

Н. М. Гула, А. А. Чумак, С. Л. Рибалко*, С. Т. Дядюн*, В. С. Асмолкова,
А. Г. Бердишев, Г. В. Косякова, Д. Б. Старосила*, Л. К. Беньковська*, Ю. М. Башта

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, 01601 Київ
*Державна установа “Інститут епідеміології і інфекційних хвороб
ім. Л. В. Громашевського НАМН України”, 03680 Київ

ПРОТИГРИПОЗНИЙ ЕФФЕКТ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ

Встановлено, що в умовах *in vitro* N-стеароїлетаноламін (NSE) пригнічує репродукцію вірусу грипу штаму H1N1 на $3,0 \lg$ ТЦД₅₀ в концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} моль/л, хіміотерапевтичний індекс NSE відносно вірусу грипу штаму H1N1 становить 100, що дозволяє віднести NSE до активних протигрипозних препаратів. У досліджах *in vivo* було показано, що інтраназальне введення за профілактичною схемою (за 24 год до зараження) 0,2 мл водної суспензії NSE у концентрації 10^{-6} моль/л та 10^{-8} моль/л сприяло зменшенню смертності інфікованих тварин на 40 % і 100 %, відповідно. В легеневій тканині мишей виявлено низький титр вірусу грипу ($<0,5 \lg$ ТЦД₅₀) при концентрації NSE 10^{-8} моль/л. При лікувальній схемі одноразове інтраназальне введення NSE (через 24 год після зараження) ефективно знижує летальність тварин від грипозної пневмонії у концентрації 10^{-6} моль/л та 10^{-9} моль/л. При цьому NSE пригнічує репродукцію вірусу в легеневій тканині інфікованих мишей на 2,0 та 3,5 \lg , відповідно. Показано, що одним із механізмів протигрипозної дії NSE є пригнічення нейрамінідазної активності вірусу грипу H1N1. При інтраперитонеальному введенні 0,2 мл NSE в концентрації 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} та 10^{-9} моль/л в організмі мишей виникає індукція *IFN γ* , а в концентрації 10^{-8} та 10^{-9} моль/л — *IFN α* , що може бути ще одним механізмом, за яким реалізується протигрипозна дія NSE. Також виявлено, що інтраназальне застосування NSE в усіх досліджуваних концентраціях та схемах введення у інфікованих вірусом грипу мишей запобігало змінам рівня холестерину в тканинах легень та печінки.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, вірус грипу, нейрамінідаза, інтерферон, протівірусна активність, профілактика вірусних інфекцій.

Грип є епідемічним вірусним захворюванням, причиною тяжких ускладнень і навіть смерті. Для запобігання цього захворювання та його ускладнень використовують актуальні протигрипозні вакцини та антивірусні препарати. Часто застосування про-

тивірусних препаратів супроводжується появою побічних наслідків і є ефективним лише проти певного штаму вірусу грипу.

На даний час у світі в боротьбі з вірусом грипу застосовують хіміотерапевтичні препарати, які

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Відділ біохімії ліпідів

Н. М. Гула — зав. відділом, чл.-кор. НАН та НАМН України

А. А. Чумак — с.н.с., д.м.н.

В. С. Асмолкова — н.с., к.б.н.

А. Г. Бердишев — н.с., к.б.н. (a6601158@yandex.ua)

Г. В. Косякова — н.с., к.б.н.

Ю. М. Башта — пров. інж.

ДУ “Інститут епідеміології і інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України”

Лабораторія експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій

С. Л. Рибалко — зав. лабораторії, д.м.н.

С. Т. Дядюн — с.н.с., к.б.н.

Д. Б. Старосила — н.с., к.б.н.

Л. К. Беньковська — м.н.с.

© Н. М. Гула, А. А. Чумак, С. Л. Рибалко, С. Т. Дядюн, В. С. Асмолкова, А. Г. Бердишев, Г. В. Косякова, Д. Б. Старосила, Л. К. Беньковська, Ю. М. Башта, 2014.

впливають на репродукцію вірусу в клітині ("Римантадин" та його аналоги), характеризуються імуномодулювальною дією чи є інгібіторами нейрамінідази ("Таміфлю"). Всі вони проявляють низку побічних ефектів, проте до них швидко формується резистентність збудника [6].

Водночас, у природі є безліч структурно відмінних хімічних сполук, що є безмежним джерелом активних речовин для створення новітніх лікарських засобів. В останнє сторіччя було ізольовано, досліджено та протестовано велику кількість різноманітних компонентів природного походження на наявність у них противірусної (зокрема, протигрипозної) активності [23, 26].

Відомо, що N-ацилетаноламіни (NAEs) — це великий та різноманітний клас сигнальних ліпідів, що є частиною великої групи ендогенних канабіноїдів (ендоканабіноїдів) — сполук, які разом з відповідними канабіноїдними рецепторами складають ендоканабіноїдну регуляторну систему. Наведені в літературі факти, а також результати власних досліджень вказують на те, що ендоканабіноїдна система є привабливою мішенню для розробки лікарських засобів для лікування серцево-судинних, онкологічних, нейродегенеративних та інших захворювань.

NAEs є похідними N-ацильованих фосфоліпідів (NAPE), їх відносять до мінорних ліпідів, оскільки в нормі в організмі вони знаходяться в пікомолярних кількостях. В останні десятиліття встановлені численні впливи NAEs на різні параметри імунної відповіді організму. На даний час широко досліджуються протизапальні властивості переважно NAEs із ненасиченим ацилом і пальмітоїлетаноламіном. Так, протизапальні ефекти N-пальмітоїлетаноламіну (NPE) широко вивчено на тваринах з експериментальною хронічною люмбагією та множинним склерозом [18], карагенін-індукованим гострим запаленням задніх кінцівок у щурів і мишей [14], де NPE чинив антигіпералгезичний ефект та попереджав утворення набряку. Цікавим є факт, що від 1970 р. у Чехословаччині NPE під комерційною назвою "Імпульсин" певний час використовувався як профілактичний засіб проти респіраторних інфекцій [20]. Біологічні ефекти N-стеароїлетаноламіну (NSE), часто тотожні NPE, залишаються малодослідженими.

