

Амброксол запобігає проникненню SARS-CoV-2 в клітини епітелію дихальних шляхів: результати дослідження

Вірус SARS-CoV-2 є збудником COVID-19 – масштабної проблеми системи охорони здоров'я останніх років. У багатьох інфікованих пацієнтів з'являються лише легкі симптоми інфекції, проте в деякого (зокрема в літніх осіб і тих, хто має додаткові фактори ризику) розвивається тяжкий перебіг захворювання. Потреба в інтенсивній терапії та штучній вентиляції легень на тлі COVID-19 асоціюється з високим рівнем смертності. Основними факторами ризику розвитку тяжкого перебігу COVID-19 є похилий вік, високий артеріальний тиск і надмірна маса тіла. Водночас тяжкий перебіг захворювання може розвинути навіть у здорових молодих людей. Надзвичайна ситуація, з якою зіткнулося людство під час пандемії COVID-19, потребує швидкого пошуку препаратів для лікування і профілактики цієї інфекції. Однак розробка новітніх лікарських засобів – це тривалий процес, який передбачає проведення численних досліджень *in vitro* та *in vivo* і може займати понад 5 років. Саме тому Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) запропонувала стратегію пошуку серед уже відомих і безпечних лікарських засобів тих, які можуть бути ефективними проти збудника COVID-19 – SARS-CoV-2 (Scalise M. et al., 2021). Одним із таких препаратів є амброксол – добре відомий муколітик із хорошим профілем безпеки, що його вже більш як 40 років застосовують у лікуванні інфекцій дихальних шляхів. Матеріал написаний на основі статті A. Carpintero та співавт. (2021), присвяченій дослідженню механізму дії амброксолу при COVID-19.

Ключові слова: COVID-19, SARS-CoV-2, амброксол, профілактика зараження, сфінгомеліназа.

Роль системи кислоти сфінгомелінази/кераміду в проникненні SARS-CoV-2 в клітини

На сьогодні процес проникнення вірусу SARS-CoV-2 у клітини вивчено доволі добре. Він опосередкований так званім spike-білком («шипуватим» білком), що входить до складу вірусної оболонки. Spike-білок складається з двох субодиниць – S1 і S2. Субодиниця S1 зв'язується з рецептором ангіотензинперетворювального ферменту 2 (АПФ-2) клітини-мішені, а субодиниця S2 сприяє злиттю її мембрани з вірусною оболонкою.

керамід виділяється на поверхню клітини, – до утворення збагачених ним доменів у зовнішньому шарі. При цьому гідрофобні молекули кераміду з'єднуються між собою та утворюють окремі мембранні домени. Останні, своєю чергою, зливаються у великі щільно упаковані гелеподібні мембранні платформи, що містять велику кількість керамідів і мають виражені гідрофобні властивості. Ці платформи служать для кластеризації рецепторних молекул, а також для організації, захоплення й накопичення специфічних сигнальних молекул і відіграють важливу роль у проникненні вірусу в клітину.

Крім spike-білка і рецепторів АПФ-2 важлива роль у процесі проникнення вірусу SARS-CoV-2 в клітини-мішені належить так званій системі кислоти сфінгомелінази/керамідів. Кисла сфінгомеліназа (КСМ) – це фермент лізосом, що перетворює сфінгомелін на керамід. Цей фермент міститься в лізосомах і кислих доманах клітинної мембрани внаслідок злиття з плазматичною мембраною секреторних лізосом.

Відомо, що інфікування епітеліальних клітин вірусом SARS-CoV-2 або системою, яка імітує проникнення SARS-CoV-2 – pp-VSV-SARS-CoV-2 (pseudoviral particles presenting SARS-CoV-2 spike protein – псевдовірусні частинки вірусу везикулярного стоматиту, що презентують на своїй поверхні spike-білок), супроводжується активацією КСМ і вивільненням кераміду. Водночас інгібування функції КСМ може запобігти інфікуванню клітин вірусом SARS-CoV-2.

