

пандемия отличалась от предыдущих отставанием вовлечения в нее городов-мегаполисов, началом среди детей школьного возраста, ранним наступлением и меньшей выраженностью пика и высокой кратностью превышения заболеваемости детей по сравнению с взрослым населением.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аниелес И. М., Фридман Э. А., Стенина Е. С.* и др. Некоторые итоги эпидемиологических, иммунологических и вирусологических сопоставлений по материалам эпидемических волн гриппа типа А2 1957 и 1959 гг. в Ленинграде. *Этиология, иммунология и клиника азиатского гриппа: Труды ИЭМ АМН СССР.* Л.; 1961: 138–47.
2. *Бурцева Е. И., Щелканов М. Ю., Колобухина Л. В.* и др. Анализ результатов надзора, лабораторной диагностики и выделения штаммов вирусов гриппа в базовых лабораториях ЦЭЭГ в период 2009–2011 гг. В кн.: *Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение: Сборник НИИ гриппа.* СПб; 2011: С. 12–6.
3. *Еропкин М. Ю., Даниленко Д. М., Коновалова Н. И.* и др. Выделение и антигенная характеристика вирусов гриппа, циркулировавших в России в эпидемические сезоны 2009–2011 гг. В кн.: *Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение: Сборник НИИ гриппа.* СПб; 2011: 37–41.
4. *Карпова Л. С., Бурцева Е. И., Поповцева Н. М., Столярова Т. П.* Сравнение эпидемий гриппа в России 2009 и 2011 годов, вызванных пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2011; 60 (5): 6–15.
5. *Карпова Л. С., Маринич И. Г.* Особенности эпидемий гриппа в России в период с 1986 до 2009 года. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2010; 55 (6): 6–12.
6. *Карпова Л. С., Маринич И. Г., Столярова Т. П., Поповцева Н. М.* Анализ эпидемии гриппа А/Калифорния/07/2009 (Н1N1) в России в сезон 2009–2010 гг. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2010; 52 (3): 23–30.
7. *Карпова Л. С., Маринич И. Г., Поповцева Н. М., Столярова Т. П.* Эпидемиология гриппа А(Н1N1) Калифорния/07/09 среди населения 49 городов России в сезон 2009–2010 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011; 3: 14–20.
8. *Карпова Л. С., Пелих М. Ю., Маринич И. Г.* Эпидемиология гриппа А(Н1N1) Калифорния/07/09 в зарубежных странах в сезон 2009–2010 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011; 4: 20–4.
9. *Карпунин Г. И.* Особенности распространения гриппа А1 в мире и СССР. В кн.: *Проблемы гриппа и острых респираторных заболеваний: Сборник научных трудов ВНИИ гриппа.* Л.; 1979; 2: 5–17.
10. *Коновалова Н. И., Еропкин М. Ю., Гудкова Т. М.* и др. Этиологическая характеристика эпидемий гриппа 2006–2009 гг. в РФ (по данным НИИ гриппа СЗО РАМН). *Вопросы вирусологии.* 2010; 4: 9–16.
11. *Львов Д. К., Бурцева Е. И., Щелканов М. Ю.* и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(Н1N1) в России. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55: 4–9.
12. *Львов Д. К., Бурцева Е. И., Щелканов М. Ю.* и др. Уроки пандемии гриппа А(Н1N1)pdm09 в России (2009–2011). В кн.: *Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение: Сборник НИИ гриппа.* СПб; 2011: 4–12.
13. Об итогах пандемии А/Н1N1/09 в мире и Российской Федерации в эпидсезон 2009–2010 гг. и прогнозе на эпидсезон 2010–2011 гг. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 1/5578-10-32 от 13.04.2010. <http://www.78rosпотребнадзор.ru/documents/print/148>.
14. *Пелих М. Ю., Карпова Л. С., Маринич И. Г.* Распространение гриппа А/Калифорния/07/2009(Н1N1) в странах Северного и Южного полушария. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2010; 53 (4): 8–24.
15. *Сморodinцев А. А.* Итоги изучения этиологии и иммунологии азиатского гриппа типа А2 в Ленинграде. В кн.: *Этиология, иммунология и клиника азиатского гриппа: Труды ИЭМ АМН СССР.* Л.; 1961: 127–37.
16. *Щелканов М. Ю., Львов Д. К., Федякина И. Т.* и др. Динамика распространения пандемического гриппа А/Н1N1swl на Дальнем Востоке в 2009 г. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (3): 10–8.
17. Human infection with new influenza A(H1N1) virus: clinical observations from Mexico and other countries, May 2009. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2009; 84 (23): 185–90. URL: <http://www.who.int/wer/2009/wer8423.pdf>.
18. *Weekly Epidemiological Monitor, November 2009, 2 (44).* URL: http://www.emro.who.int/csr/hlhl/pdf/epi_monitor_44_09.pdf.