З огляду на вищезазначене, метою даного дослідження було вивчити антигрипозну активність NSE в експериментах *in vitro* та *in vivo*.

Матеріал та методи. В дослідженнях використовували вірус грипу A/FM/1/47 (H1N1), адаптований до легенів білих мишей, який пройшов 15 пасажів на мишах, інфекційний титр $4,0 \lg LD_{50}$,

100 % летальність мишей спостерігалась протягом 5 діб; у перещеплюваній культурі клітин нирки собаки MDCK (*Madine-Darbin Canine Kidney*) інфекційний титр вірусу становив $6,0 \lg ID_{50}$.

N-стеароїлетаноламін синтезували розробленим нами методом, суть якого полягає у конденсації етаноламіну та стеаринової кислоти за певного температурного режиму [4]. Очистку отриманого NSE проводили шляхом перекристалізації в етанолі. З метою оцінки ступеня чистоти та відповідності отриманого кінцевого продукту NSE проводили його мікротонкошарову хроматографію, що дозволило виявити зону NSE у системі розчинників хлороформ : метанол : 25 % аміак (80 : 20 : 2).

Для визначення максимально переносимої концентрації (МПК) N-стеароїлетаноламіну була використана культура клітин MDCK, отримана з банку культур клітин лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України". Клітини MDCK інкубували при температурі 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ протягом 5 діб з концентрацією NSE в середовищі від 10⁻⁵ до 10⁻⁹ моль/л. Щоденно проводили перегляд дослідних та контрольних клітин із метою виявлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД) NSE на клітини. Ступінь ЦПД визначали за зміною морфології клітин (закруглення та зморщення клітин або відторгнення клітин від поверхні лунок) за 4-плюсовою системою від "+" до "++++". За МПК NSE приймали його найбільшу концентрацію, яка не спричиняла дегенерації клітин.

Для визначення мінімальної активної концентрації (МАК) NSE — мінімальної кількості препарату, що пригнічує розвиток вірус-специфічної цитопатичної дії на 50 % — тест-вірус у дозі 100 ТЦД₅₀ (ТЦД₅₀ — тканинна цитопатична доза — кількість патогенного агента, яка викликає патологічні зміни в 50 % клітин у культурі) в 0,1 мл вносили у культуру клітин MDCK та інкубували протягом 1 год при температурі 37 °C. Після адсорбції вірусу на клітинах його видаляли промиванням середовищем RPMI-1640, після чого у підтримуюче середовище (RPMI-1640 + 2 % фетальної сироватки) вносили NSE до кінцевих концентрацій від 10⁻⁵ до 10⁻¹⁰ моль/л.

Відсутність ЦПД у досліді (в оброблених культурах) при наявності її в контролі, а також зниження інфекційного титру в оброблених культурах при наявності його в контрольних та різниця інфекційних титрів у досліді порівняно з контролем вірусу грипу дозволяли визначити МАК препарату.

Хіміотерапевтичний індекс (ХТІ) NSE відносно вірусу грипу розраховували як частку від поділу значення МПК на МАК: ХТІ = МПК/МАК.

При дослідженні впливу NSE та вірусу грипу на мітотичний режим культуру клітин MDCK вирощували на покривних скельцях у поживному середовищі RPMI-1640 із додаванням 10 % фетальної сироватки теляти. Через 24 год культивування клітини було розподілено на 4 групи. Перша слугувала інтактним контролем, до другої додавали суспензію NSE до кінцевої концентрації 10^{-6} моль/л. Третю групу клітин інфікували вірусом грипу у дозі 100 ТЦД₅₀ в 0,1 мл. До четвертої групи додавали NSE вказаної концентрації та інфікували вірусом грипу. Через 24 год культивування клітин в термостаті при температурі 37 °С клітини на скельцях фіксували в реактиві Шабадша та фарбували гематоксилін-еозин за загальноприйнятою методикою [8]. Далі проводили цитологічний аналіз. Мітотичний індекс встановлювали шляхом підрахування 3000-10000 клітин і виражали у кількості мітозів на 1000 клітин (%). Одночасно визначали наявність патологічних форм мітозів, кількість яких виражали у % [1].

Для визначення антигрипозної активності NSE *in vivo* використовували модель грипозної пневмонії мишей. В дослідженнях були використані білі безпородні миші масою 18-20 г, які знаходилися на стандартному раціоні віварію не менше 7 діб. Визначення протигрипозної активності NSE *in vivo* проводили за профілактичною та лікувальною схемами його введення.

За профілактичною схемою мишам за 24 год до зараження вірусом грипу в дозі 10 LD₅₀ інтраназально вводили 0,2 мл NSE в концентрації 10^{-6} моль/л та 10^{-8} моль/л, що відповідає дозам 81,75 мкг/кг та 0,8175 мкг/кг маси тіла.

За лікувальною схемою мишам через 24 год після зараження вірусом грипу в дозі 10 LD₅₀ інтраназально вводили 0,2 мл NSE в концентрації 10^{-6} моль/л, 10^{-8} моль/л та 10^{-9} моль/л, що відповідає дозам 81,75 мкг/кг, 0,8175 мкг/кг та 0,08175 мкг/кг маси тіла.

Препаратом порівняння для обох схем введення слугував широкоживаний протигрипозний препарат Озельтамівір (комерційна назва "Таміфлю") у дозі 10 мг/кг маси тіла.

Окремо була виділена група контрольних тварин, яких інфікували вірусом грипу.

Облік ефективності дії препарату здійснювали за індексом протигрипозної ефективності пригнічення летальності (ІЕ) та інфекційного титру вірусу грипу в легеневій тканині мишей у дослідних і контрольній групах.

