

УДК 577.152.3

## ВЛИЯНИЕ НАТИВНОГО И МИКРОКАПСУЛИРОВАННОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ – АПРОТИНИНА НА РЕПРОДУКЦИЮ РЕСПИРАТОРНО-КИШЕЧНЫХ ВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Н. В. Ларионова<sup>1\*</sup>, Д. Дюшен<sup>2</sup>, Р. В. Белоусова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> (кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; тел: 939-34-17; e-mail: nilar@enzyme.chem.msu.ru; <sup>2</sup> Лаборатория физико-химии, фармакотехники, биофармации, UMR CNRS 8612, факультет фармации, Университет Париж-Юг, 902296 Шатнэ Малабри, Франция; <sup>3</sup> Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 109472 Москва)

**Ингибитор протеиназ – апротинин включен в микрокапсулы, полученные путем межфазного сшивания растворимого крахмала и бычьего сывороточного альбумина терефталойлхлоридом. Изучена кинетика освобождения активного апротинина при биодеградации микрокапсул *in vitro*. Исследовано влияние нативного и микрокапсулированного апротинина на репродукцию вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ), аденовируса и вируса диареи крупного рогатого скота. Установлено, что нативный апротинин в дозе 3000 TIU/мл ингибирует репродукцию вируса ИРТ и аденовируса и не влияет на размножение вируса диареи. Показана пригодность биоадгезивной биодеградируемой микрокапсулированной формы апротинина для эффективного подавления репродукции вируса ИРТ.**

Протеолиз вирусных белков является одним из фундаментальных явлений в репликации вирусов. Протеолитический процессинг вирусных полипептидов регулируется как последовательностью аминокислот белков-мишеней, доступных действию протеиназ, так и протеиназами соответствующей специфичности, которые могут иметь как клеточное, так и вирусное происхождение [1]. Ограниченный протеолиз определяет структурное и функциональное состояние вирус-специфических белков, что обеспечивает контроль сборки вирионов, формирование инфекционного вирусного потомства и развитие инфекционного процесса [2].

Ранее была показана возможность ингибирования репликации респираторных вирусов человека в культуре клеток [3] и в куриных эмбрионах [4, 5] с помощью природного ингибитора протеолитических ферментов – апротинина. Вирусные и бактериальные респираторно-кишечные инфекции крупного рогатого скота (к.р.с.), являются основными причинами заболеваемости и гибели молодняка сельскохозяйственных животных.

Цель настоящей работы – изучение влияния апротинина и его новой лекарственной формы в виде крахмальных микрокапсул на репродукцию вируса ИРТ, аденовируса и вируса диареи к.р.с.

### Методы исследования

В работе использовали растворимый крахмал *Glucidex 2* («Roquette Freres», Франция). Бычий сывороточный альбумин («Sigma», США). Терефталойлхлорид

(«Aldrich-Chimie», Франция). Апротинин «Contrycal» («AWD», Германия).

*Получение микрокапсулированного апротинина.* Микрокапсулы получали путем межфазного сшивания терефталойлхлоридом растворимого крахмала и бычьего сывороточного альбумина методом, детально описанным нами ранее [6]. При капсулировании апротинин в концентрации (20 000 TIU/мл) был включен в состав водной фазы. Лиофилизированные микрокапсулы стерилизовали  $\gamma$ -облучением в дозе 15 кГр.

*Характеристика микрокапсул.* Морфологию микрокапсул изучали с помощью оптической и сканирующей электронной микроскопии.

*Изучение освобождения апротинина из микрокапсул *in vitro*.* Антитрипсиновую активность в растворах, полученных в результате деградации микрокапсул под действием  $\alpha$ -амилазы (0,2 мг/мл), определяли по уменьшению амидазной активности бычьего трипсина [7].

*Культивирование клеток.* Для культивирования как первичных культур клеток, так и перевиваемых линий клеток использовали питательную среду 199 и среду Игла (1:1 об/об) с добавлением 10%-й телячьей сыворотки. В качестве поддерживающей среды использовали ту же среду, не содержащую сыворотки. Перевиваемые линии клеток поддерживали периодическими пересеваниями.