Дія КСМ призводить до вивільнення кераміду зі сфінгомеліну та, якщо

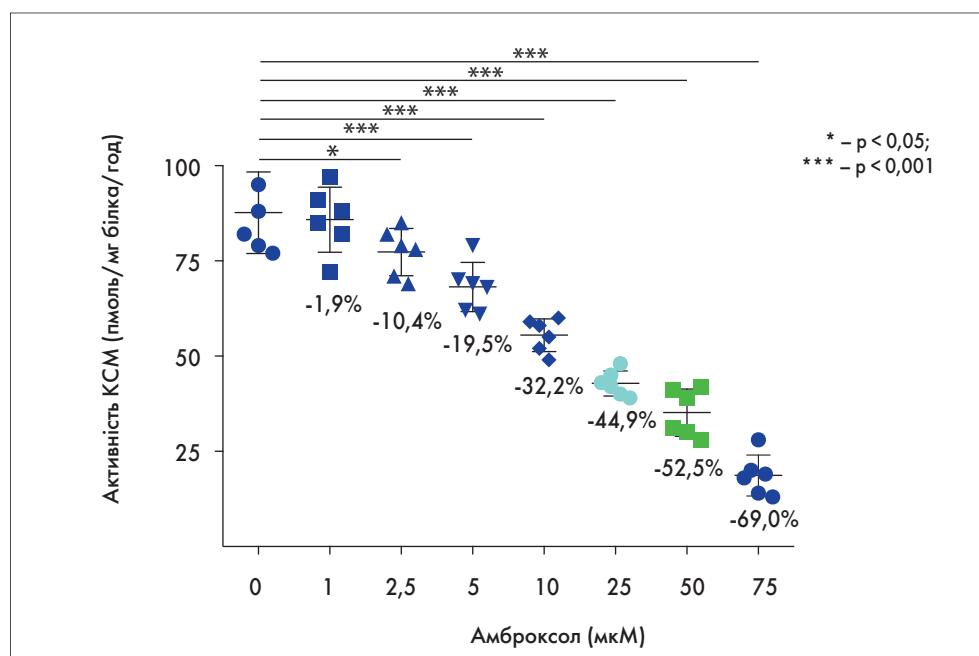


Рис. 1. Амброксол знижує активність КСМ

Хіг і результати дослідження

Для перевірки здатності амброксолу інгібувати КСМ вчені інкубували епітеліальні клітини Vero-E6 зі зростаючими дозами препарату і визначали активність КСМ в клітинних лізатах. Виявлено, що амброксол індукував дозозалежне зниження активності КСМ в клітинах Vero-E6 (рис. 1).

Далі науковці дослідили, чи індукує spike-білок pp-VSV-SARS-CoV-2 активацію КСМ в клітинах Vero-E6 і чи запобігає попередня обробка клітин амброксом цій індукції. Було виявлено, що інфікування клітин spike-білком pp-VSV-SARS-CoV-2 призводило до швидкої активації КСМ, яка досягла максимуму через 30 хв після зараження (рис. 2, А). Це узгоджувалося з раніше відомими даними. Водночас попередня обробка амброксом запобігала pp-VSV-SARS-CoV-2-індукованій активації КСМ.

Було показано, що інкубація епітеліальних клітин зі spike-білком pp-VSV-SARS-CoV-2 призводила до вивільнення кераміду, що має важливе значення для проникнення вірусу в клітину.

Зараження клітин Vero-E6 spike-білком pp-VSV-SARS-CoV-2 призводило до вивільнення керамідів С16/С18 і С22/С24, тоді як попередня обробка амброксом запобігала вивільненню кераміду: 15-20 мкМ амброксолу зменшувало або майже повністю блокувало вивільнення кераміду при зараженні клітин (рис. 2, Б).

Також було продемонстровано, що інфікування клітин Vero-E6 spike-білком pp-VSV-SARS-CoV-2 спричинювало утворення мембранних доменів із високим умістом керамідів, які кластерують АПФ-2. Це свідчить про те, що вони служать платформами для подальшого інфікування клітин.

