

*М. С. АЛЕКСЮК, А. П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, И. А. ЗАЙЦЕВА, П. Г. АЛЕКСЮК,
Н. С. СОКОЛОВА, А. С. ТУРМАГАМБЕТОВА, В. Э. БЕРЕЗИН*

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан.
E-mail: virprot@mail.ru)

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Аннотация. Грипп по-прежнему остается одним из самых распространенных вирусных заболеваний человека. Каждый год в период эпидемии, более 10% мирового населения подвержены риску вирусной инфекции. В связи с этим, разработка новых профилактических и лечебных противовирусных растительных препаратов является одной из основных задач в современной вирусологии.

Целью данных исследований было сравнительное изучение способности производных салициловой кислоты ингибировать репродукцию вируса гриппа.

В результате исследований было показано, что максимальная противовирусная активность обнаружена в присутствии ацетил или сульфогруппы, но добавление аминогруппы салицилатов снижает активность. Кроме того, исследования показали, что салицилаты можно рассматривать в качестве перспективного источника для новых эффективных противовирусных агентов.

Ключевые слова: грипп, ингибиторы нейраминидазы, салицилаты, противовирусная активность.

Тірек сөздер: тұмау, ингибиторлар, нейраминидазалар, салицилаттар, вирусқа қарсы белсенділік.

Keywords: influenza, neuraminidase inhibitors, salicylates, antiviral activity.

Введение. На сегодняшний день грипп остается одним из самых массовых вирусных заболеваний человека. Ежегодно в эпидемический период более 10% населения земного шара подвергаются риску вирусной инфекции. При этом каждый второй взрослый человек успевает заболеть дважды (весной и осенью). Грипп ежегодно становится причиной гибели более 200 тыс. человек. При этом наибольшую долю среди заболевших составляют люди от 5 до 25 и более 60 лет [1]. Все

это заставляет службы здравоохранения вкладывать серьезные средства в разработку новых средств профилактики и терапии гриппа. Наиболее эффективным методом борьбы с вирусной инфекцией является применение этиотропных препаратов, которые можно условно разделить на три группы: 1) средства, подавляющие репродукцию вируса на разных стадиях цикла размножения, 2) средства, проявляющие способность подавлять развитие вируса на стадии «раздевания», 3) средства, способные подавлять нейраминидазную активность вируса [2]. Наиболее популярными средствами этиотропной терапии гриппа в XXI веке стали так называемые ингибиторы нейраминидазной активности. Это обусловлено рядом причин, одной из которых является расшифровка механизма действия подобных препаратов. Установлено, что структура активного центра нейраминидазы консервативна не только между подтипами, но и типами фермента, что указывает на эволюционно-отлаженную систему его функционирования. Активный центр фермента сформирован функциональными остатками Arg118, Asp151, Arg152, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 и Tyr406, а также структурными остатками Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp (или Asn у N 7 и N 9) 198, Ile222, Glu227, Glu277, Asp293 и Glu425 [3–6]. Расшифровка механизма гидролиза олигосахарида, содержащего нейраминовою кислоту за счет формирования оксокарбониевого иона позволило разработать ингибиторы фермента вируса, успешно применяемые в медицине под названием занамивир и тамифлю [2].

Успех этих препаратов инициировал цикл работ по дизайну новых ингибиторов нейраминидазы. Показано, что основным элементом структуры нового класса ингибиторов (без кислородного атома в цикле) являются шести- или пятичленные циклы, способные в той или иной степени повторить пространственную структуру соединения, участвующего в ферментативном процессе. Проблема использования подобных соединений состоит в том, что ингибиторы нейраминидазы, как правило, не снижают инфекционность вируса, а только препятствуют его дальнейшему распространению, что может приводить к различного рода осложнениям при проведении подобных терапевтических мероприятий. Поэтому дизайн подобных соединений должен быть сконцентрирован не только на возможности подавления ферментативной активности вируса, но и способности ингибиторов нейраминидазы подавлять инфекционную активность вируса.

