

З. Ю. Ткачук, С. Л. Рибалко, Л. Д. Жаркова, Д. Б. Старосила,
Л. І. Семернікова

Антигрипозна активність препарату нуклекс

(Представлено академіком НАН України О. О. Мойбенком)

*Препарат нуклекс на основі дріжджової рибонуклеїнової кислоти є високоактивним антивірусним препаратом. Показано, що при грипозній інфекції його максимально переносима концентрація становить 5000 мкг/мл, а мінімально активна концентрація — 31 мкг/мл, хіміотерапевтичний індекс дорівнює 161. Розраховано ефективні дози нуклексу: 10–1,25 мг/мл при профілактичній схемі введення *in vitro*, 10–0,6 мг/мл при лікувальній схемі. Виявлено високу протигрипозну активність препарату при профілактичному лікуванні в дослідгах на мишах при внутрішньочеревному та внутрішньовенному введенні в дозах від 15 до 150 мг/кг, однак при інтраназальному введенні ефективна доза в десять разів вища. Встановлено, що механізм антигрипозної активності препарату нуклекс полягає в інгібуванні активності нейрамінідази та гемаглютиніну при взаємодії з віріоном грипу, а також він є пролонгованим індуктором альфа-інтерферону в дослідгах *in vivo*.*

Вірус грипу в період епідемій уражає велику кількість людей, завдаючи значної економічної шкоди державам. Тому надзвичайно актуальним завданням є пошук та застосування хіміотерапевтичних препаратів, які б блокували репродукцію вірусу грипу.

До недавнього часу ефективна хіміопротекція і хіміотерапія грипу, як і більшості вірусних захворювань, була дуже ускладнена. Перше повідомлення про противірусну дію 1-аміноадамантану зробили в 1963 р. Джексон зі співавт., а в 1964 р. були видані результати експериментів, проведених Девісом зі співавт. [1, 2]. Ремантадин став першим препаратом Радянського Союзу, який знайшов широке лікувально-профілактичне застосування при грипі [3].

У 1970 р. було встановлено кристалічну структуру нейрамінідази вірусів грипу типів А і В і показано, що пригнічення нейрамінідазного компонента вірусу грипу затримує репродукцію вірусу [4, 5]. Це дало можливість створити препарати, які блокують активність нейрамінідази вірусів грипу типів А і В — озелтамівір та занамівір. Дані препарати захищають від інфікування епітеліальні клітини респіраторного тракту і запобігають поширенню вірусу по організму. Озелтамівір та занамівір показали високий профілактичний та лікувальний ефект зі зменшенням тривалості захворювання в середньому на 2–3 дні і більш легким перебігом хвороби [6–8].

Епідемії грипу та ГРВІ супроводжуються високою смертністю та серйозними ускладненнями в уразливих групах населення. У групі ризику знаходяться люди з хронічними розладами, особливо такими, як серцево-судинні захворювання [9].

Існують переконливі докази того, що ГРВІ та грип викликають гострий інфаркт міокарда, серцево-судинну смертність, і доведено, що ліки проти вірусних інфекцій є ефективним засобом зниження ризику серцевих нападів у людей із серцево-судинними захворюваннями [10].

При застосуванні в клінічній практиці було виявлено, що новий вітчизняний кардіопротекторний препарат нуклекс скорочує термін одужання при ГРВІ та грипі. Клінічні

дослідження показали, що нуклекс позитивно впливає на динаміку формування зони некрозу міокарда, сприяє зменшенню залишкової маси некрозу, збільшує фракцію викиду лівого шлуночка, а також підвищує важливий показник функції нирок — швидкість клубочкової фільтрації. Вимивання кардіоспецифічного ферменту серцевого ізоензиму креатинфосфокінази у хворих при застосуванні препарату нуклекс та нормалізація величини цього ферменту наступають швидше, ніж у контрольній групі [11].

Метою наших досліджень було вивчення антигрипозної активності та механізму проти-вірусної дії кардіопротекторного препарату нуклекс.