Вчені також дослідили, чи здатний амброксол блокувати проникнення spike-білка pp-VSV-SARS-CoV-2. Клітини Vero-E6 попередньо обробляли амброксом упродовж 60 хв, промивали, а потім інфікували spike-білком pp-VSV-SARS-CoV-2 протягом 60 хвилин. Згідно з результатами дослідження амброксол у дозі 10 мкМ і 15-20 мкМ зменшував потрапляння вірусу на 50% і 80-90% відповідно, тоді як 25 мкМ амброксолу повністю блокували проникнення вірусу. Амброксол також блокував вищі концентрації spike-білка VSV-SARS-CoV-2. Додавання очищеної КСМ, що сприяє виробленню ендogenous кераміду або 10 мкМ екзогенного кераміду С16, відновлює інфікування. Це вказує на те, що амброксол діє шляхом інгібування КСМ і вивільнення кераміду. Обробка клітин Saso-2 амброксом також призводила до інгібування проникнення в них pp-VSV-SARS-CoV-2, тоді як додавання кераміду С16 – до відновлення цього процесу.

Препарати, здатні запобігати проникненню SARS-CoV-2 в клітини-мішені

Є декілька препаратів, здатних пригнічувати КСМ. Структурними особливостями цих препаратів є наявність у них ліпофільного кільця, що інтегрується в лізосомні мембрани, а також короткого спейсера і зарядженої групи третинних амінів. Ці препарати здатні витіснити КСМ з лізосомних мембран у просвіт лізосом, що призводить до її часткового розщеплення. Як наслідок, активність системи КСМ/кераміду знижується.

Такі властивості мають деякі антидепресанти, зокрема флуоксетин і амітриптилін. Науковцями навіть була запропонована абревіатура FIASMA – Functional Inhibitor of Acid SphingoMyelinAse (функціональний інгібітор КСМ) для позначення групи препаратів, здатних знижувати активність системи КСМ/кераміду.

Подібну структуру має муколітичний препарат амброксол, що дає можливість припустити наявність у нього інгібувальної дії щодо КСМ. Амброксол містить ліпофільну органічну кільцеву систему, яка за допомогою короткого спейсера з'єднана з третинним аміном; тож амброксол є потенційним функціональним інгібітором КСМ і, відповідно, може інгібувати проникнення SARS-CoV-2 в клітини-мішені.

Амброксол як потенційний інгібітор КСМ: дизайн дослідження

Аби перевірити, чи дійсно амброксол здатний інгібувати активність КСМ і, відповідно, запобігати проникненню SARS-CoV-2 в клітини, вчені провели дослідження з використанням системи pp-VSV-SARS-CoV-2 spike – псевдовірусних часток VSV, дефектних за реплікацією, що презентують на своїй поверхні spike-білок SARS-CoV-2. Декілька попередніх досліджень продемонстрували, що ці частки точно відображають ключові аспекти проникнення коронавірусу в клітини-мішені. Проникнення вірусу й вивільнення кераміду визначали за допомогою флуоресцентної мікроскопії, активність КСМ – за допомогою визначення споживання (¹⁴C) сфінгомеліну і кераміду.