Целью наших исследований являлось сравнительное изучение противовирусной активности некоторых производных салициловой кислоты. Выбор препаратов был обусловлен тем, что производные салициловой кислоты широко применяются в медицине, как антисептические, жаропонижающие, противоревматические, противовоспалительные и болеутоляющие средства. Кроме того, ранее было показано, что салициловая кислота и ее производные способны эффективно подавлять ферментативную активность вируса гриппа разной антигенной структуры [7].

Материалы и методы исследования

В работе были использованы следующие препараты: салициловая, ацетилсалициловая, сульфосалициловая и парааминосалициловая кислота (таблица 1).

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

Для выращивания вирусов использовали дневные куриные эмбрионы, полученные от птицефабрик АО «Алгел Агро» (Алматы, Казахстан).

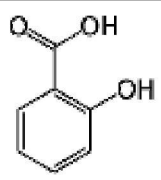
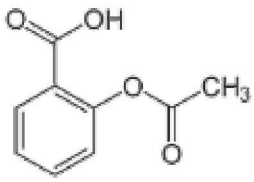
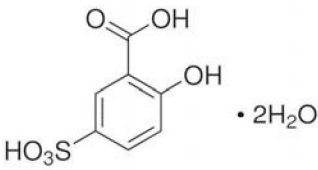
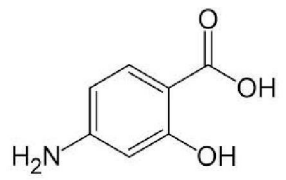
Исследования проводили с вирусом гриппа, штаммы A/Almaty/8/98 (H3N2) и A/FPV/Rostock/34 (H7N1).

Вирусы выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов в течение 24-36 часов при 37°C.

Определение противовирусных свойств выполняли методом «скрининг-тест», рассчитанным на подавление репродукции вируса в количестве 100 ЭИД₅₀ заданными дозами лекарственных препаратов. Критерием противовирусного действия считали снижение инфекционного титра вируса при обработке антивирусным средством в сравнении с контролем [8, 9].

Вирулицидную активность исследуемых препаратов определяли путем обработки вируссодержащего материала лекарственными препаратами в различных дозах при 37°C в течение 30 мин с последующим титрованием инфекционности обработанного материала. За реальное вирулицидное

Таблица 1 – Препараты, исследованные на наличие противовирусных свойств

№	Название соединения	Структурная формула
1	Салициловая кислота	
2	Ацетилсалициловая кислота	
3	Сульфосалициловая кислота	
4	Парааминосалициловая кислота	

действие принимали разность между инфекционным титром вируса в пробе до и после экспозиции с исследуемым препаратом [9].

Инфекционный титр вирусов на куриных эмбрионах определяли путем десятикратных разведений в соответствии с методом Reed и Muench [10].

Математическая обработка результатов проводилась стандартными методами [11].

Результаты и обсуждение исследования

Изучение противовирусных свойств производных салициловой кислоты было обусловлено предварительным изучением способности этих соединений подавлять ферментативную активность вируса гриппа. Было установлено, что уже в дозе 1 мг/кг производные салициловой кислоты способны подавлять 50% ферментативной активности вируса.

Для сравнительного анализа противовирусной активности производных салициловой кислоты были изучены их вирулицидные свойства в дозе 20 мг/кг (рисунок 1). Установлено, что наличие боковых заместителей молекул салициловой кислоты в значительной степени влияет на способность препаратов подавлять инфекционность вируса гриппа. Так, если салициловая кислота была способна подавлять инфекционность вируса гриппа на 0,5 lg ЭИД50, то добавление остатка серной кислоты в пара-положении к гидроксильному остатку увеличивало вирулицидную способность препарата в несколько раз и была на уровне 4 lg ЭИД50, что соответствовало снижению интактных вирионов более, чем на 99%. Замена гидроксильного радикала на ацетатный также приводила к резкому увеличению способности препарата подавлять инфекционность вируса гриппа. Добавление аминогруппы в пара-положении к гидроксильному радикалу салициловой кислоты приводило к подавлению вирулицидной активности препарата. Сопоставление вирулицидной активности исследуемых препаратов с коммерческим препаратом тамифлю показывает, что наличие в структуре препаратов атома азота препятствует проявлению способности подавлять инфекционность вируса гриппа.