ІЕ препарату визначали за формулою [2]:

$$IE = \frac{K3 - 1}{K3} \times 100 \%,$$

де К3 — кратність захисту (кратність зменшення кількості мишей — частка від поділу кількості тварин на початку експерименту на кількість тварин на кінець експерименту).

При проведенні експериментів дотримувались рекомендацій щодо медико-біологічних досліджень відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції "Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей" (Страсбург, 1998) та норм біомедичної етики, згідно із Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006 під контролем комітету з медичної етики ДУ "Інститут епідеміології і інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України".

Антинейрамінідазну активність NSE визначали за ступенем інгібування активності нейрамінідази вірусу грипу H1N1 та ізольованого ферменту — активність 105 г/(хв·мл), виділеного з *Astrobacter ureafaciens* за методом N. Aminoff [12]. До розведень нейрамінідази (0,1 мл) і вірусу грипу додавали 0,1 мл водної суспензії NSE, інкубували 1 год при 37 °С, додавали фетуїн і залишали при 37 °С на 18 год. Далі в кожну пробу вносили по 0,25 мл 1 % розчину періодату калію і інкубували 30 хв. Після цього додавали 0,4 мл 2 % розчину арсеніту натрію у 0,5 н. HCl, струшували і вносили по 2 мл тіобарбітурової кислоти (0,1 моль/л). Нагрівали на водяній бані при 100 °С протягом 7,5 хв, охолоджували на льоду. Далі додавали 5 мл підкисленого бутанолу (до 200 мл бутанолу додавали 10 мл 12 н. HCl), струшували, центрифугували 10 хв при 300g і вимірювали оптичну густина при довжині хвилі 549 нм.

Для вивчення впливу NSE на гемаглютинуючу активність вірусу грипу проводили реакцію гальмування гемаглютинації. Для цього готували двократні розведення NSE, починаючи з 1:10 до 1:320. Потім додавали вірус, що містив 4 аглютинуючих одиниці, інкубували суміш препарату та вірусу 30 хв при кімнатній температурі та додавали 0,75 % еритроцитів морської свинки, струшували та залишали при кімнатній температурі протягом 60 хв, після чого оцінювали результати реакції. За титр гальмування приймали граничне розведення, яке дає повну затримку реакції гемаглютинації.

Інтерфероніндукуючу активність NSE визначали на білих безпородних мишах, яких було розподілено на 6 груп ($n = 10$ у кожній). Тварини 1 групи отримували 0,2 мл фізіологічного розчину. Мишам 2 групи вводили еталонний індуктор інтерферону (IFN) PolyI:C (*Polyinosinic:polycytidylic acid*) в дозі 10 мг/кг маси тіла. Іншим групам мишей внутрішньочеревинно вводили водну суспензію NSE (0,2 мл): 3 групі — у концентрації 10^{-6} моль/л (в дозі 81,75 мг/кг), 4 групі — у концентрації 10^{-7} моль/л (в

дозі 8,175 мг/кг), 5 групі — у концентрації 10^{-8} моль/л (в дозі 0,817 мг/кг), 6 групі — у концентрації 10^{-9} моль/л (в дозі 0,0817 мг/кг). Через 24 год у сироватці крові мишей визначали активність *IFN* за загальноприйнятою методикою пригнічення цитопатогенної дії вірусу везикулярного стоматиту в гомологічній культурі тканин *OH-1* (лімфобластодіні клітини миші) [16]. Активність *IFN* виражали числом, зворотнім розведенню препарату, при якому культура клітин в 50 % лунок була повністю захищеною від цитопатогенної дії індикаторного вірусу. Для визначення активності *IFN* в міжнародних одиницях у дослідженнях використовували міжнародний стандарт (*IFN α* мишей, активність 75 000 МО/мл, *Sigma-Aldrich*, США). Як маркер диференціювання типів інтерферону використовували кислотостійкість *IFN α* . Для цього рН в інкубаційному розчині змінювали до 2,0 додаванням 5 н. HCl, а потім повертали до 7,5 за допомогою 5 н. NaOH. При цьому *IFN γ* руйнувався, активним залишався кислотостійкий *IFN α* .

Для дослідження впливу NSE на рівень холестерину у тканинах печінки та легень безпородних мишей, інфікованих вірусом грипу *H1N1*, було розподілено на сім груп ($n = 3$ у кожній): 1 — інтактні, 2 — контрольні тварини, яким однократно інтраназально вводили 0,2 мл водної суспензії NSE (10^{-7} моль/л), 3 — тварини, яких інтраназально заражали вірусом грипу *H1N1* у дозі $10 LD_{50}$, 4 — тварини, яким за 24 год до зараження вірусом грипу вводили водну суспензію NSE (0,2 мл, 10^{-7} моль/л), 5 — тварини, яким за 24 год до зараження вірусом грипу вводили водну суспензію NSE (0,2 мл, 10^{-9} моль/л), 6 — тварини, яким через 24 год після зараження вірусом грипу вводили водну суспензію NSE (0,2 мл, 10^{-7} моль/л), 7 — тварини, яким через 24 год після зараження вірусом грипу вводили водну суспензію NSE (0,2 мл, 10^{-9} моль/л). Тварин виводили з експерименту на 72 годину, вилучали печінку та легені, проводили гомогенізацію тканин та екстракцію ліпідів як описано нижче.

Екстракцію ліпідів проводили за методом *E. C. Bligh i W. I. Dyer* [13]. Печінку та легені дослідних тварин гомогенізували у фізіологічному розчині (ФР) (1,5 г у 5 мл ФР та 0,36 г у 1,2 мл ФР, відповідно). Аліквоти 30 % гомогенату тканин переносили до скляних центрифужних пробірок, додавали 2 мл хлороформу та 1 мл метанолу (2 : 1 за об'ємом). Суміш витримували протягом 10 хв, періодично її перемішуючи. Далі проводили центрифугування протягом 10 хв при 2000-3000 об./хв на центрифугі К-23, супернатант відбирали в іншу пробірку, а залишок ще раз екстрагували шляхом додавання 0,5 мл суміші хлороформ : метанол : вода (2 : 1 : 0,8 за об'ємом). Хлороформні шари (су-

пернатанти) після двох екстракцій об'єднували, розбавляли таким же об'ємом бензолу та випарювали на роторному випарювачі. До обробки ліпідні екстракти (у певному об'ємі бензолу) зберігали у холодильній камері при -18°C .

