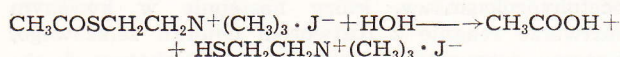


Reakcja ta była po raz pierwszy opisana przez *Schönemanna* (65) do wykrywania fosforoorganicznych gazów bojowych. *Hanker* i współpr. (22) zastosowali ją do oznaczania aktywności cholinesterazy. Przy pomocy tej reakcji, podobnie jak w metodzie *Hestrina* oznacza się ilość niehydrolizowaną acetylocholinę. Według autorów, czułość metody jest podobna do metody *Hestrina* i ilość 0,1—0,4  $\mu\text{M}$  acetylocholinę w 1 ml roztworu tworzy zabarwienie dające się kolorymetrować. Acetylo-beta-metylocholina i sukcylocholina w reakcji tej też tworzą barwne produkty oksydacji i mogą być używane do oznaczania aktywności esterazy cholinowej (22).

#### C. Metody oparte na hydrolizie estrów tiocholiny

Istota reakcji polega na hydrolizie acetylotiocholin lub butyrylotiocholinę według równania:



Ilościowo enzym oznaczać można przez: a) oznaczenie niehydrolizowanej ilości estru tiocholiny przy długości fali 229  $\mu\text{m}$  (17), b) oznaczenie powstałej po hydrolizie ilości tiocholiny.

Tiocholiny oznaczać można następująco:

- metodą jodometryczną (49),
- metodą opartą na odbarwianiu przez tiocholinę niebieskiego roztworu 2,6-dwuchlorofenolindofenolu (17, 49),
- metodą opartą na reakcji tiocholiny w dwutio-

bisnitrobenzoenamem, która tworzy żółty kolor związku wewnątrzkompleksowego (13),

d) metodą opartą na utlenieniu tiocholiny przez nitroprusydek sodowy, który z kolei redukując się daje żółto-pomarańczowe zabarwienie (30, 47).

Przy pobieraniu krwi do oznaczania aktywności esterazy cholinowej należy mieć na uwadze to, by nie zanieczyszczać próbek śladami kwasów lub zasad, lub też inhibitorami enzymu będącymi ewentualnie na skórze zwierzęcia. Wpływa to ujemnie na wynik oznaczenia. Jeżeli enzym oznacza się tylko w samej plazmie, lub w samych erytrocytach, należy jak najszybciej oddzielić od siebie te składniki. Erytrocyty przechowywane powinny być w roztworze izotonicznym. Tak erytrocyty, jak i plazmę należy przechowywać w temp. 0°—5° w lodówce. W tej temperaturze enzym jest stabilny przez kilka tygodni, a w stanie zamrożonym przez kilka miesięcy. W temperaturze pokojowej aktywność enzymu szybko obniża się.

W związku ze stosowaniem obecnie w rolnictwie na coraz szerszą skalę pestycydów fosforoorganicznych, a także ze względu na wprowadzenie do lecznictwa ludzi i zwierząt szeregu związków o właściwościach antycholinoesteraz oznaczenie aktywności esterazy cholinowej jest przedmiotem zainteresowania wielu laboratoriów. W świetle przedstawionych tu danych widać, że aczkolwiek istnieje dotychczas wiele metod, każda z nich jest obciążona większymi lub mniejszymi niedogodnościami, a w dodatku brak jest prac unifikacyjnych, które ułatwiłyby porównanie wyników, otrzymanych przez poszczególnych autorów po zastosowaniu różnych metod.

Pismienictwo, obejmujące 69 pozycji, znajduje się u autora.

Adres autora: mgr Bogdan Mizak, Puławy, ul. Partyzantów 55.

## CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZDZISŁAW LARSKI

Puławy

### Preparaty hamujące rozwój zakażenia wirusowego

Do niedawna dość pesymistycznie oceniano możliwości znalezienia preparatów wpływających hamująco na przebieg zakażenia wirusowego. Taki pogląd wydawał się całkiem uzasadniony, biorąc pod uwagę ściśle wewnątrzkomórkowy proces namnażania się wirusów, oraz zakładając konieczność bezpośredniego działania preparatu na wirus dla uzyskania efektu leczniczego.