*Исследование инфекционности вирусов.* Готовили разведения вирусов от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  в среде с апротинином и без него, оставляли при комнатной температуре на 1 ч, а затем по 1 мл каждого разведения вируса вносили в про-

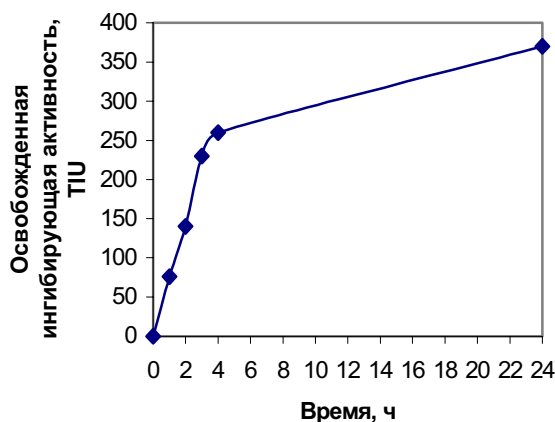
\*Адресат для переписки.

бирки с соответствующей культурой клеток. Инфицированную культуру клеток культивировали при 37° в течение 10–12 дней. Инфекционный титр вирусов определяли методом титрования по цитопатическому действию на монослой соответствующей культуры клеток.

### Результаты и их обсуждение

**Микрокапсулирование апротинина.** В исследованиях, проведенных нами ранее [6, 7], была разработана рациональная стратегия инкапсулирования ингибитора протеиназ – апротинина. В настоящей работе в оптимальных условиях были получены прочные микрокапсулы с высоким выходом. По данным сканирующей электронной микроскопии, микрокапсулы имеют гладкую сплошную поверхность, их размер составляет 50–100 мкм. Белок освобождается из микрокапсул только в результате ферментативного расщепления их стенки. Причем фармакокинетикой его освобождения можно управлять, изменяя условия получения микрокапсул. На рисунке показано, что при действии  $\alpha$ -амилазы на стерилизованные микрокапсулы антитриптическая активность апротинина освобождается в среду в течение суток. Таким образом, предложенный метод приготовления микрокапсулированного апротинина обеспечивает получение стабильных (в определенных условиях хранения) препаратов, способных к контролируемому освобождению активного ингибитора протеиназ.

**Выбор культуры клеток для культивирования вируса ИРТ, аденовируса и вируса диареи к.р.с.** С целью поиска наиболее чувствительной культуры клеток для вирусов использовали первично-трипсинизированную культуру клеток почки эмбриона коровы и тестикул бычков (ТБ), а также перевиваемые линии клеток почки теленка, почки эмбриона коровы, легкого эмбриона коровы (ЛЭК) и эпителия коронарных сосудов теленка (КСТ). Все изучаемые вирусы репродуцировались как в первичных культурах клеток, так и в перевиваемых линиях клеток, за исключением клеток КСТ для аденовируса и вируса ИРТ. Однако линия клеток КСТ обладала наибольшей чувствительностью для вируса диареи. В этом случае цитопатическое действие наступало через 36–48 ч, т.е. на 24 ч раньше,



Освобождение антитриптической активности апротинина в процессе деградации микрокапсул (10 мг)  $\alpha$ -амилазой (0,2 мг/мл) при pH 7,4 и 37°

### Антивирусное действие нативного и микрокапсулированного апротинина

Апротинин	Инфекционный титр вируса (lg ТЦД <sub>50</sub> /мл)			Пик* цитопатического действия, ч
	вирус ИРТ	аденовирус	вирус диареи	
–	7	6	7	48–60
Нативный				
3000 ТИУ/мл	5	3,5	7	72–96
5000 ТИУ/мл			7	
Микрокапсулированный				
3000 ТИУ/мл	5	–	–	72–96

\* Для вируса ИРТ и аденовируса.

