

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Федорова Виктория Александровна

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ
ЦИТИЗИНА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА И ПАРАГРИППА

03.02.02 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д-р биол. наук, Зарубаев В.В.

Санкт-Петербург

2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Вирус гриппа.....	9
1.1.1. Таксономия и молекулярная структура вируса гриппа	9
1.1.2. Морфология и структура вириона вируса гриппа.....	12
1.1.3. Вирусные белки и организация вирусного генома	13
1.1.4. Жизненный цикл вируса гриппа	17
1.1.5. Патогенез гриппозной инфекции.....	19
1.1.6. Вакцинопрофилактика и химиотерапия гриппозной инфекции	22
1.1.6.1. Вакцинопрофилактика гриппа	22
1.1.6.2. Химиотерапия гриппозной инфекции	22
1.2. Вирусы парагриппа	29
1.2.1. Вирусы парагриппа, систематика	29
1.2.2. Морфология и структура вириона парагриппа.....	29
1.2.3. Структурные белки и жизненный цикл парамиксовирусов	30
1.2.4. Патогенез парагриппозной инфекции	34
1.2.5. Терапия парагриппозной инфекции	37
1.3. Цитизин и его свойства.....	40
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Исследуемые вещества	42
2.2. Культуры клеток.....	42
2.3. Среды.....	42
2.4. Вирусы.....	42
2.5. Исследование токсичности синтетических производных цитизина	43
2.6. Подготовка вируса	43
2.7. Определение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа	44
2.8. Определение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа 3 типа	44
2.9. Изучение стадии репродукции вируса гриппа – мишени действия синтетических производных цитизина	45
2.10. Получение ультратонких срезов для электронномикроскопического исследования влияния производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции <i>in vitro</i>	45
2.11. Определение ингибирования активности нейраминидазы флюоресцентным методом.....	46

2.12.	Получение устойчивых к синтетическим производным цитизина штаммов вирусов гриппа и парагриппа	47
2.13.	Исследование организации и полимеризации актина и организации микротрубочек в клетках методом конфокальной микроскопии	47
2.14.	Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина <i>in vivo</i> на модели гриппозной пневмонии у белых мышей	48
2.15.	Статистическая обработка полученных данных	49
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ	50
3.1.	Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина.....	50
3.1.1.	Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса гриппа <i>in vitro</i>	50
3.1.2.	Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа человека третьего типа <i>in vitro</i>	67
3.2.	Изучение спектра активности синтетических производных цитизина	82
3.3.	Изучение стадии репродукции вируса гриппа – мишени действия производных цитизина	85
3.4.	Исследование влияния синтетических производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции <i>in vitro</i>	86
3.5.	Исследование ингибирующей активности синтетических производных цитизина в отношении нейраминидазы вируса гриппа.....	87
3.6.	Селекция вирусов гриппа и парагриппа, устойчивых к синтетическим производным цитизина 88	
3.7.	Исследование влияния синтетических производных цитизина на организацию и полимеризацию актина и организацию микротрубочек в клетках.....	90
3.8.	Исследование активности синтетических производных цитизина на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей.....	93
	ОБСУЖДЕНИЕ	96
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
	ВЫВОДЫ	106
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	107
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	109
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Вирусы парагриппа человека (ВПГЧ) известны, прежде всего, как возбудители респираторной инфекции у людей всех возрастных групп. У взрослых эти заболевания протекают легче и по клинической симптоматике практически неотличимы от других респираторных инфекций. ВПГЧ чаще поражают клетки гортани, и заболевание протекает с явлениями ларингита (сухой болезненный кашель, охрипший голос). У детей заболевания, вызываемые ВПГЧ, протекают более тяжело из-за сильной интоксикации. ВПГЧ 3 типа (ВПГЧ-3) является причиной 60-70% заболеваний нижних отделов дыхательных путей (бронхиолиты, пневмонии) у детей первых полутора лет жизни. Наиболее частыми осложнениями при парагриппозной инфекции является симптом «ложного крупа», возникающий в результате отека слизистой оболочки гортани, и вирус-бактериальная пневмония как следствие присоединения вторичной бактериальной флоры. Кроме того, на фоне парагриппозной инфекции у пациентов отмечается обострение хронических заболеваний.

Грипп в настоящее время является одним из самых распространенных заболеваний в мире, вызывая эпидемии и пандемии, которые наносят экономический ущерб и приводят к человеческим жертвам. В отличие от ВПГЧ, вирус гриппа поражает преимущественно верхние отделы дыхательных путей. Продукты распада пораженных клеток попадают в кровь, вызывая сильную интоксикацию и повышение температуры тела. Повышение проницаемости сосудов в ходе инфекционного процесса может стать причиной патологических изменений в различных органах: точечных кровоизлияний в трахее, бронхах, а иногда и отека мозга с летальным исходом. Восприимчивость к гриппу высокая, и им болеют люди всех возрастных групп. В результате перенесенного заболевания приобретается типоспецифический иммунитет, неспособный защитить от повторной инфекции штаммами вируса гриппа с новыми антигенными свойствами. В настоящее время доступно всего несколько противогриппозных препаратов, одобренных ВОЗ: ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир и занамивир), блокаторы М2 канала (амантадин и ремантадин) и недавно одобренный балоксавир марбоксил, селективный ингибитор эндонуклеазы. В то же время высокая вариабельность вируса гриппа позволяет ему быстро вырабатывать устойчивость к имеющимся препаратам, например, почти все эпидемически актуальные штаммы вируса гриппа резистентны к блокаторам М2 каналов. В 2019 г. зафиксированы случаи резистентности к новому препарату - балоксавиру марбоксилу, допущенного к клиническому применению в 2018 г. Именно поэтому существует необходимость поиска новых соединений, которые были бы эффективны в отношении вирусов, устойчивых к действию уже имеющихся препаратов.

В отличие от гриппа, разрешенных противовирусных препаратов для лечения парагриппозной инфекции в настоящее время нет. Препарат «Рибавирин», демонстрирующий активность *in vitro* в отношении большинства РНК-геномных вирусов, в том числе и парамиксовирусов, обладает рядом побочных эффектов. Таким образом, существует необходимость поиска новых соединений, которые были бы менее опасны и более эффективны в отношении этих вирусов.

Степень разработанности темы

В настоящее время ведется активный поиск и разработка соединений, обладающих противогриппозной активностью. Широко используемые в клинической практике препараты направлены на ингибирование только нескольких белков вируса гриппа таких как, нейраминидаза (осельтамивир, занамивир, ланинамивир, перамивир), М2-протонный канал (амантадин, ремантадин), РНК-зависимая-РНК-полимераза (фавипиравир, рибавирин). Однако в ходе последних исследований были обнаружены препараты, воздействующие на другие вирусные белки: нуклеозин, ингибирующий NP [10], соединение D715-2441 (1,3- дигидрокси-6-бензо[с]хромен) –ингибитор кэп-связывающей активности субъединицы PB2 полимеразного комплекса [100], соединение MBX2546, ингибитор HA [18]. Успешно прошел клинические испытания ингибитор кэп-связывающей активности субъединицы PB2 полимеразного комплекса препарат пимодивир (ранее известный, как JNJ-63623872 и VX-787) и ингибитор эндонуклеазы PA препарат балоксавира марбоксил (ранее соединение S- 033188) [70].

Если говорить о терапии парагриппозной инфекции, то на настоящий момент для терапии нет лицензированных химиопрепаратов. Однако, известно, что активностью *in vitro* в отношении вируса парагриппа человека 3 типа обладает фавипиравир – ингибитор РНК-зависимой-РНК-полимеразы [84]. Более перспективными в отношении этого вируса в ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo* оказались ингибиторы гемагглютинин-нейраминидазы – рекомбинантный белок DAS 181 [85] и соединения BCX2798 и BCX2855 [7].

Цитизин – хинолизидиновый алкалоид, содержащийся в семенах и частях растений семейства Бобовые. В медицине цитизин и цитизинсодержащие растения использовались в качестве диуретиков и дыхательных analeптиков. В настоящее время цитизин входит в состав средств для борьбы с табакозависимостью за счет того, что его молекула обладает высокой аффинностью к никотиновым и ацетилхолиновым рецепторам в ЦНС и в периферических ганглиях. Кроме того, цитизин и его производные, согласно многочисленным исследованиям, могут связываться еще с адреналиновыми, дофаминовыми, серотониновыми, гистаминовыми и мускариновыми рецепторами. Поэтому сейчас широко изучаются возможные противовоспалительные, спазмолитические, антиаритмические, противовирусные и нейротропные свойства этих молекул. Гипотеза об активности цитизина в отношении

респираторных вирусов человека - вирусов гриппа и парагриппа на сегодняшний день не высказывалась в научных публикациях.

Цель исследования: Характеристика активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа человека.

Задачи исследования:

1. Определить цитотоксичность синтетических производных цитизина на культурах клеток MDCK (клетки почки собаки) и MA-104 (клетки почки макаки резус).

2. Оценить противовирусную активность синтетических производных цитизина в опытах *in vitro* на культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А (H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N1) и вирусов гриппа В.

3. Оценить противовирусную активность синтетических производных цитизина в опытах *in vitro* на культуре клеток MA-104 в отношении вируса парагриппа человека 3 типа.

4. На основании полученных результатов провести анализ «структура-активность», чтобы оценить роль функциональных групп в противовирусном эффекте синтетических производных цитизина.

5. Исследовать наиболее активные синтетические производные цитизина в опытах *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей.

6. Для активных синтетических производных цитизина определить стадию вирусной репродукции, на которой они ингибируют размножение вируса гриппа, в опытах на «время добавления».

7. Провести последовательное пассирование вируса гриппа и ВПГЧ-3 в присутствии синтетических производных цитизина. Оценить уровень резистентности вирусного потомства.

Научная новизна

Впервые охарактеризованы цитотоксичность и вирусингибирующая активность новых синтетических производных цитизина в отношении респираторных вирусов человека: вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2, H5N2, вирусов гриппа В линий В/Ямагата и В/Виктория и вируса парагриппа человека 3 типа. Показана зависимость противовирусной активности соединений от их химической структуры.

Впервые было изучено влияние синтетических производных цитизина на разные стадии репродукции вируса гриппа.

Впервые показано что синтетические производные цитизина не проявляют ингибирующую активность в отношении нейраминидазы вируса гриппа А.

Впервые показано, что синтетические производные цитизина обладают умеренной противовирусной активностью *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей.

Впервые изучена возможность селекции штаммов вируса гриппа и ВПГЧЗ, резистентных к синтетическим производным цитизина.

Теоретическая и практическая значимость

Настоящая работа представляет собой исследование прикладной направленности. Полученные данные позволят создать новые лекарственные препараты, обладающие широким спектром действия в отношении респираторных вирусов человека.

Методология и методы исследования

В работе использован широкий набор методик, включая вирусологические, биохимические, иммунологические, морфологические и электронно-микроскопические методы. Цитотоксические свойства химических соединений изучены при помощи метилтетразолиевого теста, противовирусная их активность оценена в системе *in vitro* в культурах клеток MDCK и MA-104 и *in vivo* - в опытах на животных на модели летальной гриппозной пневмонии. Данные о противовирусной активности соединений получены при помощи анализа динамики смертности животных, а также при помощи оценки инфекционного титра вируса в ткани лёгких. Анализ морфогенеза вируса гриппа на ультраструктурном уровне в присутствии изучаемых веществ проведён при помощи электронно-микроскопического анализа. Анализ распределения компонентов цитоскелета в инфицированных клетках проведен при помощи конфокальной микроскопии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтетические производные цитизина обладают противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H5N2 и вирусов гриппа В линий В/Виктория и В/Ямагата, а также в отношении вируса парагриппа человека 3 типа. Соединения-лидеры этой группы проявляют умеренную противогриппозную активность *in vivo*.

2. Синтетические производные цитизина проявляют максимальную противовирусную активность на поздних стадиях репродукции вируса гриппа (6-10 ч после инфицирования). Последовательное серийное пассирование вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) и вируса парагриппа человека 3 типа в присутствии синтетических производных цитизина не приводит к возникновению резистентности. Возможной мишенью для действия синтетических производных цитизина являются белки внутриклеточного транспорта - F-актин и тубулин.

Личный вклад автора

Автор лично принимал участие в проведении всех этапов лабораторных исследований: планирование опытов, отбор материалов, проведение первичного скрининга противовирусной активности соединений *in vitro*, исследование спектра активности соединений, эксперименты на

«время добавления», а также опыты *in vivo*. Автором лично проведена обработка, анализ и обобщение полученных материалов с последующей их публикацией на различных конференциях. Синтез производных цитизина проведен сотрудниками института органической химии УНЦ РАН, г. Уфа. Приготовление ультратонких срезов для электронномикроскопического исследования, препаратов для изучения динамики структур цитоскелета клетки, а также конфокальная лазерная сканирующая микроскопия проведены сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность проведенных исследований подтверждена адекватным статистическим анализом данных. Материалы диссертации доложены на 3 отечественных и международных конференциях: 2nd Russian Conference on Medical Chemistry, Novosibirsk, Russia, July 5-10, 2015, International conference “Trends in Influenza Research”, Saint-Petersburg, Russia, 18-20 September, 2017, 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, Kazan, Russia, September 28 - October 3, 2017.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ: 2 статьи в российских журналах, входящих в перечень, рекомендованный ВАК, 3 в других изданиях, 2 из которых в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (библиографические базы SCOPUS, Pub Med) и в сборниках материалов 3 конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, перечня материалов и методов, изложения результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста и проиллюстрирована 23 таблицами и 29 рисунками. Список цитируемой литературы включает 186 источника, из них 3 в отечественных и 183 в зарубежных изданиях.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Вирус гриппа

1.1.1. Таксономия и молекулярная структура вируса гриппа

Вирусы рода *Influenzavirus* относятся к семейству *Orthomyxoviridae*. Это семейство включает семь родов: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, *Thogotovirus* (клещевые арбовирусы, инфицирующие позвоночных и беспозвоночных), *Isavirus* (вирус инфекционной анемии лосося) и *Quaranjavirus* [52, 157, 130].

В настоящее время к вирусам рода *Influenzavirus* относятся четыре серотипа вируса гриппа: А, В, С и D. Эти вирусы различаются по структуре генома и группой инфицируемых организмов [52, 157]. Вирусы гриппа А и В сходны по своему строению, однако вирус гриппа А может инфицировать птиц, которые являются его резервуаром, человека и многих млекопитающих, в числе которых свиньи, собаки, кошки, норки, лошади, тюлени [161]. Вирусы гриппа А классифицируются на подтипы на основании антигенных свойств двух поверхностных гликопротеинов - гемагглютинина и нейраминидазы. В настоящее время различают 18 подтипов НА и 11 подтипов NA. Шестнадцать классических подтипов НА вирусов подразделяются на две группы и четыре клады. Первая группа содержит клады Н1 (Н1, Н2, Н5, Н6, Н11, Н13, Н16) и Н9 (Н8, Н9, Н12), а вторая - Н3 (Н3, Н4, Н14) и Н9 (Н7, Н10, Н15) [138]. Девять классических подтипов нейраминидазы классифицируют на три группы: первая содержит N1, N4, N5, N8, вторая - N2, N3, N6, N7, N9, а в третью входят NA вирусов гриппа В [142]. Вирусы гриппа А с новыми подтипами гемагглютинина Н17 и Н18 и нейраминидазы N10 и N11 были обнаружены совсем недавно у летучих мышей [161]. Следует отметить, что не все комбинации гемагглютинина и нейраминидазы формируют вирулентный набор поверхностных гликопротеинов вируса. Так эпидемии гриппа у людей вызывают вирусы гриппа только трех генотипов: Н1N1, Н2N2 и Н3N2. Однако известны случаи, когда вирусы других подтипов - Н5N1, Н7N9, Н7N7, вызывали вспышки так называемого «птичьего гриппа» [161].

