. Shortridge K.F. Pandemic influenza: a zoonosis? / K.F.Shortridge // Seminar Respir.Infect. – 1992. - N7. – P.11-25.

46. de Jong J.C. A pandemic warning? / J.C.de Jong, E.C.Claas, A.D.Osterhaus [et al.] // *Nature* – 1997. - N389. – P.554.
47. *Weekly epidemiological record.* – 2000. – Vol. 75, N35. - P.281–288.
48. Лобзин Ю.В. Руководство по инфекционным болезням / Ю.В.Лобзин – СПб.: Фолиант, 2000. – 932 с.
49. Стратучинский Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С.Стратучинский, Ю.Б.Белоусов, С.Н.Козлов – М.: Боргес., 2002. - 384с.
50. Соминина А.А. Клинико-эпидемические данные, молекулярно-генетический и филогенетический анализ возбудителей гриппа / А.А.Соминина // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2001. - №1. – С.9-15.
51. Учайкин В.Ф. Вакцинопрофилактика и лечение гриппа у детей / В.Ф.Учайкин, О.В.Шамшева // *Эпидемиология и инфекционные болезни.* – 1998. - №1. – С.17-21.
52. Glezen W.P. Influenza virus infections in infants / W.P.Glezen, L.H.Taber, A.L.Frank [et al.] // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1997. –N16. – P. 1065-1068.
53. Hayden G.F. Structured guidelines for the use influenza vaccine among children with chronic pulmonary disorders / G.F.Hayden, H.Frayha, H.Kattan // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1995. - N14. – P.895-899.
54. Найхин А.Н. Формирование гуморального и секреторного иммунитета у лиц пожилого возраста при различных схемах иммунизации гриппозными вакцинами / А.Н.Найхин, Л.Г.Руденко, Н.Арден [и др.] // *Вопр.вирусологии.* – 1998. - №1. - С.20—24.
55. Смородинцев А.А. Грипп и его профилактика / А.А.Смородинцев – Л.: Медицина, 1984.– 384с.
56. Simonsen L. The global impact of influenza on morbidity and mortality / L.Simonsen // *Vaccine* – 1999. – N23. - P.3–10.
57. Centers for disease control and prevention and control of influenza // *MMWR, Morb. Mortal. : Weekly Report.* – 2003. – v.52.– P.1–36.

58. Nicho K.L.I. Influenza vaccination and reduction in hospitalizations for cardiac disease and stroke among the elderly / K.L.I Nicho, J.Nordin, J.Mulooly // *N.Engl. J.Med.* – 2003. – N24. – P.1322–1332.
59. Бурцева Е.И. Выбор оптимальных схем в тактике вакцинации против гриппа пожилых людей / Е.И.Бурцева, А.Н.Слепушкин, А.Л.Белякова // *ЖМЭИ.* – 1998. - №4. – С.40-44.
60. Martin C.M. Asian influenza A in Boston, 1957-1958. I Observations in thirty-two influenza-associated fatal cases / C.M.Martin, C.M.Kunin, L.S.Gottlieb [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 1959. - N103. – P.515-531.
61. Martin C.M. Asian influenza A in Boston. II Severe staphylococcal pneumonia complicating influenza / C.M.Martin, C.M.Kunin, L.S.Gottlieb, M.Finland // *Arch. Intern. Med.* – 1959. - N103. – P. 532-542.
62. Семенов Б.Ф. Иммуномодуляция при вирусных инфекциях и вакцинации / Б.Ф.Семенов, В.В.Варгин – М: ВИНТИ, 1989. – 161с.
63. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 1998-1999 season // WHO : *Weekly Epidemiological Record.* – 1998. - N73. – P.56-63.
64. Сельникова О.П. Социально-экономическое обоснование специфической иммунопрофилактики гриппа в Украине / О.П.Сельникова, В.В.Смирнов, В.Широбоков // *Укр. медчасопис.* – 1999. - №5. – С.111-138.
65. Fedson D.S. Pandemie influenza and the global vaccine supply / D.Fedson // *Clin.Infect.Dis.* – 2003 – v.36 – p. 1552–1561.
66. *Weekly epidemiological record.* - 2002. - vol.77. - No.49 - P.417-424.
67. Баринский И.О. Герпесвирусная инфекция / И.О.Баринский - М., 1990. – 167с.
68. Landolfo S. The human cytomegalovirus / S.Landolfo, M.Gariglio, G.Gribaudo, D.Lembo // *Farmakol.Ther.* – 2003. – N98. – P.269-297;
69. Баринский И.Ф. Герпес (этиология, диагностика, лечение) / И.Ф.Баринский, А.К.Шубладзе, А.А.Каспаров, В.Н.Грибенюк - М.: Медицина, 1986. – 272с.