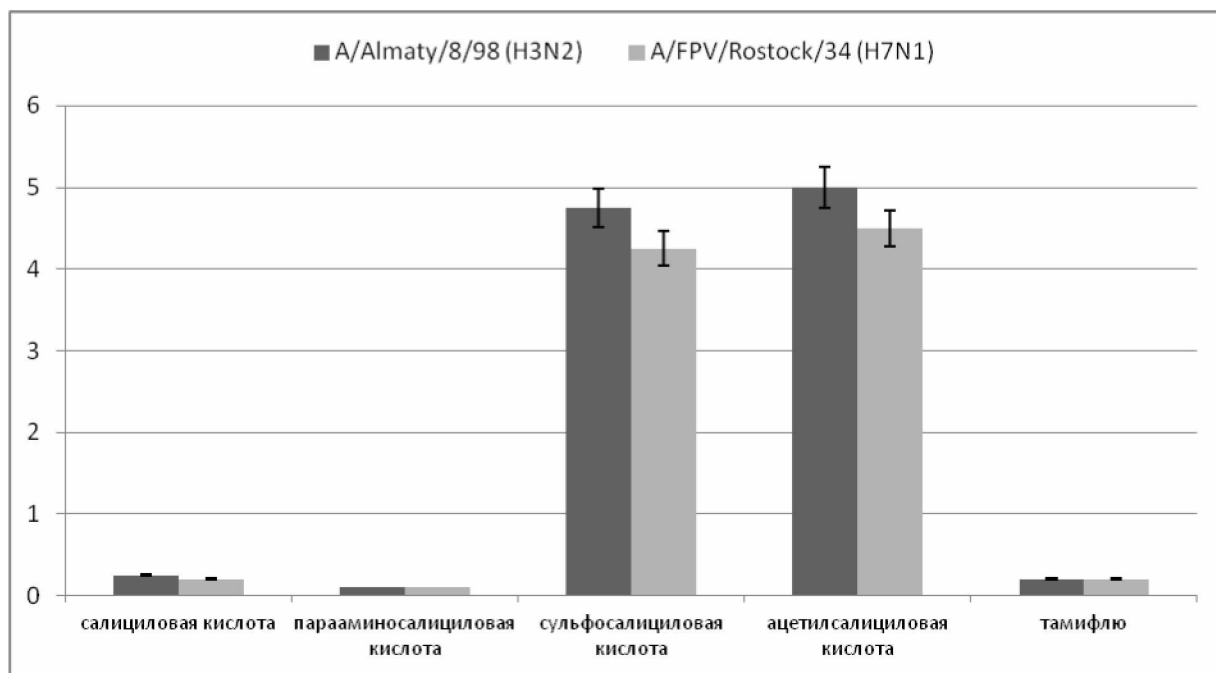


Рисунок 1 – Вирулицидная активность производных салициловой кислоты.

Примечание. Вирусы были обработаны препаратами в дозе 20 мг/кг в течение 30 мин при 37°C; результаты представлены в виде разницы десятичных логарифмов разведения между титром вируса до обработки препаратом и после; различия в подавлении инфекционности вирусов достоверны ($P < 0,05$). По оси ординат дана степень снижения титра инфекционности вируса в десятичных логарифмах разведения.