Вирусы гриппа В были обнаружены в 1940 году 20 века. Они подразделяются по антигенным свойствам на две различные линии: вирусы, подобные В/Виктория/2/87, и вирусы, подобные В/Ямагата/16/89. Процесс антигенного дрейфа происходит медленно по сравнению с вирусами гриппа А. Вирус поражает только людей. Клиническая картина заболевания такая же, как и при гриппе А. Вирусы гриппа В вызывают локальные вспышки и эпидемии [94].

Вирус гриппа С был выделен во время эпидемии респираторного заболевания в 1947 году и значительно отличается от серотипов А и В по строению и механизму инфицирования. Подобно

вирусу гриппа В, он инфицирует в природных условиях только человека. Он является причиной sporadических заболеваний среди детей [171].

Вирус гриппа D был выделен в США, Мексике, Китае, Японии, Франции и Италии в 2016 году от свиней и крупного рогатого скота. По своей структуре он сходен с вирусами гриппа С [69, 157].

Геном вирусов гриппа А подвержен частым изменениям, что обуславливает их высокую вирулентность. Новые штаммы появляются в результате накопления точечных мутаций, постоянно возникающих в процессе репликации вируса. Этот процесс получил название «антигенный дрейф». Точечные мутации, как правило, возникают в генах гемагглютинина и нейраминидазы вируса, что приводит к появлению новых штаммов вируса, частично устойчивых к иммунитету, сформировавшемуся в результате инфицирования предыдущими штаммами. После нескольких лет дрейфа штамм может сильно отличаться от предшественников, что позволяет ему вызвать заболевание у ранее переболевшего человека. Однако, благодаря частичному иммунитету к новому штамму, заболевание, которое он вызывает, может быть менее серьезно [142, 155].

Более резкие изменения в составе вирусного генома возникают в результате reassortационного процесса (антигенного шифта), который возможен при одновременном заражении клетки двумя различными вирусами гриппа. В результате происходит полная замена одного типа гемагглютинина или нейраминидазы на другой. В результате антигенного шифта также может происходить прямое заражение хозяина вирусом, адаптированным к другому биологическому виду или повторное появление вируса, ранее инфицировавшего вид и прекратившего циркуляцию [176].

Все четыре пандемии гриппа в 20 и 21 веке (1918, 1957, 1968 и 2009 гг.) были вызваны вирусами, возникшими в результате антигенного дрейфа. Первая пандемия 1918 -1919 годов 20 века, получившая название «испанка», была самой драматичной и охватила практически весь мир. Согласно данным, заболело около 35% населения земли и умерло более 40 млн. человек. Эта пандемия была вызвана вирусом, относящимся к подтипу А/Н1N1 [108]. При секвенировании генома данного вируса было показано, что генетические сегменты, которые кодируют два поверхностных белка НА и NA, были получены от вируса гриппа птиц [59].

Вирусы гриппа пандемии 1957 года («азиатский грипп») и 1968 года («гонгконгский грипп») возникли в Юго-Восточной Азии и по своей антигенной специфичности отличались от вирусов гриппа А, которые циркулировали в человеческой популяции ранее [161]. Вирус 1957 года был отнесен к подтипу А/Н2N2, а 1968 года - к А/Н3N2. Эти вирусы возникли в результате reassortации генов вирусов человека и вирусов птиц. Вирус гриппа А подтипа Н2N2 получил гены НА, NA и PB1 от вируса гриппа птиц, а остальные пять – от циркулировавшего тогда в

человеческой популяции вируса A/H1N1 [140, 89]. Вирус гриппа A/ H3N2 получил HA и PB1 от птичьего вируса, а остальные шесть генов – от сезонного вируса гриппа A/H2N2, циркулировавшего в течение 11 лет среди людей [124].

Четвертая пандемия гриппа («Свиной грипп») произошла в 21 веке в 2009 году. Вызвавший ее вирус был отнесен к подтипу A/H1N1 и по своему происхождению значительно отличался от предыдущих пандемических штаммов и возник в результате реассортации генов вирусов человека, птиц и свиней. Этот реассортант получил генные сегменты PB2 и PA от североамериканского вируса свиного гриппа, PB1 от циркулирующего среди людей вируса A/H3N2, HA, NP, NS – от классического вируса гриппа свиней, а NA, M - от европейского вируса свиного гриппа H1N1 [164].

Основным резервуаром вирусов гриппа являются водоплавающие птицы, у которых этот вирус вызывает кишечную инфекцию. На основании степени тяжести заболевания у птиц вирусы делят на высокопатогенные и низкопатогенные. В настоящее время способность вызывать тяжелую форму гриппа у птиц и у людей была обнаружена только у вирусов с H5 и H7 [161].

Инфекция у диких водоплавающих птиц протекает бессимптомно. Вирус легко распространяется в воде и разносится повсеместно при ежегодной миграции птиц. Обычно вирус птичьего гриппа не может напрямую инфицировать млекопитающих, а возникающие редко инфекции распространяются в пределах небольших групп животных. Однако некоторые штаммы могут приспособиться к новым видам и стать причиной эпидемии и пандемии [161].

Вирусы свиного гриппа, выделяемые от свиней наиболее часто принадлежат к генотипам H1N1, H1N2, и H3N2 [161]. В Канаде и Корее был выделен вирус нового генотипа H3N1 [99]. В Канаде от свиней были выделены реассортантные вирусы H1N1, содержащие генетические сегменты классического вируса гриппа свиней и вируса гриппа человека [88]. В Китае от свиней был выделен штамм, полностью адаптированный к заражению человека [183].

Наличие специфических рецепторов лежит в основе избирательности поражения вирусами определенных клеток, тканей и органов. Таким рецептором для вируса гриппа является сиаловая кислота в составе гликопротеинов и гликолипидов клеток дыхательных путей. Существует большое число сиаловых кислот, которые отличаются друг от друга функциональными группами. Разные штаммы вируса гриппа имеют сродство к разным молекулам, что также определяет, какой вид животного может инфицировать этот вирус. Так, вирусы гриппа человека специфически связываются с терминальным остатком сиаловой кислоты, присоединенным α -(2,6) -связью, а вирусы птичьего и конского гриппа распознают сиаловые кислоты с α -2'-3'- типом связи. Вирусы свиного гриппа способны распознавать оба типа связи, и поэтому свиньи считаются «сосудом» для смешивания различных штаммов вирусов

гриппа, в результате чего могут возникать новые реассортантные вирусы, способные преодолевать межвидовой барьер [142].

Вирусы животных нечасто инфицировали человека напрямую, однако наибольшую угрозу для человека с точки зрения медицины представляют вирусы гриппа птиц подтипов H5N1 и H7N9. Так в 1997 году в Гонгконге высокопатогенный вирус птичьего гриппа вызвал крупную эпизоотию среди домашних и диких птиц с 80-90% летальностью. В тот период заболело 18 человек, 6 из которых умерло. Заражение произошло в результате контакта с инфицированной птицей или контаминированными окружающими предметами. В 2004 году вспышки гриппа, вызванного штаммом, H5N1 стали вновь регистрироваться в странах Юго-Восточной Азии с высоким процентом смертности среди больных. Вирус вызывал очень тяжелые клинические формы заболевания с 50% летальным исходом [20]. В 2017 году грипп птиц подтипа H7N9 вызвал крупную вспышку заболевания среди людей в Китае. До 2017 года этот вирус являлся низкопатогенным и вызывал легкую бессимптомную инфекцию. Однако с помощью лабораторных исследований было показано, что некоторые штаммы вируса A/H7N9 приобрели тропизм к рецепторам клеток верхних дыхательных путей, что может обеспечить передачу вируса от человека к человеку. В результате инфекции в 2017 году погибло около 494 человек. [173].

1.1.2. Морфология и структура вириона вируса гриппа

Вирусы гриппа являются оболочечными вирусами. Обычно вирионы имеют сферическую форму от 100 до 200 нм в диаметре, однако иногда встречаются и филаментозные частицы до 20 мкм в длину [161, 46]. Оболочка вирусов гриппа представляет собой липидный бислой мозаичной структуры, содержащий липидные рафты, обогащенные холестерином, и нерафтовые липиды, полученные в результате почкования от плазматической мембраны клеток хозяина [119]. Липидный бислой вируса гриппа А содержит три вирусных трансмембранных белка: HA, NA и M2. Белки HA и NA плотно связаны с липидными рафтами и формируют выступающие над вирусной оболочкой шипы [120, 158]. Соотношение HA и NA на поверхности вирусной частицы варьирует, но обычно составляет 4:1 или 5:1 [52]. Третий белок оболочки, M2, формирует ионные каналы и содержится в количестве 16-20 молекул/вирион [120]. Липидная оболочка частицы вируса гриппа В содержит четыре вирусных белка: HA, NA, NB и BM2, а вирусов гриппа С и D только два: NEF и CM2 [157, 94, 171]. Матриксный слой сформирован M1-белком. Он взаимодействует с цитоплазматическими концами белков оболочки вируса и нуклеокапсидом. Нуклеокапсид представлен спиральными рибонуклеопротеиновыми тяжами, содержащими

вирусную РНК, белок NP, три белка полимеразного комплекса (PB1, PB2 и PA) и минорное количество ядерного экспортного белка (NEP) (рисунок 1) [52].

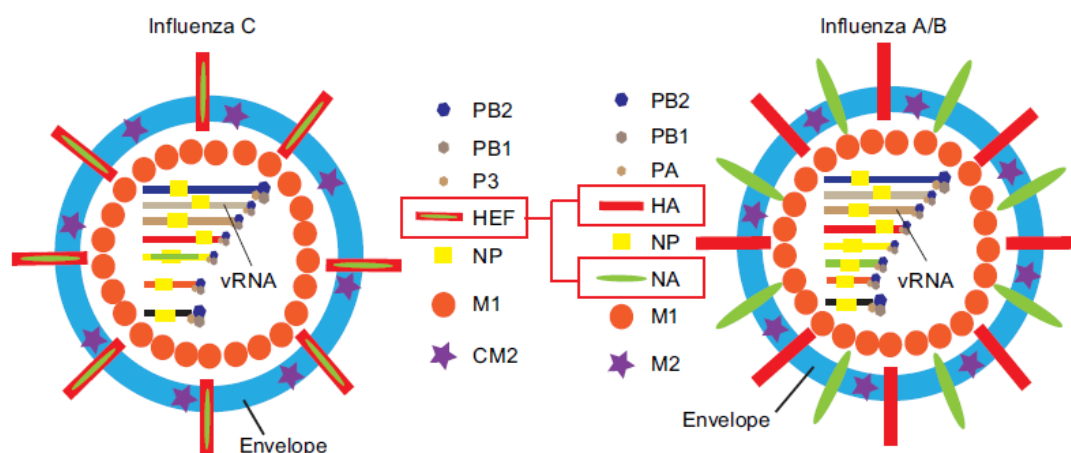


Рисунок 1 - Схема строения частиц вирусов гриппа А, В и С [171]

1.1.3. Вирусные белки и организация вирусного генома

Геном вирусов гриппа представлен однонитевой сегментированной РНК отрицательной полярности. Геномная РНК вирусов гриппа А и В состоит из 8 сегментов, а вирусов гриппа С и D из 7 [46]. На 3'-концах всех сегментов vРНК имеются одинаковые последовательности нуклеотидов (12 н.о. у вируса гриппа А). 5'-концы каждого сегмента также имеют одинаковые последовательности (13 н.о), которые частично комплементарны участкам на 3'-конце [161].

Три первых крупных сегмента РНК вируса гриппа А кодируют три белка полимеразного комплекса: PB2 (сегмент1), PB1 (сегмент2) и PA (сегмент3) [26, 161]. PB1 – белок с молекулярной массой около 88 кДа является каталитическим центром полимеразного комплекса и выполняет функцию РНК – зависимой РНК полимеразы. Этот белок содержит сайты связывания с NP и вирусными геномными РНК и участвует в формировании РНП. PB2 - белок с молекулярной массой 91 кДа обладает кэп-связывающей активностью. Он взаимодействует с 5' – кэп – структурой клеточных мРНК во время транскрипции вирусного генома. PB2, так же как и PB1, участвует в формировании РНП. Третий компонент полимеразного комплекса, белок PA, имеет молекулярный вес около 85 кДа и обладает эндонуклеазной активностью. Он расщепляет клеточные мРНК, кэпированные фрагменты которых затем используются в качестве затравок для синтеза вирусных РНК (vРНК) [101, 161].

Четвертый сегмент вируса гриппа А кодирует гемагглютинин (НА) – белок с молекулярной массой 76-77 кДа. НА –тример, состоящий из идентичных субъединиц, содержащих 540-550 аминокислот, длиной около 13,5 нм [161]. Гемагглютинин синтезируется

как неактивный предшественник HA0, который посттрансляционно расщепляется протеазами хозяйской клетки на две небольшие субъединицы HA1 (50кДа) и HA2 (27кДа), связанные дисульфидными связями. Субъединица HA1 содержит рецептор-связывающие участки, или так называемый «рецептор – связывающий карман», необходимый для взаимодействия вирусной частицы с рецепторами на поверхности хозяйской клетки, содержащими сиаловые кислоты. Вторая субъединица – HA2 – содержит «пептид слияния», который обеспечивает слияние оболочки вириона с мембраной клетки и эндосомы [137, 150]. HA является главным вирусным антигеном, против которого в процессе инфекции вырабатываются нейтрализующие антитела, и изменения в его антигенной структуре являются одной из важных причин эпидемий гриппа [52].

Пятый сегмент вируса гриппа кодирует NP - белок с молекулярной массой около 60 кДа. Нуклеопротеин формирует с вРНК и субъединицами полимерного комплекса рибонуклеопротеин. NP содержит сигналы ядерной локализации (NLS) и ядерного экспорта (NES), которые позволяют перемещать вирусные РНП в ядро и обратно за счет активного транспорта в процессе репродукции вируса [76]. Кроме того, нуклеопротеин взаимодействует с различными клеточными факторами и подавляет врожденный иммунный ответ хозяина [185].

Шестой сегмент кодирует второй поверхностный гликопротеин вируса - нейраминидазу (NA), - белок с молекулярным весом около 60 кДа. NA – тетрамер из идентичных субъединиц, длина каждой из которых составляет около 470 аминокислот. Нейраминидаза обладает сиалидазной активностью, которая проявляется в отщеплении остатков сиаловых кислот от вновь синтезированных вирионов и мембраны клетки и предотвращает их агрегацию [161, 34].