70. Takagi M. Human herpesvirus-6 (HHV-6)-associated hemophagocytic syndrome / M.Takagi, T.Maruyama, K.Kaneko, K.Obinata // *Pediatr.Hematol.Oncol.* - 1996. - N13. – P.451-456.
71. Самгин М.А. Простой герпес (дерматологические аспекты) / М.А.Самгин, А.А.Халдин – М.: МЕДпресс-информ, 2002. - 160 с.
72. Хахалин Л.Н. Вирусы простого герпеса у человека / Л.Н.Хахалин // *Consilium medicum.* - 1999. - Т. 1, № 1. – С.5-17.
73. Хахалин Л.Н. Принципы патогенетической противогерпетической химиотерапии острой и рецидивирующей герпетической инфекции / Л.Н.Хахалин, Ф.М.Абазова // *Терапевтический архив.* - 1995. - № 1. – С.21-26.
74. Шабалин А.Р. Иммунные нарушения и их коррекция у больных с генитальной герпес-вирусной инфекцией / А.Р.Шабалин // *Дерматология та венерология.* - 2002. – Т. 16, №2. С.12-16.
75. Посевая Т.А. Роль герпетической инфекции при эпителиальных дисплазиях шейки матки и опыт их лечения противогерпетическими препаратами / Т.А.Посевая, В.Г.Цукерман, Н.Н.Шуваева [и др.] // *Вопросы вирусологии.* – 1991. - №1. – С.12-17.
76. Georgouli M. Serological assessment of Herpes group virus reactivation in seropositive oncological patients undergoing chemotherapy / M.Georgouli, E.Chinou, E.Tsiganou [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2001. - vol.7, N1. — P.222.
77. Посібник з хіміотерапії вірусних інфекцій: [навч.-метод. посібник для лікарів] / [Дзюблік І.В., Дяченко Н.С., Рибалко С.Л. та ін.]; за ред. Дзюблік І.В. – К., 2004. – 176с.
78. Panchenko L. Detection of herpes simplex virus in accidental abortions in women / L.Panchenko, Y.Grechanina, N.Popova [et al.] // *Clin. Microbial. and Infection.* – 2001. - Vol.7, N1. — P.146.
79. Серов В.Н. Цитомегаловирусная инфекция в акушерстве и перинатологии / В.Н.Серов - М., 2000. – 169с.

80. Kurtz J. Differential diagnosis of neonatal herpes simplex encephalitis and nonaccidental head injury / J. Kurtz, P. Anslow // *Clin. Microbiol. and Infection.* – 2001. - Vol.7, N1. — P.147.
81. Семенова Е.И. Иммунологические показатели в динамике лечения и профилактике офтальмогерпеса / Е.И.Семенова, В.В.Мальханов // *Вестн. офтальмологии.* – 1983. - №3. – С.45-47.
82. Гранитов В.М. Герпесвирусная инфекция / В.М.Гранитов - М.:Медицинская книга, 2001. – 182с.
83. Семенова Т.Б. Генитальный герпес у женщин / Т.Б.Семенова // *РМЖ.* - 2001. - Т. 9, № 6. - С. 237-42.
84. Szkaradkiewicz A. Detection of Epstein-Barr virus in the palatine tonsil carcinomas / A.Szkaradkiewicz, A.Kruk-Zagajewska, M.Wal [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection.* – Vol.7, N1. – 2001. – P.145.
85. Жирнов О.П. Синергидное терапевтическое действие апротинина и ремантадина при экспериментальной гриппозной инфекции / О.П.Жирнов // *Вопр. вирусологии.* – 1986. - №3. – С.292-296.
86. Поляк Р.Я. Проблемы противовирусного иммунитета в свете новых представлений о молекулярной природе патогенеза вирусных инфекций / Р.Я.Поляк // *Методы изучения комбинированного действия противовирусных препаратов и иммуномодуляторов при вирусных инфекциях.* – Рига: Зинатне, 1988. – С. 23-27.
87. Рязанцева Г.М. Перспективы комбинированной химиотерапии вирусных инфекций / Рязанцева Г.М. // *Методы изучения комбинированного действия противовирусных препаратов и иммуномодуляторов при вирусных инфекциях.* – Рига: Зинатне, 1988. – С. 18-22.
88. Матросович М.Н. Стадия рецепции вирусов как возможная мишень для воздействия химиопрепаратами / М.Н.Матросович, М.П.Чумаков // *Новые подходы к химиотерапии вирусных инфекций: сборник.* – Рига: Зинатне, 1991. – С.7-15.