Поступила 31.05.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 615.281.8.012

В. В. Зарубаев, П. М. Анфимов, А. А. Штро, А. В. Гаршинина, И. А. Мелешкина, Л. А. Карпинская, К. Н. Козелецкая, О. И. Киселев

Разработка новых препаратов против вируса гриппа на основе синтетических и природных соединений

Лаборатория молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург

В статье дан обзор последних разработок лаборатории в области поиска новых средств для профилактики и терапии гриппа. Приведены данные по изучению противовирусной активности химических соединений классов азоло-адамантанов, тритерпенов, производных бензимидазола, усниновой кислоты и других гетероциклических соединений. Описаны протективные свойства природных растительных антиоксидантов при летальной гриппозной инфекции у животных. Показана высокая вирусингибирующая активность природных полисахаридов и их комплексов с серебром против вируса гриппа. Приведенные данные позволяют рассматривать перечисленные группы веществ как перспективные кандидаты для дальнейшей разработки в качестве противовирусных средств.

Ключевые слова: *грипп, химиотерапия, профилактические средства*

Контактная информация:

Зарубаев Владимир Викторович, канд. биол. наук, зав. лаб.; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru

Development of Novel Drugs against Influenza Virus Based on Synthetic and Natural Compounds

V. V. Zarubaev, P. M. Anfimov, A. A. Shtro, A. V. Garshinina, I. A. Meleshkina, L. A. Karpinskaya, K. N. Kozeletskaia, O. I. Kiselev

Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Recent progress of the laboratory in the area of the search and development of novel remedies for prophylaxis and treatment of influenza is reviewed in this work. The data of the study of the anti-viral activity of compounds from the chemical groups of azolo-adamantanes, triterpenes, derivatives of benzimidazole, usnic acid, and other heterocyclic substances are presented. The protective properties of the plant antioxidants at lethal influenza infection of animals are discussed. High virus-inhibiting activity of natural polysaccharides and their complexes with silver ions is shown against influenza virus. The data presented allow listed groups of compounds to be suggested as promising candidates for further development of anti-influenza drugs.

Key words: influenza, chemotherapy, prophylactic compounds

Несмотря на успехи в области химиотерапии и вакцинопрофилактики гриппа, он остается трудно контролируемой инфекцией вследствие высокой генетической изменчивости и долговременных осложнений после острой стадии, приводящих к “скрытой”, или вторичной, смертности, вызванной не самим вирусом гриппа, а вирусиндуцированными вторичными процессами [1].

Новые вирусы гриппа птиц H5N1 и свиней H1N1, появившиеся в человеческой популяции в последние годы, являются опасными патогенами человека. Большинство человеческих изолятов вируса устойчивы к действию наиболее распространенного препарата ремантадина и способны эффективно подавлять интерфероновый ответ организма [2]. Таким образом, ситуация, сложившаяся в последние 3 года в отношении инфицирования человека вирусом гриппа, придает особую актуальность поискам новых эффективных средств профилактики и борьбы с этой инфекцией.

Химиопрофилактика и химиотерапия гриппа применяются наряду с вакцинацией для предотвращения и лечения заболевания. В настоящее время для этих целей доступен широкий спектр патогенетических, иммуномодулирующих, общеукрепляющих препаратов вместе со средствами специфической противогриппозной терапии. Несмотря на то что в составе вириона и жизненном цикле вируса гриппа есть много уникальных компонентов и стадий, способных служить мишенями для лекарственного вмешательства, лишь два из них используются в клинике в настоящее время. Международно признанными противогриппозными препаратами являются химические соединения двух групп – производные адамантана (амантадин и его аналог в России ремантадин) [3] и ингибиторы вирусной нейраминидазы – озельтамивир (тамифлю) и занамивир (реленза) [4]. В США получено разрешение FDA на использование еще двух ингибиторов нейраминидазы – перамивира (Рапиакта®) внутривенно [5] и ланинамивира (Инавир®) ингаляционно [6]. В России ни перамивир, ни ланинамивир не сертифицированы.

К недостаткам лекарств первой группы – производных адамантана – относится узкий спектр действия, поскольку они активны против вирусов гриппа А, но не гриппа В. Нейраминидазные ингибиторы приводят к многочисленным побочным эффектам, таким как аллергические реакции, осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта, тошнота [7], а также неврологическим расстройствам [8]. К тому же они

имеют высокую стоимость, что ограничивает их применение в большинстве стран мира.

