

Терапия на ентеровирусните инфекции

Ангел С. Гълъбов, Аделина Стоянова,
Симеон А. Гълъбов

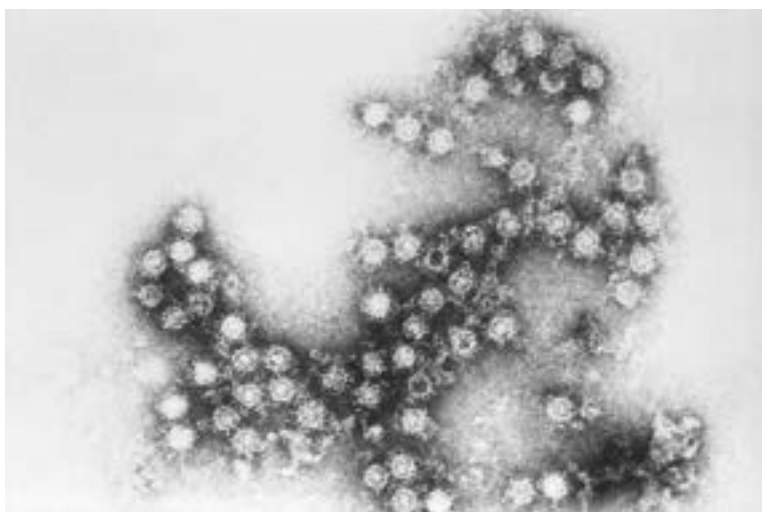
Ентеровирусите са причинители на широк спектър заболявания, заемащи голямо място в инфекциозната патология на човека. Част от ентеровирусните инфекции са по-леко протичащи – ентерит и т. нар. летен грип, но повечето имат сериозен до смъртоносен ход, особено при децата – менингоенцефалит, полиомиелит, миокардит, в част от случаите водещ до дилатативна кардиомиопатия, юношески инсулинозависим диабет, хронична умора, клиника, наподобяваща шапа – т. нар. заболяване ръка-крак-уста (HFMD). Характерно е атакуването на централната нервна система, най-често с проява на менингит.

Заболяванията протичат като епигемичен взрив, но в много случаи се разгръщат като по-продължителни епидемии. Особеност на ентеровирусните инфекции е високият процент (до 75 – 80%) на безсимптомно протичане, което силно затруднява диагностиката и епидемиологичния анализ. Друг главен проблем е големият брой ентеровируси – над 150. При това един ентеровирус в една и съща местност може да причини различни клинични картини.

Характерно свойство на ентеровирусите е необичайно високата им изменчивост – всеки размножителен цикъл води до мутация, както е доказано от знаменития руски учен Вадим Азол. Това

се дължи на водещия в размножението им ензим – вирусна РНК-зависима РНК-полимераза. Този ензим е непознат за клетката, поради което вирусното размножение често греши. Така се формира вирусна популация, състояща се от милиарди вирусни частици с разнообразна структура и свойства (т. нар. *псевдовиг* или *квазивиг*). Тук е мястото да кажем, че това определя и невъзможността да се създаде химиотерапия на ентеровирусните инфекции, тъй като веднага се формира лекарствено резистентна вирусна популация.

Друго свойство на ентеровирусите е необичайно високата им устойчивост в околната среда, включително в канални



Електронно-микроскопска снимка на ентеровирусна популация Коксаки вирус. Снимка Public Health Image Library Image #5630

води, близка до устойчивостта на микробните спори. Оттук и лесното им предаване чрез контаминирана (заразена) храна, пренасяни от мухи и мръсни ръце. За предпазване от тях особено важна е хигиената на заведенията за обществено хранене, както и на местата за приготвяне на домашна храна. Лятният сезон с посещенията на по-голям брой места за почивка и обществено хранене благоприятства развитието и разпространението на ентеровирусните инфекции.