89. Lentz T.L. Binding of viral attachment protein to host-cell receptor: the Achilles hell of ingectious viruses / T.L.Lentz // TIBS. – 1988. – Vol.9, N 7.- P.247-252.
90. Lomberg-Holm K. Virus attachment and entry into cells / K.Lomberg-Holm, R.L.Crowell. – Washington, 1986. – 212 p.
91. Paulson J.C. Interaction of animal viruses with cells surface receptors / J.C. Paulson // The receptors. – Orlando, 1985. – Vol.2 – P.131-219.
92. Weis W. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid / W.Weis, J.H.Brown, S.Cusack // Nature. – 1988. – vol.333, N 6172. – P.426-431.
93. Wiley D.C. The structure and function of the haemagglutinin membranen protein of influenza virus / D.C.Wiley, J.J.Skehel // Ann.Rev.Viochem. – 1987. – Vol.56. – P.365-394.
94. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты / Ф.И.Ершов - М.: Медицина, 1998. - 187с.
95. Вотяков В.И. Теоретические и методические аспекты экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций / В.И.Вотяков // Проблемы и перспективы изучения нуклеозидов, бициклогептана, адамантана и других противовирусных соединений и других противовирусных соединений в эксперименте и клинике. – Минск, 1982. – С.3-17.
96. Вотяков В.И. Химиотерапия и химиопрофилактика вирусных инфекций / В.И.Вотяков, Г.А.Галегов // Тезисы докладов XLIX сессии общего собрания АМН СРСР. – М., 1983. – С.34-37.
97. Фисенко В.П. Анализ наиболее перспективных исследований по созданию новых лекарственных средств / В.П.Фисенко, А.П.Дрожжин, М.Т. Абидов. - НЦЭГКЛС, 2000. - 47с.
98. Ершов Ф.И. Современные средства терапии наиболее распространенных вирусных инфекций / Ф.И.Ершов, Н.В.Касьянова // Вирусные инфекции. – 2004. - Т.6, №1. – С.12-19.

99. Андронати С.А. Пероральный индуктор эндогенного интерферона «Амиксин» и его аналоги / С.А.Андронати, Л.А.Литвинова, Н.Я.Головенко // Журн. АМН Украины. – 1999. – Т.5, №1. – С.53-66.
100. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии / Ф.И.Ершов - М.: Медицина, 1998. - 140 с.
101. Andersen J.H. Antiviral activity of lactoferricin against clinical isolates of HSV-1 and 2 / J.H.Andersen, H.Jenssen, K.D.Thompson, T.J.Gutteberg // Antivir.Research. – 2002. – vol.53, N3. – P.54.
102. Gong Y. Evaluation of antiviral activity of virucept red marine algae against herpes simplex viruses (HSV) / Y.Gong, R.Roberts, I.Gadawski [et al.] // Antivir.Research. – 2002. – vol.53, N3. – P.55.
103. Gong Y. Direct antiherpetic activities of the immunomodulators picolinic acid (PA) and fusaric acid (FA) / Y.Gong, A.Amin, D.Cheung, [et al.] // Antivir.Research. – 2002. – vol.53, N3. – P.55.
104. Н.П.Чижов. Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций / Чижов Н.П., Ершов Ф.И., Индулен М.К. – Рига: Знатье, 1988. – 171с.
105. De Clercq E. Antiviral potentials of E-5-(2-halogenovinil)-pyrimidine nucleosides / E.De Clercq // 5th Intern.congr. on virology. Austr. – Strasbourg, 1981. – P.329-345;
106. Drach J.C. Antiviral agents / J.C.Drach // Ann.Rep.Med.Chem. – 1980. – Vol.16. – P.254-261.
107. De Clercq E. Pyrimidine nucleoside analogues as antiviral agents / E.De Clercq // Tarhets design on antiviral agents. – New York; London, 1984 – P.203-230.
108. Renis H.E. Pyrimidines and their nucleotides / H.E.Renis // Virus chemotherapy [ed. F.E.Hahn, S.Karger]. – Basel, 1980. – P.164-207.
109. Hovi T. Nuclear war against herpes-viruses / T.Hovi // Med.Biol. – 1980. – Vol.58, N1. - P.5-7.