В целом современные фармацевтические препараты, удовлетворяющие требованиям доказательной медицины, оптимизированы для селективного взаимодействия с определенной мишенью. Однако для противовирусных соединений точная подгонка под определенную мишень приводит к быстрому появлению резистентных штаммов при недостаточной консервативности выбранного рецептора. Так, устойчивость к адамантановым препаратам достигает 90–100% [2], процент тамифлю-устойчивых штаммов невысок, однако с ноября 2007 по март 2009 г. этот показатель среди вирусов подтипа H1N1 вырос до 100% [9], и если бы эти вирусы не были вытеснены пандемическими штаммами A(H1N1)pdm09, чувствительными к озельтамивиру, это сильно осложнило бы ситуацию со средствами химиотерапии гриппа. По нашим данным, в России в течение последних 5 эпидемических сезонов отмечались те же тенденции (рис. 1).

В 2010 г. были опубликованы данные о новом эффективном препарате нуклеозин, направленном против белка NP вируса гриппа [10]. Несмотря на активность этого соединения против вирусов гриппа подтипов H1N1 и H3N2 в культуре клеток и на животных моделях, пандемические штаммы, появившиеся в 2009 г., проявили к нему устойчивость [11].

В тяжелых случаях гриппа в клинической практике применяется рибавирин, эффективный не только против гриппа, но и против других РНК-геномных вирусов. Однако высокая токсичность позволяет рекомендовать его лишь в далеко зашедших случаях инфекции и тем самым ограничивает его применение как средства широкомасштабной борьбы с эпидемиями и пандемиями гриппа.

Помимо препаратов прямого противовирусного действия, в России с той же целью используются вещества, обладающие опосредованным или комбинированным механизмом активности. К таким соединениям относится арбидол – вещество, препятствующее слиянию вирусной и клеточной мембран в жизненном цикле вируса и стимулирующее выработку интерферона – основного компонента врожденного иммунитета [12, 13]. Арбидол хорошо зарекомендовал себя в противовирусной терапии, в том числе в педиатрии [14, 15]. Препарат Ингавирин, оказывающий как противовирусное, так и цитопротективное и иммуностимулирующее действие, также с успехом применяется

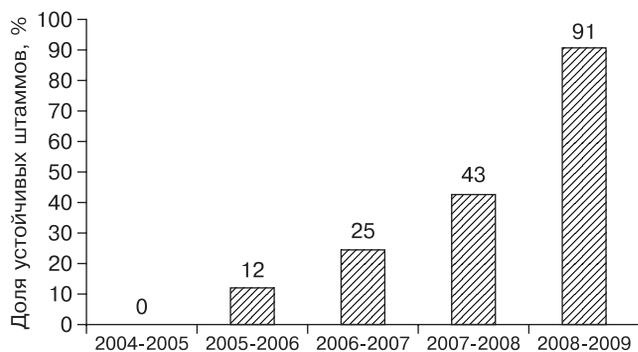


Рис. 1. Динамика чувствительности российских изолятов вируса сезонного гриппа А(Н1N1) к озельтамивиру (Тамифлю) в 2004–2009 гг.

в клинике и хорошо зарекомендовал себя, в частности, во время пандемии 2009 г. Применение ингавирина в первые 48 ч болезни приводило к достоверному сокращению периода лихорадки, интоксикации и катаральных симптомов. Ингавирин вызывал эффективную реабилитацию иммунной, интерфероновой и цитокиновой систем, снижал вирусную нагрузку, препятствовал активации бактериальной инфекции и тем самым сокращал сроки болезни [16]. Из индукторов интерферона в России применяются также циклоферон, амиксин, ридостин, кагоцел, полудан и другие, а из препаратов интерферонового ряда – гриппферон, герпферон, риальдерон, ингарон, роферон и др. Все эти соединения следует рассматривать как средства профилактики или ранней либо экстренной терапии гриппа, поскольку в поздних стадиях заболевания, при развившейся инфекции и выраженных реактивных процессах их эффективность не проявляется.

Факторы патогенеза гриппа включают как вирусспецифические, так и реактивные процессы. При тяжелых формах именно последние определяют тяжесть и исход заболевания. К числу таких факторов относятся ДВС-синдром, интоксикация организма, массивное воспаление и интенсивные процессы протеолиза и генерации свободных форм кислорода в его очагах, обуславливающие распад тканей. Поэтому разработка новых эффективных патогенетических препаратов также является важным звеном в комплексной терапии гриппа, особенно его тяжелых форм.

Использование растительных метаболитов в создании препаратов в самых разных терапевтических классах является одним из основных путей развития мировой фарминдустрии. Примерно половина всех внедренных в медицинскую практику препаратов за последние 25 лет связаны с природными соединениями. Нами были проведены исследования по поиску противовирусных веществ среди нескольких больших групп химических соединений. Первую группу составили низкомолекулярные синтетические и природные соединения. Вторая группа была представлена низкомолекулярными вещества-

ми, непосредственно содержащимися в растительном сырье, как индивидуальными соединениями, так и суммарными растительными экстрактами. В третью группу вошли высокомолекулярные полисахариды различной природы и их производные.

