

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ КУМАРИНОВ НА МОДЕЛИ ВИРУСА ГРИППА

**Аннотация.** Поиск новых противовирусных препаратов, способных эффективно подавлять репродукцию вируса гриппа входит в число актуальных задач вирусной химиотерапии. Одной из перспективных групп противовирусной терапии являются нуклеозидные ингибиторы полимеразной активности вируса, к которым можно отнести растительные кумарины. Проведены исследования противовирусной активности некоторых представителей кумаринов и фурукумаринов на модели вируса гриппа. Показано, что скополетин и азотсодержащее производное ореозолонна способны эффективно подавлять репликацию вируса гриппа на стадиях внутриклеточной репродукции. При этом активность кумаринов превышает активность коммерческого препарата ремантадин. Полученные данные могут послужить основой для создания новой группы химиопрепаратов способных эффективно блокировать репликацию вируса гриппа.

**Ключевые слова:** кумарины, фурукумарины, скополетин, азотсодержащее производное ореозолонна-вирулицидная активность, вирусингибирующая активность, противовирусная активность.

**Тірек сөздер:** кумариндер, фурукумариндер, скополетин, ореозолонның азот құрамдас туындылары, вирулицидті белсенділік, вирусқа қарсы белсендік.

**Keywords:** coumarins, furocoumarins, scopoletin, nitrogen-containing derived orazalinov-culicidae activity, viringia activity, antiviral activity.

Создание эффективных отечественных лекарственных средств – одна из первоочередных задач медицинской науки любой страны. Препараты природного происхождения, как правило, имеют преимущественное применение в профилактике и поддерживающей терапии целого ряда заболеваний, смертность от которых в настоящее время достаточно высока. Это в первую очередь связано с низкой токсичностью природных соединений и их способностью участвовать в различных системах биосинтеза макроорганизма. Поиск растений, содержащих биологически активные вещества (БАВ), для производства таких препаратов в последние годы становится все более целенаправленным.

Среди соединений, обладающих биологической активностью, важное место принадлежит производным гетероциклических систем, и особенно интересны в этом плане производные кумарина, представляющего собой основу большого количества природных и синтетических биологически активных соединений. Изучение кумаринов имеет двухвековую историю. Название этой группы производных происходит от наименования растения *CoumarounaodorataAubl.*, из которого в 1812 г. был выделен кумарин (2H-хромен-2-он или 2H-1-бензопиранон-2) [1] – простейший представитель данного класса. Природные производные кумарина, содержащиеся в растениях различных семейств и микроорганизмах, а также их синтетические аналоги, проявляют широкий спектр фармакологических свойств, включая противокоагулирующую, противотромботическую, противоопухолевую, антибактериальную и антивирусную (в том числе анти-ВИЧ-1) активность, противовоспалительную.

тельные свойства, а некоторые из них являются перспективными агентами при лечении нейродегенеративных заболеваний, например болезни Альцгеймера [2, 3]. Наряду с этим, благодаря своим уникальным оптическим свойствам, соединения кумаринового ряда нашли широкое применение для создания лазерных устройств, светодиодов, в качестве флуоресцентных меток в биомедицинской визуализации и в других областях современной техники [4].

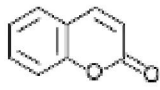
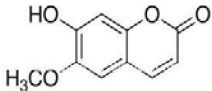
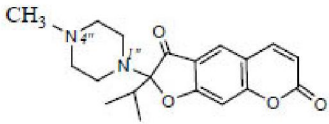
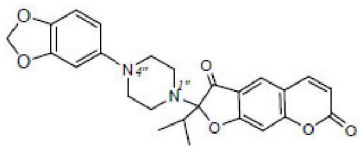
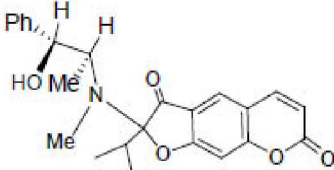
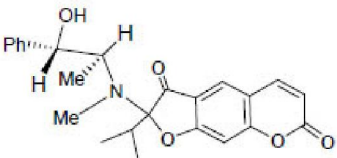
С начала 1980-х гг. опубликованы порядка двух десятков книг и обзоров [5], посвященных происхождению, биологической активности и классическим методам синтеза соединений кумаринового ряда.