110. Allandeen H.S. On the herpesvirus of selective inhibition of herpesvirus by (5)-5(2-bromvinil)-2-deoxyuridine / H.S.Allandeen, I.W.Kozarich, I.R.Betrino, E.De Clerq // Proc.Nat.Acad.Sci. – 1981. – Vol.78. – P.2698-2699.
111. Smith R.A. Ribavirin: A broad spectrum antiviral agent / R.A.Smith, W.Kirkpatrick. – New York; London, 1980. -237p.
112. Fernandez H. Ribavirin: A summary of clinical trials / H.Fernandez // Herpesgenitalis and measles. – New York, 1980. – P.43-58.
113. Brigen D. Acyclovir / D.Brigen, N.P.Sutton // J.Infections Diseases. - 1983. – N3. – P.1-3.
114. Whatley J.D. Episodic acyclovir therapy to abort recurrent attacks of genital herpes simplex infection / J.D.Whatley, R.N.Thin // J. Antimicrobial Chemotherapy. – 1991. - N27. – P.677-81.
115. Schaffer H.J. Acyclovir chemistry and spectrum activity / H.J.Schaffer // Amer.J.Med. – 1983. – Vol.23. – P.4-6.
116. Bryson Y.J. Treatment of first episodes of genital herpes simplex virus infection with oral acyclovir: a randomized double-blind controlled trial in normal subjects / Y.J.Bryson, M.Dillon, M.Lovett // N. Engl. J. Med. – 1983. -N308. – P.916-21.
117. Tilson H.H. Safety of acyclovir: a summary of the first 10 years experience / H.H.Tilson, C.R.Engle, E.B.Andrews // J. Med. Virol. – 1993. -N1. – P.67-73.
118. Field H.J. Development of clinical resistance to aciclovir in herpes simplex virus-infected mice receiving oral therapy / H.J.Field // Antimicrobial Agents Chemotherapy. – 1982. – Vol.21, N5. – P.744-752.
119. Shilaki K. Isolation of drug resistant mutants of varizella-zoster virus: cross resistance of acyclovir resistant mutant with phophonoacetic acid / K.Shilaki, T.Ogino, M.Yamamushi // Biken J. – 1983. – Vol.26, N1. – P.17-23.
120. Индулен М.К. Механизм антивирусного действия производных адамантана / М.К.Индулен, В.А.Калныня, Г.М.Рязанцева, В.И.Бубович. – Рига, 1981. – 168с.