Седьмой сегмент вируса гриппа А длиной в 1027 н.о. кодирует два белка: М1 и М2. Белок М1 кодируется полноразмерной мРНК, комплементарной всей кодирующей части сегмента. Для белка М2 мРНК образуется в результате сплайсинга, при котором отрезается около 680 н.о. [161, 47]. Белок М1 подстилает внутренний листок оболочки вируса и играет важную роль в жизненном цикле вируса гриппа. М1 участвует в процессе раздевания вирусной частицы, в транскрипции и репликации вирусных РНК, обеспечивает ядерный транспорт и экспорт вирусных РНП, а также участвует в процессе сборки и почкования новых вирусных частиц [120, 135]. М2 - интегральный белок с молекулярной массой около 15 кДа. Белок М2 представляет собой тетрамер, в котором центральная трансмембранная часть формирует канал, который обеспечивает транспорт протонов H^+ внутрь вирусной частицы, что приводит к отделению вирусного нуклеокапсида от М1 – белка и выходу вирусного генома в цитоплазму хозяйской клетки [104].

Восьмой сегмент вируса гриппа А является самым коротким – 890 н.о. и кодирует два белка NS1 и NS2 [161]. Белок NS1 (неструктурный белок) образуется в результате трансляции полноразмерной мРНК [161]. Этот белок необходим вирусу для противодействия

противовирусному эффекту ИФН. Так, например, взаимодействуя с клеточными сенсорами двуцепочечных молекул РНК протеинкиназой R (PKR), RIG – 1 и 2'-5' – олигоаденилатсинтетазой напрямую или опосредованно, NS1 подавляет синтез интерферонов первого типа [109, 110, 66]. Кроме того, этот белок активирует сигнальный путь PI3K/Akt и блокирует апоптоз инфицированной вирусом клетки [185]. Было показано, что NS1 связывается с 30 кДа субъединицей фактора расщепления и полиаденилирования CPSF30, в результате чего происходит ингибирование расщепления и полиаденилирования мРНК хозяйской клетки [122, 185]. NS1 может усиливать трансляцию вирусной мРНК за счет взаимодействия с субъединицей eIF4GI транскрипционного фактора eIF4F [28]. Второй белок NS2 или NEP – ядерный экспортный белок – транслируется со сплайсированной мРНК восьмого сегмента. Он опосредует экспорт вирусных РНП из ядра хозяйской клетки за счет формирования комплекса с рецептором ядерного экспорта, белком CRM1, и M1 – белком вируса гриппа [144]. Gorai T. *et al.* было показано, что NEP взаимодействует с мембран-ассоциированной F1F0 АТФазой, которая участвует в процессах почкования и морфогенеза вирусных частиц [61].

Кроме 10 основных белков геном вируса гриппа А кодирует около семи вспомогательных: PB1-F2, PB1-N40, PA-X, M42, NS3, PA-N155, PA-N182. В настоящее время наиболее детально изучены два - PB1 – F2 и PA – X [75].

Белок PB1 – F2 кодируется дополнительной (+1) открытой рамкой считывания внутри второго сегмента вирусного генома. Этот белок является фактором вирулентности и имеет молекулярный вес около 10,5 кДа [32]. PB1 – F2 индуцирует апоптоз инфицированных клеток за счет того, что он может встраиваться в мембрану митохондрий и нарушать ее целостность, либо за счет взаимодействия с компонентами путей Drg – 1 и Vak/Vax [32, 87]. Mazur I. *et al.* в своих исследованиях показали, что этот белок может связываться с PB1 и препятствовать выходу последнего из ядра, повышая тем самым активность вирусной полимеразы [105]. Исследования *in vivo* показали, что PB1- F2 может взаимодействовать с компонентами иммунной системы [161]. Во-первых, PB1- F2 во время инфекции стимулирует синтез ряда провоспалительных цитокинов, таких как: IL - 1 β , GM-CSF, IFN- γ , IL-6 и IL-8, что приводит к миграции макрофагов и нейтрофилов в легкие [87]. Во-вторых, этот белок может взаимодействовать с компонентами системы RIG-1/MAVS и ингибировать синтез IFN - β [167].

Третий сегмент генома кодирует также PA-X – небольшой белок с молекулярной массой 29 кДа, C – концевой домен которого кодируется альтернативной перекрывающейся рамкой считывания – «X ORF». Накапливаясь в ядре, этот белок участвует в процессе деградации мРНК хозяйской клетки, транскрибируемых РНК – полимеразой II [91]. Кроме того, PA-X играет важную роль в процессе иммунного ответа. Было показано, что белок PA-X супрессирует MHC I – ассоциированные гены и активирует интегрины и компоненты внеклеточного матрикса,

стимулируя активацию и пролиферацию лимфоцитов. PA-X способствует также увеличению экспрессии генов иммунного ответа, убиквитинлигаз и генов, связанных с посттрансляционными модификациями белка в комплексе Гольджи [75].

Белок PB1-N40 с молекулярным весом 82 кДа представляет собой усеченный на N-конце PB1 и кодируется альтернативной ORF внутри второго сегмента. Предполагается, что этот белок взаимодействует с полимеразным комплексом и регулирует репликацию вируса [179].

Белок M42 кодируется альтернативной сплайсированной мРНК седьмого сегмента и функционально замещает M2 [180].

Вспомогательный белок NS3 имеет молекулярный вес 20 кДа и транслируется с альтернативной сплайсированной мРНК 8 сегмента и является необходимым фактором адаптации вируса к новым хозяевам [141].

Два неструктурных белка вируса гриппа А PA-N155 и PA-N182 транслируются с альтернативной ORF внутри третьего сегмента вирусного генома и представляют собой усеченные на N – конце аналоги PA. Muramoto Y. *et al.* в ходе исследований было показано, что мутантные вирусы не экспрессирующие PA – N155 очень плохо реплицируются в клеточных культурах и менее патогенны для мышей, чем вирусы дикого типа. Все это говорит о том, что этот белок влияет на репродукцию вируса и на его патогенность [117].

Геном вируса гриппа В также содержит восемь сегментов одноцепочечной РНК. Большинство сегментов, за исключением 6,7, и 8, кодируют только один белок.

Шестой сегмент мРНК вируса гриппа В кодирует два белка: NA и NB. Белок NB является вспомогательным белком, который необходим для репродукции вируса в культуре клеток [161].

Седьмой сегмент вирусного генома кодирует два белка, M1 и BM2, используя «стоп-старт» трансляционный механизм (кодон терминации трансляции для M1 перекрывается со старт – кодоном для BM2) [74]. BM2 является малым гидрофобным интегральным белком, формирует протонный канал и сходен по своим функциям с белком M2 вируса гриппа А [94].

Несплайсированная мРНК 8 сегмента вируса гриппа В кодирует NS1, а сплайсированная - NS2/NEP и по своим функциям сходны с таковыми у вируса гриппа А [94].

Генетический материал вирусов гриппа С и D представлен семью сегментами односторонней молекулы РНК отрицательной полярности. Четвертый сегмент мРНК этих вирусов кодирует единственный поверхностный гликопротеин вирусной оболочки HEF (Hemagglutinin-Esterase-Fusion). Этот белок совмещает в себе функции гемагглютинаина и нейраминидазы вирусов гриппа А и В. HEF, как и HA, распознает и связывается с рецепторами на поверхности клетки, однако он взаимодействует с другим производным сиаловой кислоты - N-ацетил-9-О-ацетилнейраминовой кислотой. Эстеразная активность этого белка проявляется в отщеплении

ацетильных групп в положении С-9 N–ацетил–9-O–ацетилнейраминовой кислоты, способствуя тем самым выходу сформировавшихся вирионов из инфицированной клетки [171, 157].

1.1.4. Жизненный цикл вируса гриппа

Адсорбция вируса на мембране клетки происходит за счет взаимодействия его гемагглютинина с рецепторами на поверхности клеток, содержащими остатки сиаловых кислот. Физико-химическая конформация этих рецепторов различается у различных видов животных и является важной детерминантой, определяющей круг хозяев для вирусов гриппа. Так, например, штаммы вирусов гриппа птиц используют в качестве рецептора сиаловые кислоты, связанные с галактозой посредством α -2,3 гликозидной связи [145]. Штаммы вирусов гриппа человека, напротив, прикрепляются к сиаловым кислотам с α -2,6 связью, которые локализируются на поверхности эпителиальных клеток верхних дыхательных путей. Вместе с тем, небольшое количество кислот с α -2,3-связью представлено на реснитчатом эпителии нижних дыхательных путей [52]. Затем вирус проникает в клетку с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза (клатрин/кавеолин – зависимого или независимого) и макропиноцитоза [46, 147, 182, 177]. В результате вышеперечисленных механизмов вирусные частицы оказываются внутри окаймленных пузырьков, которые формируют, сливаясь, ранние, а затем поздние эндосомы [77]. Низкий уровень pH (~5,0) внутри эндосомы приводит к конформационному изменению в молекуле гемагглютинина, в результате которого высвобождается пептид слияния. Пептид слияния встраивается в эндосомальную мембрану и обеспечивает ее слияние с вирусной оболочкой [46]. Кроме того, происходит закисление внутренней среды вириона за счет перекачки протонов водорода из эндосомы через канал, формируемый белком M2, что приводит к диссоциации вирусных РНП от M1 и позволяет выйти нуклеопротеидам в цитоплазму клетки [46]. Далее РНП транспортируется в ядро клетки за счет взаимодействия белка NP с импортинами α и β [36].

Внутри ядра вирусная РНК–зависимая–РНК-полимераза осуществляет транскрипцию и репликацию вирусного генома. РНК вируса гриппа не содержат кэп на 5'-конце, поэтому для того, чтобы осуществить транскрипцию вирусного генома, полимеразы связывают и отщепляют 5' – концевой участок клеточной пре-мРНК, содержащий метилированный остаток гуанозина и 10-13 прилежащих нуклеотидов [46, 161]. Распознавание и связывание кэпа осуществляется белком PB2, а эндонуклеазное отщепление – белком PA [65]. Отщепленные участки используются в качестве праймеров для транскрипции вирусного генома. Далее осуществляется элонгация цепи мРНК, в которой принимает участие белок PB1 полимеразного комплекса. Каждый транскрипт полиаденилируется полимеразой, и затем мРНК из ядра транспортируются в цитоплазму для

трансляции рибосомами клетки с образованием вирусных белков. Часть мРНК, транскрибированных с генов М и NS, подвергаются сплайсингу [46]. Белок NP и белки полимеразного комплекса содержат последовательности ядерной локализации и с помощью импортинов транспортируются в ядро. Белки NS1, NS2 и, частично, M1 также импортируются в ядро клетки [46, 37]. После достижения в ядре определенной концентрации белка NP полимеразный комплекс синтезирует полные комплементарные копии РНК-сегментов вируса (кРНК), у которых уже отсутствуют клеточные праймерные последовательности. Комплементарные РНК-транскрипты связываются с NP и используются в качестве матриц для новых вРНК. Новые геномные РНК подвергаются транскрипции с образованием вирусных мРНК [42, 46, 161]. На поздних стадиях жизненного цикла вируса новые РНП с вРНК выходят в цитоплазму. В процессе ядерного экспорта вРНП принимают участие белки M1 и NS2 [161]. Транспорт нуклеокапсидов к месту сборки новых вирусных частиц осуществляется за счет их взаимодействия с Rab 11 в рециркулирующих эндосомах, которые перемещаются по микротрубочкам к поверхности клетки [9, 113].

Белки HA и NA синтезируются рибосомами шероховатого эндоплазматического ретикулаума, а M1 и M2 - на свободных рибосомах в цитоплазме клетки. После трансляции эти белки поступают в аппарат Гольджи, где подвергаются таким модификациям, как: гликозилирование (HA и NA), пальмитирование/S-ацилирование (HA и M2), фосфорилирование (NS1), сумоилирование (M1, NS1, NP, PB1 и NEP) малым убиквитин-родственным модификатором типа 1/2/3 (SUMO – 1/2/3) и фолдингу [58].

Следует отметить, что HA подвергается в ходе процессинга разрезанию протеазами клетки на HA1 и HA2. У высокопатогенных вирусов птичьего гриппа расщепление молекулы предшественника по нескольким аминокислотным остаткам осуществляется фурином, кальций-зависимой сериновой эндопротеазой, локализованной внутри транс-Гольджи сети [153]. У вирусов гриппа человека и у низкопатогенных вирусов птичьего гриппа расщепление молекулы предшественника осуществляется по одному аминокислотному остатку трансмембранными сериновыми протеазами и трипсин-подобной протеазой дыхательных путей внутри транс-Гольджи сети [25].

После посттрансляционной модификации вирусные белки транспортируются к поверхности клетки. Сборка вирусных частиц осуществляется в липидных рафтах, участках плазматической мембраны, обогащенных холестерином, сфинголипидами и фосфолипидами. Главную роль в этом процессе играет матриксный белок вируса M1, который присоединяется к плазматической мембране и определяет морфологию вириона за счет взаимодействия с цитоплазматическими концами поверхностных белков вируса (HA, NA, и M2) и компонентами

РНП (NP и NEP). Завершается жизненный цикл вируса отпочковыванием и выходом из клетки вновь синтезированных вирионов (рисунок 2) [31,161, 168].

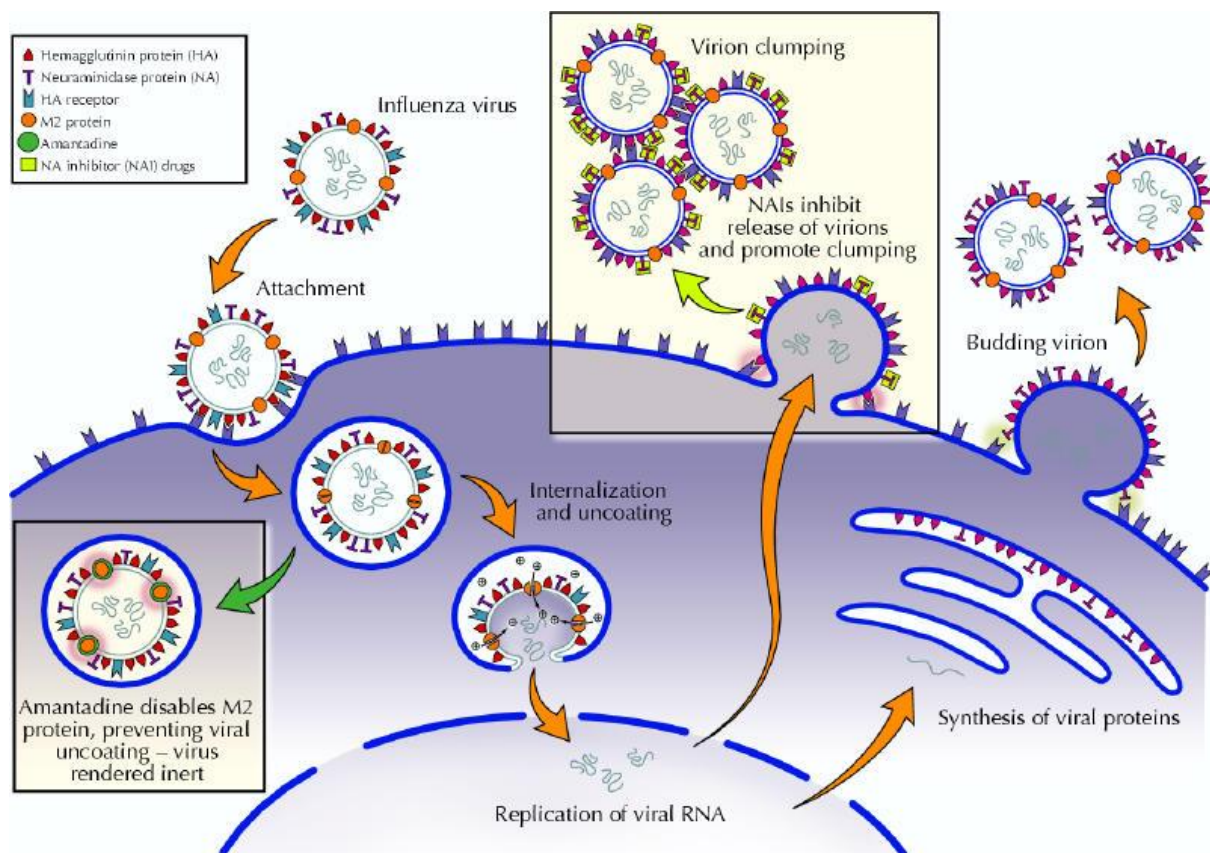


Рисунок 2 - Жизненный цикл вируса гриппа [4]

1.1.5. Патогенез гриппозной инфекции

Вирусы гриппа распространяются аэрозольно воздушно-капельным путем или в результате контакта с контаминированными поверхностями. Заражение людей штаммами вирусов птичьего гриппа и вирусов гриппа млекопитающих осуществляется в результате прямого контакта человека с инфицированными животными или их экскретами [161].