Все исследуемые вещества растворяли в минимальном количестве диметилсульфоксида и доводили до необходимого объема среды для клеточных культур. Токсические свойства оценивали при помощи микротетразолиевого теста [17] и рассчитывали величину 50 цитотоксической дозы (CTD_{50}). Первичный скрининг противовирусной активности химических соединений проводили в культуре клеток MDCK, инфицированной вирусами гриппа А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) или А/California/07/09 (H1N1)pdm09. Титр вируса в контрольных и опытных образцах определяли при помощи реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. На основании данных о снижении титра вируса в присутствии веществ рассчитывали величину 50 эффективной концентрации (EC_{50}) и индекс селективности (отношение CTD_{50} к EC_{50}).

Среди низкомолекулярных синтетических соединений следует отметить активность веществ следующих химических классов:

- азоло-адамантаны (рис. 2, а);
- производные бензимидазола (рис. 2, б) и гетероциклические спиросоединения (рис. 2, в);
- тритерпены и их производные (рис. 2, г);
- монотерпеновые производные (рис. 2, д);
- усниновая кислота и ее химические модификации (рис. 2, е)

Нами было показано, что эти группы соединений обладают в корне различными потенциалами как противогриппозные средства. Так, среди азолоадамантанов были изучены производные ди-, три- и тетразола-адамантана [18]. За редкими исключениями была обнаружена строгая зависимость противовирусной активности от количества атомов азота в гетероцикле. Примеры соединений этого класса и их противовирусной активности приведены в табл. 1. Видно, что тетразольные производные адамтанов обладают наиболее высокой противовирусной активностью *in vitro* (соединения 1–2, 3–4 и 5–6). Наибольшей активностью обладали молекулы, содержащие не более одного тетразольного и одного адамантильного остатка

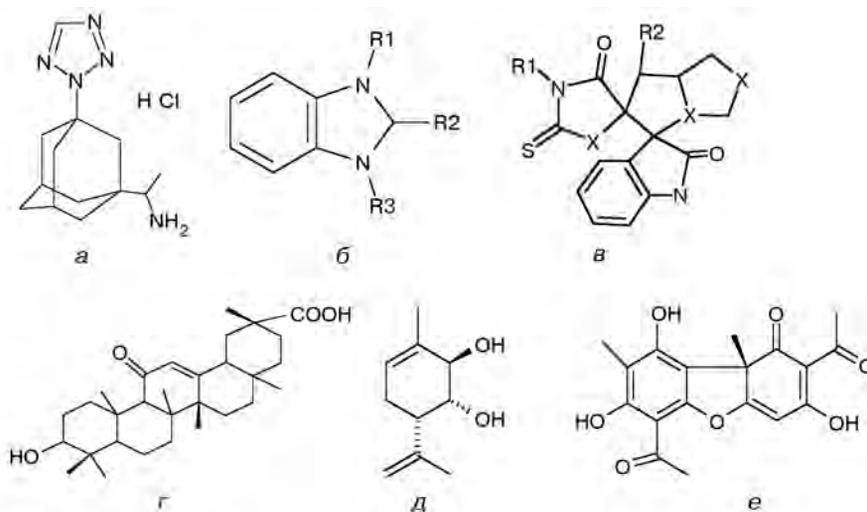


Рис. 2. Химические группы соединений, активных против вируса гриппа.

Таблица 1

Закономерности противогриппозной активности азоло-адамантанов

№ соединения	Структура	CTD ₅₀ , мкг/мл	ED ₅₀ , мкг/мл	SI
1		443	300	1
2		50	17	3
3		600	111	6
4		>1000	123	9
5		604	10	60
6		300	10	30
7		0,18	0,09	2
8		>500	500	1
9	Ремантадин	60	12	5

Примечание. Здесь, в табл. 2 и 3 и на рис. 3: ED₅₀—эффективная доза; SI—индекс селективности.

(соединения 7–8). Эти вещества проявили активность против ремантадинчувствительного вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), превышающую активность самого ремантадина (см. табл. 1). В то же время на модели гриппозной пневмонии у мышей они имели умеренный уровень активности или не проявляли ее вообще. Несмотря на более высокую активность этих соединений по сравнению с ремантадином, пассирование вируса в их присутствии приводило к появлению мутации S31N в M2-белке полученного штамма, характерной для ремантадинустойчивых вирусов, что может указывать на сходство механизмов их действия и спектра противогриппозной активности.