121. Злыдников Д.М. Химиопрофилактика и химиотерапия гриппа ремантадином / Д.М.Злыдников, О.И.Кубарь, Т.П.Ковалева // Вопр. вирусологии. – 1981. - №5. – С.516-524.
122. Oxford J.S. Antiviral activity of amntadine: a rewiw of laboratory and clinical data / J.S.Oxford, A.Galbraith // Pharmacol.Therapy. – 1981. - vol.11. – P.181-262.
123. Bauer D.Y. Thiosemicarbozones / D.Y.Bauer // Chemotherapy of virus diseases. – New York, 1972. – vol.1. – P.35-113.
124. Boezi Y.A. Antiherpetic action of phosphonoacetate / Y.A.Boezi // Pharmacol. Theraupeutics. - 1979. - vol.4. – P.231.
125. Tamm I. 2-(α -hydroxybenzil) binzimidazole and related compounds / I.Tamm, A.Caliguirri // Chemotherapy Virus Diseases. – 1972. – vol.1. – P.115-230.
126. Phillpotts R.J. The activity of enviroxime against rhinovirus infection in man / R.J.Phillpotts, R.W.Jones, D.C.De long // Lancet. – 1981. – Vol.40. – P.1342.
127. Kuz'min V.E. Hierarchic System of QSAR Models (1D-4D) on the Base of Simplex Representation of Molecular Structure / V.E.Kuz'min, A.G.Artemenko, P.G.Polischuk [et al.] // J. Mol. Mod. – 2005. - vol. 11. - P. 457-467.
128. Бореко Е.И. Сравнительная характеристика и закономерности проявления противовирусной активности синтетических и природных соединений: автореф. дис. на соискание степени доктора мед. наук: спец. 03.00.06 – „Вирусология” / Бореко Евгений Иванович.– Минск, 2003. – 52с.
129. Онищенко Г.Г. Контроль и ликвидация инфекционных заболеваний – стратегическое направление здравоохранения / Г.Г.Онищенко // Журн. микробиол. – 2002. – №4 – с.3016.
130. Belshe R.B. Resistance of influenza A virus to amantadine and rimantadine: results of one decade of surveillancе / R.B.Belshe, B.Burk, F. Newman // J. Infect. Dis. – 1989. - N159. – P.430-435.
131. Бореко Е. И. Полипептиды вируса гриппа, полученного в присутствии высоких концентраций ремантадина / Е.И.Бореко, Н.И.Парлова, В.И.Вотяков // Вопр. вирусологии. – 1998. - №6. - С.270—274.

132. Чижов Н.П. К вопросу о механизмах формирования резистентных к антивирусным препаратам мутантов вируса / Н.П.Чижов // Резистентность вирусов к химиопрепаратам. – Рига, 1987. – С.7-23.
133. Bright R.A.. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern / R.A.Bright, M.Medina, X.Xu [et al.] // Lancet. – 2005. – vol.366. – P.1175-1181.
134. Bright R.A. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States / R.A.Bright, D.Shay, B.Shu [et al.] // Journal of the American Medical Association. – 2006. – vol.295 (doi:10.1001/jama.295.8.joc60020).
135. Жилинская И. Н. Роль нейраминидазы в патогенезе гриппозной инфекции / И.Н.Жилинская, Л. А.Ляпина, О.Ю.Решетникова, О.И.Киселев // Вопросы вирусологии. – 2003. - №2. – С.2.
136. Calfee D.P. New approaches to influenza chemotherapy. Neuraminidase inhibitors / D.P.Calfee, F.G.Hayden // Drugs. – 1998. - N56. P.537-553.
137. Stephenson I. Chemotherapeutic control of influenza / I.Stephenson, K.G.Nicholson // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. - N44. P.6-10.
138. Федоров С.М. Современные аспекты лечения герпетической инфекции / С.М.Федоров, М.Х.Колиева, А.В.Резайкина // Вестник дерматологии и венерологии. – 1994. - №4. – С.27-34.
139. Алимбарова Л. М. Лечебное действие нового противовирусного препарата гепона при экспериментальном генитальном герпесе / Л.М.Алимбарова, И.Ф.Баринский, К.К.Кузьмин // Вопр.вирусологии. – 2002. - №1. – С.34-37.
140. Vere Hodge R.A. Famciclovir and penciclovir: the mode of action of famciclovir including its conversion to penciclovir / R.A.Vere Hodge // Antiviral Chem. Chemother. – 1993. -N4. – P.67-84.
141. Weller S. Pharmacokinetics of the acyclovir prodrug, valaciclovir, after escalating single - and multiple-dose administration to normal volunteers /