Матеріали і методи. *Препарати.* Досліджуваний препарат нуклекс — активний інгредієнт, складається з високоочищеної РНК, виділеної з дріжджів, яка включає в основному 20–25 нуклеотидів. Таміфлю (Tamiflu–Oseltamivir) фірми “Roche” (75 мг у капсулі). Полі:ПоліЦ — еталонний індуктор інтерферону (ІФН) фірми “Calbiochem”. Нейрамінідаза — був використаний препарат нейрамінідази з *Astrobacter ureafaciens* 1 unit Calbiochem, Hoest.

Віруси. Вірус грипу в досліді *in vitro*: A/FM/1/47(H1N1), інфекційний титр в МДСК — 3,0 — 7,0 lg ID₅₀. Вірус грипу в досліді *in vivo*: A/FM/1/47(H1N1), адаптований до легенів білих мишей, який пройшов 15 пасажів на мишах, інфекційний титр — 4,0 lg LD₅₀, 100% летальність тварин спостерігалася протягом 5 днів. Вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана, одержаний з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д. І. Івановського РАМН (Москва). Інфекційний титр у культурі тканин L41 становив 4,0–5,0 lg ТЦД₅₀.

Культура клітин. МДСК — перещеплювана культура клітин нирки собаки, середовище для культивування: RPMI-1640 + 10 фетальної сироватки великої рогатої худоби + + антибіотики. L41 — лімфобластоїдні клітини людини. ОН-1 — лімфобластоїдні клітини миші.

Визначення *максимальної переносимої концентрації препаратів* (МПК) та *мінімально активної концентрації* (МАК) проводили відповідно до методичних рекомендацій [12]. За МПК вважали його найбільшу дозу, яка не спричиняла дегенерації клітин, а МАК являє собою мінімальну кількість препарату, яка гальмує розвиток вірусоспецифічної цитопатогенної дії (ЦПД) на 50% [12].

Хіміотерапевтичний індекс (ХТІ) препарату стосовно вірусу грипу визначали шляхом встановлення співвідношення МПК до МАК. Відсутність ЦПД у досліді, при наявності його в контролі вірусу, а також різниця інфекційного титру в досліді у порівнянні з контролем вірусу грипу дозволили розрахувати МАК препарату [12].

Антигрипозну активність препарату *in vitro* визначали на перещеплюваній культурі клітин МДСК (клітини нирки собаки) із суцільним шаром відповідно до рекомендацій [12]. Антигрипозну активність нуклексу *in vivo* вивчали на моделі грипозної пневмонії у мишей за профілактичною та лікувальною схемами. Неінбредним мишам внутрішньочеревно, внутрішньовенно або інтраназально вводили розчин препарату нуклекс за 24 год до інтраназального інфікування вірусом грипу, адаптованого до легеневої тканини мишей, у дозі 10 LD₅₀ (профілактична схема) і через 24 год після зараження вірусом грипу (лікувальна схема). Одночасно ставили контроль вірусу грипу для профілактичної та лікувальної схеми дослідів. Ефективність дії препарату оцінювали за індексом ефективності інгібіції летальності та інфекційного титру вірусу грипу в легеневій тканині мишей [12].

Визначення *активності інтерферону* проводили за загальноприйнятою методикою пригнічення ЦПД вірусу везикулярного стоматиту в культурі клітин ОН-1 [12].

Визначення *нейрамінідазної активності* проводили за методом D. Aminoff [13]. До розведень нейрамінідази (0,1 мл) додавали 0,1 мл препарату нуклекс у дозах 1,0; 3,0; 10,0; 30,0 мг/мл і інкубували 1 год при 37 °С. Активність нейрамінідази виражали в одиницях УФ-поглинання при довжині хвилі 549 нм або в процентах при порівнянні досліджуваних зразків та контролю. Реакцію гемаглютинації ставили паралельно з 1% курячими еритроцитами або 0,75% еритроцитами морської свинки за загальноприйнятою методикою [14]. *Інфекційний титр* вірусу грипу визначали за наявністю гемаглютиніну вірусу грипу.

Результати дослідження та їх обговорення. Розрахована нами МПК препарату нуклекс дорівнює 5000 мкг/мл, а МАК — 31 мкг/мл, ХТІ препарату становить 161. Показники МПК, МАК та ХТІ дозволяють віднести препарат нуклекс до високоактивних [15].