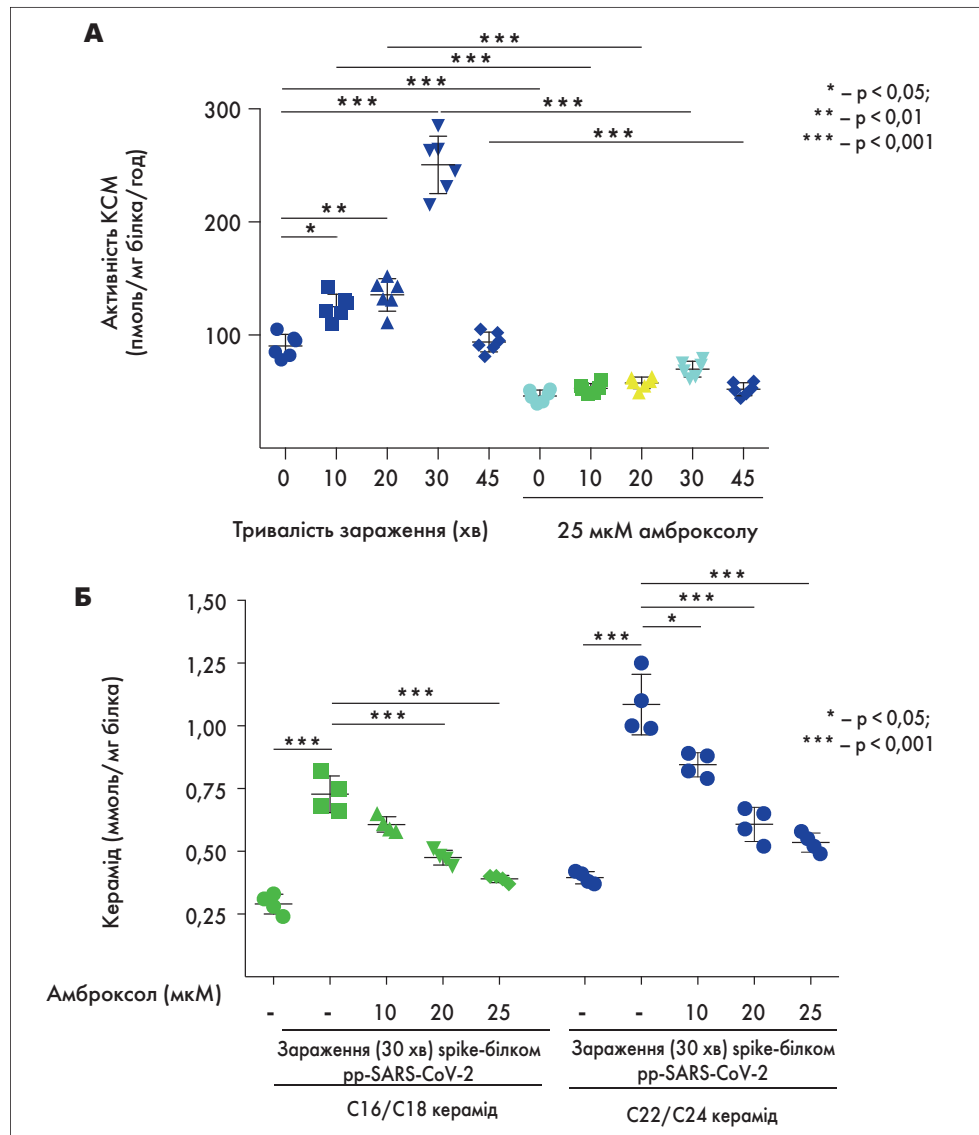


Рис. 2. Амброксол запобігає активації КСМ і вивільненню кераміду в разі зараження pp-VSV-SARS-CoV-2: А. Інфікування клітин spike-білком pp-VSV SARS-CoV-2 призводить до швидкої активації КСМ, що досягає максимуму через 30 хв після зараження. Б. Зараження клітин Vero-E6 spike-білком pp-VSV-SARS-CoV-2 призводить до вивільнення керамідів C16/C18 і C22/ C24, тоді як попередня обробка амброксом запобігає цьому: 15-20 мкМ амброксолу зменшує або майже повністю блокує вивільнення кераміду.

Таким чином, амброксол блокує проникнення spike-білка pp-VSV-SARS-CoV-2 шляхом інгібування системи КСМ/кераміду.

Вчені також відтворили ці результати на клітинах свіжовиділеного з носа добровольців дихального епітелію. Клітини обробляли 25 мкМ амброксолу