Leki przeciwbakteryjne wprowadzone do ustroju niszczyć mogą wybiórczo bakterie (mające własną niezależną przemianę materii) dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu na nie, nie uszkadzając komórek gospodarza. Preparaty przeciwwirusowe dla wywołania tego samego efektu musiałyby przenikać do wnętrza komórki, która jednak posiada szereg mechanizmów przeszkadzających dostawianiu się tam obcych substancji. Już pierwsze próby leczniczego użycia surowic odpornościowych dostarczyły na to wyraźnych dowodów. Z drugiej strony przeniknięcie do wnętrza komórki pewnych preparatów powodować może jej uszkodzenie, a trudno byłoby mówić w tym przypadku o działaniu leczniczym, nawet gdyby występowała przy tym również inaktywacja wirusa.

W miarę dokładniejszego poznawania właściwości wirusów oraz zjawisk zachodzących w czasie zakażenia, zebrano szereg danych wskazujących na możliwość wpływania na przebieg tego procesu. Okazało się, że można w tym celu wykorzystać właśnie ten „u-

pełny brak „samodzielności” wirusa i jego zależność od komórek organizmu gospodarza. Jest ona tak wielka, że nawet nieznaczne odchylenia od normalnego metabolizmu tego ostatniego, mieszczące się w granicach fizjologicznych, wywierają wpływ na namnażanie się wirusa.

Stwierdzono na przykład, że pewne braki pokarmowe u ludzi i zwierząt wyrażają się zwiększoną opornością na zakażenie wirusowe — zjawisko pozornie paradoksalne i krańcowo odmienne niż przy zakażeniach bakteryjnych. Według *Schradera* (19) niedożywienie i awitaminozy u dzieci wyrażają się większą opornością na zakażenie, lub zahamowaniem namnażania się wirusa polio (choroby Heinego—Medina) w organizmie. Zarówno krowy jak i świnki morskie skąpo żywione wykazują mniejszą wrażliwość na zakażenie wirusem przyszczyicy. Przykładów takich można znaleźć więcej. *Stefański* i *Zebrowski* (22) stwierdzili większą oporność na zakażenie wirusem choroby Newcastle u kur wykazujących silną inwazję pasożytniczą. Także w roślinach uprawianych na glebach ubogich oraz w bakterjach hodowanych w pożywkach o niedostatecznej ilości składników odżywczych namnażanie się wirusów jest znacznie słabsze. Istnieją też inne czynniki o podobnym działaniu i *Horsfall* (8) podkreśla ogólną zasadę, że im bardziej nienormalne są warunki środowiskowe, lub metaboliczne tym bardziej wyraźny jest hamujący wpływ na namnażanie się wirusa.

Takie obserwacje wskazały drogę świadomego działania dla hamowania rozwoju procesu zakaźnego.

Stwierdzono też, że wiele preparatów, zarówno naturalnego pochodzenia, jak i otrzymanych sztucznie, wywiera działanie na procesy syntezy wirusa. Chemioterapia zakażeń wirusowych opiera się więc na nieco innych zjawiskach biologicznych, niż to ma miejsce przy zakażeniach bakteryjnych. Przy tych ostatnich preparat działa bezpośrednio na bakterię. Natomiast preparaty wywierające wpływ na zakażenie wirusowe oddziałują pośrednio na syntezę nowego wirusa zwalniając ją, albo całkowicie namając. Większość preparatów nie wykazuje bezpośredniego działania wirusobójczego *in vitro*.

Złagodzenie przebiegu zakażenia wirusowego może być również następstwem zanamowania procesów, prowadzących do uszkodzenia i śmierci komórek, bez wpływu na namnażanie się wirusa.