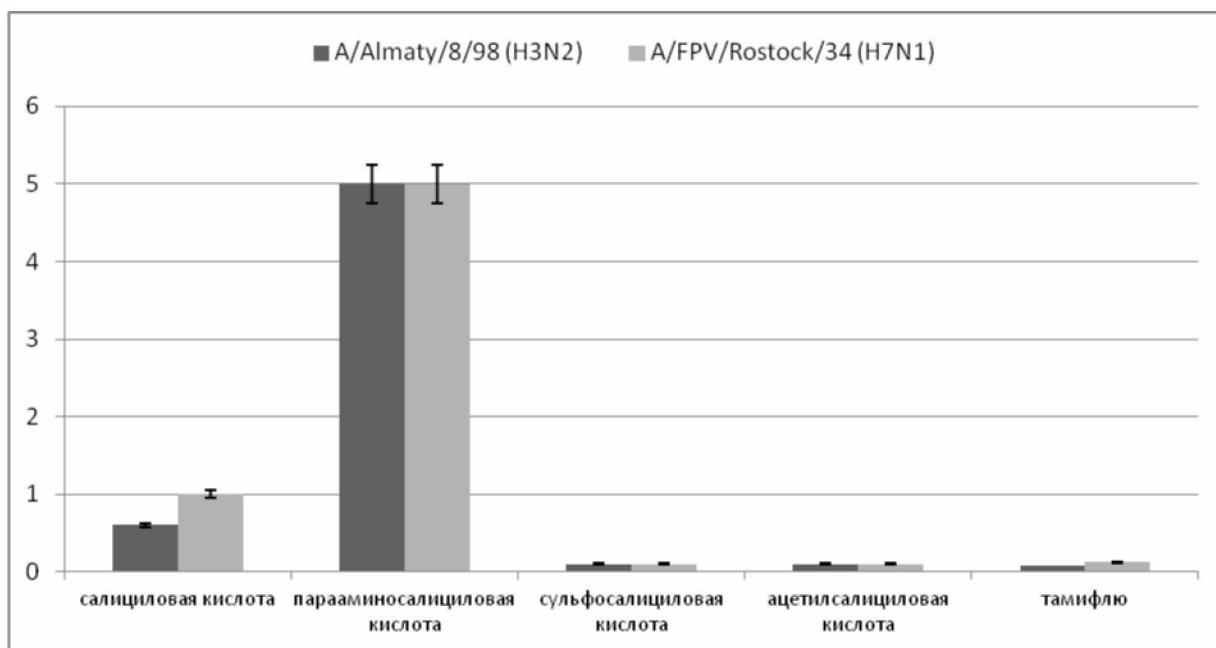


Рисунок 2 – Сравнительная вирусингибирующая активность производных салициловой кислоты.

Примечание. По оси доза препарата, подавляющая 50% репродукции 100 инфекционных доз вируса.

Также была изучена вирусингибирующая активность производных салициловой кислоты. Показано, что способность блокировать репродукцию 100 инфекционных доз вируса в значительной степени зависит от структуры используемого препарата (рисунок 2). Показано, что наличие боковых заместителей играет существенную роль в проявлении противовирусной активности производных

водных салициловой кислоты, способной эффективно подавлять репродукцию вируса гриппа в дозе от 0,6 мг на куриный эмбрион. Так, добавление аминогруппы в пареположении снижает противовирусную активность не менее, чем в 5 раз, а добавление сульфогруппы увеличивает противовирусные свойства препарата в 5 раз. Замена гидроксильной группы на ацетатную также увеличивает противовирусные свойства препарата.

