

ГЛІЦИРИЗИН, АКТИВНИЙ КОМПОНЕНТ КОРЕНІВ СОЛОДКИ, І РЕПЛІКАЦІЯ SARS-АСОЦІЙОВАНОГО КОРОНАВІРУСУ

J Cinatl, B Morgenstern, G Bauer, P Chandra, H Rabenau, H W Doerr

Спалах SARS (тяжкого гострого респіраторного синдрому) вимагає пошуку противірусних препаратів для лікування цього захворювання. В даний час не виявлено будь-якого спеціального лікування коронавірусної інфекції, пов'язаної із SARS. Ми оцінили противірусний потенціал рибавірину, 6 азаурідину, піразофуріну, мікофенолової кислоти і гліциризину щодо двох клінічних ізолятів коронавірусу (FFM-1 і FFM 2), отриманих від пацієнтів із SARS (тяжкий гострий респіраторний синдром), що надійшли в клінічний центр Франкфуртського університету, Німеччина. Із усіх сполук, гліциризин був найбільш активним у пригніченні реплікації SARS-асоційованого вірусу. Дані результати показують, що гліциризин повинен бути проаналізований для лікування ТГРС (SARS, тяжкий гострий респіраторний синдром).

Lancet 2003; 361: 2045–46

Новий коронавірус був ідентифікований у пацієнтів з тяжким гострим респіраторним синдромом (ТГРС).¹ ТГРС є інфекційним захворюванням з високою контагіозністю. Спалах ТГРС в декількох країнах призвела до пошуку активних противірусних сполук для лікування цього захворювання.

Тут ми оцінили противірусну активність рибавірину, 6-азаурідину, піразофуріну, мікофенолової кислоти і гліциризину щодо двох клінічних ізолятів коронавірусу (FFM-1 і FFM-2) від пацієнтів з ТГРС, що надійшли в клінічний центр Франкфуртського університету, Німеччина. Всі препарати доступні у продажу і застосовуються у пацієнтів, оскільки мають противірусну, протипухлинну та імунодепресивну активність. Ми візуально оцінили цитопатогенність, індуковану вірусом через 72-96 год після інфікування в 96-ямкових мікропланшетах на безперервних шарах клітин Vero. Індекс селективності визначався як відношення концентрації сполуки, яке знижувало життєздатність клітин до 50% (CC₅₀), до концентрації сполуки, необхідної для пригнічення цитопатичного ефекту, до 50% від контрольного значення (EC₅₀). Цитотоксичність лікарських засобів визначалась шляхом ММТ тесту проліферативної активності клітин I (Roche, Мангейм, Німеччина).

Активність сполук щодо SARS-асоційованого коронавірусу у клітинних культурах Vero

	EC ₅₀ * (мг/л)	CC ₅₀ * (мг/л)	Індекс селективності
Сполука			
6-азаурідін	16·8 (2·9)	104 (18)	6
піразофурін	4·2 (0·57)	52 (9·6)	12
Мікофенолова кислота	>50	>50	NC
Рибавірін	>1000	>1000	NC
Гліциризин	600 (72)	>20 000†	>33
Після вірусної адсорбції			
Під час і після вірусної адсорбції	300 (51)	>20 000	>67
Під час вірусної адсорбції	2400 (410)	>20 000	>8·3