При проведенні випробувань по антигрипозній активності препарату нуклекс *in vitro* досліджували його профілактичну та лікувальну дію. Згідно з одержаними результатами (табл. 1), при застосуванні профілактичної схеми введення нуклекс був ефективний у дозах 10–1,25 мг/мл, при лікувальній схемі — у дозах 10–0,6 мг/мл.

Визначення антигрипозної активності нуклексу *in vivo* проводили при різних способах введення за профілактичною та лікувальною схемами (табл. 2). Виявлено, що при профілактичному введенні препарату внутрішньочеревно та внутрішньовенно ефективними були дози 150, 50, 15 мг/кг, при інтраназальному введенні ефективна доза препарату була значно вищою — 1000 мг/кг. При лікувальній схемі ефективним було внутрішньочеревне та інтраназальне введення препарату і при більш низьких дозах — 25 мг/кг (ІЕ = 60,0) та 50 мг/кг (ІЕ = 60,0).

При вивченні механізму дії препарату нуклекс визначали нейрамінідазну, гемаглютинуючу та інтерферогенну активність.

Дослідження впливу нуклексу на гемаглютинуючу активність вірусу грипу А/ФМ/1/47 (H1N1) проводили, використовуючи дози препарату 30,0; 10,0; 3,0; 1,0 мг/мл. Згідно з результатами досліджень, нуклекс у дозах 10,0; 3,0; 1,0 мг/мл статистично достовірно (у 4 рази) зменшує гемаглютинуючу активність гемаглютиніну вірусу грипу: при контролі титру вірусу $64 \pm 9,6$ у вказаних дозах титр дорівнював $16 \pm 2,4$.

Нейрамінідазну активність препарату нуклекс вивчали на прикладі нейрамінідази вірусу грипу та розчину препарату нуклекс у дозах 30,0; 10,0; 3,0; 1,0 мг/мл (контакт препарату відбувався протягом 1 і 18 год). У результаті проведених досліджень (табл. 3) виявлено, що при дії препарату в дозі 30,0 та 10 мг/мл протягом 1 год інгібіція нейрамінідазної активності вірусу грипу була повною на 100%, у дозах 3 і 1 мг/мл — на 50%. При більш тривалому

Таблиця 1. Антигрипозна дія препарату нуклекс *in vitro*

Концентрація препарату, мг/мл	Вплив			
	профілактичний		лікувальний	
	Інфекційний титр вірусу, lg ID ₅₀	Показник інгібіції, lg ID ₅₀	Інфекційний титр вірусу, lg ID ₅₀	Показник інгібіції, lg ID ₅₀
10	2,0 ± 0,3	5,0 ± 0,75	0	3,0 ± 0,45
5	2,0 ± 0,3	5,0 ± 0,75	0	3,0 ± 0,45
2,5	0	7,0 ± 1,05	0	3,0 ± 0,45
1,25	0	7,0 ± 1,05	0	3,0 ± 0,45
0,6	7,0 ± 1,05	0	0	3,0 ± 0,45
Контроль вірусу	7,0 ± 1,05	—	3,0 ± 0,45	—

контакті (18 год) повна інгібіція нейрамінідазної активності вірусу грипу відмічалася при дії препарату в дозах 30,0; 10,0 та 3,0 мг/мл і на 50% — у дозі 1 мг/мл.

Таким чином, препарат нуклекс у дозах 30,0; 10,0; 3,0; 1,0 мг/мл інактивує активність нейрамінідази вірусу грипу на 10 та 50%, у дозах 10,0; 3,0; 1,0 мг/мл статистично достовірно зменшує його гемаглютинуючу активність.