**Целью** наших исследований являлось сравнительное изучение вирусингибирующей активности некоторых кумаринов на модели вируса гриппа.

**Материалы и методы.** Противовирусные препараты:

1. Ремантадин (АО «Олайнфарм», Латвия),
2. Кумарин, скополетин и азотсодержащие производные ореозелона, предоставлены сотрудниками АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»» (таблица) [2-4, с. 1].

Препараты исследованные на наличие противовирусных свойств

№	Температура плавления, по Цельсию	Растворимость	Молекулярный вес (Дальтон)	Структурная формула
1	237–239	Спирт	200–300	
2	200–202	Спирт	192	
3	193–195	Вода	300	
4	143–145	Вода	400	
5	222–224	Спирт	412	
6	129–131	Спирт	341	

Приготовление суспензий и растворов препаратов осуществляли в растворе фосфатно-солевого буфера, pH 7,2.

Штаммы вируса гриппа А:

Штаммы вируса гриппа птиц: А/малая крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3), А/FPV/Rostock/34 (H7N1), получены из коллекции вирусов ГУ «Институт вирусологии им Д. И. Ивановского».

В работе использовали 9–11 дневные куриные эмбрионы, полученные из птицефабрик АО «Аллель Агро» (Алматы, Казахстан).

Вирусы выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов в течение 24–36 ч при 37 °С.

Вирусингибирующие свойства соединений изучали в экспериментах на куриных эмбрионах. Определение противовирусных свойств выполняли методом «скрининг-тест», рассчитанным на подавление репродукции вируса в количестве 100 ЭИД<sub>50</sub> заданными дозами лекарственных препаратов. Критерием противовирусного действия считали снижение инфекционного титра вируса при обработке противовирусным средством в сравнении с контролем.

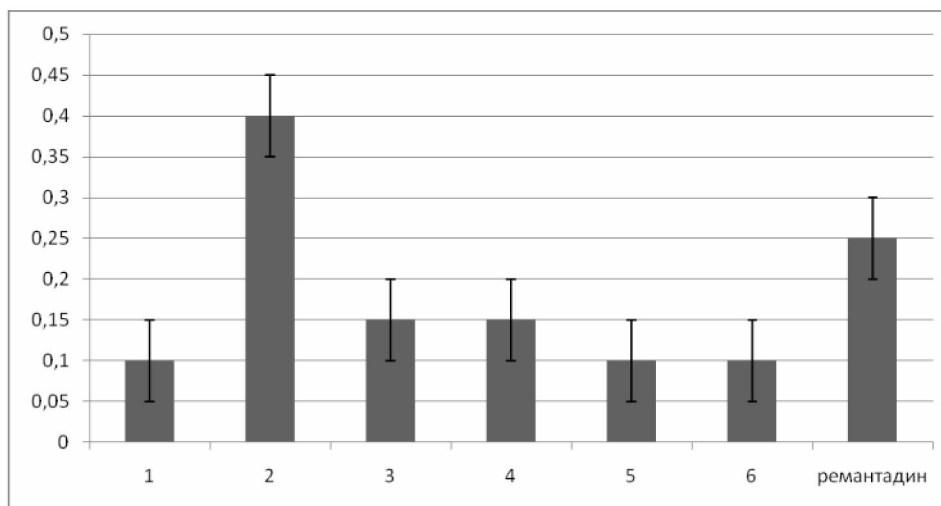
Вирулицидную активность исследуемых препаратов определяли путем обработки вирусосодержащего материала лекарственными препаратами в различных дозах (далее по тексту) при 37°С в течение 30 мин с последующим титрованием инфекционности обработанного материала. За реальное вирулицидное действие принимали разность между инфекционным титром вируса в пробе до и после экспозиции с исследуемым препаратом [6].

Инфекционный титр вирусов на куриных эмбрионах определяли методом десятикратных разведений в соответствии с методом Reed и Muench [7, 8].

Математическая обработка результатов. Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и средних ошибок [9].

**Результаты и обсуждение.** Большинство кумаринов обладают ярко выраженными токсическими свойствами в силу антитромботических свойств, препятствующих свертыванию крови. Эти препараты способны вызывать гибель животных уже при достижении концентрации 0,0028% в корме животных. Поэтому при изучении биологических свойств кумаринов не используются дозы препаратов, превышающие 200 мкМ [10, 11].