Фракцію вільного холестерину виділяли методом одновимірної мікротонкошарової хроматографії на платівках "*Sorbfil*" (Росія). На хроматографічні платівки розміром 6×9 см наносили аліквоту ліпідного екстракту і проводили хроматографію в системі розчинників гексан : діетиловий ефір : льодяна оцтова кислота (85 : 15 : 1). Зони досліджуваних ліпідних класів знімали з платівки разом із силікагелем. Зону вільного холестерину переносили в підготовлену мікроколону та елюювали діетиловим ефіром. Після випарювання розчинника сухий залишок холестерину піддавали аналізу на газорідинному хроматографі на скляних колонках (0,5 м) з носієм 1,5 % *OV-1* на *Chimalite W* (80-100 меш) при температурі 250°C . Рівень холестерину розраховували відносно стандартного розчину β -ситостеролу.

Отримані дані обробляли статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. У системі доклінічного вивчення лікарських препаратів першим етапом досліджень є оцінка токсичності сполуки для клітин та лабораторних тварин [9]. Як правило, в процесі вивчення токсичності досліджують вплив різних концентрацій препарату на морфологію клітин. Показником токсичності кожної сполуки для тієї чи іншої культури клітин є МПК, яка становить 1/2 максимальної концентрації препарату, що не проявляє у клітині токсичної дії (за даними прижиттєвого морфологічного визначення порушення поглинання клітинами вітального фарбника) [11]. Як правило, максимальний термін контакту досліджуваної сполуки з культурою клітин при визначенні МПК відповідає періоду максимального функціонування клітинних структур (у середньому 4-5 діб) [7].

Результати наших досліджень на клітинах *MDCK* показали, що МПК NSE становить 10^{-5} моль/л.

Згідно з методичними рекомендаціями проведення доклінічних досліджень лікарських засобів, речовину або препарат вважають таким, що проявляє протівірусну активність, коли рівень репродукції вірусу під їх дією зменшується на $2,0 \lg TCD_{50}$ та більше [10]. Наші експерименти показали (табл. 1), що NSE пригнічує репродукцію вірусу грипу на $3,0 \lg ID_{50}$ (ID_{50} — кількісний показник вірулентності вірусу, що виражається значенням інфікуючої дози, яка викликає зараження 50 % клітин) в концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} моль/л. Слід відзначити, що NSE як в концентрації 10^{-5} моль/л, так і в діапазоні 10^{-8} - 10^{-10} моль/л не пригнічує репродукцію вірусу грипу в

клітинах MDCK. МАК NSE становить 10^{-7} моль/л, а ХТІ по відношенню до вірусу грипу дорівнює 100. Ці результати дозволяють віднести NSE до речовин з активною антигрипозною дією.

Таблиця 1

Вплив різних концентрацій NSE на репродукцію вірусу грипу у клітинах MDCK

Концентрація препарату, моль/л	Титр вірусу, lg ТЦД ₅₀	Інгібуюча активність, lg ID ₅₀
0 (контроль вірусу)	6,0	-
10^{-5}	6,0	0
10^{-6}	3,0	3,0
10^{-7}	3,0	3,0
10^{-8}	6,0	0
10^{-9}	6,0	0
10^{-10}	6,0	0

Слід відзначити, що більшість токсичних агентів впливає на клітину шляхом втручання в молекулярні механізми гомеостазу. Така дія може проявлятися низкою ефектів, що включають зміни фундаментальних клітинних реакцій, які визначають функції конкретного органу-мішені. Найбільш простим та доступним методом оцінки цитотоксичності є візуальне спостереження за станом клітин за допомогою світлового мікроскопа за малого збільшення [5]. Так, простий підрахунок кількості типових та атипичних мітозів у культурі клітин є інформативним показником типового/атипового функціонування клітинної культури за дії досліджуваної сполуки.

Культивування нормальних MDCK клітин з NSE у концентрації 10^{-6} моль/л не впливає на їх мітотичну активність — їх мітотичний індекс реструється на рівні показника інтактних клітин (рис. 1). В клітинах, що заражені вірусом грипу, мітотичний індекс знижується більш ніж у 2 рази порівняно з інтактними клітинами, це свідчить про зниження проліферативної активності інфікованих клітин. Додавання NSE до середовища інкубації перед зараженням клітин вірусом грипу вірогідно попереджало зниження мітотичного індексу, що свідчить про протекторну дію NSE за умов грипозної інфекції (див. рис. 1). Водночас NSE вірогідно попереджає викликане вірусом грипу збільшення числа аномальних мітозів, (див. рис. 1).

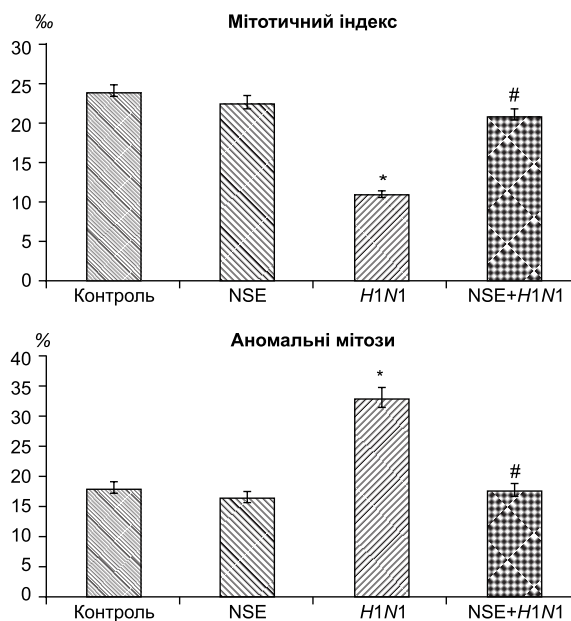


Рис. 1. Вплив NSE на мітотичний індекс та число аномальних мітозів клітин MDCK. * — $P < 0,05$ порівняно з контролем (неінфіковані клітини); # — $P < 0,05$ порівняно з клітинами, що інфіковані вірусом грипу H1N1.