При неосложненной гриппозной инфекции вирус поражает верхние и нижние дыхательные пути. Репликация вирусов в клетках цилиндрического эпителия трахеи и бронхов при неосложненной форме инфекции морфологически характеризуется набуханием и вакуолизацией цитоплазмы, исчезновением мерцательных ресничек с последующей десквамацией и гибелью клеток. Усиленная миграция нейтрофилов и секреция ими лизосомальных ферментов может оказывать повреждающее действие на эндотелий сосудов, базальную мембрану, что значительно способствует распространению инфекции и проникновению ее в кровь [159]. Слизистая оболочка верхних дыхательных путей «обнажается»,

снижается ее барьерная функция, в результате чего создаются условия для присоединения бактериальной микрофлоры, среди основных представителей которой *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* [107].

Частым осложнением при гриппе является пневмония, при которой наблюдается повреждение альвеолярного эпителия, и как следствие, нарушение функции газообмена в легких. Повреждение альвеолоцитов первого и второго типа опосредуется цитолитическим действием вирусной инфекции и иммунным ответом хозяина. На ранних стадиях отмечается некроз альвеолярного эпителия, характеризующийся разрушением межальвеолярной перегородки и наличием десквамированных клеток в просвете альвеол. Просвет альвеол заполняется воспалительным экссудатом, содержащим фибрин и эритроциты. Отмечается также расширение альвеолярных перегородок вследствие гиперемии альвеолярных капилляров, интерстициального отека и инфильтрации нейтрофилов и эозинофилов. Поздняя стадия вирусной пневмонии характеризуется повторной эпителизацией альвеол альвеолоцитами второго типа (гиперплазия пневмоцитов второго типа), интерстициальным фиброзом и инфильтрацией мононуклеарными лейкоцитами, преимущественно лимфоцитами и плазматическими клетками. Кроме того, наблюдается некротический бронхолит, характеризующийся некрозом эпителиальных клеток, формированием гиалиновых мембран и обширной миграцией нейтрофилов в очаги поражения. [96].

Повышение проницаемости сосудов, ломкость их стенок при гриппозной инфекции являются причиной различных гемморагических проявлений – от носовых кровотечений до гемморагических отеков легких и кровоизлияний в головной мозг. Одним из механизмов влияния вируса гриппа на сосудистую систему организма является генерация активных форм кислорода в процессе инфекции, которые взаимодействуя с фосфолипидами клеточных мембран, вызывают в них окисление липидов. В результате происходит нарушение мембранного транспорта. Следует отметить также, что секреция лизосомальных ферментов (эластазы, катепсинов, коллагеназы) нейтрофилами приводит к повреждению эпителия капилляров, базальной мембраны клеток, что способствует дальнейшему распространению вирусной инфекции и виремии [3].

Для гриппозной инфекции характерны поражения не только дыхательных путей, но и многих других систем органов. Наиболее часто регистрируются патологические изменения в печени, почках, нервной и сердечно-сосудистой системах органов [96]. Со стороны центральной нервной системы осложнения проявляются в виде токсической энцефалопатии, при которой наблюдаются расстройства гемо – и ликвородинамики, и нарушениями метаболизма. Симптомы поражения ЦНС обычно отмечаются на 3-7 сутки болезни. При патологоанатомическом исследовании в мозге отмечается отек с очагами кровоизлияний и набухание мозговых оболочек.

Основными клиническими симптомами токсической энцефалопатии являются судороги и помутнение сознания у больного [3, 163].

Изменения со стороны сердечно-сосудистой системы характеризуются поражением миокарда за счет токсического действия вируса. РНК вируса гриппа определяется в миокарде и крови примерно у 1-5% пациентов с острым миоперикардитом. При патологоанатомическом исследовании в миокарде регистрируются повреждения в виде периваскулярного отека, полнокровия, тромбоза вен и мелких кровоизлияний в эпикард [96, 161].

Инкубационный период при гриппе короткий (от 1 до 2 дней). Начало острое, с озноба и повышения температуры тела до максимальных значений (39-40°C). В первые сутки нарастают симптомы токсикоза: озноб, сильная головная боль, миалгии, головокружения, сильная слабость. Головная боль локализуется в лобно-височной области, движения глазных яблок сопровождаются болью. У больного наблюдается сухой кашель, заложенность носа, ларингит. Лицо больного одутловато, сосуды конъюнктивы и склер резко инъектированы. Со стороны нижних дыхательных путей иногда могут выслушиваться сухие хрипы. Со стороны сердечно-сосудистой системы отмечается тахикардия. Лихорадочный период длится обычно от 2 до 4 дней и сопровождается снижением температуры. Продолжительность лихорадки более 5 суток свидетельствует о развитии осложнений. Катаральные явления прекращаются через 10-14 дней [3, 112, 161].

Клинические проявления гриппа, вызванные высокопатогенным вирусом птичьего гриппа А/Н5N1, значительно отличаются от таковых при эпидемическом гриппе и сопровождаются высокой лихорадкой, сильной интоксикацией и ранним поражением нижних дыхательных путей. Продолжительность инкубационного периода обычно составляет от 1 до 7 дней. Постоянными симптомами заболевания являются высокая температура и кашель. На ранних сроках заболевания у некоторых больных наблюдается дисфункция желудочно-кишечного тракта, характеризующаяся абдоминальной болью, диареей и рвотой. На вторые-третьи сутки кашель становится влажным, мокрота с примесью крови. При прогрессировании заболевания развивается острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и полиорганная недостаточность (поражение мозга, печени, почек) [20].

У каждого больного клинические симптомы и степень тяжести заболевания различны. В группу риска тяжелого течения гриппа входят дети раннего возраста, лица с хроническими заболеваниями органов дыхания, сердечно – сосудистой и эндокринной систем, с иммунной недостаточностью, страдающие диабетом и избыточным весом, онкологические больные, пожилые люди старше 65 лет, беременные женщины [112].

После перенесенной инфекции у больных формируется типоспецифический иммунитет, который связан с формированием вируснейтрализующих антител к двум поверхностным белкам

вируса - гемагглютинирующую и нейраминидазу. Повторные случаи заболевания гриппом обуславливаются появлением штамма с новыми антигенными свойствами [52].

1.1.6. Вакцинопрофилактика и химиотерапия гриппозной инфекции

1.1.6.1. Вакцинопрофилактика гриппа

Вакцинация является одним из эффективных способов уменьшения заболеваемости гриппом, снижения частоты осложнений во время заболевания, а также снижения экономических затрат. Прививки против гриппа производят по эпидпоказаниям. В настоящее время для вакцинации применяют инактивированные субъединичные вакцины, вводимые внутримышечно, или вакцины на основе живых аттенуированных штаммов вируса, которые вводятся интраназально детям в США и Европе. Препараты инактивированных трех – или четырехвалентных вакцин содержат антигены двух штаммов вируса гриппа А (H1N1 и H3N2) и одного или двух штаммов вируса гриппа В (линии В/Yamagata и В/Victoria) и индуцируют образование в крови только сывороточных Ig G [52, 129]. Живые аттенуированные вакцины производят на основе холодо-адаптированных штаммов H2N2, которые могут репродуцироваться при низкой температуре (+25°C). Кроме того, они индуцируют более сильный иммунный ответ, чем инактивированные вакцины, как гуморальный, характеризующийся продукцией IgG и IgA, так и клеточный, в результате которого образуются Т-клетки памяти. Эффект вакцинации составляет около 50-60%. После вакцинации иммунитет вырабатывается через 14-28 суток, кратковременный (6-12 месяцев) и типоспецифичный. По причине изменчивости вируса ВОЗ каждый год дает рекомендации по штаммовому составу компаниям-производителям на предстоящий сезон, однако иногда вакцинные штаммы не соответствуют циркулирующим штаммам вируса [3, 161].

1.1.6.2. Химиотерапия гриппозной инфекции

Несмотря на то, что ежегодные программы иммунизации с использованием трех- или четырехвалентной вакцины являются важнейшим средством снижения заболеваемости и смертности, существует ряд причин, по которым они уступают противовирусным препаратам. Во-первых, не у всего населения формируется адекватный иммунный ответ на вакцину, во-вторых, вакцинные штаммы не всегда соответствуют циркулирующим в текущем году [4]. Противовирусные препараты, в свою очередь, позволяют подавить активность вирусной инфекции, облегчить клинические проявления гриппозной инфекции и предупредить развитие

осложнений и вылечить их, если они возникли, а также защитить здоровых лиц, находившихся в контакте с больными во время эпидемии [3, 52].

Для лечения гриппозной инфекции применяются следующие группы препаратов:

- этиотропные,
- ИФН и их индукторы,
- патогенетические средства, направленные на борьбу с интоксикацией, обезвоживанием, поражениями сосудов, осложнениями,
- симптоматические средства для купирования отдельных проявлений.

Среди вышеперечисленных групп препаратов самыми эффективными и хорошо изученными являются этиотропные препараты, так как механизм их действия непосредственно направлен на причину заболевания - репродукцию вируса.

В настоящее время для химиотерапии гриппозной инфекции широко применяются этиотропные препараты, относящиеся к двум классам: блокаторы М2-каналов и ингибиторы нейраминидазы [161]. К первой группе относятся амантадин (1-аминоадамантан) и ремантадин (α – метил – 1- адамантилметиламин гидрохлорид) [4, 58]. Вторая группа включает в себя занамивир («Реленза»), осельтамивир («Тамифлю»), перамивир («Рапиваб»), ланинамивир («Инавир») [58, 79].

Блокаторы М2-каналов. Амантадин (1-аминоадамантан) и ремантадин (α – метил – 1- адамантилметиламин гидрохлорид) относятся к первому поколению противогриппозных препаратов и представляют собой симметричные трициклические амины (рисунок 3). Производные адамантана в относительно низких концентрациях (<1,0 мкг/мл ингибируют репродукцию только вирусов гриппа А, что говорит об их высокой специфичности [80]. Амантадин и ремантадин обладают двумя механизмами противовирусного действия. При низких концентрациях эти вещества взаимодействуют с участком на N-конце трансмембранного домена молекулы М2 белка между 27 и 34 аминокислотными остатками и блокируют функцию протонного канала, препятствуя разборке вирусной частицы при эндоцитозе [172]. Кроме того, адамантаны блокируют процесс сборки у вирусов гриппа А подтипа Н7. При высоких концентрациях производные адамантана ингибируют конформационные изменения в молекуле гемагглютинина, необходимые для слияния вирусной и эндосомальной мембран за счет повышения рН внутри эндосомы [58]. Препараты эффективны для экстренной профилактики и в первые два дня заболевания. Они снижают продолжительность заболевания и тяжесть клинических симптомов [115]. Согласно рекомендациям центров по контролю и профилактике США 2011 года, ремантадин и амантадин не рекомендуются к использованию при терапии гриппа А по причине высокого уровня устойчивости к этим препаратам среди циркулирующих штаммов Н1N1 и Н3N2. Формирование резистентности связано с заменой аминокислот в

положениях 26, 27, 29, 30, 31, 34 в N-концевом трансмембранном участке молекулы M2, что приводит к увеличению диаметра поры протонного канала или недостаточно прочному связыванию ингибитора с этим участком молекулы [80].



Рисунок 3 - Структурные формулы амантадина (1-аминоадамантана) и ремантадина (α – метил – 1- адамантилметиламин гидрохлорида) [58]

Ингибиторы нейраминидазы. В настоящее время для этиотропной терапии гриппозной инфекции во всем мире широко используются два ингибитора нейраминидазы: занамивир («Реленза») и осельтамивир («Тамифлю»). По своей химической природе NA-ингибиторы могут быть классифицированы на производные сиаловой (или производные 5, 6 – дигидро-4Н-пирана) и бензойной кислот, производные циклогексана, циклопентана и пирролидина [58]. Известно, что активный сайт нейраминидазы в глобулярном домене вируса гриппа содержит восемь функциональных (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, Y406) и одиннадцать структурных аминокислот (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, D293, E425), которые консервативны среди всех штаммов вирусов гриппа А и вирусов гриппа В [34]. Занамивир и осельтамивир взаимодействуют с этими аминокислотами и блокируют активность нейраминидазы, предотвращая тем самым выход и распространение вновь сформированных вирусных частиц [64].

Осельтамивир (рисунок 4) представляет собой пролекарство, которое абсорбируется в ЖКТ и с помощью печеночных эстераз превращается в свою активную форму – осельтамивир карбоксилат ([3R,4R,5S]-4ацетамидо-5-амино-3-(1-этилпропокси)-1-циклогексен-1-карбоксилат фосфат). Этот препарат обладает высокой биодоступностью при пероральном введении, около 79-93%, проникает во все ткани и жидкости организма и элиминируется почками. Применение осельтамивира в первые 48 часов после появления клинических симптомов при гриппе сокращает продолжительность заболевания, а также развитие осложнений. Кроме того, он купирует такие симптомы заболевания, как лихорадка, интоксикация, головные и мышечные боли, кашель у пациентов с хроническими болезнями дыхательной системы [79].

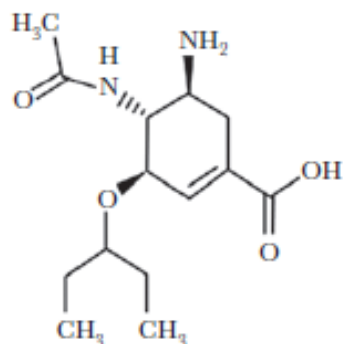


Рисунок 4 - Структурная формула осельтамивира [58]

Занамивир (рисунок 5) обладает низкой биодоступностью при оральном введении (около 2%), поэтому его используют в виде сухой пудры для ингаляции. Он так же, как и осельтамивир, эффективен только в течение 48 часов после появления клинических симптомов и сокращает продолжительность заболевания. Однако при ингаляционном введении препарата могут возникать такие побочные явления, как кашель и бронхоспазм [80].

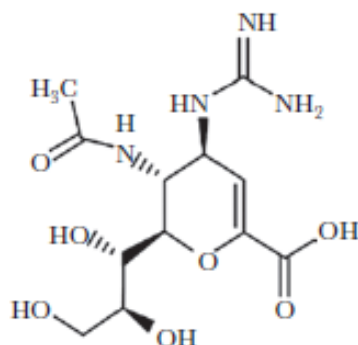


Рисунок 5 - Структурная формула занамивира [58]

Устойчивость вирусов к этой группе препаратов возникает в результате мутаций в гене нейраминидазы, которые затрагивают участок связывания и приводят к снижению аффинности для молекулы ингибитора [80]. Однако поскольку число циркулирующих штаммов вирусов гриппа А H1N1 и H3N2, резистентных к занамивиру и осельтамивиру относительно невелико, ВОЗ рекомендует их использование для лечения и профилактики гриппозной инфекции [17, 58].