- S.Weller, M.R.Blum, M.Doucette // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 1993. –N54. – P.595-605.
142. Mc Laren C. Spectrum of sensitivity to acyclovir of herpes simplex virus clinical isolates / C.Mc Laren, C.D.Sibrack, D.W.Barry // *Amer. J. Med.* – 1982. – Vol.23. – P.326-329.
143. Spickett G. *Oxford Handbook of clinical Immunology* / G.Spickett. - New York: Oxford University Press Inc., 1999. – 160p.
144. Лазарев Д.Н. Стимуляторы иммунитета / Д.Н.Лазарев, Е.К.Алехин. М.: Медицина, 1985. – 127с.
145. Лекарственные препараты в России. - Справочник Видаль, 2000. – 210с.
146. Чувирич Г.Н. Актуальные вопросы противовирусной терапии / Г.Н.Чувирич, Т.П.Маркова // *РМЖ.* – 2002. – Т.10. - №3..
147. Field H.J. Persistent herpes simplex virus infections and mechanisms of virus drug resistance / H.J.Field // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1989. -N8. – P.671-80.
148. Fauld D. Ganciclovir. A review of its Antiviral Activity Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in Cytomegalovirus Infections / D.Fauld, R.Heel // *Drugs.* – 1990. – vol.39. - №4. – P.597-639.
149. Алимбарова Л.М.. Оценка противовирусной активности новых лекарственных форм фоскарнета при генитальном герпесе морских свинок / Л.М.Алимбарова, И.Ф.Баринский, К.К.Кузьмин // *Вопр. вирусологии.* - 2002. - №2. - С.82—86.
150. Fedtchouk A.S. Medical cure of recidiving herpes simplex virus infections by means of proteolysis inhibitors / A.S.Fedtchouk, P.G.Veveritsa, V.P.Loizitsky, Yu.I.Girlya // *Antiviral Research.* - 1999. -vol.41, N2. - p.67.
151. Galegov G. Paraaminobenzoic acid (PABA) is effective stimulator of antiherpetic action of acyclovir, ganciclovir and BVDU / G.Galegov, V.Andronova, N.Leontieva // *Antiviral Res.* – 2002. – vol.53, N3. – P.56.
152. Пат. 63020 Україна, А61К31/095, А61К31/18, А61К31/22 / Інгібітор вірусів герпесу та імунодефіциту людини – 1,2-дитіол-3-пропілсульфонат

натрію / Рибалко С.Л., Максименко О.В., Дядюн С.Т. [та ін.]; заявник-патентоутримувач Інститут епідеміології та інфекційних хвороб, Інститут фармакології та токсикології - №63020; – завл.15.01.04; опубл.15.01.04. Бюл.№1.

153. Лекарственные средства : пособие для врачей / [сост. М.Д. Машковский]. - 15-е изд., пер., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2007. – С. 748, 749, 952, 953.

154. Антисептики у профілактиці й лікуванні інфекцій. / [ред. Г.К.Палій та ін.] – К.: Здоров'я, 1997. – 201 с.

155. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів: методичні рекомендації / [А.М.Щербинська, Н.С.Дяченко, С.Л.Рибалко та ін.]. – Київ, 2005. – 39с.

156. Finter N.B. Methods for Screening in vitro and in vivo for Agents Active Against Myxoviruses / N.B.Finter // Ann. N.Y. Sci. – 1970. - Vol.173, №1. – P.131.

157. Ильенко В.И. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа: методические рекомендации. / В.И. Ильенко. – Всесоюзный НИИ гриппа МЗ СССР. - Ленинград, 1977. – 36 с.

158. Носач Л.Н. Цитопатология аденовирусной инфекции / Л.Н.Носач, Н.С.Дяченко – 1982. – К.: Наукова думка. – 124с.

159. Голубев Д.Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / Д.Б.Голубев, А.А.Соминина, М.Н.Медведева – Л.: Медицина, 1976. – 223 с.

160. Доклинические исследования лекарственных средств. Методические рекомендации: [ред. А.В.Стефанов]. – К.: Авиценна, 2002. – С.395-420.

161. Мальцева А.И. Репродукция вирусов гриппа в культуре ткани хорионаллантоисной оболочки куриных эмбрионов, прикрепленной к скорлупе / А.И.Мальцева, В.Е.Аграновская, Я.С.Шварцман // Лаб. Дело. – 1973. - №11. – С.689-690.