За профілактичною схемою одноразове інтраназальне введення мишам 0,2 мл NSE в концентрації 10^{-6} моль/л та 10^{-8} моль/л за 24 год до зараження грипом значно зменшило титр вірусу грипу у легеневій тканині мишей. При цьому найбільш виражений ефект (lg ТЦД₅₀ < 0,5) був виявлений при введенні 0,2 мл водної суспензії NSE в концентрації 10^{-6} і 10^{-8} моль/л, що свідчить про зниження за дії NSE імовірності захворювання на грип. Така дія NSE зменшувала смертність інфікованих тварин на 40 % і 100 %, відповідно (табл. 2). Причому NSE в концентрації 10^{-8} моль/л виявився більш ефективним, ніж широкоживаний антигрипозний препарат “Таміфлю” з діючою речовиною озельтамівіром в концентрації 0,16 моль/л. Таким чином, отримані результати свідчать про виражену профілактичну дію NSE в умовах розвитку грипозної інфекції.

За лікувальною схемою одноразове інтраназальне введення мишам 0,2 мл водної суспензії NSE через 24 год після зараження грипом найбільш ефективно

Таблиця 2

Противірусна дія NSE на моделі експериментальної грипозної інфекції у мишей за умов профілактичної схеми введення

Препарат	Концентрація препарату, моль/л	Кількість мишей		Коефіцієнт захисту	Індекс ефективності, %	Титр вірусу грипу в легенях мишей, lg ТЦД ₅₀
		всього	з них загинуло, абс. (%)			
Контроль вірусу	0	12	12 (100,0)	-	-	4,0
Озельтамівір	0,16	10	2 (20,0)	5,0	80,0	1,5
NSE	10^{-6}	10	6 (60,0)	1,7	39,7	2,0
	10^{-8}	10	0	>10	100,0	<0,5

знижує летальність тварин від грипозної пневмонії у концентраціях 10^{-6} моль/л та 10^{-9} моль/л (табл. 3). При цьому NSE пригнічує репродукцію вірусу в легеневій тканині інфікованих мишей на 2 та 3,5 lg, відповідно. Індекс ефективності NSE в концентрації 10^{-9} моль/л був вищим на 23 % за значення цього показника у озельтамівіру. Виявлена нами більш ефективна дія концентрації NSE 10^{-9} моль/л за лікувальної схеми введення порівняно з профілактичним застосуванням NSE, де концентрація була в 10 раз більшою, можливо, пов'язана із впливом NSE на нейрамінідазну активність вірусу грипу. На користь цього припущення свідчить дуже низький титр вірусу в легеневій тканині інфікованих мишей, яким вводили 0,2 мл 10^{-9} моль/л NSE (див. табл. 3).

Отже, наші дані свідчать про виражений профілактичний та лікувальний ефекти N-стеароїлтанолоаміну при грипозній пневмонії у мишей.

У 1970 р. була встановлена кристалічна структура нейрамінідази (NA) вірусів грипу типів A і B, а у 1983 р. — її амінокислотна послідовність, однакова для всіх типів NA вірусів грипу. Так, NA грипу (глікозид гідролаза, КФ 3.2.1.18), поряд з гемаглютиніном (HA) є антигенним протеїном на поверхні віріону грипу. NA та HA впізнають карбоксильні залишки та зв'язуються з термінальними сіаловими кислотами на поверхні клітини-хазяїна. Зв'язування HA з рецептором поверхні клітини ініціює проникнення вірусу у клітину-хазяїна та забезпечує злиття вірусної та клітинної мембран. NA — тетрамерний фермент, що складається з цитоплазматичного "хвоста", трансмембранного домену, рухливої частини та глобулярної головки, — руйнує рецептори зв'язування з HA, знижуючи таким чином кількість доступних для HA місць зв'язування з поверхнею клітини. Це дозволяє вже зрілій вірусній частинці відкріпитися від клітини-хазяїна після її виходу з клітини, запобігає агрегації вірусних частинок між собою, що може мати місце на поверхні клітини та забезпечує розповсюдження інфекції по дихальній системі організму [17, 19, 22]. Отже, NA відіграє критичну роль у розповсюдженні вірусу по інфікованим тканинам. Через антагоністичні функції NA та HA, збалансована взаємодія обох вірусних глікопротеїнів є не-

обхідною для ефективного проникнення та розповсюдження вірусу грипу [24]. На додачу, функція NA полягає також у забезпеченні необхідної мобільності вірусної частинки у дихальній системі — NA руйнує полісахариди клітин слизової оболонки органів дихання і таким чином забезпечує проникнення вірусу до клітин [15, 21].

Існування такої консервативної молекулярної структури як NA, яка відповідає за вірулентність вірусу, навела дослідників на думку, що пригнічення нейрамінідазного компонента вірусу грипу затримає репродукцію вірусу. Як наслідок, з'явилися препарати, які блокують активність нейрамінідази вірусів грипу типів A і B — озельтамівір та занамівір. Але, зважаючи на вищесказані причини, постає питання про пошук нових сполук з антинейрамінідазною активністю.