чем в случае первичной культуры ТБ (через 60–72 ч). Титр вируса стабильно находился в пределах 6,5–7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (ТЦД – тканевая цитопатическая доза), что на 1–1,5 lg выше, чем в культуре клеток ТБ.

Вирус ИРТ и аденовирус наиболее активно репродуцировались в перевиваемой линии клеток ЛЭК. Инфекционный титр вируса ИРТ составлял от 6,0 до 7,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, аденовируса – от 5,5 до 6,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, пик цитопатического действия наблюдали через 48–60 ч.

В дальнейших опытах использовали перевиваемую культуру клеток ЛЭК для аденовируса, ИРТ и культуру клеток КСТ для вируса диареи. Обе эти линии клеток быстро формировали монослой (через 48–72 ч) при пересеве их 1:6.

**Изучение влияния нативного и микрокапсулированного апротинина на репродукцию респираторно-кишечных вирусов к.р.с.** На первом этапе исследования проверяли воздействие апротинина на культуру клеток ЛЭК и КСТ. Для этого после формирования монослоя культуры клеток в поддерживающую среду добавляли апротинин в разных дозах (300, 1000, 3000 и 5000 ТИУ/мл среды) и наблюдали в течение 12 дней. Указанные дозы препарата не оказывали токсического действия на культуру клеток. Более того, в присутствии апротинина морфология клеток сохранялась в нормальном состоянии, в то время как в контрольных образцах (без апротинина) к 10–12-му дню наблюдения отмечали неспецифическую дегенерацию (зернистость цитоплазмы, округление клеток и сползание клеток со стекла). Результаты экспериментов по влиянию апротинина на зараженные вирусами культуры клеток представлены в таблице. Видно, что присутствие апротинина в поддерживающей среде приводило к уменьшению инфекционного титра вируса ИРТ и аденовируса на 2 и 2,5 логарифмических единицы соответственно. Кроме того, цитопатическое действие указанных вирусов проявлялось на 24–48 ч позже, чем в контрольных образцах. Микрокапсулы, способные к постепенному освобождению апротинина, демонстрировали подавление репродукции вируса ИРТ, аналогичное нативному ингибитору протеиназ. Однако апротинин не оказывал подавляющего действия на вирус диареи при концентрациях вплоть до 5000 ТИУ/мл.

Таким образом, результаты настоящего сообщения показывают возможность подавления репродукции вируса

ИРТ и аденовируса аprotинином. Поскольку механизм протеолитической активации вирионов протеиназами, организма-хозяина присущ широкому кругу респираторных вирусов (грипп А, В, С, парамиксовирус, включая респираторно-синцитиальный, паротита кори, парагриппозные вирусы, коронавирусы и др.), можно ожидать, что препараты на основе аprotинина будут обладать широким спектром противовирусного действия [1]. Перечис-

ленные достоинства могут способствовать скорейшему созданию на основе аprotинина высокоэффективного средства против респираторных вирусов. Готовая лекарственная форма аprotинина в виде биоадгезивных крахмальных микросфер представляется перспективной, поскольку в условиях *in vivo* может дать дополнительное преимущество, связанное с усилением перехода аprotинина на респираторный эпителий и пролонгирование действия.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журнов О.П. // Мол. биол. 1988. **22**. С. 581.
2. Krausslich H.-G., Wimmer E. // Ann. Rev. Biochem. 1988. **57**. P. 701.
3. Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Bukrinskaya A.G. // J. Gen. Virol. 1982. **63**. P. 469.
4. Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Bukrinskaya A.G. // J. Gen. Virol. 1982. **66**. P. 1633.
5. Zhirnov O.P., Golyando P.B., Ovcharenko A.V. // Arch. Virol. 1994. **135**. P. 209.
6. Larionova N.V., Ponchel G., Duchene D., Larionova N.I. // Inter. J. Pharm. 1999. **189**. P. 171.
7. Ларионова Н.В., Казанская, Н.Ф., Ларионова, Н.И., Пошиель, Ж., Дюшен, Д. // Биохимия. 1999. **64**. С. 14.

Поступила в редакцию 20.06.00