162. Lozitsky V.P. Resistance of mice to reinfection after E-aminocaproic acid treatment of primary influenza virus infection / V.P.Loizitsky, L.E.Puzis, R.Ya.Polyak // *Acta Virol.* – 1988. – №32. – P.117-123.
163. Дегтяренко В.И. Изучение протеолитических механизмов депротенизации вируса гриппа плазматическими мембранами / В.И.Дегтяренко, А.С.Федчук // *Молекулярная биология.* – 1977. - №3. – С.516-520.
164. Pristašova S. Isolation of plasma membranes from chick embryo chorioallantoic membranes and identification of main nucleolytic activities / S.Pristašova // *Collection of Czechoslovak chemical communication.* – 1981. – v.46. – P.1054-1058.
165. Вовчук С.В. Определение активности протеолитических ферментов в зерне злаковых культур / С.В.Вовчук // *Биохимические методы исследования селекционного материала.* – Одесса, 1976. – С.56-57.
166. Lowry ОН. Protein measurement with the folin phenol reagent / О.Н.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – v.193. – N. – P.265-75.
167. Ашмарин И.П. Вычисление ED_{50} при малом числе подопытных животных / И.П.Ашмарин // *Ж. микробиол.* – 1959. - №2. – С.102-108.
168. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В.Гублер, А.А.Генкин. - Л.: Медицина, 1973. – 142с.
169. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю.Урбах. – М.: Медицина, 1975. – 295с.
170. Kuz'min V. Development of Perspective Antiviral Compounds by Means of 4D-QSAR on the base of Simplex Representation of Molecular Structure / V.Kuz'min, A.Artemenko, V.Loizitsky [et al.] // *10 Congress of the Bulgarian Microbiologist with International Participation.* – Plovdiv (Bulgaria). – 2002. – P.206-207.

171. Poroikov V. Discriminating between Drugs and Nondrugs by Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) / V.Poroikov, D.Filimonov, Yu.Borodina [et al.] // *J.Chem.Inform.Comput.Sci.* - 2000. - V.40, №6. - P.1349-1355.
172. Лагунин А. Компьютерный поиск потенциальных антигипертензивных соединений комбинированного действия / А.Лагунин, Д.Филимонов, В.Поройков // *Хим.-Фарм. Журнал.* – 2001. - т 35- №7- с.28 – 34;
173. Глориозова Т. Тестирование компьютерной системы предсказания спектра биологической активности PASS на выборке новых химических соединений / Т.Глориозова, Д.Филимонов, А.Лагунин, В.Поройков // *Хим.-Фарм. Журнал.* – 1998. - Т. 32. - С. 33 – 39.
174. Крылов Ю.Ф. Энциклопедия лекарств / Ю.Ф.Крылов. - М.: Мир, 2000. - 160с.
175. Кузьмин В.Е. 4D-QSAR на основе симплексного представления молекулярной структуры / В.Е.Кузьмин, А.Г.Артеменко, Н.Н.Муратов // *Труды Одесского политех.ун-та.* - 2002. - Вып.1(13). - С.1-4.
176. Kuz'min V.E. The analysis of structure-anticancer and antiviral activity relationships for macrocyclic pyridinophanes and their analogues on the basis of 4D QSAR models (simplex representation of molecular structure) / V.E.Kuz'min, A.G.Artemenko, V.P.Loizitsky [et al.] // *Acta Biochimica Polonica.* - 2002. - N1. - P.157-168.
177. Artemenko A.G. The investigation of Anti-influenza and Antiherpetic Activity of Macrocyclic Pyridinophanes and Relative Compounds by Means of 4D QSAR / A.G.Artemenko, V.E.Kuz'min, V.P.Loizitsky [et al.] // *Antiviral Research.* - 2002. - Vol. 53, № 3. - P.A75.
178. Muratov E.N. Investigation of Anti-influenza Activity Using Hierarchic QSAR Technology on the Base of Simplex Representation of Molecular Structure / E.N.Muratov, A.G.Artemenko, V.E.Kuz'min [et al.] // *Antiviral Research.* - 2005. - Vol. 65, № 3. - P. 62-63.
179. Artemenko A.G. Investigation of Antiherpetic Activity Using Hierarchic QSAR Technology on the Base of Simplex Representation of Molecular Structure /

A.G.Artemenko, V.E.Kuz'min, E.N.Muratov [et al.] // Antiviral Research. - 2005. - Vol. 65, № 3. - P. 77.

180. Pozdnyakova L.I. Biological method for the water, food, foddors and enviroment toxic chemical materials contamination indication / L.I.Pozdnyakova, V.P.Loizitsky, A.S.Fedchuk [et al.] // 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.