Наші дослідження антинейрамінідазної активності показали, що NSE в діапазоні концентрацій 10^{-7} – 10^{-9} моль/л (рис. 2) на 100 % інгібує нейрамінідазну активність, а в концентраціях 10^{-6} та 10^{-10} моль/л — на 50 % та 25 %, відповідно. Отже, одним із механізмів протигрипозної дії NSE є його здатність пригнічувати активність нейрамінідази вірусу грипу.

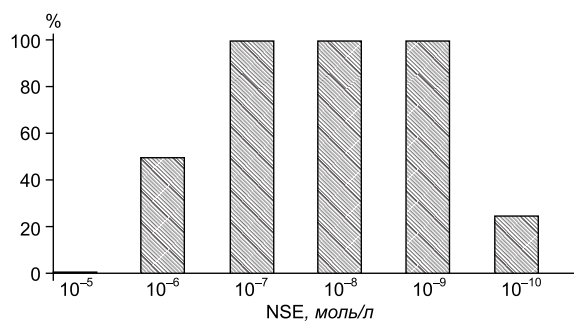


Рис. 2. Вплив NSE на інгібування нейрамінідазної активності вірусу грипу H1N1.

Відкриття та детальне вивчення специфічного зв'язування вірусу грипу з поверхнею клітини-хазяїна за допомогою глікопротеїд-глікопротеїдної взаємодії є одним з найвидатніших досягнень ранніх етапів розвитку вірусології. Відкривши у 1941 р. явище гемаглютинації, Херст показав, що клітини, чутливі до вірусу грипу, несуть на своїй

Таблиця 3
Протигрипозна дія NSE на моделі експериментальної грипозної інфекції у мишей за лікувальною схемою введення

Препарат	Концентрація препарату, моль/л	Кількість мишей		Коефіцієнт захисту	Індекс ефективності, %	Титр вірусу грипу в легенях мишей, lg ТЦД ₅₀
		всього	з них загинуло, абс. (%)			
Контроль вірусу	0	10	10 (100,0)	–	–	4,0
Озельтамівір	0,16	10	3 (30,0)	3,30	77,0	2,5
NSE	10^{-6}	10	6 (60,0)	1,66	40,0	2,0
	10^{-8}	10	8 (80,0)	1,25	20,0	4,0
	10^{-9}	10	0	>10	100,0	<0,5

поверхні рецептори до вірусного *HA* і можуть набувати стійкості до інфекції у випадку деструкції специфічних поверхневих рецепторів нейрамінідазою. Тому крім дослідження антинейрамінідазою. Тому крім дослідження антинейрамінідазою. Тому крім дослідження антинейрамінідазою. Тому крім дослідження антинейрамінідазою.

Дослідження інтерфероніндукуючої активності показало, що NSE при внутрішньочеревному введенні 0,2 мл його водної суспензії індукує продукцію як *IFN γ* , так і *IFN α* (рис. 3). При цьому NSE вірогідно посилює продукцію *IFN γ* у концентрації 10^{-6} моль/л (що відповідає дозі 81,75 мкг/кг), 10^{-7} моль/л (8,175 мкг/кг), 10^{-8} моль/л (0,8175 мкг/кг) та 10^{-9} моль/л (0,08175 мкг/кг), а *IFN α* — лише у концентраціях 10^{-8} моль/л (0,8175 мкг/кг) та 10^{-9} моль/л (0,08175 мкг/кг).

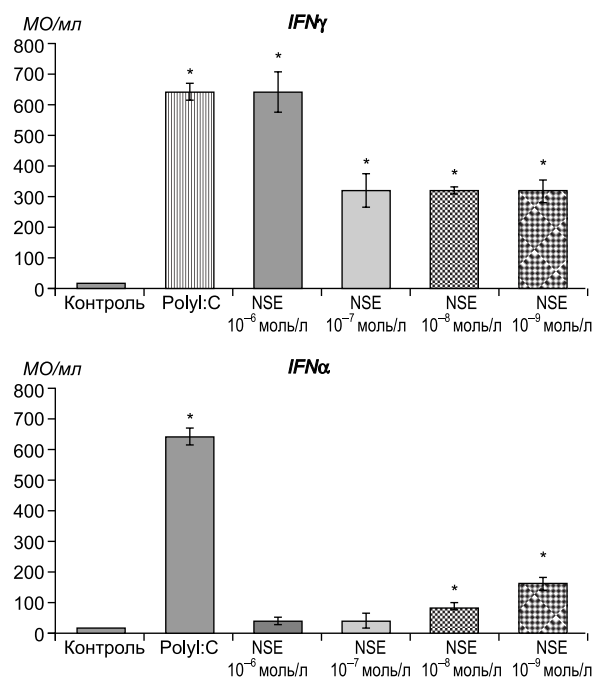


Рис. 3. Вплив NSE на рівень *IFN γ* та *IFN α* в крові мишей. * — $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Отже, NSE в усіх досліджуваних дозах є активним індуктором *IFN γ* . Причому, інтерфероніндукуюча дія NSE у дозі 81,75 мкг/кг маси тіла (що відповідає 0,2 мл NSE в концентрації 10^{-6} моль/л) подібна до дії потужного еталонного імуномодулятора PolyI:C в дозі 10 000 мкг/кг маси тіла.

Звертає на себе увагу, що NSE вірогідно підвищував активність *IFN α* у найменших концентраціях — 10^{-8} моль/л та 10^{-9} моль/л, тоді як високі концентрації NSE не впливали на активність *IFN α* ,

що свідчить про те, що високі концентрації NSE не викликають індукції *IFN α* у крові мишей.

Отже, індукція *IFN* в організмі мишей під дією NSE може бути ще одним механізмом, за яким реалізується його протигрипозна дія.

Беручи до уваги, що використаний у дослідженнях штам вірусу грипу H1N1 був адаптований до тканини легень і наслідком його дії є розвиток грипозної пневмонії у мишей, наступним завданням роботи було визначення механізмів протекторного впливу NSE на тканину легень мишей, заражених вірусом грипу.