В борбата с тях има и сериозни успехи. Ваксинопрофилактика е осъществена срещу детския паралич (полиомиелит), върлуващ епидемично включително през 50-те години на XX век. Налице са две ваксини, разработени в края на 50-те години срещу трите вируса, причинители на заболяването: инактивираната ваксина на американския учен Джонас Салк (Jonas Salk) и живата ваксина на американско-еврейския учен Албърт Сейбин (Albert Bruce Sabin), съдържаща

трите полиомиелитни вируса със силно намалена патогенност чрез серия пасажи в клетки от маймунски бъбрек. Прилагането им доведе до прелом – почти пълно ликвидиране на заболяването в световен мащаб. Оказва се обаче, че за окончателното ликвидиране на огнищата от полиомиелит са необходими още усилия. Това е защото третият полиомиелитен вирус във ваксината на Сейбин е податлив към възвръщане на патогенността си. Освен това полиомиелитните вируси се оказват склонни, макар и в редки случаи, да се рекомбинират с ваксиналните щамове, причинявайки ваксина-асоцииран паралитичен полиомиелит, или с ентеровируси Коксаки В.

Създадена бе и ваксина срещу вирус Коксаки А16 и ентеровирус 71, причинители на шапоподобното заболяване (HFMD), съпроводено с тежки поражения в централната нервна система, заливащо Югоизточна Азия с епидемии, главно в детска възраст,



Академик г-р Ангел Гълъбов, г.м.н. е специалист по вирусология. Основател на Балканското дружество по микробиология. Председател на Българското микробиологично дружество. Активен член на International Society for Antiviral Research. Автор на 338 публикации и 39 патента и изобретения. Преподавател във висши училища, ръководител на 22 докторанта.

Приготвяне на ваксини срещу всеки от десетките особено патогенни за човека ентеровируси е невъзможен за решаване проблем. Смята се, че създаването на ефективни химиотерапевтици би решило лечението на ентеровирусните инфекции. Прилагането им в детски колективи (детски градини, ясли, начални училища) би имало ефекта на екстрена профилактика. След постигнатите успехи в химиотерапията на херпеса, СПИН, епидемичния грип и напоследък на хепатит С, изследванията в търсене на антивиращи срещу ентеровирусите заемат важно място във вирусологията.

Няколкостотин съединения показваха избиращи инхибиращ ефект върху вирусната репликация. Сред тях се откриха вещества лиганди (*вещество, което формира комплекс с биомолекула и я кара да изпълнява определена функция*) на вирусния протеин 1 (VP1) на гредичките, изграждащи вирусния капсид – 70-те капсомера (*защитната протеинова обвивка на РНК във вируса*). Тъй като те бяха разработени и тествани главно във фирмата Wintrop (САЩ) бяха назовани WIN-съединения. Най-висока активност между тях показваха дизоксарил и плеонарил, чиито механизъм на действие е включване в хидрофобния джоб на VP1 с изместване на молекулата на палмитиновата киселина.

Нашият екип от Института по микробиология на БАН доказва висока активност на веществото оксоглауцин, апорфоиден алкалоид, изолиран от наземните части на жълтия мак в Центъра по фитохимия на Института по органична химия на БАН. Неговият начин на действие бе установен от японския вирусолог Минетаро Арита (Minetaro Arita) – свързване с клетъчния протеин 4-киназа III бета, участващ в размножителния цикъл на ентеровирусите.



Симеон Гълъбов е завършил средното си образование в 29 СУ „Кузман Шанкарев“, София. Висшето си образование завършва в Медицинския факултет на Медицински университет – София. Работи в екип с акад. Ангел Гълъбов и асист. Аделина Стоянова в Института по микробиология „Стефан Ангелов“ към БАН



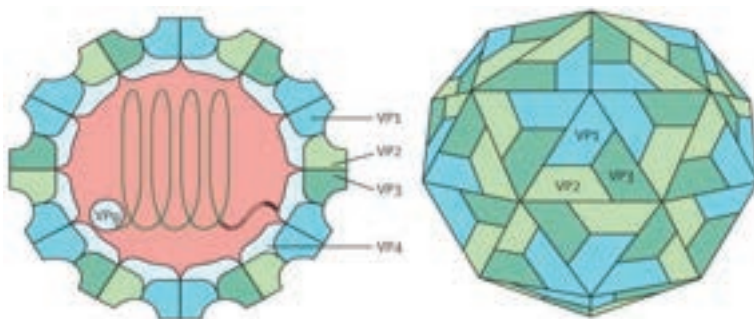
Агелина Стоянова е изследовател в Департамента по вирусология на Института по микробиология при Българската академия на науките. Работата ѝ е фокусирана върху разработването и изпитването на различни антивирусни комбинации. Член на Съюза на учените в България, Асоциацията на европейските вирусолози и Международното дружество за антивирусни изследвания.