Для сравнительного анализа противовирусных свойств исследуемых кумаринов и фурокумаринов была изучена их вирулицидная активность в дозе 100 мкМ. Установлено, что все исследуемые препараты обладают слабовыраженной вирулицидной активностью, сопоставимой с коммерческим препаратом ремантадин (рисунок 1).

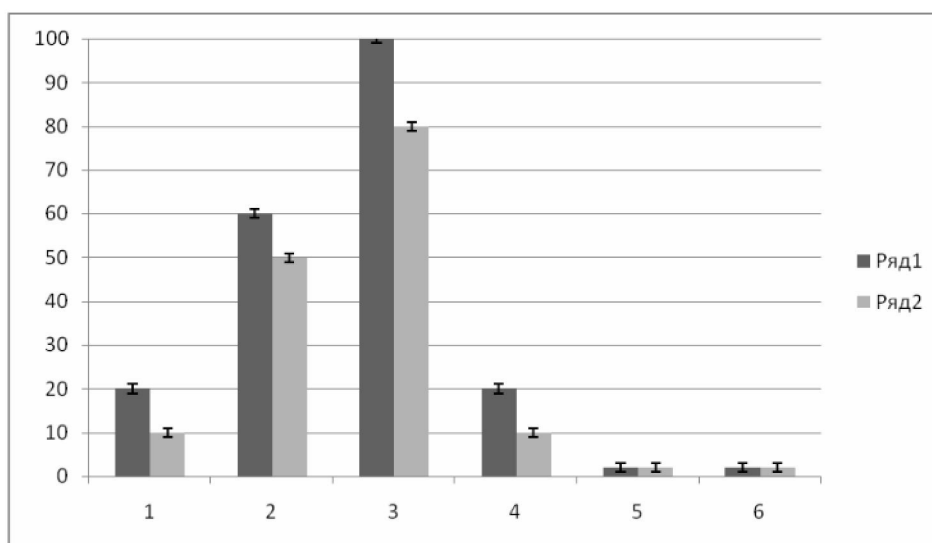


*Примечание.* Вирусы были обработаны кумаринами в концентрации 100 мкМ в течение 30 мин при 37°С; результаты представлены в виде десятичных логарифмов разведения; различия в подавлении инфекционности вирусов достоверны ( $P < 0,05$ ). По оси ординат степень снижения титра инфекционности вируса в десятичных логарифмах разведения, по оси абсцисс – номер препарата.

Рисунок 1 – Вирулицидная активность кумаринов

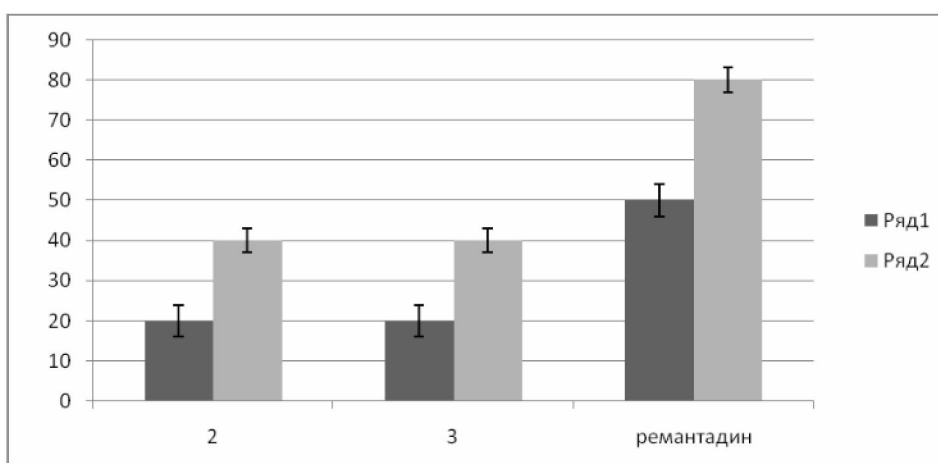
Также была изучена вирусингибирующая активность кумаринов. Показано, что кумарины, несодержащие больших гетероциклических боковых заместителей способны в той или иной степени подавлять репродукцию вируса независимо от антигенной структуры вируса гриппа (рисунок 2). Наиболее выраженными вирусингибирующими свойствами обладали препараты № 2 и № 3 (скополетин и азотсодержащее производное ореозолон). Установлено, что эти препараты в дозе

20 мкМ подавляют 50% инфекционности вируса гриппа A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и в дозе 40 мкМ – вируса гриппа A/малая крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3), что в два раза превышает вирусингибирующую активность ремантадина по отношению к этим вирусам (рисунок 3).