Перспективные соединения были обнаружены среди группы тритерпенов [19]. В целом группа характеризовалась умеренной активностью, и индексы селективности веществ в ней не превышали 10. Практически все химические модификации исходных природных соединений приводили к потере активности. Исключением является активность метилового эфира мацедониловой кислоты при ее отсутствии у самой кислоты (табл. 2). В то же время некоторые из изученных тритерпенов, такие как 3,21-диацетоксиолеана-

11,13(18)-диен-29-овая кислота, глицерретовая кислота и ее метиловый эфир, при отсутствии активности *in vitro* демонстрировали протективные свойства *in vivo*. Это проявлялось в снижении специфической смертности (на 15–40%) и увеличении продолжительности жизни (до 2 сут) по сравнению с контрольными группами. Данный факт говорит о наличии у этих соединений иного механизма активности, не связанного с воздействием на вирусспецифическую мишень, а реализуемого в целостном организме.

В группе монотерпеновых производных также были выявлены соединения с высоким противогриппозным потенциалом, хотя в целом группа характеризовалась умеренной активностью [20]. Было показано, что соединение (1R,5S,6R)-6-гидрокси-2-метил-5-(1-метилэтил)циклогекс-2-енил никотинат (рис. 3), получаемое из доступного монотерпеноида (-)-вербенона с использованием недорогих реагентов, имеет высокие показатели вирусингибирующего действия. Примечательно, что на этой группе химических веществ была продемонстрирована решающая роль абсолютной конфигурации, поскольку переход к соединению, являющемуся оптическим антиподом указанного мононикотината, привел к практически полной потере антигриппозной активности. Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность поиска противогриппозных средств нового типа среди производных монотерпеноидов и делают необходимыми дальнейшие исследования механизмов их противогриппозных свойств.

Как группы с высокой активностью были идентифицированы производные бензимидазола и разнородная группа гетероциклических соединений (табл. 3). За редким исключением представители этих групп характеризуются низкими значениями эффективных доз и высоким индексом селективности. Среди доступных соединений этих классов проведен первый этап анализа взаимоотношений структура–активность, сформулированы условия активности, и в настоящее время проводится процедура патентования этих классов химических веществ как противогриппозных средств.

Исследования 2010–2011 гг. были посвящены также разработке противогриппозных соединений на основе усниновой кислоты – вторичного метаболита лишайников (см. рис. 1). Ранее были обнаружены

Таблица 2

Противогриппозная активность тритерпеновых соединений

Соединение	CTD ₅₀ , мкг/мл	Показатели активности <i>in vitro</i> против вируса гриппа			
		А		В	
		ED ₅₀	SI	ED ₅₀	SI
Меристотроповая кислота	320	15	21	30	11
Метиловый эфир меристотроповой кислоты	34	8	4	н/т	
Мацедониловая кислота	137	71	2	н/т	
Метиловый эфир мацедониловой кислоты	320	30	11	30	11

Примечание. н/т – не титровали.

Активность гетероциклических соединений против вируса гриппа A/California/07/09(H1N1)pdm09

Соединение	CTD ₅₀ , мкг/мл	ED ₅₀ , мкг/мл	SI
Производные бензимидазола			
626	6,7	0,6	11
627	75,5	2,7	28
628	459	20	23
630	75	0,9	83
631	15	1,7	9
633	29	3,6	8
634	5,5	0,7	8
635	132	22	11
643	118,6	11,1	11
644	1221	103,8	12
645	28	17	2
646	15,6	2,2	7
Гетероциклические спиросоединения			
654	415	26	16
655	169	15	11,3
656	286	25	11,4
657	37	1,9	19,2
658	62	30	2

Примечание. Серым тоном выделены соединения, имеющие SI = 10 и более.

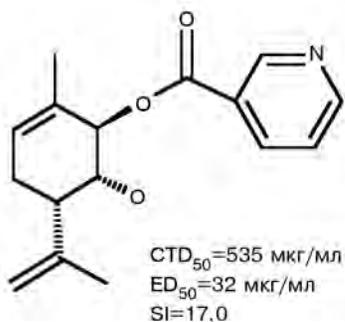


Рис. 3. (1R,5S,6R)-6-гидрокси-2-метил-5-(1-метилэтенил)циклогекс-2-енил никотинат, активный против вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09.

антибактериальные, инсектицидные и фунгицидные свойства усниновой кислоты, а также ее активность в отношении ДНК-геномных вирусов [21–23].