Wiele preparatów przeciwwirusowych wykazuje swe działanie w zarodkach kurzych i hodowlach komórek zakażonych wirusem, a tylko niektóre z nich działają na proces zakaźny w organizmie zwierzęcia. Jednak stale zwiększa się ilość tych ostatnich i coraz realniejsze stają się szanse przy czynowego leczenia chorób wirusowych.

Niezależnie od tych praktycznych celów, badania zjawisk namowania syntezy wirusa oraz zapobiegania uszkodzeniom i śmierci komórek mają duże teoretyczne znaczenie, gdyż pozwalają poznać istotę skomplikowanego zjawiska na poziomie komórkowym i wyjaśnić ważne zagadnienia biologii molekularnej.

Różne preparaty działają hamująco w poszczególnych stadiach zakażenia komórki. Stadia te to: adsorpcja wirusa, przenikanie jego do wnętrza komórki, rozdział na białko i kwas nukleinowy, synteza „wczesnego białka”, a następnie synteza kwasu nukleinowego i białka wirusowego, łączenie się składników w nowy wirus i uwalnianie się go z komórki. Szczegółowe omówienie preparatów działających w poszczególnych fazach zawiera między innymi praca *Horsfalla* (8).

Użycie preparatów inaktywujących wirus pozakomórkowy nie znalazło praktycznego zastosowania, gdyż związki o takim bezpośrednim działaniu uszkadzają również komórki gospodarza. Wyjątek stanowią syntetyczne peptydy polilizynowe (*Green* i *Stahmann*), które łącząc się z pozakomórkowymi wirusami grypy, choroby Newcastle (NDV), zakaźnego bronchitu, mozaiki tytoniowej oraz z niektórymi bakteriofagami hamują ich zakaźność oraz preparat „Ket-hoxal” (*Mc Limans* i wsp.) wykazujący bezpośrednie działanie inaktywujące na wirusy grypy, choroby Newcastle, mumpsu i krowianki (cyt. wg 8). Najenergiczniejsze działanie na wirus pozakomórkowy wywierają swoiste przeciwciała.

Preparaty zmieniające powierzchnię komórki wpływają hamująco na zainicjowanie jej zakażenia przez wirus. Szczególnie dobrze znane jest to zjawisko w odniesieniu do myksowirusów (grypy, NDV, mumpsu itd.). *Burnet* wykazał jeszcze w 1946 r., że komórki poddane działaniu enzymu niszczącego receptory, (otrzymanego z hodowli *Vibrio cholerae*) mieszczące się na ich powierzchni, stają się bardziej odporne na zakażenie wirusowe. Podobne działanie wykazują również enzymy z hodowli niektórych innych bakterii (badania takie prowadzone były też w Polsce, 14), a także preparaty syntetyczne, przy czym niektóre z nich hamują nie tylko adsorpcję wirusa, ale i jego penetrację do wnętrza komórki.

Większość poznanych dotąd preparatów wpływających na namnażanie się wirusa wykazuje działanie w okresie jego syntezy wewnątrz komórki. Okres ten podzielić można na dwie fazy. Pierwsza, zwana fazą eklipsy lub utajoną, charakteryzuje się tym, że nie można w niej wykazać obecności wirusa we wnętrzu komórki. Wiadomo, że jest to następstwem jego podziału na podjednostki, brak zatem pełnego zakaźnego wirusa; natomiast w tym czasie odbywa się syn-

teza „wczesnego białka”, kwasu nukleinowego wirusa, oraz swobodnego białka wirusowego. W pewnym momencie, który kończy fazę eklipsy następuje połączenie obu składników, a raczej wbudowanie nowo powstałego kwasu nukleinowego w płaszcz białkowy wirusa i w ten sposób powstaje zakaźna jego cząstka (kolejność tych zjawisk została opisana bardziej szczegółowo w innym artykule (12).

Preparaty działające na którekolwiek ogniwo tych procesów wywołują zaburzenia syntezy wirusa, co wyraża się albo zmniejszeniem ilości cząstek zakaźnych, lub powstawaniem cząstek o niepełnej aktywności (np. wirusów niekompletnych).