Як відомо, асоціація вірусу грипу з плазматичною мембраною клітини-хазяїна на етапі проникнення вірусу грипу у клітину відбувається на ліпідному рафті — збагаченій холестерином та сфінгомієліном ділянці мембрани [25]. Тому доцільним було визначення вмісту холестерину в тканині легень мишей, інфікованих вірусом грипу.

За умов нашого експерименту група мишей, інфікованих вірусом грипу, загинула від грипозної пневмонії; при цьому відбулась деструкція легеневої тканини, що унеможливило проведення подальших вимірювань біохімічних параметрів у цій групі. Інтраназальне введення NSE у всіх досліджуваних дозах та схемах введення запобігало або зменшувало не лише загибель тварин від грипозної пневмонії, але й зміни рівня холестерину в тканині легень інфікованих мишей (рис. 4).

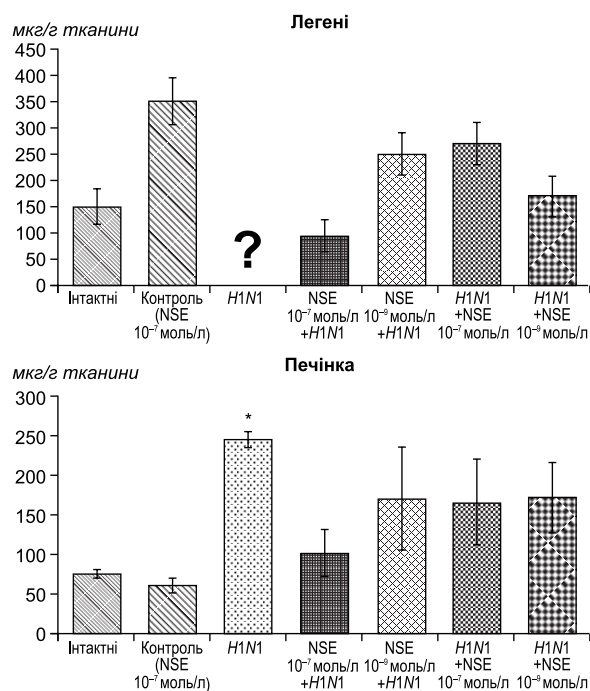


Рис. 4. Вплив NSE на рівень вільного холестерину у легенях та печінці мишей, інфікованих вірусом грипу. ? — деструкція легень, * — $P < 0,05$ порівняно з контролем.

В печінці мишей, інфікованих вірусом грипу, спостерігалось зростання кількості вільного холестерину, тоді як за введення NSE цим тваринам у всіх дозах і схемах рівень холестерину достовірно не змінюється порівняно з інтактними тваринами (див. рис. 4).

Отже, отримані нами дані свідчать про потужну антигрипозну дію N-стеароїлетаноламіну, що

реалізується шляхом пригнічення активності нейрамінідази, посиленням синтезу інтерферонів, а також його мембранопротекторною дією. Це закладає засади для створення принципово нового лікарського засобу для профілактики та лікування грипу. Використання NSE в якості антигрипозного засобу захищено патентом України [3].

Список використаної літератури

1. Блюмкин В. Н., Жданов В. М. Влияние вирусом на хромосомный аппарат и деление клеток. — М.: Медицина, 1973. — 128 с.
2. Гаращенко М. В., Гаращенко Т. И., Мезенцева М. В. Клинико-иммунологическое обоснование гомеопатических препаратов в профилактике и лечении гриппа и ОРВИ // Русск. мед. журн. — 2005. — 13, № 21. — С. 1432-1437.
3. Гула Н. М., Асмолова В. С., Рибалко С. Л. та ін. Застосування N-стеароїлетаноаміну як речовини з активною антигрипозною дією: Пат. 79010 UA, МПК (2013.01) А 61К 45/00, С12Р 19/04 (2006.01). — Опубл. 10.04.2013. — Бюл. № 7.
4. Гула Н. М., Маргітич В. М., Горідько Т. М. та ін. Спосіб одержання N-ацилетаноламінів: Пат. 81861 UA, МПК (2007.01) С07С 215/00, С07С 229/02. — Опубл. 11.02.2008. Бюл. № 3.
5. Еропкин М. Ю., Еропкина Е. М. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. — СПб.: Морсар АВ, 2003. — 239 с.
6. Злыдников Д. М. Опыт клинического изучения противогриппозного препарата ремантадина // Врачеб. дело. — 1991. — № 4. — С. 15-18.
7. Носков Ф. С., Демченко В. М., Соколова Е. Д. и др. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. — Минск, 1977. — С. 49-55.
8. Роскин Г. И., Левинсон Л. Б. Микроскопическая техника. — М.: Сов. наука, 1957. — 469 с.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
10. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів, методичні рекомендації. — Київ, 2005. — 528 с.
11. Чижов Н. П., Носков Ф. С. Схема первичного отбора противовирусных препаратов // Молекулярная биология вирусом, химиотерапия и химиопрофилактика вирусных инфекций. — Минск, 1974. — С. 217-219.
12. Aminoff N. Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // Biochem. J. — 1961. — 81. — P. 384-392.
13. Bligh E. C., Dyer W. I. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. — 1959. — 37, № 8. — P. 911-917.
14. Conti S., Costa B., Colleoni M. et al. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat // Br. J. Pharmacol. — 2002. — 135, № 1. — P. 181-187.
15. Gong J. Z., Xu W. F., Zhang J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase // Curr. Med. Chem. — 2007. — 14. — P. 113-122.
16. Ho M., Enders J. F. An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 1959. — 45, № 3. — P. 385-389.
17. King S. J., Hippe K. R., Weiser J. N. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae* // Mol. Microbiol. — 2006. — 59. — P. 961-974.
18. Lambert D. M., Vandevoorde S., Jonsson K. O. et al. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? // Curr. Med. Chem. — 2002. — 9. — P. 663-674.
19. Manco S., Hernon F., Yesilkaya H. et al. Pneumococcal neuraminidases A and B both have essential roles during infection of the respiratory tract and sepsis // Infect. Immun. — 2006. — 74. — P. 4014-4020.
20. Masek K., Perlik F., Klíma J. et al. Prophylactic efficacy of N-hydroxyethyl palmitamide (impulsin) in acute respiratory tract infections // Eur. J. Clin. Pharmacol. — 1974. — 7, № 6. — P. 415-419.
21. Matrosovich M. N., Matrosovich T. Y., Gray T. et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium // J. Virol. — 2004. — 78. — P. 12665-12667.
22. Orihuela C. J., Gao G., Francis K. P. et al. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis // J. Infect. Dis. — 2004. — 190. — P. 1661-1669.
23. Roxas M., Jurenka J. Colds and influenza: a review of diagnosis and conventional, botanical, and nutritional considerations // Altern. Med. Rev. — 2007. — 12. — P. 25-48.
24. Tong H. H., Blue L. E., James M. A. et al. Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model // Infect. Immun. — 2000. — 68. — P. 921-924.
25. Veit M., Thaa B. Association of influenza virus proteins with membrane rafts // Adv. Virol. — 2011. — doi: 10.1155/2011/370606.
26. Vlietinck A. J., De Bruyne T., Vanden Berghe D. A. Plant substances as antiviral agents // Curr. Org. Chem. — 1997. — 1. — P. 307-344.