Исследования активности производных усниновой кислоты против вируса гриппа показали эффективность многих подобных соединений как ингибиторов репродукции этого вируса, при этом проявляемая активность сильно зависела от абсолютной конфигурации полученных соединений. В паре исходных субстратов на репродукцию вируса гриппа наиболее активно влияет (-)-усниновая кислота, однако при химической модификации молекулы, как правило, происходит обращение биологической активности. Если (-)-усниновая кислота проявляет большую противовирусную активность, чем ее (+)-энантиомер, среди пар энантиомерных производных существенно большей ингибирующей активностью по отношению к вирусу гриппа обладают (+)-энантиомеры. В некоторых случаях активность обоих энантиомеров была сравнима.

Анализируя зависимость структура–активность, было отмечено, что пиразольные производные усниновой кислоты малотоксичны, но и малоактивны по отношению к вирусу. Вирусингибирующее действие резко возрастает при восстановлении их карбонильной группы (C=O) до гидроксильной. При этом, однако, существенно повышается цитотоксичность, что приводит к выравниванию индексов селективности соединений. На общем фоне можно выделить продукт взаимодействия (-)-усниновой кислоты и глицина (рис. 4, а), индекс селективности которого составляет 32 за счет невысокой цитотоксичности и выраженной вирусингибирующей способности.

Наиболее интересные результаты показали окисленные производные усниновой кислоты, полученные воздействием на усниновую кислоту органических надкислот. Окисленное производное (+)-усниновой кислоты (рис. 4, б) проявило высокую ингибирующую активность при низкой цитотоксичности, его индекс селективности составил 38.

Помимо перечисленных групп, была изучена противовирусная активность производных природного алкалоида цитизина (рис. 5, а) и производные резвератрола (рис. 5, б). В целом обе группы были охарактеризованы как умеренно или слабоактивные, поскольку ни одно из соединений не имело индекса селективности выше 10. Однако, учитывая природный источ-

ник этих веществ, можно ожидать, что их противовирусное действие не будет проявляться в гомогенной клеточной культуре, а лишь на уровне организма, как это происходит в случае других препаратов опосредованного или патогенетического действия.

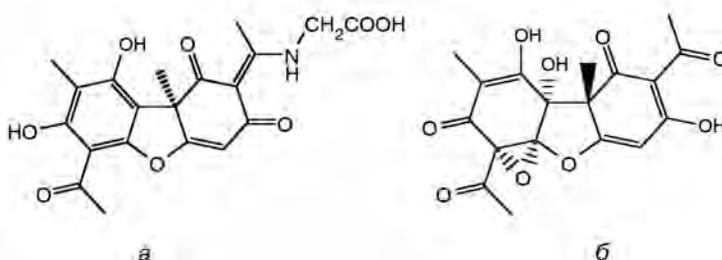


Рис. 4. Производные усниновой кислоты, активные против пандемического вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09.

а – продукт взаимодействия (-)-усниновой кислоты и глицина; б – окисленное производное (+)-усниновой кислоты.

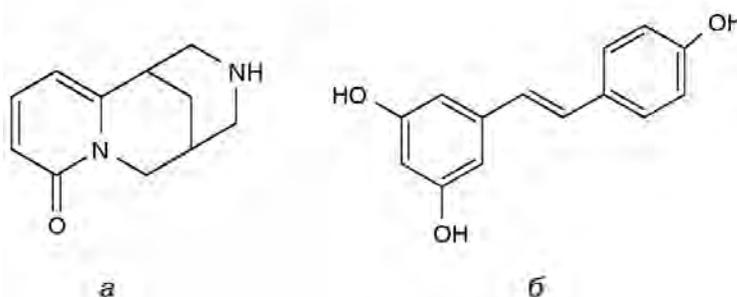


Рис. 5. Структура цитизина (а) и резвератрола (б).