Omówienie preparatów hamujących syntezę wirusa w fazie eklipsy zawiera praca przeglądowa *Horsfalla* (8). Autor ten podaje też niektóre przypuszczalne mechanizmy ich działania; na przykład metoksy-nina blokuje metabolizm metioniny, p-fluorofenylalanina (FPA) metabolizm fenylalaniny, DRB (pochodna benzimidazolu) hamuje syntezę RNA, a DAB (inna pochodna benzimidazolu) — zarówno syntezę RNA, jak i białka.

Szczególnie duże nadzieje wiązać można z wynikami ostatnich badań szeregu autorów, szczególnie *Rotta* (17). Wykazano, że tak zwane „wczesne białko”, powstające w komórce po wtargnięciu do niej wirusa, jest polimerazą kwasu rybonukleinowego (RNA), to jest enzymem warunkującym łączenie się poszczególnych nukleotydów w łańcuch RNA, co jest koniecznym warunkiem powstania zakaźnego wirusa. *Rot-towi* udało się zahamować syntezę tego enzymu *in vitro* przy pomocy stosunkowo prostych preparatów chemicznych, i to skłania go do przypuszczenia, że wkrótce możliwe będzie leczenie chorób wirusowych, podobnie jak przy użyciu antybiotyków w zakażeniach bakteryjnych.

Substancją naturalnego pochodzenia, która wywiera bardzo znaczny wpływ hamujący na proces syntezy wirusa jest interferon. Jego obecnością w komórce tłumaczy się obecnie zjawisko interferencji. Substancja ta jest przedmiotem licznych badań i z jej użyciem w przyszłości łączy się również bardzo wielkie nadzieje, zwłaszcza, że jest ona produktem naturalnym tkanki, nie wywiera żadnego działania uszkadzającego, a obecnie stosowane udoskonalone metody pozwalają otrzymać ją w większej ilości i w postaci stosunkowo trwałej. Pozytywne wyniki oceny wartości klinicznej w odniesieniu do chorób wirusowych zwierząt uzyskano również w Polsce (11). Obszerne omówienie cech biologicznych interferonu zawierają między innymi prace *Skurskiej* (21) i *Janowskiej* (10).

Jedną z przyczyn zaburzeń metabolizmu w okresie syntezy składowych części wirusa jest rozkojarzenie oksydatywnej fosforylacji, głównego źródła energii tej syntezy. Podobny mechanizm przyjmowano dla istoty działania interferonu, lecz dla tego ostatniego nie jest on prawdopodobnie jedynym.

Preparaty, powodujące dezorganizację w okresie wbudowywania komponenty nukleinowej do płaszcza białkowego wirusa, wpływają również hamująco na powstanie pełnego wirusa (17). Działanie takie jest szczególnie wyraźne przy zakażeniu tymi wirusami (np. wirus grypy), których elementy składowe są syntetyzowane w różnych miejscach komórki, a łączą się w cząstkę zakaźną wirusa w trakcie wędrówki do jej obwodu.

Dalsza możliwość oddziaływania na syntezę wirusa, to stosowanie preparatów powodujących pewne „zniękształcenie” jego białkowej części. Cząstki zakaźne wirusów, nazywane obecnie wirionami, składają się bowiem z zewnętrznego płaszcza białkowego, czyli kapsydu o swobodnej dla danego zarazka wielkości i układzie symetrii oraz z mieszczącego się wewnątrz genomu, będącego nośnikiem informacji genetycznej. „Zniękształcenie” części białkowej uzyskano przez podawanie analogów aminokwasów;

powstały komponenty wirusa, lecz pod względem przestrzennym niezupełnie pasujące do siebie i nie tworzące zakaznej jego cząstki. Takie tłumaczenie sugerują również *Trummeler* i *Wecker* (9) dla wyjaśnienia działania małych dawek p-fluorofenylalaniny (FPA) na syntezę wirusa polio; powstaje zarówno RNA, jak i białkowa komponenta, lecz prawdopodobnie włączenie FPA, zamiast naturalnego aminokwasu feniloalaniny, powoduje pewne zmiany symetrii i niemożność wbudowania RNA i stworzenia zakaznej cząstki wirusa.