Едва по-малко от 20 от тези стотици инхибитори се оказаха активни инвио (в експериментални ентеровирусни инфекции в лабораторни животни), като

нито едно от тях не показва ефект в системата на двоен слеп опит у хора, прилагана при разработването на всяко лекарство. Увреждане на чернодробен ензим бе установено при изследване на най-силното WIN съединение плеконарил.

Доказвайки неефективността на монотерапията, ние се насочихме към изследване ефекта на комбинации от ентеровирусни инхибитори. За целта бе използван три-пространствения метод на Причард и Шипман (Three-dimensional method of M.N.Prichard and C.Shipman), позволяващ определяне характера на комбинирания ефект – синергизъм, адитивен ефект (сумация) или антагонизъм. Изследвайки инвитро в клетъчни култури комбинации от двойки инхибитори, подбрахме за следващи проучвания тези с подчертан синергизъм.

На тази основа преминахме към изследвания инвио, в експериментални ентеровирусни инфекции в лабораторни животни. Избрахме Коксаки вируси В, най-подходящи като причинители у хората на широк спектър заболявания – невроинфекции, поражения на сърцето и панкреаса (инсулинозависим диабет), Борнхолмска болест (поражения на меж-



Структура на ентеровирусите. Състои се от белтъчен капсид, обграждащ едноверижния РНК-геном

дурекрената мускулатура) и др. Като удобен модел *ин vivo* бяха използвани новородени бели мишки.

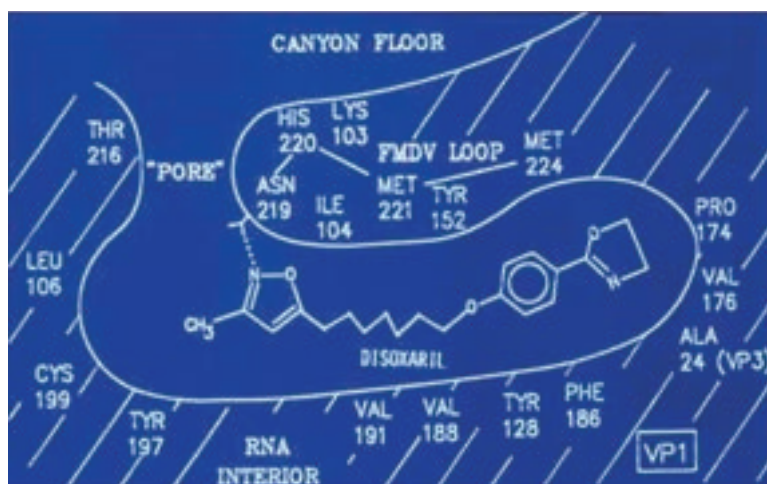
Първоначално бяха проведени изследвания на монотерапия с WIN-съединения – установено бе сравнително бързо развитие на лекарствена резистентност. Изолираните лекарствено резистентни щамове показаха повишена патогенност за мишките, крайно негативен резултат, демонстриращ защо монотерапията с наличните инхибитори може да се разглежда като вредна за прилагане при ентеровирусните инфекции. Последвалите изпитания на подобрените *ин vitro* двойни синергични комбинации, прилагани едновременно, се оказаха неефективни. Установено бе в някои случаи развитие на двойна резистентност.