Кроме осельтамивира и занамивира для терапии гриппозной инфекции в Японии и других странах Азии используются два других ингибитора нейраминидазы – ланинамивир и перамивир [161].

Ланинамивир («Инавир») (рисунок 6) представляет собой октаноильное пролекарство 7-метоксизанамивира, которое превращается в активную форму в дыхательных путях.

Ланинамивир октаноат разрешен для терапии гриппозной инфекции в Японии в 2011 году. «Инавир» обладает активностью в отношении большинства циркулирующих штаммов вируса гриппа А и В, а также в отношении большинства осельтамивир-устойчивых штаммов. Ланинамивир вводится ингаляционно (20-40мг) однократно на весь курс терапии, и его высокая концентрация в слизистых дыхательных путей сохраняется до пяти дней [80, 181]. Кроме того, применение ланинамивира не вызывает бронхоспазм и другие побочные эффекты со стороны дыхательной системы у людей с хроническими респираторными заболеваниями [174].

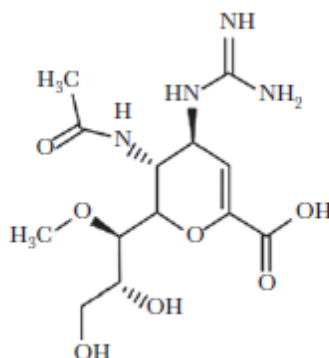


Рисунок 6 - Структурная формула ланинамивира [181]

Перамивир («Рапиваб») (рисунок 7) - ингибитор нейраминидазы, разрешенный для терапии гриппозной инфекции в Японии, Южной Корее и США в 2011 году. В отличие от других ингибиторов нейраминидазы, перамивир по своей химической природе является производным циклопентана с негативно заряженной карбоксилатной группой, положительно-заряженной гуанидиновой группой и липофильными боковыми цепями [15]. Такая структура позволяет ему взаимодействовать с нейраминидазой вируса гриппа со значительно большим сродством, чем осельтамивир, что обеспечивает его высокую активность в отношении некоторых вирусов, резистентных к другим противогриппозным препаратам [79]. Следует отметить также, что благодаря такой химической структуре, молекула вещества может связываться с нейраминидазой в течение длительного периода времени (около 24 ч) и очень медленно диссоциировать [175]. Поскольку препарат обладает низкой биодоступностью при оральном введении, его вводят внутривенно. Перамивир демонстрировал активность *in vitro* и *in vivo* в отношении вирусов гриппа А и В, а также в отношении пандемических и высокопатогенных штаммов вирусов гриппа подтипов H5N1 и H9N2 [62, 175]. Препарат эффективен при однократном введении в течение 48 часов после появления клинических симптомов, значительно облегчает течение заболевания и способствует быстрому клиренсу вируса [23]. Однако существенным недостатком перамивира является то, что профиль его резистентности аналогичен таковому для осельтамивира [79].

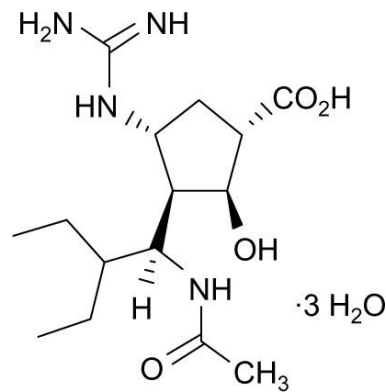


Рисунок 7 - Структурная формула перамивира [175]

Ингибиторы полимеразы обладают активностью в отношении вирусов гриппа А и В, а также в отношении штаммов вирусов гриппа с мутациями, обеспечивающими устойчивость к М2-блокаторам и ингибиторам нейраминидазы.

Рибавирин («Виразол») (рисунок 8) – аналог гуанозина с широким спектром противовирусной активности. Он используется для лечения гепатита С и тяжелой инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом. Рибавирин быстро фосфорилируется клеточными ферментами и ингибирует активность вирусной РНК-полимеразы и ГТФ – зависимое 5'- кэпирование мРНК вируса гриппа [79]. Однако он очень редко используется для терапии гриппозной инфекции, по причине возникновения ряда побочных эффектов, одним из которых является дозозависимая гемолитическая анемия [81].

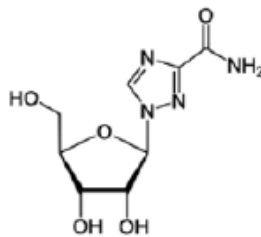


Рисунок 8 - Структурная формула рибавирина [58]

Фавипиравир (Т-705, 6-фторо–3-гидрокси-2-пиазинкарбоксамид) (рисунок 9) – новый ингибитор вирусной полимеразы, обладающий активностью в отношении вирусов гриппа А, В и С. Т-705 метаболизируется внутри клетки с формированием Т-705 – рибофуранозилтрифосфата, который распознается вирусной полимеразой как пуриновый нуклеотид и ингибирует ее активность. Кроме того, препарат демонстрирует активность *in vitro* и *in vivo* в отношении РНК-содержащих вирусов семейств *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Filoviridae* и *Rhabdoviridae* [56].

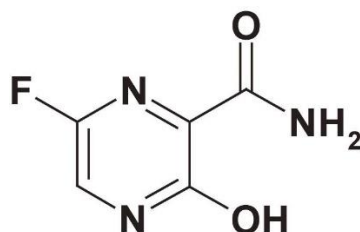


Рисунок 9 - Структурная формула фавипиравира [56]

Производное индола – «Арбидол» или умифеновир (этил-6-бromo-4-[(диметиламино)метил]-5-гидрокси-1-метил-[(фенилтио)метил]-индол-3-карбоксилатгидрохлорид моногидрат) (рисунок 10) относится к **ингибиторам гемагглютинирина**. Арбидол является противовирусным препаратом широкого спектра действия, активным в отношении большинства оболочечных и безоболочечных вирусов таких, как вирусы гриппа, респираторно-синцитиальный вирус, аденовирусы, вирусы парагриппа, вирус Эбола, гепатиты В и С [24]. Он демонстрирует активность в отношении различных штаммов и подтипов вирусов гриппа А и В. Арбидол был разработан и первоначально лицензирован в СССР в 1990 году для лечения и профилактики гриппозной инфекции, а с 2006 года его применение разрешено в Китае [58,60]. Молекула арбидола связывается с гидрофобной областью на поверхности протомеров гемагглютинирина и увеличивает ее стабильность к конформационным изменениям, индуцируемым низким рН, предотвращая тем самым процесс слияния липидной оболочки вируса с мембраной эндосом и высвобождения вирусного РНП в цитоплазму клетки [86]. Кроме того, арбидол обладает прямым вирулицидным эффектом, блокирует адсорбцию вируса и нарушает его репликацию за счет взаимодействия с белками и липидами [58].

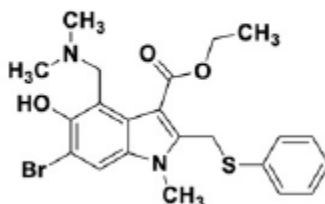


Рисунок 10 - Структурная формула арбидола [86]

1.2. Вирусы парагриппа

1.2.1. Вирусы парагриппа, систематика

К семейству Paramyxoviridae относятся вирусы, патогенные для человека, а также для некоторых видов животных, птиц, рептилий и рыб. Это семейство содержит семь родов: Aquarparamyxovirus, Avulavirus, Ferlavirus, Henipavirus, Morbillivirus, Respirovirus и Rubulavirus [8].

Вирусы парагриппа человека 1-4 типов, относящиеся к родам Respirovirus и Rubulavirus, были обнаружены впервые в 1950-1960 –х годах 20 века. Они являются возбудителями респираторных инфекций верхних и нижних дыхательных путей у детей и взрослых [97]. Патогенными для человека являются также вирус кори (Morbillivirus) и вирус эпидемического паротита (Rubulavirus) [83]. Вирусы Нипах и Хендра (Henipaviruses) являются возбудителями смертельных инфекций у человека с образованием острых и обширных васкулитов и энцефалитов, приводящих в 40 % случаев к смертельному исходу [21]. Эти вирусы - зоонозные, их природными хозяевами являются летучие мыши, относящиеся к семейству Pteropodidae (Крылановые), а промежуточными хозяевами - лошади в случае вируса Хендра, и свиньи - в случае вируса Нипах [49]. Представители родов Avulavirus и Morbillivirus являются возбудителями контагиозных и неврологических заболеваний у птиц (Newcastle disease virus) и крупного рогатого скота (Rinderpest virus) [134]. Вирусы парагриппа обезьян 5 типа и Сендай, обладающие антигенным сходством с ВПГЧ, широко используются в лабораторных исследованиях для изучения ряда биохимических и молекулярно-биологических особенностей парамиксовирусов [97].

1.2.2. Морфология и структура вириона парагриппа

Вирусы парагриппа - крупные оболочечные вирусы. Их размер варьирует от 150 до 350 нм в диаметре, однако встречаются и более крупные частицы. Внутри вириона содержится линейная несегментированная одноцепочечная молекула РНК с отрицательной полярностью (комплементарная мРНК), имеющая размер 15 000 нуклеотидов [52, 126]. Некоторые частицы могут содержать и +РНК, но они, как правило, не обладают инфекционностью [90]. С помощью методов обратной генетики было открыто «правило шести» для вирусов парагриппа. Согласно ему, наиболее эффективные процессы репликации и транскрипции вируса происходят в том случае, когда количество нуклеотидов в геноме кратно шести [48]. Геномная РНК вместе с белком N, фосфопротеином Р и белком полимеразного комплекса L образует спиральную нуклеокапсидную сердцевину. Она покрыта липопротеиновой оболочкой, на поверхности

которой находятся гликопротеины HN (гемагглютинин-нейраминидаза) и F-белок. Также вирионы содержат матричный белок М, расположенный между оболочкой и центральной частью вируса (рисунок 11) [54].

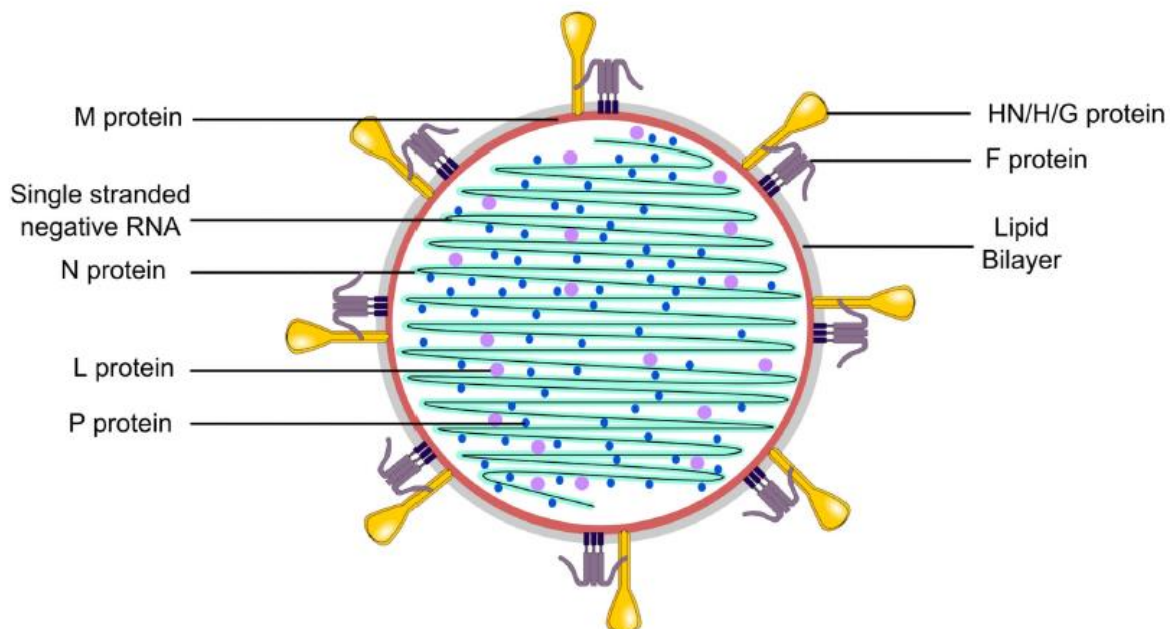


Рисунок 11 - Структура вириона парамиксовирусов [126]

1.2.3. Структурные белки и жизненный цикл парамиксовирусов

Структурными белками вирусов семейства Paramyxoviridae являются N, P, L, F, HN (Н (род Morbillivirus) или G (род Henipavirus)) и М белки. Все они играют важную роль в репликации и патогенезе вирусов парагриппа. Однако у некоторых представителей родов Rubulavirus есть ген, кодирующий малые гидрофобные белки (SH), расположенный между генами белков F и HN [53].

NP- белок имеет молекулярный вес 66-70кДа и формирует с РНК вируса, Р и L белками нуклеокапсид. Каждый из его мономеров связан с 6 нуклеотидами, создавая матрицу, позволяющую L и P белкам транскрибировать и окончательно реплицировать геном вируса [30]. N – концевой домен белка является консервативным, составляет около 80% молекулы и образует глобулу. Он взаимодействует с РНК и определяет спиральную структуру нуклеокапсида. С – концевой участок NP – белка является варибельным и содержит его главные антигенные участки [52].

P- белок – фосфопротеин. Согласно данным электрофореза, его молекулярный вес различен у разных типов вирусов парагриппа. Так, например, молекулярная масса

фосфопротеина у вирусов парагриппа человека II и IV серотипов составляет 49 кДа и 53 кДа, а у I и III – 83 кДа и 90 кДа [154]. Фосфопротеин представлен в виде тетрамера, фосфорилированного по одному или двум сериновым остаткам на N- концевом участке молекулы, и функционирует как малая субъединица РНК-полимеразы. Р-белок функционирует как шаперон для N-белка в процессе формирования нуклеокапсида [139].

L – белок - РНК- зависимая РНК –полимераза. Он имеет молекулярный вес 175 – 251 кДа. Присутствуя в небольшом числе копий в вирусной частице (около 20-40 копий), L-белок выполняет важные функции в процессе синтеза РНК, включая каталитическую активность, кэпирование и метилирование [52, 139].

M – белок - мембранный гликопротеид, имеющий молекулярную массу 28- 40 кДа, формирует основу белково-липидной оболочки вируса и играет важную роль в созревании вирусных частиц. Он последовательно взаимодействует с нуклеокапсидом, а затем с HN и F белками [5].

HN - белок или гемагглютинин-нейраминидаза – интегральный мембранный гликопротеин с молекулярным весом 69-82 кДа. Он связывает вирион с рецепторами на поверхности хозяйской клетки, содержащих сиаловые кислоты (гемагглютинирующая активность), инициируя, таким образом, процесс инфекции. HN – белок также обладает нейраминидазной активностью, которая проявляется в отщеплении остатков сиаловых кислот от гликопротеинов и гликолипидов, предотвращая тем самым агрегацию вирусных частиц во время их выхода из инфицированной клетки [127].