Заключение. В проведенных исследованиях было установлено, что дизайн новых препаратов, подавляющих ферментативную активность вируса гриппа, должен учитывать разные стороны противовирусной активности соединений. Высокая способность подавлять ферментативную активность вируса, как правило, сопровождается высокими вирусингибирующими свойствами, но не всегда сочетается со способностью препаратов подавлять инфекционность вируса. Добавление дополнительных заместителей, находящихся на максимальном удалении от гидроксильной группы салициловой кислоты, может существенно изменять наличие противовирусной активности препарата. Исследованные препараты производных салициловой кислоты, широко применяемых в медицинской практике в качестве антисептических, жаропонижающих, противоревматических, противовоспалительных и болеутоляющих средств, могут рассматриваться как перспективный источник для дизайна и получения новых эффективных противовирусных средств.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Moriarty L F, Omer S B. Infants and the seasonal influenzavaccine: A global perspective on safety, effectiveness, and alternate forms of protection // *Hum VaccinImmunother.* – 2014. – Vol. 10, N 9. – P. 10-12.
- 2 von Itzstein M., Wu W.-Y., Kok G.B., Pegg M.S., Dyason J.C., Jin B., Phan T.V., Smythe M.L., White H.F., Oliver S.W., Colman P.M., Varghese J.N., Ryan D.M., Woods J.M., Bethel R.C., Hotham V.J., Cameron J.M., Penn C.R. Rational design of potent sialidasebased inhibitors of influenza virus replication. // *Nature.* – 1993. – 363: 418-423.
- 3 Varghese J.N., Colman P.M. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 1991. – 221: 473-486.
- 4 Varghese J.N., Colman P.M., van Donkelaar A., Blick T.J., Sharasrabudhi A., McKimm-Breschkin J.L. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases // *Biochem.* 1997. – 94: 11808-11812.
- 5 Takahashi T., Suzuki T., Hidari K.I-P.J., Miyamoto D., Suzuki Y. A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases // *FEBS Lett.* – 2003. – 543: 71-75.
- 6 Штыря Ю.А., Мочалова Л.В., Бовин Н.В. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция // *Acta Naturae.* – 2009. – № 2. – С. 28-34.
- 7 Соколова Н.С., Турмагамбетова А.С., Зайцева И.А., Алексюк М.С., Анаркулова Э.И., Аканова К.С., Молдаханов Е.С., Богоявленский А.П., Березин В.Э. Соединения с циклогексановым углеродным скелетом как ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа // *Вестник КазНУ. Серия биол.* – 2013. – № 3/2(59). – С. 425-426.
- 8 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus // *AvianDis.* – 1970. – Vol. 14. – P. 542-549.
- 9 Шнейдер М.А. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. Минск: Наука, 1977. – С. 150.
- 10 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Amer. J. Hyg.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- 11 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М., 1975. – С. 295.

REFERENCES

- 1 Moriarty L F, Omer S B. Infants and the seasonal influenzavaccine: A global perspective on safety, effectiveness, and alternate forms of protection. *Hum VaccinImmunother.* 2014. Vol. 10, N 9. P. 10-12.
- 2 von Itzstein M., Wu W.-Y., Kok G.B., Pegg M.S., Dyason J.C., Jin B., Phan T.V., Smythe M.L., White H.F., Oliver S.W., Colman P.M., Varghese J.N., Ryan D.M., Woods J.M., Bethel R.C., Hotham V.J., Cameron J.M., Penn C.R. Rational design of potent sialidasebased inhibitors of influenza virus replication. *Nature.* 1993. 363: 418-423.
- 3 Varghese J.N., Colman P.M. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1991. 221: 473-486.
- 4 Varghese J.N., Colman P.M., van Donkelaar A., Blick T.J., Sharasrabudhi A., McKimm-Breschkin J.L. Structural evidence for a second sialic acid binding site in avian influenza virus neuraminidases. *Biochem.* 1997. 94: 11808-11812.
- 5 Takahashi T., Suzuki T., Hidari K.I-P.J., Miyamoto D., Suzuki Y. A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases. *FEBS Lett.* 2003. 543: 71-75.
- 6 Shtyrja Ju.A., Mochalova L.V., Bovin N.V. Nejraminidaza virusa grippa: struktura I funkcija. *Acta Naturae.* 2009. N 2. S. 28-34 (in Russ)
- 7 Sokolova N.S., Turmagambetova A.S., Zajceva I.A., Aleksjuk M.S., Anarkulova Je.I., Akanova K.S., Moldahanov E.S., Bogojavlenskij A.P., Berezin V.Je. Soedinenija s ciklogeksanovym uglerodnym skeletom kak ingibitory nejraminidazy virusa grippa. *Vestnik KazNU. Serija biol.* 2013. N 3/2(59). S. 425-426 (in Russ)
- 8 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus. *AvianDis.* 1970. Vol. 14. P. 542-549.
- 9 Shnejder M.A. Metodicheskie voprosy nauchnoj razrabotki protivovirusnyh sredstv. *Minsk: Nauka,* 1977. S. 150. (in Russ)
- 10 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 1938. Vol. 27. P. 493-497.
- 11 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. *M.,* 1975. S. 295. (in Russ)