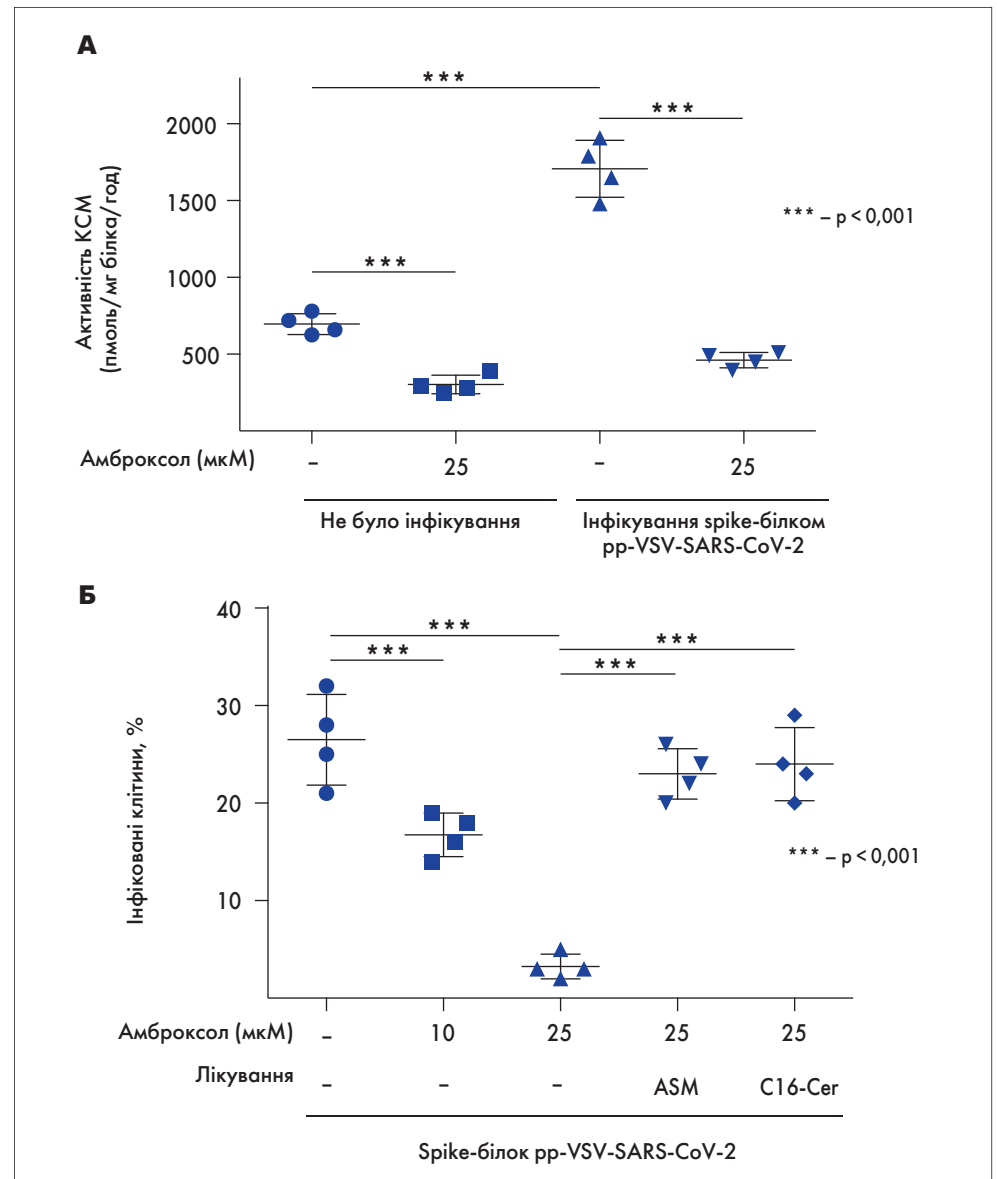


Рис. 3. Амброксол запобігає активації КСМ в клітинах носового епітелію людини in vitro: А. Амброксол знижував активність КСМ в неінфікованих клітинах і запобігав її стимуляції під впливом pp-VSV-SARS-CoV-2. Б. Додавання очищеної КСМ або 10 мкМ C16 кераміду відновлювало надходження вірусних часток у клітини, оброблені амброксом.

протягом 60 хв, а потім визначили активність КСМ та інфікування клітин. Виявлено, що амброксол знижував активність КСМ в неінфікованих

клітинах приблизно на 50% і запобігав її стимуляції під впливом pp-VSV-SARS-CoV-2 (рис. 3, А). Амброксол блокував надходження spike-білка pp-VSV-SARS-CoV-2 у свіжоізолювані клітини носового епітелію, тоді як додавання очищеної КСМ або 10 мкМ C16 кераміду відновлювало проникнення вірусних часток у клітини, оброблені амброксом (рис. 3, Б).