F – белок – второй мембранный гликопротеин, который обеспечивает слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной хозяйской клетки. Синтезируется как неактивный предшественник F0 (60-66 кДа), который посттрансляционно расщепляется хозяйскими протеазами с формированием биологически активного F-белка, состоящего из двух молекул F1 и F2, связанных дисульфидными связями [98]. Круг хозяев и вирулентность вирусов парагриппа человека тесно связана с ферментами, которые осуществляют протеолитическое расщепление неактивной формы F-белка. У человека в этом процессе принимают участие протеазы фурин и kex2 [125].

SH (малый гидрофобный белок) - интегральный белок, состоящий из 44-183 аминокислотных остатков. У вирусов эпидемического паротита и ПГ 5 типа SH выполняет функцию фактора вирулентности, так как эти белки блокируют TNF- α -опосредованные пути апоптоза клеток [178].

Вне зависимости от вида вируса парагриппа структурные гены располагаются в следующем порядке: 3' - NP (G/H) - P- M - F-HN-L-5' (рисунок 12). Помимо генов, геномная РНК содержит на 3' – конце лидерный и на 5'-конце трейлерный участки [51]. У всех вирусов

семейства Paramyxoviridae репродукция происходит в цитоплазме и длится в среднем от 14 до 30 часов. Цикл репродукции начинается с прикрепления вируса к клеточной поверхности и слияния вирусной оболочки с мембраной клетки. Слияние осуществляется при помощи F- белка, при нейтральном значении pH. В результате слияния липидных слоев оболочки вируса с плазматической мембраной формируется пора, через которую вирусный нуклеокапсид выходит в цитоплазму, где начинается процесс транскрипции вирусных генов РНК- зависимой РНК-полимеразой, входящей в состав нуклеокапсид. Полимераза во время транскрипции геномной РНК сдвигает белковый чехол, сформированный NP- белком, и после прохождения полимеразного комплекса структура нуклеокапсид на транскрибируемом участке вновь восстанавливается [52].

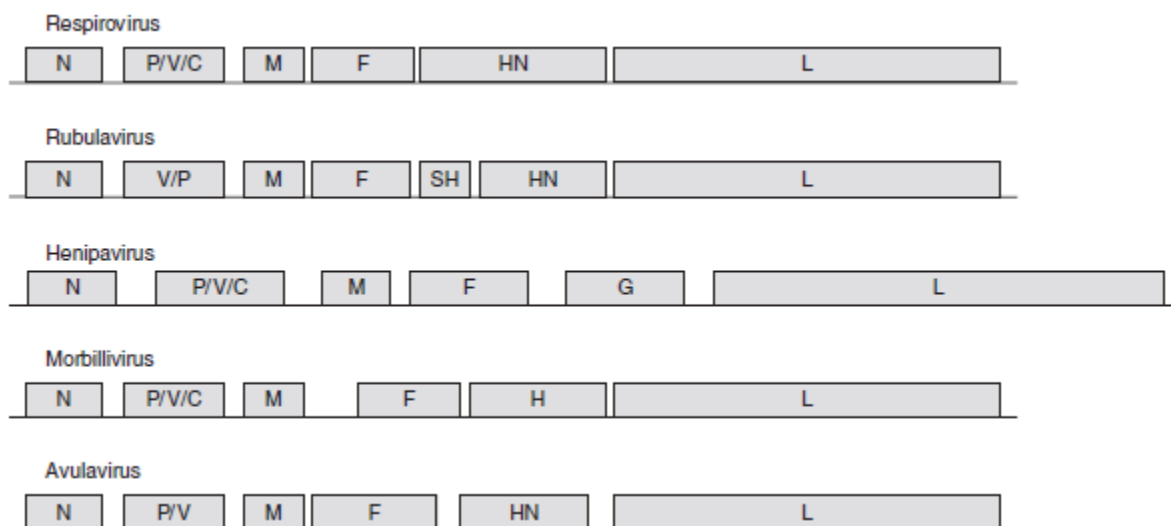


Рисунок 12. -Схематическое изображение генома парамиксовирусов разных родов [54]

Сначала осуществляется транскрипция лидерного участка, а затем транскрибируются все остальные вирусные гены. Транскрипция происходит по «стоп-старт» механизму: на межгенных участках терминируется синтез мРНК предшествующего гена и начинается транскрипция следующего гена [51].

Трансляция первичных транскриптов приводит к накоплению вирусных белков и переходу к репликации. Полимераза начинает синтезировать полноразмерные молекулы +РНК. При этом полимеразы не распознают сигналы терминации и реинициации на границах между генами. Позитивная антигеномная РНК во время синтеза сразу вступает в ассоциацию с NP – белком. В результате вся синтезируемая +РНК оказывается внутри структуры, сходной с нуклеокапсидом. Белок NP взаимодействует с антигеномной РНК при помощи Р-белка. Далее +РНК копируется полимеразой с образованием новых молекул геномной РНК [52].

При транскрипции геномных РНК образуются вирусные мРНК, при трансляции которых образуются вирусные белки. Вирусные гликопротеиды синтезируются рибосомами шероховатого эндоплазматического ретикулума, и, попадая в его просвет, проходят процессинг (гликозилирование, фолдинг, формирование тримеров и тетрамеров, протеолитическое разрезание с образованием субъединиц) и транспортируются на поверхность клетки. Остальные вирусные белки транслируются цитоплазматическими рибосомами и также транспортируются к поверхности клетки. С участками клеточной поверхности, где клеточные белки вытеснены вирусными, связываются нуклеокапсиды вируса. На поверхности клетки формируется «почка», которая затем отшнуровывается с образованием зрелой вирусной частицы (рисунок 13) [52].

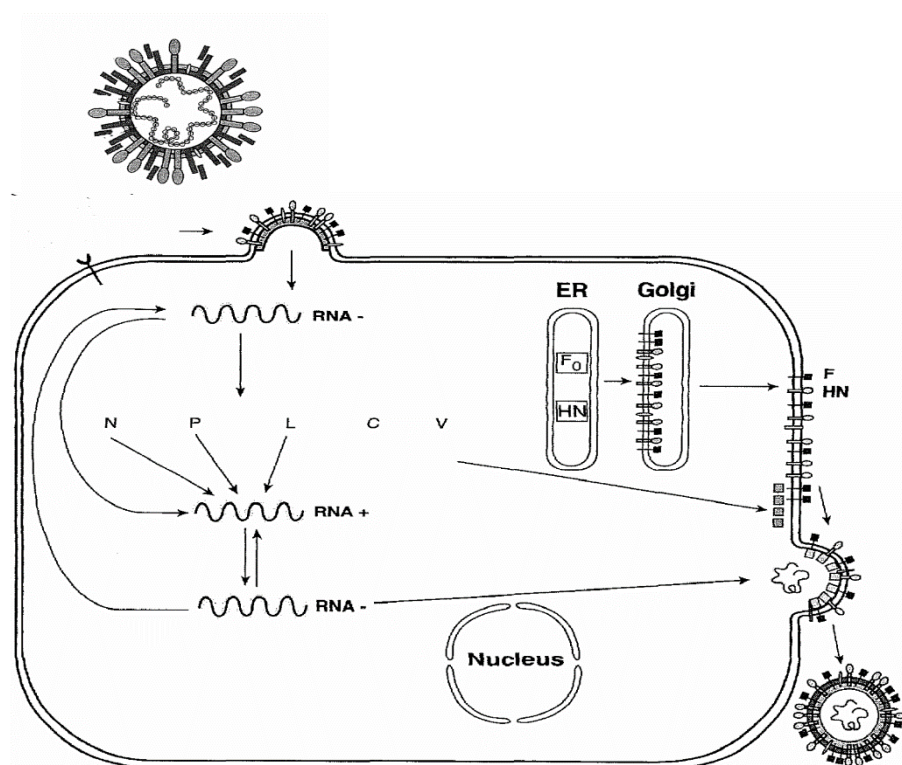


Рисунок 13 - Схематическое изображение жизненного цикла парамиксовирусов [139]

Вирусы парагриппа обладают механизмами, препятствующими врожденному иммунному ответу хозяина. В большинстве случаев в этих механизмы вовлечены неструктурные вирусные белки. Гены неструктурных белков образуются в ходе процесса редактирования РНК. Полимеразы вирусов подсемейства Paramyxovirinae используют этот процесс для вставки гуаниновых нуклеотидов в консервативный UC-богатый мотив (расположенный на – РНК). В результате возникают дополнительные рамки считывания. Белки, образующиеся с

редактируемых и неотредактируемых транскриптов, имеют одинаковые N-концевые последовательности [169]. Обширная открытая рамка считывания в Р гене родов *Respirovirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus* и *Avulavirus* кодирует соответствующий белок. Инсерция одного гуанина приводит к возникновению рамки считывания для V- белка, двух гуанинов – к трансляции белков W и D [57, 128]. Перекрывающиеся открытые рамки считывания для транскрипции одного (С-белок) или нескольких небольших белков (С, С', Y1, Y2) находятся рядом с 5' – концевым участком Р мРНК у представителей родов *Respirovirus*, *Henipavirus* и *Morbillivirus*. Старт-кодона этих ORF могут располагаться либо перед AUG Р-гена, либо после [22, 38].

Неструктурные С-белки вирусов кори и Сендай блокируют транскрипцию и репликацию вирусного генома за счет взаимодействия с L-белком. Предполагают, что они могут участвовать в процессе формирования вирусной частицы и регуляции апоптоза [73, 95].

1.2.4. Патогенез парагриппозной инфекции

Процесс инфекции начинается с момента прикрепления вируса к поверхности хозяйской клетки. Взаимодействие с мембраной обеспечивается за счет поверхностных гликопротеинов – HN (G, H). Представители родов *Respirovirus* и *Rubulavirus* взаимодействуют с белками и липидами, содержащими остатки сиаловых кислот [52]. Вирусы, относящиеся к родам *Morbillivirus* и *Henipavirus*, используют рецепторы для прикрепления к поверхности клеток. Для вируса кори были идентифицированы 2 рецептора: CD46 и сигнальная молекула активации лимфоцитов (SLAM) [45, 118]. Вирусы Хендра и Нипах используют в качестве рецепторов эфрины В2 и В3 [121].

После прикрепления за счет F- белка происходит слияние оболочки вируса с плазматической мембраной клетки и выход нуклеокапсида в цитоплазму [98].

Вирусы парагриппа человека известны, прежде всего, как возбудители респираторной инфекции. Они поражают верхние и нижние дыхательные пути. Спорадические случаи заболевания регистрируются в течение всего года. Инкубационный период заболевания составляет от 2 до 8 дней. Вирус реплицируется в клетках носоглоточного эпителия. Через 3 дня после проникновения вируса в организм инфекция, распространяясь по трахеобронхиальному дереву, поражает нижние дыхательные пути. Характерно возникновение очагов разрушения клеток бронхиолярного эпителия и отшелушивание реснитчатых клеток в малых дыхательных путях. Усиленная миграция в очаг воспаления нейтрофилов приводит к избыточной секреции ими во внешнюю среду лизосомальных ферментов, что способствует повышению проницаемости эндотелия капилляров, приводит к нарушению водно-солевого баланса и

транспорта белков. Размножившиеся вирусы и продукты распада эпителиальных клеток частично проникают в кровь, способствуя развитию лихорадки и других симптомов интоксикации. У детей из-за отека слизистой оболочки гортани и ее воспалительной инфильтрации может возникнуть синдром «ложного крупа». В возникновении пневмоний, как и в случае других респираторных инфекций, существенную роль играет наслоившаяся бактериальная флора [67].

Источником парагриппозной инфекции являются лица с клинически выраженной формой заболевания. Инфекция передается воздушно-пылевым и воздушно-капельным путем [27].

У людей, больных парагриппом, наблюдается субфебрильная температура тела, общая слабость, головная боль. В клинической картине преобладают поражения верхних отделов респираторного тракта. Частыми проявлениями парагриппа являются боли и першения в горле, заложенность носа, сухой кашель, симптомы ринофарингита. Ларингит и трахеит у взрослых встречается значительно реже, чем у детей. Кроме того, может возникнуть острый ларингит с синдромом стеноза гортани («ложный круп») [71].

Наиболее частым осложнением у детей и взрослых является пневмония. С ее появлением процесс приобретает остролихорадочный характер со значительным повышением температуры, ознобом, сильной головной болью, усиленным кашлем с выделением мокроты. У больных наблюдаются влажные хрипы над нижними долями легких [43].

У людей с ослабленным иммунитетом парамиксовирусы могут поражать не только дыхательные пути, но и другие ткани и органы. Вирусные частицы были обнаружены в спинномозговой и перикардальных жидкостях, печени, поджелудочной железе, селезенке, лимфатических узлах, желудочно-кишечном тракте, кровеносных сосудах различных органов. Все это говорит о том, что инфекция может распространяться по всему организму, и, учитывая иммунный статус пациентов, приводить к смерти [55].

Есть также предположения о том, что парамиксовирусы могут быть причастны к развитию острой и хронической неврологической патологии человека. Вирусные частицы обнаруживаются в спинномозговой жидкости у пациентов с острым энцефалитом, менингитом, рассеянным склерозом, синдромами демиелинизации [13, 160, 170].

Вирусы парагриппа человека могут поражать животных в естественных и экспериментальных условиях. Все четыре типа этого вируса могут вызывать бессимптомные заболевания у хомяков, морских свинок и хорьков. ВПГЧ антигенно, генетически и патофизиологически близки парамиксовирусам животных, однако не было установлено случаев заражения людей этими вирусами [72].

Следует отметить также, что парамиксовирусы довольно лабильны к действию физических и химических факторов. Вирусы максимально устойчивы в растворах с рН 7,4-8,0

при температуре окружающей среды +4°C...+6°C; при температуре – 70°C сохраняются на протяжении 26 лет. Инактивирующее действие на парамиксовирусы оказывает резко кислая среда (рН 3,0-3,4) [186].

Механизмы защиты организма от парагриппозной инфекции связаны с формированием гуморального иммунитета к двум поверхностным гликопротеинам, F- белку и гемагглютинин-нейраминидазе. Большинство детей рождается с нейтрализующими антителами ко всем четырем типам вируса парагриппа, однако титры этих антител сильно снижены в течение первых шести месяцев жизни. Опыты на животных показали, что антитела к F и HN белкам могут препятствовать возникновению инфекции верхних и нижних дыхательных путей, вызванных вирусом парагриппа третьего типа [151].

В процессе элиминации вируса в дыхательных путях могут участвовать цитотоксические Т-лимфоциты. CD4+ и CD8+ Т – клетки при поражении нижних дыхательных путей вирусом Сендай синтезируют IL-2, IFN- α , фактор некроза опухолей (TNF), IL-6 и IL-10, а лейкоциты человека –TNF- α , моноцитарный хемотоксический фактор, IL-6, IL-8 и макрофагальный белок воспаления [111]. Другим медиатором воспаления, синтезируемым при инфекции вирусом Сендай, является внутриклеточная молекула клеточной адгезии. Она отвечает за миграцию нейтрофилов и моноцитов в легкие. IL-10, синтезируемый при инфекции ВПЧ-3, стимулирует активную пролиферацию Т-лимфоцитов, помогая им тем самым избежать вирус-опосредованного апоптоза [148]. У детей с заболеваниями верхних дыхательных путей синтезируется IL-11, который приводит к клиническому бронхоспазму [50].