Hamowanie procesu zakaznego można również uzyskać przez wstrzymanie procesu uwalniania wirusa z komórki. *Ackermann* i *Maassab*, (cyt. wg 8) znaleźli związek chemiczny o takim działaniu, a *Rott* i wsp. poszukują obecnie preparatów namulających działanie enzymu, uwalnającego wirus z zakażonej komórki.

Dla pewnych preparatów określono dokładnie fazę, w której wykazują one działanie na syntezę wirusa, o większości wiadomo jednak tylko, że na nią wpływają, ale przeprowadzone badania nie pozwalają określić momentu i miejsca działania.

Wiele uwagi poświęcono też poznaniu zależności budowy chemicznej preparatów i ich przeciwwirusowego działania, jednak nie zawsze udało się ją wykażać. Należą one do bardzo odmiennych grup chemicznych, a ponadto nawet drobne różnice między wirusami mogą decydować o bardzo dużych różnicach ich właściwości na dany preparat.

*Matthews* i *Smith* (15), uwzględniając zarówno budowę, jak i sposób działania preparatów na syntezę wirusa, wyróżnili następujące grupy: a) analogi zasad purynowych i pirymidynowych, b) aminokwasy, analogi aminokwasów i związki pokrewne, c) analogi witamin i związki pokrewne, d) jony metali i czynniki chelatujące, e) barwniki, f) antybiotyki, g) regulatory wzrostu roślin i związki pokrewne, h) inne związki hamujące syntezę wirusów zwierzęcych.

Analog danego związku to związek wykazujący ogólne podobieństwo budowy chemicznej, jednak różniący się w szczegółach; to pozorne podobieństwo powoduje, że analog zostaje użyty w procesach syntezy biologicznej (miejako przez „medopatrzenie” przyrody), jednak powstały produkt tej syntezy może wykazywać odmiennie właściwości, a nawet okazać się biologicznie nieczynnym.

Analogi zasad purynowych i pirymidynowych działają hamująco na syntezę wirusa w ten sposób, że zostają wcielenie do kwasów nukleinowych w miejsce normalnych zasad; prowadzi to do umniejszenia, lub zmiany funkcji kwasów nukleinowych w sensie biologicznym.

Wymienieni autorzy zwracają też uwagę, że analogi mogą zostać wcielenie do kwasów nukleinowych gospodarza, a zatem istnieje problem znalezienia warunków hamowania syntezy wirusa, bez dezorganizacji funkcji kwasów nukleinowych komórek.

Użycie analogów posiada też bardzo duże znaczenie dla badań teoretycznych. Stwierdzono bowiem, że niektóre preparaty hamują syntezę kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), a nie wywierają wpływu na syntezę kwasu rybonukleinowego (RNA). Zamiast więc dość trudnych technicznie fizyko-chemicznych oznaczeń typu kwasu nukleinowego danego wirusa, można go określić w sposób dużo prostszy w hodowlach komórek. W obecności preparatów o wybiórczym hamowaniu syntezy DNA występuje bowiem namnażanie się tylko wirusów zawierających RNA.

Hamujące działanie analogów aminokwasów jest w pewnym sensie podobne do działania analogów zasad purynowych i pirymidynowych; zostają one „podstawione” w łańcuchu polipeptydowym i białko wirusowe jest zmienione. Możliwe też, że wpływ na syntezę wirusa jest następstwem konkurencyjnego hamowania reakcji w stosunku do aminokwasów na-

turalnych; poprzednio podano przypuszczalny mechanizm działania p-fluorofenylalaniny (FPA), będącej sztucznym, nie istniejącym w przyrodzie, analogiem aminokwasu alaniny. Natomiast trudne do wytłumaczenia jest działanie naturalnych aminokwasów.