181. Пат. 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. [та ін.]; заявник-патентоутримувач Український наук.-досл. Протичумний ін.-т, ТОВ „Відродження М”. - №u2005 12542; заявл. 26.12.05; опубл. 17.07.06, Бюл. №7.

182. Сидоров К.К. Токсикология новых промышленных веществ / К.К.Сидоров. – М.: Медицина, 1973. – вып.3. – 47с.

183. 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.Универтистета. - 2002. - №2. - С. 381.

184. Shitikova L.I. Anti-viral activity of decametoxin / L.I.Shitikova, A.S.Fedchuk, T.L.Gridina [et al.] // Анали Мечніковського інституту. – 2003. - №4-5, - С.118.

185. Fedchuk A.S. Anti-influenza and anti-herpetic activity of decametoxin / A.S.Fedchuk, V.P.Loizitsky, T.L.Gridina [et al.] // Antiviral Research. – 2003. - v.57, N3. - p.82.

186. Loizitsky V. Antiviral action of the bis-quarternary ammonium bases / V.Loizitsky, T.Gridina, Yu.Boschenko [et al.] // Antiviral research. - 2005. - Vol.65, N3. - P. 64.

187. 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. - Vol.65, N3. - P.96.
188. Гридiна Т.Л. Новi властивостi декаметоксину: антигрипозна i протигерпетична дiя *in vitro* та *in vivo* / Т.Л.Гридiна, В.П.Лозицький, Ю.А.Бощенко, В.Г.Палiй // *Вiсник морфологiї*. – 2004. - №10 (1). – С.166-169.
189. Лозицький В.П. Противiрусна дiя бiс-четвертинних солей амонiю у вiдношеннi збудникiв масових захворювань людей та птици з групи мiксовiрусiв / В.П.Лозицький, Т.Л.Гридiна, Ю.А.Бощенко [та iн.] // *Вiсник Вiнницького нацiонального медичного унiверситету*. – 2004. - №8 (2). – С.437-440.
190. Гридiна Т.Л. Протигрипозна дiя етонiю *in vitro* та *in vivo* / Т.Л.Гридiна // *Одеський медичний журнал*. – 2004. - №5 (85). – С.4-7.
191. Гридiна Т.Л. Протигрипознi властивостi унiтiолу / Т.Л.Гридiна, В.П.Лозицький, А.С.Федчук, Ю.А.Бощенко // *Одеський медичний журнал*. – 2005. - №1 (87). – С.4-7.
192. Лозицький В.П. Противiрусна дiя офiцiальних препаратiв Е-амiнокапронової кислоти та унiтiолу у вiдношеннi вiрусу грипу птахiв / В.П.Лозицький, Т.Л.Гридiна, А.С.Федчук [та iн.] // *Одеський медичний журнал*. – 2006. - №3 (95). – С.4-8.
193. Гридiна Т.Л. Противiрусна дiя бiс-четвертинних солей амонiю у вiдношеннi збудникiв вiрусу грипу птахiв *in vitro* / Т.Л.Гридiна, В.П.Лозицький, А.С.Федчук [та iн.] // *Вiсник морфологiї*. – 2006. - №12 (1). – С.7-11.
194. Zimmer C. Influenze of netropsin and distamycin A on the secondary structure and template activity of DNA / C.Zimmer, B.Puschendorf, H.Grunicke [et al.] // *Eur. J. Biochem*. 1971. – Vol.21. - № 1. – P.269-278.
195. Лозицький 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.

196. Лозицкий В.П. Участие системы протеолиза в развитии экспериментальной гриппозной инфекции и противогриппозное действие ингибиторов протеаз: дис. ...канд. мед. наук: 03.00.06 / Виктор Петрович Лозицкий. – Л., 1977. – 156 с.

197. Федчук А.С. Роль системы протеолиза в ранних этапах взаимодействия вирусов гриппа с чувствительными клетками: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.06 / Алла Семеновна Федчук. – Одесса, 1980. – 121 с.

198. Коломиец А.Г. Этиологическая структура вирусных заболеваний респираторного тракта и современные возможности их патогенетической терапии / А.Г.Коломиец, В.П.Лозицкий, Н.Д.Коломиец // Медицинские новости. – 1997. - №2. – С. 3-11.