Механизмы иммунной защиты против вирусной инфекции запускаются с того момента, как происходит узнавание вирусных белков и нуклеиновых кислот специфическими рецепторами, локализованными на поверхности иммунных клеток. После узнавания эти рецепторы запускают внутриклеточный сигнальный каскад, в результате которого происходит активация транскрипционных факторов IRF3 и NF- κ B. Активированные факторы перемещаются в ядро и связываются с промоторной областью гена IFN- β . Синтезированные IFN I типа – IFN- α и IFN- β , секретируемые из клетки, взаимодействуют с соответствующими рецепторами. Тирозиновые киназы фосфорилируют рецепторы по остаткам тирозина. Фосфотирозины затем взаимодействуют с SH2 доменами молекул переносчиков сигнала и активаторов транскрипции – STAT1 и STAT2. Фосфорилированные STAT1 и STAT2 вместе с IRF9 формируют комплекс ISGF3. Этот комплекс перемещается в ядро, где, взаимодействуя с промоторами интерферонзависимых генов, запускает их транскрипцию. Продукты этих генов обеспечивают защиту клеток от вирусной инфекции. Однако некоторые вирусы, в том числе и парамиксовирусы, развили стратегию, которая позволяет им избегать интерферон-опосредованных механизмов защиты хозяйской клетки. Способность нейтрализовывать

противовирусное действие интерферонов обеспечивается неструктурными белками [68,132]. Исследования показали, что комплекс ISGF3 является мишенью анти-IFN стратегий, используемых некоторыми вирусами с негативной РНК. Неструктурные белки вируса Сендай подавляют IFN-индуцированное фосфорилирование молекул STAT1, 2 и 3, обеспечивая тем самым дефосфорилирование и деградацию молекулы STAT1, и пути активации транскрипционных факторов IRF3 и NF-κB [92, 93]. Неструктурные белки вирусов рода Rubulavirus принимают участие в протеолитическом расщеплении молекул STAT1 и STAT2 [44]. V-белки вирусов Хендра и Нипах (род Henipavirus) подавляют IFN-α/β-сигнальные пути за счет формирования комплексов с молекулами STAT, препятствуя тем самым их активации и ядерной транслокации [133]. Этот же самый белок у вируса кори (Morbillivirus) напрямую взаимодействуя с тирозиновой киназой Jak1, обеспечивает инактивацию молекулы STAT1 [54].

1.2.5. Терапия парагриппозной инфекции

В настоящее время нет разрешенных (утвержденных) противовирусных препаратов для лечения парагриппозной инфекции, хотя есть данные, что некоторые соединения проявляют против этих вирусов активность *in vivo* и *in vitro*.

Рибавирин (1-β-D- рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) представляет собой синтетический аналог нуклеозидов (рисунок 14). Рибавирин в виде аэрозоля применяли для лечения инфекций, вызванных респираторно-синцитиальным вирусом у грудных детей [41]. Препарат проявлял активность (противовирусное действие) против вирусов парагриппа *in vitro*, что позволило его использовать для лечения и профилактики респираторной инфекции нижних дыхательных путей у пациентов с иммунной недостаточностью [103]. Рибавирин оказывает свое противовирусное действие, прежде всего, за счет уменьшения уровней внутриклеточного GTP. В результате этого снижается активность IMP- дегидрогеназы и не происходит превращения инозин-5'-монофосфата в ксантозин-5'-монофосфат и, как следствие, синтеза гуаниновых нуклеотидов [156]. Однако следует отметить, что этот препарат обладает рядом значительных недостатков. Во-первых, при ингаляционном введении рибавирин может вызывать кашель и бронхоспазм, а во – вторых, одним из его побочных эффектов является дозозависимая экстравазкулярная гемолитическая анемия, которая может вызвать смерть пациента [29, 152].

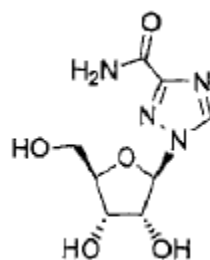


Рисунок 14 - Структурная формула рибавирина [139]

Ингибиторы нейраминидазы. Занамивир (4-гуанидин – 2,4- дидезокси-2,3-дигидро- N-ацетилнейраминовая кислота) – аналог сиаловой кислоты (рисунок 15). Является ингибитором нейраминидазы вируса гриппа. При ее ингибировании нарушается способность вирусов проникать в здоровые клетки, тормозится выход вирионов из инфицированной клетки и уменьшается их устойчивость к инактивирующему действию слизистого секрета дыхательных путей, вследствие чего тормозится дальнейшее распространение вируса в организме. Благодаря структурному сходству поверхностных гликопротеинов вируса гриппа и парамиксовирусов, занамивир можно использовать для лечения парагриппозной инфекции. Однако в результате тестов на ингибирование нейраминидазы было показано, что IC_{50} для занамивира составляет $250\mu M$ и что этот препарат в 100000 раз менее активен в отношении ВПГЧЗ по сравнению с вирусом гриппа [63].

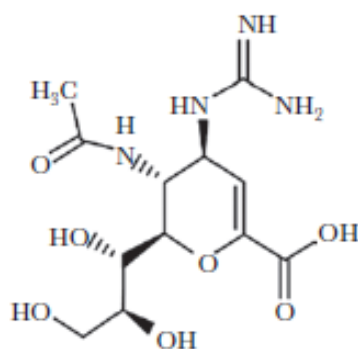


Рисунок 15 - Структурная формула занамивира [139]

В 1991 году были обнаружены новые соединения EICAR и TJ13025, демонстрирующие активность *in vitro* против орто- и парамиксовирусов (рисунок 16). По своей химической природе эти соединения являются аналогами нуклезидов. EICAR (5-этинил-1-β-D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид) может рассматриваться как аналог рибавирина, в котором азот в позиции 2 триазольного кольца заменен на пропин [40]. Кроме того, он обладает

похожим механизмом действия и большей эффективностью против ВПГЧ. TJ13025 (6'-(R)-С-метилнепаноцин А) – является 6'-(R) –метилпроизводным непаноцина А, который представляет собой циклопентениладенин [146]. Непаноцин А известен как ингибитор S-аденозинмоноцистеин гидролазы, обладает широким спектром действия против ДНК и РНК-вирусов, но является достаточно токсичным для клеток. Предполагают, что соединения EICAR и TJ13025 могут препятствовать процессам метилирования мРНК вирусов.

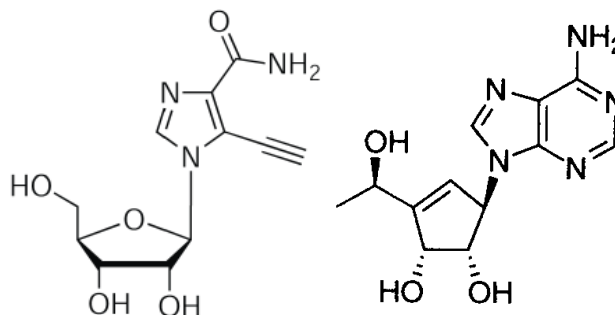


Рисунок 16 - Структурные формулы EICAR [40] и TJ13025 [146]

В 2004 году Alutova et al. исследовали активность соединений BCX2798 и BCX2855 против вирусов парагриппа человека 1, 2, 3 типов *in vitro* на культуре клеток LLC-MK2 (рисунок 17). Мишенью этих соединений является гемагглютинин-нейраминидаза вируса. BCX2798 и BCX2855 были созданы на основе HN-белка вируса болезни Ньюкасла с добавлением к нему 2-дезоксидезокси-2,3-дидегидро-N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac2en). Гидроксильный радикал в позиции О-4 был заменен на азидный и дихлорметансульфониламидный, а метильный радикал в С-5 – на изопропильный. Было показано, что соединения BCX2798 и BCX2855 снижают титр вируса в легочной ткани и снижают уровень смертности у мышей, инфицированных рекомбинантным вирусом парагриппа [6, 7].

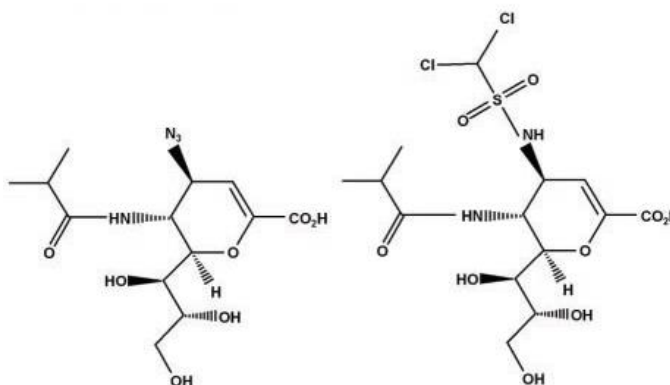


Рисунок 17 - Структурные формулы BCX2798 и BCX2855 [6]

В настоящее время новым перспективным соединением в отношении ВПГЧ является DAS181 – рекомбинантный белок слияния. Его молекула отщепляет остатки сиаловых кислот от поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей и предотвращает инфекцию [102]. DAS181 использовался для терапии парагриппозной инфекции у пациентов с иммунной недостаточностью, в результате которой отмечалось полное или частичное выздоровление у 81% пациентов. В настоящее время препарат находится на второй стадии клинических испытаний [79].

Специфические иммуностимуляторы (дигидрогептапренол, N-ацетилглюкозаминилмурамил, три- или тетрапептиды, имиквимод) могут препятствовать возникновению парагриппозной инфекции. Их защитное действие основано на том, что они стимулируют выработку цитокинов [72]. Опыты *in vivo* показали, что иммунная терапия и применение стероидов приводят к уменьшению вирусных титров в легких и воспаления у хлопковых крыс, инфицированных ВПГЧ 3 типа [131].

1.3. Цитизин и его свойства

Цитизин (рисунок 18) - хинолизидиновый алкалоид, содержащийся в семенах и частях растений семейства Бобовые, таких, как ракичник, софора, баптизия и улекс [82, 165]. Наибольшее количество этого алкалоида содержится в семенах декоративного садового растения *Laburnum anagyroides* (Бобовник анагировидный) [165].

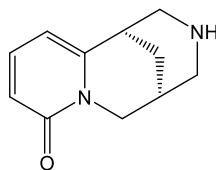


Рисунок 18 - Структурная формула (-)-цитизина [165]

Экстракты из семян и цветов ракичника издавна использовались в традиционной медицине при мигрени, бессоннице, невралгиях, а также в качестве противоастматического агента и инсектицида. В странах Восточной Европы цитизин и цитизинсодержащие растения применялись в качестве диуретиков, а в странах бывшего СССР в качестве дыхательных analeптиков [39, 136] с 60-х годов 20 века и по настоящее время цитизин входит в состав средств для лечения табакозависимости [165].

Цитизин был выделен в 1863 году Husemann и Marme, однако его химическая структура была описана только в 1930 году. Рентгеноструктурный анализ показал, что по своей химической структуре молекула цитизина обладает сходством с молекулой никотина [16]. Цитизин представляет собой бесцветные кристаллы, легко растворимые в воде, этаноле и хлороформе, менее растворимые в бензоле и ацетоне и практически нерастворимые в эфире [165].

Применение цитизина при лечении никотиновой зависимости основано на том, что его молекула обладает более высокой аффинностью к никотиновым ацетилхолиновым рецепторам $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ в ЦНС и $\alpha 3\beta 4$ в периферических ганглиях [11]. Кроме того, в результате исследований было показано, что цитизин и его производные могут связываться с адреналиновыми, дофаминовыми, серотониновыми, гистаминовыми и мускариновыми рецепторами. В связи с этим, широко исследуются возможные противовоспалительные, спазмолитические, антиаритмические, противовирусные и нейротропные свойства этих молекул [166].

Согласно экспериментальным данным, цитизин обладает низкой токсичностью, быстро распадается и легко выводится из организма, что делает его безопасным с фармакологической точки зрения [165]. Известное фармакологическое действие цитизина - холиномиметическое. Он возбуждает н-холинорецепторы вегетативных (симпатических и парасимпатических) ганглиев, мозгового вещества надпочечников и синокаротидной зоны. Взаимодействуя с н-холинорецепторами каротидных клубочков, цитизин вызывает кратковременную рефлекторную стимуляцию дыхательного центра продолговатого мозга. Возбуждение н-холинореактивных структур хромаффинной ткани надпочечников сопровождается увеличением выделения эпинефрина, что, в сочетании со стимуляцией симпатических ганглиев, приводит к повышению АД. Гипертензивный эффект может использоваться при угнетении кровообращения и других гипотензивных состояниях [2].

Таким образом, цитизин, воздействуя на дыхательные центры продолговатого мозга, стимулирует жизненно важные функции дыхания и кровообращения. Можно, следовательно, предположить, что в комбинации с вирусингибирующей активностью использование его производных в терапии респираторных вирусных инфекций будет препятствовать развитию вирус-бактериальной пневмонии и способствовать клиренсу вируса.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исследуемые вещества

Соединения класса производных цитизина были синтезированы в институте органической химии УНЦ РАН, г. Уфа. В качестве препаратов сравнения использовали осельтамивир и рибавирин.

2.2. Культуры клеток

Перевиваемые культуры клеток MA-104 (клетки почки макаки резус) и MDCK (клетки почки собаки) получены из коллекции Музея клеточных культур ФГБУ «НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Клеточные культуры (10^6 клеток/мл) рассеивали на 96-луночные микропланшеты (Orange Scientific, США) по 180 мкл в лунку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5%CO₂ до формирования конфлюэнтного монослоя на дне лунок.

2.3. Среды

Для культивирования клеток в работе использовали питательную среду альфа MEM («Биолот», Россия), обогащенную L- глутамином, в которую добавляли бычий сывороточный альбумин (1,3 %) (Calbiochem, США) и трипсин (1мг/мл) (Fluca, США). Физиологический раствор готовили по следующей прописи: NaCl (Sigma, Германия) – 8,5 г/л и бидистиллированная вода – 1,0 л.

Для культивирования вирусов гриппа использовали бессывороточную питательную среду альфа MEM, обогащенную L-глутамином («Биолот», Россия) с добавлением 0,2 % раствора ципрофлоксацина и трипсина (1мг/мл). Для культивирования вируса парагриппа третьего типа в среду добавляли только антибиотик.

2.4. Вирусы

В работе использовали штаммы вирусы гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1), A/California/7/09(H1N1)pdm09, A/Владивосток/2/09 (H1N1), A/Aichi/2/68(H3N2), A/Mallard/Pennsylvania/10249(H5N2), B/Malaysia/2506/04 (линия В/Виктория), B/Florida/04/06 (линия В/Ямагата) и штамм вируса парагриппа человека 3 типа из коллекции ФГБУ «НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

2.5. Исследование токсичности синтетических производных цитизина

Все соединения тестировали на токсичность на культурах клеток МА-104 и MDCK. Для каждого соединения готовили серию трехкратных разведений на среде альфа MEM до получения соответствующих концентраций. Перед заливкой разведенных веществ удаляли ростовую среду с сывороткой. Далее в лунки вносили раствор исследуемых соединений. Клетки MDCK инкубировали 48 часов, а МА-104 96-120 часов при 37°C в 5% CO₂ в присутствии растворенных производных цитизина. По истечении необходимого времени степень деструкции клеточного монослоя оценивали с помощью метилтетразолиевого теста [116]. Клетки отмывали от супернатанта физиологическим раствором (по 100 мкл/лунку). Готовили раствор 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) 0,5 мг/мл: МТТ (“AppliChem”, Германия) растворяли в физиологическом растворе. Полученный раствор вносили в лунки (по 100 мкл) и помещали планшеты в CO₂-инкубатор (37°C) на 2 часа для того, чтобы произошло восстановление соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана. По истечении данного времени жидкость удаляли, заливали в лунки (по 100 мкл) ДМСО (диметилсульфоксид) и производили измерение оптической плотности при длине волны 535 нм на многофункциональном ридере «Victor 2 1440» (Perkin Elmer, Финляндия). На основании значений оптической плотности из двух параллельных измерений для каждой концентрации исследуемого соединения вычисляли ЦТД₅₀ (50% цитотоксическая доза) - дозу вещества в лунке при которой наблюдается деструкция 50% клеточного монослоя. Исходя из полученного значения ЦТД₅₀, рассчитывали рабочую концентрацию вещества.