Така достигнахме до идеята за прилагане на ентеровирусните инхибитори последователно – алтернативно с еднодневен интервал. Изпитани бяха двойни, тройни и четворни комбинации. Като най-подходяща според получените резултати се оказа тройната комбина-

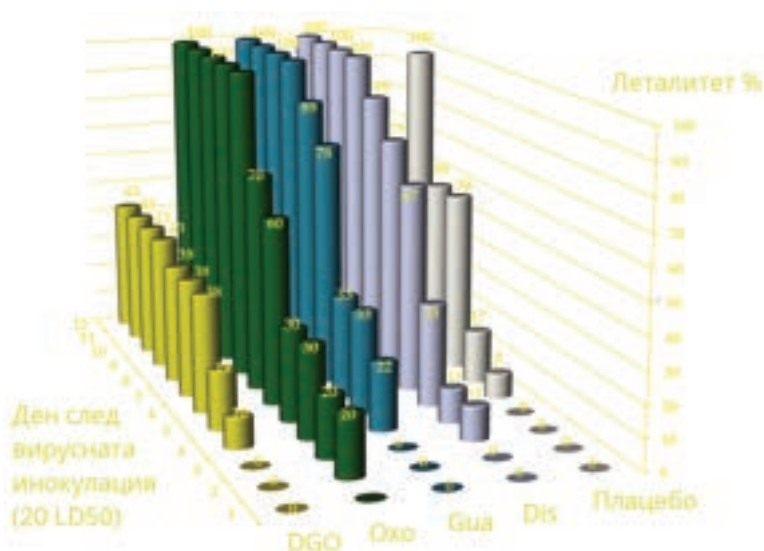
ция. Първоначално този лечебен подход (CAA) включваше дизоксарил (WIN-съединение, атакуващо повърхностния протеин VP1), гванидин хидрохлорид (инхибитор на протеин 2C, регулиращ репликацията на вирусния геном) и изолирани у нас оксоглауцин (свързващ се с клетъчния протеин 4-киназа III бета, съставка на репликативния комплекс на вируса). Оказа се, че освен подборът на съединения с различен механизъм на действие, съществено е и тяхното подреждане. Установено бе, че лечебният курс CAA следва да започне със съединението, атакуващо VP1.

При следващите изследвания дизоксарилът бе заменен с плеконарил, а гванидинът – с 5-нитробензонитрила MDL-860. MDL-860 е разработен от австрийски учен, а Минетаро Арита определи начин на действие (също инхибитор на клетъчния протеин 4-киназа III бета).

Проведените експерименти показаха висока ефективност на лечебния курс с тройни комбинации от ентеровирусни инхибитори, следващ CAA, ефективност, изразяваща се със силен протек-



Дизоксарил в каньона на VP1 (G. D. Diana)



Ефект на тройната комбинация (DGO) – дизоксарил (DIS) + гванидин (GUA) + оксоглауцин (OXO) по лечебната схема САА (последователно алтернативно прилагане) при инфекция с Коксаки вирус В1 (щам Woodruff) в новородени бели мишки въз основа на леталитета

тивен ефект – намалена смъртност и удължаване на средното време на преживяване. Наред с това бе установен един необичаен феномен – вирусната популация показва повишена чувствителност към съединенията партньори в комбинацията. Тези резултати откриха пътя към създаване на химиотерапия на ентеровирусните инфекции.

В какво се състои ефективността на лечебната схема САА за приложение на тройна комбинация от инхибитори на ентеровирусната репликация. Размножителният цикъл на ентеровирусите е 8 часа, т. е. за денонощие те преминават три цикъла, което е недостатъчно за развитие на лекарствена резистентност спрямо инхибитор номер 1. Следва ефектът на инхибитор номер 2 с друг механизъм на действие. Остатъчният

ефект от действието на инхибитор номер 1 е „пометен“ от ефекта на инхибитор номер 2, и така нататък. Лечебната схема САА е уникална и фактически подходяща като средство за неопускаемо развитието на лекарствена резистентност спрямо инхибиторите на ентеровирусите.

Американската фирма Gilead (Сан Франциско) предложи създаденият от нас метод за лечение да предвиди комбинация от ентеровирусни инхибитори, включени вече в изпитания у хора по двоякия слеп метод. Това би позволило бъдещото включване чрез САА в изпитания по двоен слеп метод да бъде улеснено с получените вече данни от първия етап на изпитанието – определяне на толерантността на съединението – кандидат за лекарство. ■