*Примечание.* По оси ординат степень подавления инфекционности вируса в %, по оси абсцисс – номер препарата.  
Ряд 1 вирус гриппа, штамм A/FPV/Rostock/34 (H7N1), Ряд 2 вирус гриппа, штамм A/малая крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3)

Рисунок 2 – Влияние кумаринов в дозе 100 мкМ на инфекционный титр вируса



*Примечание.* По оси ординат доза препаратов в мкМ, способная подавлять репродукцию вируса на 50%, по оси абсцисс – номер препарата

Ряд 1 вирус гриппа, штамм A/FPV/Rostock/34 (H7N1), ряд 2 вирус гриппа, штамм A/малая крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3)

Рисунок 3 – Сравнительная вирусингибирующая активность скополетина и азотсодержащее производное ореозелона с метильной боковой группой

**Заключение.** Таким образом, в наших исследованиях было установлено, что кумарины скополетин и азотсодержащее производное ореозелона с метильной боковой группой способны эффективно подавлять репродукцию вируса гриппа с разной антигенной структурой. При этом вирусингибирующая активность кумаринов практически вдвое превышает вирусингибирующую активность коммерческого препарата ремантадин. Исследованные препараты кумаринов могут рассматриваться как перспективный источник получения новых эффективных противовирусных средств.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Coumarins, Biology, Applications and Mode of Action, R. O'Kennedy, R. D. Thomes (Eds.), John Wiley and Sons, Chichester, 1997. – P. 348.
- 2 Липеева А.В., Шульц Э.Э., Шакиров М.М., Толстиков Г.А. Исследование растительных кумаринов. Сообщение 4. Синтез азотсодержащих производных ореозелона // ХПС. – 2009. – № 3. – С. 289-294.
- 3 Липеева А.В., Шульц Э.Э., Шакиров М.М., Толстиков Г.А. Исследование растительных кумаринов. Сообщение 5. Катализируемое комплексами палладия аминирование 2-(1,3-дибромпропан-2-илиден)ореозелона // ЖОрХ. – 2010. – Т. 46, № 12. – С. 1845-1854.
- 4 Липеева А.В., Шульц Э.Э., Морозова Е.А., Толстикова Т.Г., Толстиков Г.А. Синтез и исследование фармакологической активности азотсодержащих производных ореозелона // Химия в интересах устойчивого развития. – 2010. – Т. 18, № 4. – С. 461-468.
- 5 Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Березин В.Э. Противовирусные препараты растительного происхождения // Фундаментальные исследования (Россия). – 2013. – № 6. – С. 1141-1146.
- 6 Шнейдер М.А. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. – Минск: Наука, 1977. – 150 с.
- 7 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing New castledisease virus. Avian Dis. – 1970. – Vol. 14. – P. 542-549.
- 8 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points // Amer. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- 9 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М., 1975. – 295 с.
- 10 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Основы химии природных соединений. – Алматы: Қазақ университеті, 2010. – 564 с.
- 11 Музычкина Р.К., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. – Алматы: Қазақ университеті, 2004. – 288 с.