Аби відтворити вплив амброксолу на інфіковані клітини в умовах, максимально наближених до реальних, експеримент було проведено в такій послідовності:

1. Виділення в добровольців клітин носового епітелію.
2. Вдихання добровольцями 2 мл амброксолу (7,5 мг/мл).
3. Через 60 хв після інгаляції – повторне виділення клітин дихального епітелію з протилежної ніздрі носа.
4. Інфікування pp-VSV-SARS-CoV-2 ex vivo впродовж 60 хвилин.
5. Промивання клітин.
6. Інкубація протягом 24 год із наступним оцінюванням інфекційного проникнення.

Також вчені порівняли активність КСМ в клітинах епітелію носа до й після інгаляції амброксолу. Дослідження продемонстрували, що вдихання амброксолу in vivo помітно знижувало активність КСМ в клітинах носового епітелію (рис. 4). Інфікування pp-VSV-SARS-CoV-2 впродовж 30 хв призводило до активації КСМ (рис. 4, А) і вивільнення кераміду (рис. 4, Б). Ці події блокувалися попередньою інгаляцією амброксолу. Визначено, що

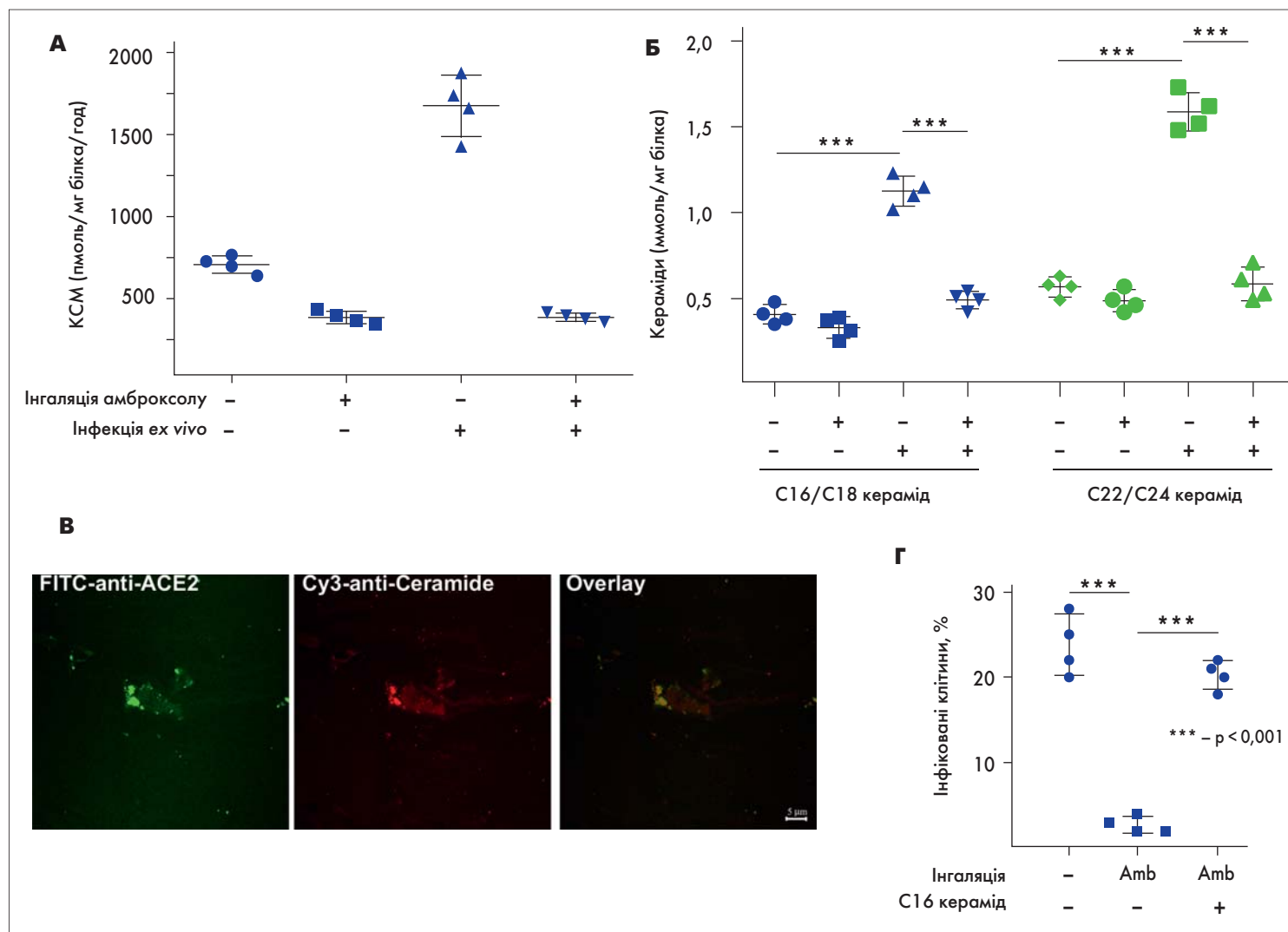


Рис. 4. Амброксол in vivo запобігає інфікуванню епітеліальних клітин носа spike-білком pp-VSV-SARS-CoV-2 ex vivo: А. Інфікування pp-VSV-SARS-CoV-2 впродовж 30 хв призводить до активації КСМ. Б. Інфікування pp-VSV-SARS-CoV-2 впродовж 30 хв призводить до вивільнення кераміду. В. Інфекція призводить до скупчення рецепторів АПФ-2 у багатьох на кераміди мембранних доменах клітин носового епітелію. Г. Амброксол запобігав проникненню ex vivo spike-білка pp-VSV-SARS-CoV-2 у свіжоізолювані клітини носового епітелію.

Продовження на стор. 18.

A. Carpintero, B. Gripp, M. Hoffmann, S. Pohlmann та ін., Інститут молекулярної біології Університету Дуйсбург-Ессен, Німеччина

Амброксол запобігає проникненню SARS-CoV-2 в клітини епітелію дихальних шляхів: результати дослідження

Продовження. Початок на стор. 16.