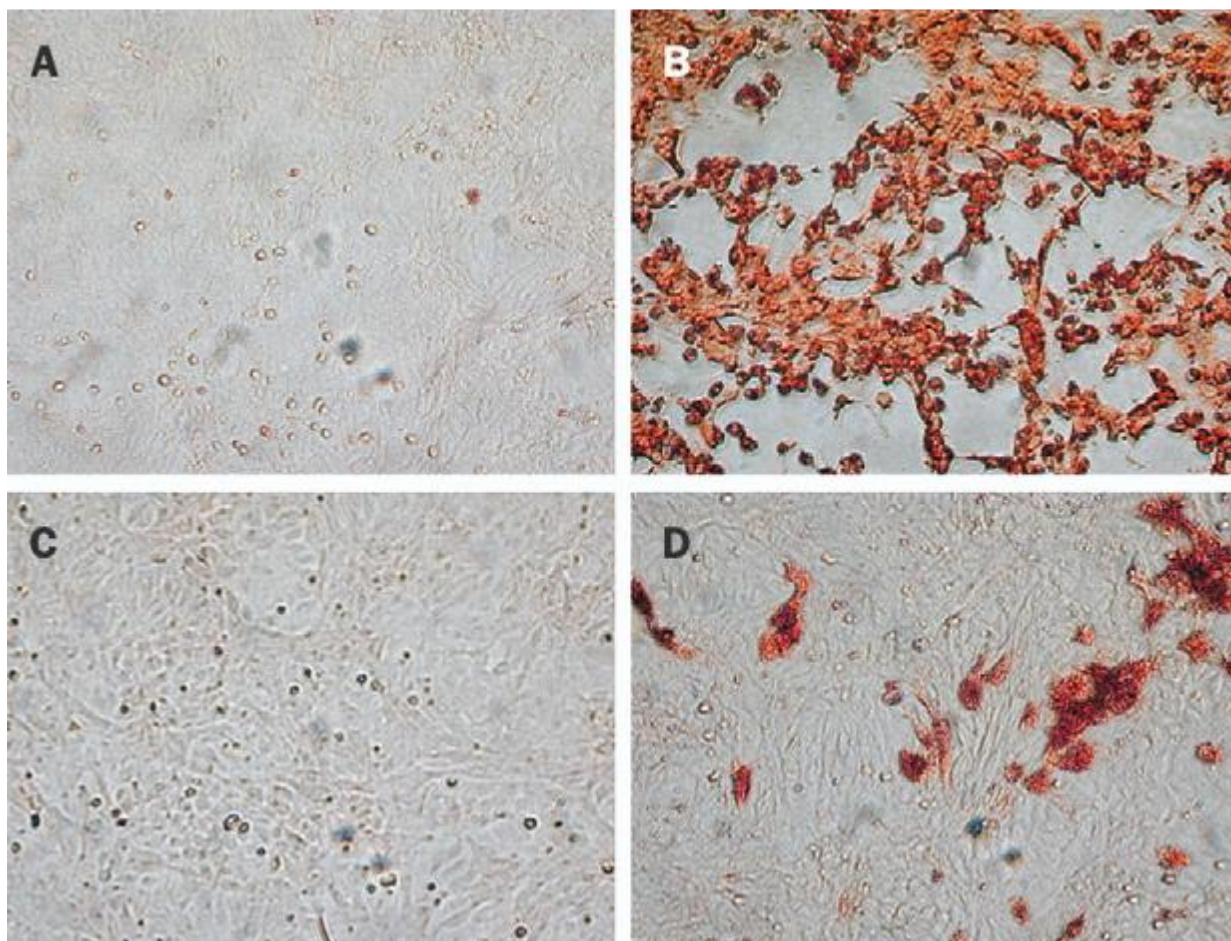
EC₅₀ = ефективна концентрація сполуки, необхідна для придушення цитопатичного ефекту, до 50% від контрольного значення. CC₅₀ = цитотоксична концентрація сполуки, яка знижує життєздатність клітин до 50%. NC = не розраховується.

* Середнє відхилення (SD) з восьми проб. † При максимальній використаній концентрації (20 000 мг/л) було відзначено зниження життєздатності клітин на 20–30%.

Рибавірін і мікофенолова кислота, інгібітори інозинмонофосфатдегідрогенази не впливали на реплікацію SARS-асоційованих коронавірусів (SARS-CV) (таблиця). Інгібітори оротидинмонофосфатдекарбоксилази, 6-азаурідін і піразофурін інгібували реплікацію

SARS-CV в нетоксичних дозах з індексами селективності 5 і 12 відповідно. Найсильнішим інгібітором реплікації SARS-CV в клітинах Vero був гліциризин з індексом селективності 67.

Крім інгібування реплікації вірусу, гліциризин пригнічує адсорбцію і проникнення вірусу – перші етапи реплікативного циклу. Гліциризин був менш ефективний при додаванні впродовж періоду адсорбції, ніж при додаванні після адсорбції вірусу (EC_{50} 600 мг/л у порівнянні з 2400 мг/л відповідно). Гліциризин був найбільш ефективним, коли його вводили як під час, так і після періоду адсорбції (EC_{50} 300 мг/л). На малюнку показано вплив гліциризину на реплікацію SARS-CV у клітинах Vero. Ми виявили реплікацію SARS-CV із зразками сироватки від пацієнтів з SARS. Експресія вірусних антигенів була набагато нижче в культурах, оброблених 1000 мг/л гліциризину, ніж в будь-якій іншій культурі; високі концентрації гліциризину (4000 мг/л) повністю блокували реплікацію вірусу (малюнок).