## REFERENCES

- 1 Coumarins, Biology, Applications and Mode of Action, R. O'Kennedy, R. D. Thomes (Eds.). John Wiley and Sons, Chichester, 1997. R. 348.
- 2 Lipeeva A.V., Shul'c Je.Je., Shakirov M.M., Tolstikov G.A. Issledovanie rastitel'nyh kumarinov. Soobshhenie 4. Cintez azotsoderzhashhih proizvodnyh oreozelona. HPS. 2009. № 3. S. 289-294.
- 3 Lipeeva A.V., Shul'c Je.Je., Shakirov M.M., Tolstikov G.A. Issledovanie rastitel'nyh kumarinov. Soobshhenie 5. Kataliziruемое kompleksami palladija aminirovanie 2-(1,3-dibrompropan-2-iliden)oreozelona. ZhOrH. 2010. T. 46, № 12. S. 1845-1854.
- 4 Lipeeva A.V., Shul'c Je.Je., Morozova E.A., Tolstikova T.G., Tolstikov G.A. Sintez i issledovanie farmakologicheskoy aktivnosti azotsoderzhashhih proizvodnyh oreozelona. Himija v interesah ustojchivogo razvitija. 2010. T. 18, № 4. S. 461-468.
- 5 Bogojavlenskij A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.Je. Protivovirusnye preparaty rastitel'nogo proishozhdenija. Fundamental'nye issledovaniya (Rossija). 2013. № 6. S. 1141-1146.
- 6 Shnejder M.A. Metodicheskie voprosy nauchnoj razrabotki protivovirusnyh sredstv. Minsk: Nauka, 1977. 150 s.
- 7 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing New castledisease virus. Avian Dis. 1970. Vol. 14. P. 542-549.
- 8 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. Amer. J. Hyg. 1938. Vol. 27. P. 493-497.
- 9 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskij i medicinskih issledovaniyah. M., 1975. 295 s.
- 10 Muzychkina R.A., Korul'kin D.Ju., Abilov Zh.A. Osnovy himii prirodnyh soedinenij. Almaty: Қазақ universiteti, 2010. 564 s.
- 11 Muzychkina R.K., Korul'kin D.Ju., Abilov Zh.A. Kachestvennyj i kolichestvennyj analiz osnovnyh grupp BAV v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i fitopreparatah. Almaty: Қазақ universiteti, 2004. 288 s.

## Резюме

*А. П. Богоявленский, С. М. Адекенов, В. Э. Березин*

(РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы, Қазақстан)

ӘРТҮРЛІ КУМАРИНДІ МОДЕЛІНДЕГІ ВИРУС ҒЫНТАЛАНДЫРУШЫ  
БЕЛСЕНДІЛІГІН САЛЫСТЫРМАЛЫ ТҮРДЕ ЗЕРТТЕУ

Жаңа вирусқа қарсы препараттарды іздеу, тұмау вирусының репродукциялық икемді басым вирустық химиотерапияда өзекті тапсырмасы болып саналады. Перспективалы топтың бір бөлігі вирусқа қарсы терапия нуклеозитті емес вирустың полимеразы белсенділігін ғынталандырушысы өсімдіктерді кумариндер тобына жатқызуға болады. Тұмау вирусының үлгісіндегі кумариндер және фурукумариндердің кейбір өкілдерін вирусқа қарсы белсенділігінің зерттеуі жүргізілді. Азот құрамдас және скополетин өндірістік ореозолонасы тиімді басым тұмау вирусының репликациясына ішкі клеткалық репродукциясы кезең бойынша көрсетілді. Кумариндер белсенділігі коммерциялық препарат ремантадинге қарағанда белсенділігі жоғары. Алынған мәліметтер бойынша негізгі құрылған жаңа топтар химиопрепараттар қабілетті тұмау вирусының репликациясын тиімді блокадалайды

**Тірек сөздер:** кумариндер, фурукумариндер, скополетин, ореозолонның азот құрамдас туындылары, вирулицидті белсенділік, вирусқа қарсы белсендік.

**Summary**

*A. P. Bogoyavlenskiy, S. M. Adekenov, V. E. Berezin*

(RSE «Institute of Microbiology and Virology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan)

COMPARATIVE STUDY OF VIRUSINHIBITORY ACTIVITY OF SOME COUMARINS  
ON THE MODEL OF INFLUENZA VIRUS

Search new antiviral drugs that can effectively inhibit influenza virus replication is one of the urgent problems of viral chemotherapy. One of the perspective groups of antiviral therapy is non-nucleoside inhibitors of the polymerase activity of the virus, which include plant coumarins. The investigations of the antiviral activity of some representatives of coumarins and furocoumarins on the model of the influenza virus are conducted. It is shown that scopoletin and nitrogen-containing derivative oreozolona able to effectively suppress the replication of influenza virus on intracellular stages of reproduction. The activity of the investigated coumarins have greater activity than commercial drug rimantadine. Obtained data can provide a basis for creating a new group of chemotherapeutic agents can effectively block the replication of influenza virus.

**Keywords:** coumarins, furocoumarins, scopoletin, nitrogen-containing derived orazalinov-culicidae activity, viringia activity, antiviral activity.

*Поступила 10.03.2014г.*