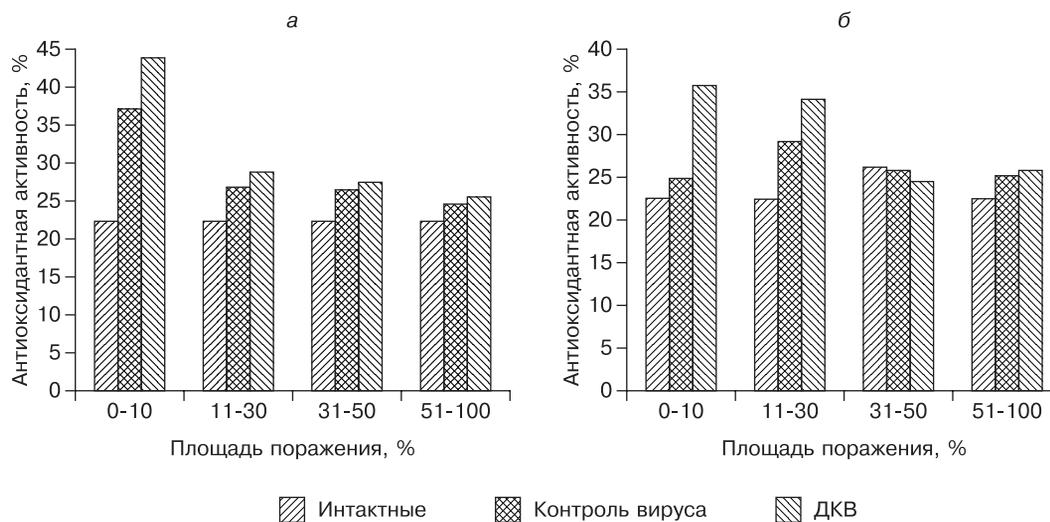


Рис. 6. Интенсивность антиоксидантных процессов в ткани легких белых мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), в условиях применения дигидрокверцетина.
а – 4-е сутки, б – 7-е сутки после инфицирования.

Следующая группа соединений – низкомолекулярные вещества, непосредственно содержащиеся в растительном сырье, не имели прямой противовирусной активности, поэтому не рассматриваются как потенциальные этиотропные средства. Тем не менее их протективная активность, показанная на модели летальной гриппозной инфекции, оказалась весьма высокой. Эта группа средств была представлена флавоноидом дигидрокверцетином (ДКВ), содержащимся в коре и древесине лиственницы, а также экстрактами и чистыми соединениями на основе ДКВ, обладающими антиоксидантной активностью. Независимо от этиологии инфекции (вирусы гриппа А(H1N1), А(H5N2) и В) эффект этих препаратов заключался в снижении смертности животных (до 80%) и увеличении продолжительности жизни (на 1–5 сут) в зависимости от дозы препарата, вируса и режима лечения.

В отдельной серии экспериментов оценивали сравнительную антиоксидантную активность изучаемых соединений. Два соединения (экстракт косточек винограда – АОК-G-DE и экстракт коры китайской сосны – АОК-P) оказались более сильными антиоксидантами, чем сам ДКВ (табл. 4). По-видимому, именно это свойство в числе прочих обеспечивает высокую протективную активность этих препаратов при летальной гриппозной инфекции у мышей.

Для изучения механизма активности этой группы соединений была исследована динамика окислительных и антиоксидантных процессов в ткани легких животных при гриппе. Интересно отметить, что низкая степень тяжести гриппозной пневмонии и небольшие по объему поражения легочной ткани были связаны с повышением уровня антиоксидантных процессов в легких, тогда как обширные поражения ассоциировались со снижением этих реакций (рис. 6). Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что протективный механизм ДКВ и родственных препаратов связан с повышением антиоксидантной активности (АОА) в легочной ткани и снижением уровня свободнорадикальных процессов. Использование ДКВ повышало уровень АОА во всех группах опыта. При этом, однако, степень воздействия ДКВ зависела

от тяжести поражения. Наибольший уровень АОА отмечался при малой площади очагов пневмонии. С возрастанием тяжести поражения усиление АОА было выражено меньше (см. рис. 6).

Наконец, в рамках исследования третьей группы соединений – растительных полисахаридов и их производных было изучено вирулицидное действие серии арабиногалактанов (АГ), содержащихся в коре и древесине лиственницы. Среди 16 исследованных полисахаридных экстрактов были идентифицированы 10, обладающие способностью снижать инфекционную активность вируса гриппа при предварительной инкубации. Из 10 изученных полисахаридов и их комплексов с металлами оптимальные показатели были обнаружены для комплексов АГ с серебром. Для оценки их противовирусных свойств было проведено тестирование их действия на репликацию вируса гриппа в культуре клеток MDCK в зависимости от концентрации. Результаты показали, что изученный препарат проявляет выраженную дозозависимую противовирусную активность в отношении вируса гриппа, снижая уровень его репликации более чем на 5 порядков.

Таблица 4
Антиоксидантные свойства природных соединений и их производных

Продукт	Снижение OD ₅₃₅ с 0,01% продукта, кратность
АОК-G-DE	10
АОК-P	7,0
ДКВ	5,0
АОК-G-SE	4,0
ДКВ-Zn	3,2
Комплекс продуктов восстановления ДКВ	3,2
Фракция спирофлавоноидов коры лиственницы	2,7
ДКВ-Ca	2,5
Пикнолар	2,4

Таким образом, комплексы АГ с серебром можно рекомендовать для разработки на их основе высокоэффективных противовирусных средств для местного применения.

Суммируя полученные результаты, следует сказать, что потенциал для разработки новых этиотропных и патогенетических средств для профилактики и терапии гриппа далеко не исчерпан. Изучение новых природных и синтетических химических соединений самых различных групп позволяет идентифицировать вещества, направленные на новые вирусные мишени, расширяя спектр средств для борьбы с этой инфекцией.