інфекція спричинювала скупчення рецепторів АПФ-2 у багатих на кераміди мембранних доменах клітин носового епітелію (рис. 4, В), тоді як вдихання амброксолу запобігало проникненню *ex vivo* spike-білка pp-VSV-SARS-CoV-2 у свіжоізолювані клітини епітелію носа (рис. 4, Г). Додавання С16 кераміду або рекомбінантної КСМ відновлювало інфекційний процес.

Обговорення результатів дослідження

Результати дослідження демонструють, що амброксол запобігає проникненню spike-білка pp-VSV-SARS-CoV-2 як у культивовані епітеліальні клітини, так і в свіжовиділені епітеліальні клітини носа людини *ex vivo*. Інгаляції амброксолу було достатньо, аби зменшити активність КСМ в клітинах носового епітелію *in vivo* і запобігти їх зараженню. В інгаляційних експериментах використовували стандартні концентрації амброксолу, що застосовують для лікування пацієнтів у клінічній практиці. Ці концентрації були достатніми для зменшення активності КСМ в клітинах епітелію носа *in vivo*.

Роль системи КСМ/кераміду для проникнення вірусів у клітини раніше була показана для риновірусів, лихоманки Ебола, кору й вірусу японського енцефаліту. Застосування препаратів групи FIASMA допомогло уникнути проникнення цих вірусів у клітини, що підтверджує роль системи КСМ/кераміду в проникненні вірусу в клітини-мішені.

Виявлено, що вдихання амброксолу було достатньо для пригнічення КСМ в клітинах епітелію носа *in vivo* і блокування проникнення pp-VSV-SARS-CoV-2 в ці клітини *ex vivo*.

Механізм дії амброксолу, що запобігає проникненню вірусу в клітину, зображений на рисунку 5.

Раніше було продемонстровано, що деякі антидепресанти (зокрема, флуоксетин і амітриптилін) запобігають зараженню клітин людини вірусом SARS-CoV-2. Дія антидепресантів є подібною до такої амброксолу і реалізується шляхом пригнічення КСМ. Треба зазначити, що антидепресанти діють системно, тоді як амброксол може вводитися шляхом інгаляцій і діяти місцево в дихальних шляхах. В амброксолу має хороший профіль безпеки, він добре переноситься і практично не має обмежень до застосування. Антидепресанти ж мають низку побічних ефектів (зокрема, подовження інтервалу QT), небажаних лікарських