Mechanizm działania wielu wymienionych preparatów nie został dotychczas poznany.

Na obszerniejsze omówienie zasługuje przeciwwirusowe działanie antybiotyków, gdyż panuje w tym zakresie dość znaczne zamieszanie i wiele spraw jest niejasnych. Wiadomo było do niedawna, że wirusy w odróżnieniu od bakterii są niewrażliwe na działanie antybiotyków, i ta ich cecha była i jest wykorzystywana również przy pewnych metodach wirusologicznych. Antybiotyki dodaje się do zawiesin wirusa w celu usunięcia zanieczyszczeń bakterierycznych, a płyny odżywcze hodowli komórek i tkanek, używanych do namnażania wirusa, zawierają stale pewną ilość antybiotyków dla zapobieżenia ewentualnym zakażeniom bakterierycznym.

Nieliczne czynniki zakaźne o charakterze wirusowym wykazywały wrażliwość na działanie antybiotyków, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, ale dokładniejsze badania wykazały, że zarazki te różnią się znacznie od typowych wirusów i obecnie zalicza się je do bakterii (np. „wirusy” grupy *psittacosis-lymphogranuloma*). Przez pewien czas fakt wrażliwości danego czynnika zakaźnego na działanie antybiotyków stanowił pewne dodatkowe kryterium wykluczające jego przynależność do wirusów.

Ostatnio jednak nagromadzono wiele obserwacji i zebrano sporo materiału, wskazującego na konieczność barziej szczegółowego określenia tej cechy i większej ostrożności przy ocenie wyników, gdyż poznano antybiotyki przeciwwirusowe, jakkolwiek efekt ich działania jest oparty na odmiennych mechanizmach, niż przy działaniu przeciwbakteryjnym.

*Matthews* i *Smith* (15) cytują prace kilku autorów, wykonane już w latach 1951—1954, wskazujące na pewne nieznaczne działanie przeciwwirusowe ehrlichiny i kserozyny na wirusy grypy (*Groupe* i wsp.), wyraźne ochronne działanie przeciw *Penicillium stoloniferum* na zakażenie myszy wirusami MM i Semliki Forest (*Powel* i *Culbertson*) oraz na zakażenie małp typem I wirusa polio (*Cohran* i wsp.), ochronne działanie netropsyny u myszy zakażonej domózgowo neurotropowym szczepem krowianki (*Schabel* i wsp.) oraz lecznicze działanie substancji wytwarzanej przez *Penicillium funiculosum* u myszy zakażonych wirusem grypy świni (*Shope*).

W tym samym mniej więcej okresie wykazano działanie antybiotyków wyższych roślin (odpowiednik fitoncydów Tokina) na namnażanie się wirusów i wzrost nowotworów (16, 23, 24).

W następnych latach wzrosło zainteresowanie przeciwwirusowym działaniem antybiotyków, jednak dopiero powszechne wprowadzenie metod w hodowli tkanek i komórek pozwoliło na umasowienie takich prac, przy stosunkowo niskich kosztach.

Obecnie badania dotyczą ponadto prób wyjaśnienia istoty przeciwwirusowego działania antybiotyków. Zagadnienie to jest szczególnie interesujące i ważne, gdyż coraz więcej gromadzi się danych wskazujących, że działanie to oparte jest na odmiennych mechanizmach niż aktywność przeciwbakteryjna. W tym ostatnim przypadku antybiotyki działają na bakterie zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Natomiast substancje wykazujące aktywność przeciwwirusową nie działają na wirus bezpośrednio (brak wirusobójczego działania *in vitro*), a pośrednio na jego syntezę.

*Haff* (7) wykazał, że cykloheksamid, antybiotyk izolowany z hodowli *Streptomyces griseus* posiadający dość szerokie widmo aktywności wobec grzybów, alg i pierwotniaków, a także działający przy niektórych doświadczalnych nowotworach, wykazujący stosunkowo słabe działanie wobec bakterii, działa hamująco