Суммируя полученные результаты, следует сказать, что потенциал для разработки новых этиотропных и патогенетических средств для профилактики и терапии гриппа далеко не исчерпан. Изучение новых природных и синтетических химических соединений самых различных групп позволяет идентифицировать вещества, направленные на новые вирусные мишени, расширяя спектр средств для борьбы с этой инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Palese P.* Influenza: old and new threats. *Nat. Med.* 2004; 10 (12, suppl. 1): S82–7.
2. *Dawood F. S., Jain S., Finelli L., Shaw M. W.* et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A(H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 2605–15.
3. *Scholtissek C., Quack G., Klenk H. D., Webster R. G.* How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res.* 1998; 37: 83–95.
4. *De Clercq E.* Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; 5: 1015–25.
5. *Shetty A. K., Peek L. A.* Peramivir for the treatment of influenza. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2012; 10: 123–43.
6. *Vavricka C. J., Li Q., Wu Y., Qi J., Wang M., Liu Y.* et al. Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathog.* 2011; 7: 1002249.
7. *Bijl D.* Pandemic influenza vaccines and neuraminidase inhibitors: efficacy and side effects. *Int. J. Risk Saf. Med.* 2011; 23: 65–71.
8. *Chung S., Joung Y. S.* Oseltamivir (tamiflu) induced depressive episode in a female adolescent. *Psychiatry Invest.* 2010; 7: 302–4.
9. http://www.who.int/influenza/resources/documents/H1N1webupdate2009_0318_ed_ns.pdf.
10. *Kao R. Y., Yang D., Lau L. S., Tsui W. H., Hu L., Dai J.* et al. Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. *Natotechnol.* 2010; 28: 600–5.
11. *Su G. Y., Cheng T. J., Lin M. I., Wang S. Y., Huang W. I., Lin-Chu S. Y.* et al. High-throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 19 151–6.
12. *Brooks M. J., Burtseva E. I., Ellery P. J., Marsh G. A., Lew A. M., Slepishkin A. N.* et al. Antiviral activity of arbidol, a broad-spectrum drug for use against respiratory viruses, varies according to test conditions. *J. Med. Virol.* 2012; 84: 170–81.
13. *Boriskin Y. S., Leneva I. A., Pecheur E. I., Polyak S. J.* Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. *Curr. Med. Chem.* 2008; 15: 997–1005.
14. *Гагарина В. М., Игнатьева Г. С., Сеницкая Л. В.* и др. Новый химиопрепарат арбидол: профилактическая эффективность во время эпидемий гриппа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1993; 5: 40–3.
15. *Беляев А. Л., Бурцева Е. И., Слепушкин А. И.* и др. Арбидол – новое средство для профилактики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций у детей. *Вестник РАМН.* 1996; 3: 34–37.
16. *Колобухина Л. В., Меркулова Л. Н., Григорян С. С., Щелканов М. Ю., Оспельникова Т. П., Гусева О. А.* и др. Эффективность и безопасность препарата Ингавирин в лечении гриппа и других ОРВИ у взрослых. *Справочник поликлинического врача.* 2010; 9: 3–7.
17. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55–9.
18. *Zaruba V. V., Golod E. L., Anfimov P. M., Shtro A. A., Saraev V. V., Gavrilov A. S.* et al. Synthesis and anti-viral activity of azolo-adamantanes against influenza A virus. *Bioorg. Med. Chem.* 2010; 18: 839–48.
19. *Зарубаев В. В., Киселев О. И., Штро А. А., Зорина А. Д., Балькина Л. В., Есипенко Н. А.* и др. Синтез и противогриппозная активность производных меристотроповой и мацедониновой кислот. *Химико-фармацевтический журнал.* 2012.
20. *Ardashov O. V., Zarubaev V. V., Shtro A. A., Korchagina D. V., Volcho K. P., Salakhutdinov N. F., Kiselev O. I.* Antiviral activity of 3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-3-ene-1,2-diol and its derivatives against influenza A(H1N1)2009 virus. *Lett. Drug Design Discovery.* 2011; 8 (4): 375–80.
21. *Perry N. B., Benn M. H., Brennan N. J., Burgess E. J., Ellis G., Galloway D. J.* et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist.* 1999; 31: 627–36.
22. *Scrippa P., Scambia G., Masciul V., Battaglia F., Foti E., Lopez R.* et al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as postsurgical adjuvant therapy in genital lesion by human papillomavirus. *Minerva Ginecol.* 1999; 51: 255–60.
23. *Yamamoto Y., Miura Y., Kinoshita Y., Higuchi M., Yamada Y., Murakami A.* et al. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein–Barr virus activation. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 1995; 43: 1388–90.

Поступила 31.05.12