Вплив гліциризину на реплікацію SARS-асоційованого коронавірусу в клітинах Vero

Клітини були зафіксовані сумішшю метанолу і ацетону у співвідношенні 60:40 через 72 години після інфікування. Вірус був виявлений в сироватці крові пацієнта з ТГРС шляхом фарбування пероксидазою. (А) макет інфікованих клітин. (Б) інфіковані клітини без обробки. (С) інфіковані клітини, оброблені 4000 мг/л гліциризину. (D) інфіковані клітини, оброблені 1000 мг/л гліциризину.

При порівнянні противірусного потенціалу 6-азаурідину, рибавірину та гліциризину щодо кількох патогенних флавівірусів, Crance і колеги² продемонстрували, що рибавірин і 6-азаурідин були активними, але не селективними інгібіторами, коли їх оцінювали щодо інгібування росту клітин. Гліциризин мав низький індекс селективності, але був в значній мірі потужним інгібітором реплікації всіх протестованих вірусів. EC_{50} (концентрація, що викликає 50% придушення вірусної реплікації клінічних та лабораторних штамів), про який повідомляють ці автори для гліциризину, становив 316-625 мг/л (додавали двічі впродовж періоду інкубації, що становить 7 днів).

Беручи до уваги, що сполуки були додані двічі впродовж всього періоду інкубації, EC_{50} для гліциризину, який ми записали (таблиця), вказує на більш високу чутливість SARS-CV до цього лікарського засобу, ніж у Crance і колег.

Механізм активності гліциризину щодо SARS-CV неясний. Гліциризин впливає на клітинні сигнальні шляхи, такі як протеїнкіназа C; казеїнкіназа II; і фактори транскрипції, такі як білок-активатор 1 і ядерний фактор κB. Крім того, гліциризин і його метаболіт аглікона 18β гліциретинова кислота підсилює експресію індукцибельної синтази закису азоту і продукцію закису азоту в макрофагах³. Закис азоту пригнічує реплікацію декількох вірусів, наприклад вірус японського енцефаліту⁴ (представник сімейства Flaviviridae), який також може інгібуватися гліциризином.² Наші попередні результати показують, що гліциризин індуктує синтазу оксиду азоту в клітинах Vero, і що реплікація вірусу інгібується при додаванні донора закису азоту (DETA NONOate) до живильного середовища.

Гліциризин раніше застосовувався для лікування пацієнтів з ВІЛ-1 і з хронічним вірусним гепатитом С. Отримані в результаті низькі концентрації антигену Р24, у пацієнтів з ВІЛ-1, яким давали цю сполуку, були пов'язані з активацією хемокінів. Рідкі побічні ефекти, такі як підвищення артеріального тиску і гіпокаліємія, були зареєстровані у деяких пацієнтів після декількох місяців лікування гліциризином. Лікування ТГРС проводиться тільки протягом короткого часу. Оскільки побічні ефекти цієї сполуки відомі і можуть контролюватися, належний моніторинг може привести до ефективного використання гліциризину як засіб від ТГРС. Booth і колеги⁵ повідомили, що рибавірин мав багато токсичних ефектів при застосуванні у пацієнтів з ТГРС, включаючи гемоліз (76% пацієнтів) і різке зниження гемоглобіну (49% пацієнтів). Однак, хоча в клінічних дослідженнях застосовувалися високі дози гліциризину, ця сполука надавала мало токсичних ефектів у порівнянні з іншими схемами лікування, і, як повідомлялося, препарат був клінічно ефективним.

Майбутній пошук сполук, що представляють терапевтичний інтерес щодо ТГРС (SARS), буде значно полегшений за допомогою вирощування SARS-CV в клітинах людини.

Список літератури:

- 1 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1967–76.
- 2 Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine, and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* 2003; 58: 73–79.
- 3 Jeong HG, Kim JY. Induction of inducible nitric oxide synthase expression by 18-glycyrrhetic acid in macrophages. *FEBS Lett* 2002; 513: 208–12.
- 4 Lin YL, Huang YL, Ma SH, et al. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J Virol* 1997; 71: 5227–35.
- 5 Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 2003; 289: 1–9.

Institute of Medical Virology, Frankfurt University Medical School, Paul-Ehrlich Str 40, D-60596 Frankfurt, Germany (Prof J Cinatl PhD, B Morgenstern, G Bauer, Prof P Chandra PhD, Prof H Rabenau PhD, Prof H W Doerr MD)

Інститут медичної вірусології, Медична школа Франкфуртського університету, вул. Пауля Ельріха 40, D-60596 Франкфурт, Німеччина