Таблиця 2. Антигрипозна дія нуклексу *in vivo* при профілактичному та лікувальному введенні

Доза, мг/кг	Спосіб введення	% загиблих	КЗ	ІЕ
Профілактична схема введення				
1500	Інтраназально	80 ± 1,25	1,25	25,0
1000	Так само	33,3 ± 1,67	3,0	66,6
500	—	80 ± 1,25	1,25	25,0
50	—	100	1,0	0
15	—	66,6 ± 3,33	1,25	25,0
150	Внутрішньочервно	60 ± 3,0	1,7	41,2
50	Так само	60 ± 3,0	1,7	41,2
15	—	60 ± 3,0	1,7	41,2
150	Внутрішньовенно	60 ± 3,0	1,7	41,2
15	Так само	80 ± 1,25	1,25	25,0
Таміфлю, 1 мг/кг	Внутрішньочервно	30 ± 1,0	5,0	70,0
Контроль вірусу		100	1	0
Лікувальна схема введення				
1500	Інтраназально	80 ± 1,25	1,25	25,0
1000	Так само	100	1,0	0
500	—	60 ± 3,0	1,7	41,2
50	—	40 ± 2,0	2,5	60,0
15	—	44,4 ± 2,2	2,25	52,0
150	Внутрішньочервно	40 ± 2,0	2,5	60,0
50	Так само	60 ± 3,0	1,7	41,2
25	—	40 ± 2,0	2,5	60,0
15	—	100	1,0	0
150	Внутрішньовенно	100	1,0	0
15	Так само	20 ± 1,0	1,25	20,0
Таміфлю, 1 мг/кг	Внутрішньочервно	20,0 ± 0,5	10,0	80,0
Контроль вірусу		100	1,0	0

Таблиця 3. Пригнічення нейрамінідазної активності препаратом нуклекс

Препарат	Доза, мг/мл	Пригнічення нейрамінідазної активності, %			
		Контакт с препаратом 1 год		Контакт з препаратом 18 год	
		ОГ/549	% інгібіції	ОГ/549	% інгібіції
Нуклекс	30	0,085 ± 0,012	100	0,070 ± 0,008	100
		0,092 ± 0,014	100	0,065 ± 0,0078	100
	10	0,080 ± 0,012	100	0,080 ± 0,009	100
		0,087 ± 0,013	100	0,078 ± 0,009	100
	3	0,420 ± 0,06	50	0,075 ± 0,008	100
		0,417 ± 0,063	50	0,072 ± 0,072	100
1	0,430 ± 0,065	50	0,440 ± 0,05	50	
	0,435 ± 0,065	50	0,410 ± 0,05	50	
Контроль вірусу		0,950 ± 0,14		0,910 ± 0,11	
Контроль фетуїну		0,920 ± 0,138		0,890 ± 0,11	
		0,059 ± 0,009		0,070 ± 0,01	
		0,072 ± 0,011		0,063 ± 0,007	

Таблиця 4. Інтерферогенна активність нуклексу *in vivo*

Термін визначення, доба	Титри інтерферону, од. акт.	
	-рН	+рН
1	160 ± 19,2	160 ± 19,2
2	80 ± 9,6	80 ± 9,6
3	80 ± 9,6	40 ± 4,8
6	80 ± 9,6	80 ± 9,6

Вивчення індукції ІФН препаратом нуклекс в експерименті *in vivo* проводили на мишах, яким препарат вводили внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг. Через 1, 2, 3, 6 діб визначали наявність ІФН у сироватці крові тварин за загальною методикою пригнічення ЦПД вірусу везикулярного стоматиту в перещеплюваних клітинах мишей ОН-1 (лімфобластоїдні клітини мишей).

Динаміка індукції ІФН препаратом нуклекс в організмі мишей полягала в тому, що максимальна активність ІФН реєструвалася в першу добу, а потім активність ІФН знижувалася вдвічі і на такому рівні визначалася через 6 діб (табл. 4). Маркер кислотостійкості ІФН свідчить про те, що індукований нуклексом ІФН є альфа-ІФН.

Аналізуючи одержані результати, необхідно відзначити, що механізм антигрипозної дії препарату нуклекс здійснюється за рахунок впливу на активність нейрамінідази і гемаглютиніну та індукції альфа-ІФН. Антигенні властивості гемаглютиніну та нейрамінідази залежать від специфіки їх внутрішньомолекулярної конфігурації. Ми припускаємо, що рибонуклеїнова кислота препарату нуклекс впливає на конфігурацію цих білків, як це раніше було встановлено, зокрема, для гуанідин-гідрохлориду, який, впливаючи на слабкі водневі полярні зв'язки, змінює конфігурацію вірусних рецепторів — гемаглютиніну та нейрамінідази. Внаслідок таких змін конфігурації своїх рецепторів вірус втрачає інфекційність.