Одержано 24.08.2014

ПРОТИВОГРИПОЗНИЙ ЭФФЕКТ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА

**Н. М. Гулая, А. А. Чумак, С. Л. Рыбалко*, С. Т. Дядюн*, В. С. Асмолоква,
А. Г. Бердышев, Г. В. Косякова, Д. Б. Старосила*, Л. К. Беньковская*, Ю. М. Башта**

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, 01601 Киев

*Государственное учреждение “Институт эпидемиологии и инфекционных болезней
им. Л. В. Громашевского НАМН Украины”, 03680 Киев

Установлено, что в условиях *in vitro* N-стеароилэтаноламин (NSE) подавляет репродукцию вируса гриппа штамма H1N1 на 3,0 lg ТЦД₅₀ в концентрациях 10⁻⁶ и 10⁻⁷ моль/л, химиотерапевтический индекс NSE в отношении вируса гриппа штамма H1N1 составляет 100, что позволяет отнести NSE к активным противогриппозным препаратам. В опытах *in vivo* было показано, что водная суспензия NSE 0,2 мл в концентрации 10⁻⁶ моль/л и 10⁻⁸ моль/л при интраназальном введении при профилактической схеме (за 24 ч до заражения) способствовала уменьшению смертности инфицированных животных на 40 % и 100 %, соответственно. В легочной ткани мышей выявлен низкий титр вируса гриппа (<0,5 lg ТЦД₅₀) при концентрации NSE 10⁻⁸ моль/л. При лечебной схеме однократное интраназальное введение NSE (через 24 ч после заражения) эффективно снижает летальность животных от гриппозной пневмонии при концентрации 10⁻⁶ моль/л и 10⁻⁹ моль/л. При этом NSE подавляет репродукцию вируса в легочной ткани инфицированных мышей на 2,0 и 3,5 lg, соответственно. Показано, что одним из механизмов противогриппозного действия NSE является подавление нейраминидазной активности вируса гриппа H1N1. Интраперитонеальное введение 0,2 мл NSE в концентрации 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ и 10⁻⁹ моль/л вызывает в организме мышей индукцию IFN γ , а в концентрации 10⁻⁸ и 10⁻⁹ моль/л — IFN α , что может быть еще одним механизмом, по которому реализуется противогриппозное действие NSE. Также выявлено, что интраназальное применение NSE во всех исследуемых концентрациях и схемах введения у инфицированных вирусом гриппа мышей предотвращало изменения уровня холестерина в тканях легких и печени.

ANTI-INFLUENZA EFFECT OF N-STEAROYLETHANOLAMINE

**N. M. Hula, A. A. Chumak, S. L. Rybalko*, S. T. Diadiun*, V. S. Asmolkova,
A. G. Berdyshev, H. V. Kosiakova, D. B. Starosyla*, L. K. Benkovskaia*, Yu. M. Bashta**

A. V. Palladin Institute of Biochemistry NAS Ukraine, 01601 Kyiv

*State Institution “L. V. Gromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases NAMS
Ukraine”, 03680 Kyiv

N-stearoylethanolamine (NSE) was shown *in vitro* experiments to suppress viral replication of influenza H1N1 strain in the 3.0 lg CCID₅₀ in concentrations 10⁻⁶ and 10⁻⁷ mol/l, a chemotherapeutic index NSE against influenza virus H1N1 strain to be 100 that confirms NSE anti-influenza activity. The results of *in vivo* experiments showed that intranasal prophylactic administration of 0.2 ml 10⁻⁶ mol/l and 10⁻⁸ mol/l of NSE contributed to the decrease of mortality of infected animals by 40 % and 100 %, respectively. A low titer of influenza virus (<0.5 lg CCID₅₀) under NSE concentration 10⁻⁸ mol/l was revealed in the lung tissue of mice. The most effective concentrations of NSE which reduced lethality of animals from influenza pneumonia following therapeutic administration were 10⁻⁶ and 10⁻⁹ mol/l. NSE inhibited viral replication in the infected lung tissue of mice at 2.0 and 3.5 lg, respectively. Inhibition of H1N1 neuraminidase activity was shown to be one of the mechanisms of NSE anti-influenza effect. Another mechanism of such effect is the induction of IFN synthesis (IFN γ — in concentrations of NSE 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ and 10⁻⁹ mol/l, and IFN α in concentrations of NSE of 10⁻⁸ and 10⁻⁹ mol/l). It was also found that the intranasal administration of NSE in all studied concentrations prevented changes of cholesterol level in liver and lung tissues of mice infected with influenza virus.