Резюме

*М. С. Алексюк, А. П. Богоявленский, И. А. Зайцева, П. Г. Алексюк,
Н. С. Соколова, А. С. Тұрмагамбетова, В. Э. Березин*

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

ТУЫНДЫ САЛИЦИЛ ҚЫШҚЫЛЫН ВИРУСҚА ҚАРСЫ БЕЛСЕНДІЛІКТЕРІН САЛЫСТЫРМАЛЫ ЗЕРТТЕУ

Тұмау адамдар арасында бұрынғыша ең көп таралған вирустық аурулар ретінде қалып отыр. Жыл сайын эпидемия кезеңінде әлемнің 10%-дан астам тұрғыны вирустық инфекцияға душар болады. Осыған байланысты вирустың алдын алуға және вирусқа қарсы емдік жаңа өсімдіктес препараттарын әзірлеп шығару заманауи вирусологияда бірден бір негізгі мақсат болып отыр. Осы зерттеудің мақсаты тұмау вирусының репродукциясын туынды салицил қышқылының ингибиторлық қабілеттіліктерімен салыстырмалы зерттеу еді.

Зерттеу нәтижесі вирусқа қарсы жоғарғы белсенділік ацетилдің немесе сульфотоптар қатысуында білінген, бірақ аминотоптардың қосылуы салицилаттардың белсенділігін төмендетінін көрсетті. Сонымен қатар, зерттеу салицилаттарды вирусқа қарсы жаңа тиімді агенттер үшін болашағы зор препарат ретінде қарастыруға болатынын көрсетті.

Тірек сөздер: тұмау, ингибиторлар, нейраминидазалар, салицилаттар, вирусқа қарсы белсенділік.

Summary

*M. S. Alexyuk, A. P. Bogoyavlenskiy, I. A. Zaitseva, P. G. Alexyuk,
N. S. Sokolova, A. S. Turmagambetova, V. E. Berezin*

(«Institute of microbiology and virology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan)

COMPARATIVE STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF SALICYLIC ACID DERIVATIVES

Influenza is still one of the most widespread viral diseases of human. Every year in the epidemic period, more than 10% of the global population are at risk of viral infection. In this regard, the development of preventive and therapeutic antiviral plant preparations is one of the major practical goal in modern virology.

The purpose of these researches was a comparative study of the ability of salicylic acid derivatives to inhibit influenza virus reproduction.

As a result of studies, it was found that maximal antiviral activity was detected in the presence of the acetyl or sulfo group, but adding of amino group salicylates decreases the activity. Thus, it was shown that the addition of further substituents at the para position to the hydroxyl group of salicylic acid can significantly change the availability of the antiviral activity of the preparation. Also, studies have shown that salicylates can be considered as a promising source for new effective antiviral agents.

Keywords: influenza, neuraminidase inhibitors, salicylates, antiviral activity.

Поступила 10.0.2014 г.