1. Jackson G. G., Muldon R. L., Akers L. W. Serological evidence for prevention of influenza infection in volunteers by anti-influenzal drug amantadine hydrochloride // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. S. 1. – New York: Acad. Press, 1964. – P. 703–707.
2. Davies W. L., Grunert R. R., De Somer P. et al. Antiviral activity of I-adamantanamine (amantadine) // *Science*. – 1964. – **144**. – P. 862–863.
3. Смородинцев А. А. Итоги изучения профилактической эффективности амантадина и ремантадина // *Химиопрофилактика гриппа амантадином*. – Ленинград, 1971. – С. 11–45.
4. Müller W. E. Mechanisms of action and pharmacology chemical agents // *Antiviral agents and viral diseases of man* / Ed. by G. J. Gallasso et al. – New York: Raven Press, 1979. – P. 77–149.
5. Hayden F. G., Osterhaus A. D., Treanor J. J. et al. Efficacy and safety of the neur-aminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections / GG 167 Influenza Study Group // *N. Engl. J. Med.* – 1997. – **337**, No 13. – P. 874–880.
6. Monto A. S., Fleming D. M., Henry D. et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections // *J. Infect. Diseases*. – 1999. – **180**, No 2. – P. 254–261.
7. Iozzo M. Efficacy and Tolerability of the Neuraminidase Inhibitor Zanamivir // *J. Acad. Phys. Assistants*. – 2001. – **2**, No 2. – P. 186–188.
8. Hayden F. G., Treanor J. J., Fritz R. S. et al. Use of Oral Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir in Experimental Human Influenza // *J. Amer. Med. Assoc.* – 1999. – **282**, No 13. – P. 48–50.
9. Davis M. M., Taubert K., Benin A. L. et al. Influenza vaccination as secondary prevention for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association // *Amer. College of Cardiology. Circulation*. – 2006. – **114**. – P. 1549–1553.
10. Warren-Gash C., Smeeth L., Hayward A. C. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review // *Lancet Infect. Dis.* – 2009. – **9**. – P. 601–610.
11. Пархоменко О. М., Кожухов С. М., Ткачук З. Ю. Застосування препарату Нуклекс у пацієнтів з гострим інфарктом міокарду // *Медицина неотложных состояний*. – 2009. – № 1(20). – С. 206–208.

12. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації. – Київ, 2001. – С. 371–396.
13. Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // Biochem. J. – 1961. – 81. – P. 384–392.
14. Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней. – Москва: Медицина, 1965. – С. 136.
15. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. В. П. Фисенко. – Москва: Ремедиум, 2000. – С. 25–33.

Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ
Державна установа “Інститут епідеміології
та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського
АМН України”, Київ

Надійшло до редакції 27.05.2010

**Z. Yu. Tkachuk, S. L. Rybalko, L. D. Zharkova, D. B. Starosyla,
L. I. Semernikova**

Antiinfluenzal activity of drug Nuclex

The RNA-based drug Nuclex is a highly active antiviral compound. It has been experimentally proved that, in case of the influenza infection, its maximum tolerant concentration is 5000 microgram/ml, the minimum active concentration is 31 microgram/ml, while its chemotherapeutic index constitutes 161. In the preventive treatment in vitro, Nuclex proved to be effective in dosages from 10 to 1.25 milligram/ml, while, in therapeutic treatments, the effective dosage was between 10 and 0.6 milligram/ml. The drug has shown a high antiinfluenzal activity during a prophylactic treatment in mice, both for intraperitoneal and intravenous introductions between 15 and 150 milligram/kg. At the same time, the effectiveness of Nuclex was ten times higher in case of the intranasal introduction. It has been determined that the antiinfluenzal action of Nuclex lay in inhibiting the activities of neuraminidase and hemagglutinin during the interaction with the influenza virion. Also, it is a prolonged inductor of alpha-Interferon in tests in vivo.