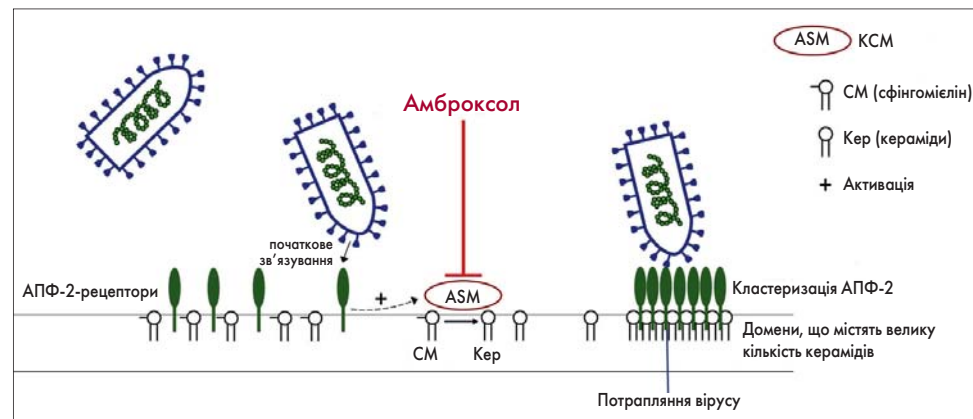


Рис. 5. Механізм пригнічення амброксом проникнення SARS-CoV-2

взаємодій (інгібування CYP2D6) і протипоказань (супутне застосування інгібіторів моноаміноксидази), чого немає в амброксолу.

Таким чином, хороша переносимість амброксолу і його здатність пригнічувати проникнення вірусу в клітину можуть бути аргументами для призначення низьких доз препарату для профілактики в осіб із ризиком розвитку тяжкої інфекції COVID-19, у разі контакту з інфікованою COVID-19 людиною або позитивного результату тестування на SARS-CoV-2 за відсутності симптомів. Водночас амброксол, імовірно, не ефективний на пізніх стадіях інфекції, коли відбулася генералізація інфекційного процесу.

Амброксол – безпечний препарат, що застосовується з 1979 року. Він практично не має побічних ефектів. При цьому інгаляції є загалом дуже безпечним методом лікування, оскільки дають можливість уникнути системного впливу препарату. Проведення подальших досліджень доцільності застосування амброксолу з метою профілактики й лікування COVID-19 становить великий клінічний інтерес і є перспективним.

За матеріалами Carpintero A. et al. Inhibition of acid sphingomyelinase by ambroxol prevents SARS-CoV-2 entry into epithelial cells. J. Biol. Chem. V. 296, 100701, Jan 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100701>

Реферативний огляд підготувала Анастасія Козловська

Анкета читача



Заповніть анкету та надішліть за адресою:

Медична газета «Здоров'я України» Тематичний номер, «Ппульмонологія, алергологія, риноларингологія» вул. Світлицького, 35, м. Київ, 04123.

Вкажіть відомості, необхідні для отримання тематичного номера «Ппульмонологія, алергологія, риноларингологія»

Прізвище, ім'я, по батькові

Спеціальність, місце роботи

Індекс

місто

село

район

вулиця

корпус

Телефон: дом.

роб.

моб.

E-mail:

* Я добровільно надаю вказані в анкеті персональні дані ТОВ «Медичний журнал «Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія», даю згоду на їх використання для отримання від компанії (її пов'язаних осіб, комерційних партнерів) видань, інформаційних матеріалів, рекламних пропозицій, а також на включення моїх персональних даних у базу даних компанії, необмежене в часі зберігання даних.

Підпис

Здоров'я України

Для нас важливо знати вашу думку!

Чи сподобався вам тематичний номер «Ппульмонологія, алергологія, риноларингологія»?

Назвіть три найкращі матеріали номера.

1.
2.
3.

Які теми, на ваш погляд, варто розглянути у наступних номерах?

Публікації яких авторів вас цікавлять?

Чи маєте ви бажання стати автором статті для тематичного номера «Ппульмонологія, алергологія, риноларингологія»?

На яку тему?

Чи є наше видання корисним для підвищення вашої кваліфікації?