2.6. Подготовка вируса

Штаммы вируса гриппа культивировали в 10-12 дневных куриных эмбрионах, вводя в аллантоисную полость 1-10 ЭИД₅₀/0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости инкубировали в течение 48 часов при температуре +37°C для вирусов гриппа А и 72 часа при +34°C для вирусов гриппа В.

Вирус парагриппа 3 типа культивировали на культуре клеток МА-104 в культуральных флаконах (Orange Scientific, США) в течение 96-120 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до состояния 70% деструкции монослоя.

2.7. Определение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа

Для каждого соединения готовили серию трехкратных разведений, начиная с $\frac{1}{2}$ ЦТД₅₀. Перед заливкой растворенных веществ удаляли среду, содержащую ростовую сыворотку. В лунки 96-луночного планшета с монослойной культурой клеток MDCK вносили раствор исследуемого соединения (по 100 мкл/лунку) и помещали на 1 час в CO₂ – инкубатор при 37°C. Из вирусосодержащего материала готовили серию 10-кратных разведений (10^{-1} – 10^{-6}) и вносили в лунки планшета в объеме 100 мкл. В качестве контроля в лунки вместо веществ вносили чистую культуральную среду. Планшеты инкубировали в течение 48 часов для вирусов гриппа А и 72 часа для вирусов гриппа В при 37°C и 5% CO₂.

Инфекционную активность вируса оценивали с помощью реакции гемагглютинации (РГА) с куриными эритроцитами. РГА проводили в круглодонных микропланшетах для иммунологических реакций (Медполимер, Россия). В лунки микропланшета переносили 100 мкл вирусосодержащей жидкости из соответствующей лунки культурального планшета, после чего туда вносили равный объем 1% суспензии куриных эритроцитов. Результаты реакции учитывали через 30 – 40 минут при комнатной температуре [78]. За титр вируса принимали наибольшее разведение, при котором наблюдалась полная агглютинация эритроцитов. На основании полученных данных рассчитывали ЭД₅₀ (50% эффективная доза) – дозу исследуемого соединения, при которой титр вируса снижается вдвое. Далее в ходе исследования определяли ИС (индекс селективности) – основной показатель при изучении специфического действия противовирусных лекарственных средств, позволяющий количественно определить противовирусную активность вещества. ИС определяется отношением ЦТД₅₀ к ЭД₅₀. Активными считали препараты, ИС которых был больше 10.

2.8. Определение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа 3 типа

Для каждого вещества готовили серию трехкратных разведений, начиная с $\frac{1}{2}$ ЦТД₅₀. Перед заливкой растворенного соединения удаляли ростовую среду. В лунки планшетов с монослойной культурой клеток МА-104 вносили вещество по 100 мкл/лунку и помещали на 1 час в CO₂ – инкубатор при температуре 37°C. По истечении необходимого времени в лунки планшета вносили вирус (10^{-1} – 10^{-6}). В качестве контроля в лунки вместо соединений добавляли чистую культуральную среду. Планшеты инкубировали 96-120 часов при 37°C в атмосфере 5%CO₂.

Инфекционную активность вируса оценивали при помощи регистрации характерного вирусспецифического цитопатогенного действия (ЦПД) в лунках. На основании полученных результатов рассчитывали ЭД₅₀ и ИС для каждого из тестируемых соединений.

2.9. Изучение стадии репродукции вируса гриппа – мишени действия синтетических производных цитизина

Эксперимент проводили на культуре клеток MDCK. Клетки рассеивали в 24-луночный планшет и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до состояния конфлюэнтного монослоя. Для исследования выбрали соединение с высоким индексом селективности и вносили его в культуру клеток в активной нетоксичной концентрации до, после или одновременно с внесением вируса. Время внесения вещества отсчитывали от точки 0 – времени, когда вирус входит в клетку.

Вирус добавляли к клеткам в момент времени, условно обозначаемый как точка -1, после чего планшеты с клетками выдерживали в течение 1 часа при температуре +4°C. Затем вирус удаляли и промывали планшеты два раза чистой культуральной средой. Далее, в точке 0, в клетки вносили препарат и помещали планшет в CO₂ – инкубатор при 37°C, где он находился в течение 10 часов, до окончания эксперимента.

Исследуемое вещество вносили в следующие сроки относительно добавления вируса: (-2) - (-1) – препарат внесен за час до добавления вируса, (-1) - 0 – одновременно с вирусом, 0 – 2, 2 – 4, 4 – 6, 6 – 10 часов после заражения. В качестве позитивного контроля использовали интервал (-2) – 10, где исследуемое вещество присутствовало в течение всего эксперимента.

После окончания эксперимента из супернатанта в лунках готовили серию десятикратных разведений (10^{-2} - 10^{-7}) и вносили в 96-луночные планшеты с монослойной культурой клеток MDCK, которые затем инкубировали в течение 48 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Результаты эксперимента учитывали с помощью реакции гемагглютинации, которая была описана выше. Вирусные титры выражали в lgTCID₅₀/0,2 мл [12].

2.10. Получение ультратонких срезов для электронномикроскопического исследования влияния производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции *in vitro*

Клеточную культуру MDCK высевали в 24-луночные планшеты и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до состояния конфлюэнтного монослоя. Для проведения эксперимента готовили раствор исследуемого вещества в нетоксичной активной концентрации в чистой культуральной среде альфа MEM («Биолот», Россия). Перед заливкой растворенного соединения удаляли ростовую среду, содержащую сыворотку. В лунки вносили вещество и вирус. В контрольные лунки вносили вирус и чистую культуральную среду. Планшеты инкубировали в

течение 1 часа при температуре +4°C. По истечении необходимого времени планшеты отмывали от вирусодержащей жидкости чистой культуральной средой альфа MEM («Биолот», Россия). В лунки снова добавляли вещество, а в лунки с контролем вируса – чистую культуральную среду. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор при 37°C на 6 часов. Затем из планшетов сливали супернатант, добавляли 0,8% раствор глутарового альдегида на среде альфа MEM и оставляли на 15 минут. Далее клетки соскабливали из лунок, переносили суспензию в 1,5 мл пробирки и центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 2500 об/мин, после чего аккуратно удаляли супернатант и добавляли в пробирки 1мл 2,5% раствора глутарового альдегида на среде альфа MEM. Пробирки с фиксатором помещали в холодильник (+4°C) на 24 часа. После супернатант удаляли, образцы трижды промывали в 0,2 М какодилатном буфере (pH 7,2) по 5 минут и фиксировали материал в 1% растворе OsO₄ на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2). Затем материал отмывали от фиксатора трижды физиологическим раствором по 5 минут. Обезвоживание материала осуществляли в спиртах восходящей концентрации: 30% (10 минут), 50% (10 минут), 70% (10 минут), 96% (дважды по 5 минут), 100% (дважды по 5 минут), и в абсолютном ацетоне (трижды по 15 минут). В стеклянной пробирке готовили заливочную смесь смол: эпон 812 (6,25 мл), Аралдит М (3,75 мл), DDSA (13,75 мл) + DMP-30 (25-30 капель) (Fluka, Германия). Смесь тщательно перемешивали и хранили при -20°C. Далее обезвоженный материал пропитывали смесью из абсолютного ацетона (1 часть) и заливочной смолы (1 часть) и выдерживали материал в этой смеси в эксикаторе 2 часа в эппендорфе с закрытой крышкой и 12 часов с открытой крышкой. Далее материал, пропитанный смолой, переносили и ориентировали в желатиновых капсулах, предварительно заполненных заливочной смолой. Полимеризацию смол проводили в термостате при 37°C в течение 12 часов и при 60°C в течение 48 часов. Из полученных блоков готовили ультратонкие срезы, которые затем контрастировали в цитрате свинца по Рейнольдсу в течение 10 минут. Далее сетки промывали в дистиллированной воде, высушивали и изучали морфологию клеток при помощи просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (Jeol, Япония) при инструментальном увеличении x5 000 – x50 000.

2.11. Определение ингибирования активности нейраминидазы флюоресцентным методом

В эксперименте использовали следующие реактивы:

Ферментный буфер: 32,5 mM MES (морфолино – 2- этансульфоновая кислота), pH 6.0 (Sigma, США), 4mM CaCl₂

Раствор субстрата: Ферментный буфер + 0,2 mM MUNANA (4-метилумбеллиферил- α -D-N-ацетилнейраминовая кислота) (Sigma, США)

Стоп-раствор: 25% этанол, 0,1М глицин, рН10 (Sigma, США)

Для проведения эксперимента использовали планшеты Costar (США) черного цвета. Готовили 20% вирусные разведения в ферментном буфере. Из исследуемого препарата готовили 10 трехкратных разведений в MES и добавляли по 25 мкл каждого разведения в соответствующую лунку планшета. В качестве положительного контроля вместо исследуемых соединений в лунки вносили ферментный буфер. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После инкубации в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора субстрата и инкубировали планшеты при комнатной температуре 30 минут. Затем в лунки добавляли по 150мкл стоп-раствора и проводили измерения с помощью многофункционального ридера «Victor 2 1440» (Perkin Elmer, Финляндия). ЭД₅₀ рассчитывали, используя анализ линейной регрессии в программе Microsoft Excel.

2.12. Получение устойчивых к синтетическим производным цитизина штаммов вирусов гриппа и парагриппа

Для получения устойчивых штаммов вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1) культивировали в клеточной культуре MDCK, а вирус парагриппа 3 типа на культуре клеток МА-104 в 24-луночных планшетах в присутствии нарастающих концентраций исследуемых производных цитизина, начиная с концентрации равной 1ЭД₉₀ (см.далее). При каждом следующем пассаже концентрацию вещества увеличивали вдвое до тех пор, пока она не достигала значений ЦТД₅₀ [12]. Всего для каждого вируса провели пять последовательных пассажей. О приобретении вирусами резистентности судили по снижению противовирусной активности исследуемых соединений в отношении пассированных вирусов по сравнению с исходными (контрольными). Оценку противовирусного эффекта соединений в отношении пассированных вирусов проводили после второго, четвертого и пятого пассажей.

2.13. Исследование организации и полимеризации актина и организации микротрубочек в клетках методом конфокальной микроскопии

Культуру клеток MDCK высевали в 24-луночный планшет, в лунки которого были помещены покровные стекла (Menzel, Германия), и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до формирования конфлюэнтного монослоя. В лунки добавляли соединение в активной нетоксичной концентрации и вирус. В качестве контроля в лунки вносили чистую культуральную среду. Планшеты инкубировали при температуре +4°C в течение 1 часа. Далее из лунок удаляли супернатант и промывали планшеты дважды чистой культуральной средой. В лунки с препаратом добавляли исследуемое вещество и культуральную среду, а во все остальные –

только культуральную среду. Затем планшеты инкубировали в течение 6 часов в атмосфере 5%CO₂ при 37°C. После инкубации из лунок удаляли супернатант и дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), после чего клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида на PBS в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее удаляли фиксатор, промывали планшеты дважды PBS и пермеабелизировали клетки 0,1% раствором Triton X-100 на PBS (5 минут, при комнатной температуре). Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте в 0,3 мМ растворе конъюгата фаллоидина с флуоресцентным красителем ATTO488 (Sigma-Aldrich, США), приготовленном на фосфатно-солевом буфере. Ядра клеток окрашивали 300 нМ раствором DAPI (2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамадин дигидрохлорид) (Sigma-Aldrich, США) на фосфатно-солевом буфере (5 минут, комнатная температура). Покровные стекла затем промывали несколько раз фосфатно-солевым буфером, заключали в специальную среду Fluoroshield™ (ImmunoBioScience Corp., США) и хранили в темноте при +4°C до проведения микроскопического исследования.

Для одновременной визуализации актина и тубулина после блокирования 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma-Aldrich, США) на PBS клетки инкубировали с первичными антителами (мышинные моноклональные антитела против α-тубулина (Sigma-Aldrich, Великобритания)), приготовленными в концентрации 1мкг/мл на 5% БСА, в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки затем дважды промывали PBS и инкубировали с козыми анти-мышинными АТ, меченными флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647 (ThermoFisher, США), приготовленными в концентрации 2 мкг/мл на 5% БСА, 1 час при комнатной температуре в темноте. Далее промывали клетки фосфатно-солевым буфером. Актиновые филаменты и ядра в клетках окрашивали ATTO488-фаллоидином и DAPI соответственно, после чего покровные стекла промывали PBS, заключали в среду Fluoroshield™ (ImmunoBioScience Corp., США) и хранили в темноте при +4°C до проведения микроскопического исследования.

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию выполняли на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 (Leica, Германия). DAPI возбуждали при длине волны 405 нм, ATTO488-фаллоидин – при 488 нм, а Alexa Fluor 647 – α-тубулин – при 576 нм. Анализ полученных изображений осуществляли с помощью программного обеспечения Leica Application Suite X (LasX, Германия).

2.14. Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей

Опыты проводили на белых беспородных мышах, полученных из питомника «Рапполово» (Россия). В эксперименте использовали адаптированный к мышам вирус A/PR/8/34 (H1N1), который культивировали в 10-12 дневных куриных эмбрионах. Для титрования вирусосодержащей аллантоисной жидкости (АЖ) мышей (по 5 шт. в группе) заражали интраназально под легким эфирным наркозом серийными десятикратными разведениями полученной АЖ (от 10^{-1} до 10^{-5}) в объеме 50мкл/мышь. Смертность животных учитывали в течение 2 недель после заражения. На основании полученных результатов рассчитывали 50% летальную дозу вируса – LD₅₀. Для заражения мышей в дальнейшем эксперименте использовали дозу 10LD₅₀ в объеме 50 мкл/мышь.

Исследуемые вещества вводили внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл. В предварительной серии экспериментов оценивали токсичность этих соединений для животных. В опыте использовали максимально переносимые концентрации (МПК) веществ и дозы вдвое меньшие МПК. Далее препараты вводили внутрибрюшинно (0,2 мл) по лечебно-профилактической схеме: за 1 час до заражения и через 1, 2 и 3 суток после заражения [1].

В качестве противовирусного средства для группы положительного контроля использовали осельтамивир, входящий в состав препарата «Тамифлю» в дозировке 20 мг/кг. Препарат вводился по лечебно-профилактической схеме в объеме 0,2 мл.

Группе отрицательного контроля вводили внутрибрюшинно по лечебно-профилактической схеме физиологический раствор в объеме 0,2 мл.

Противовирусную активность исследуемых соединений учитывали по снижению смертности животных в опытных группах по сравнению с контрольной.

В экспериментах по изучению снижения смертности в каждой группе было по 10 мышей.

2.15. Статистическая обработка полученных данных

Расчет ЦТД₅₀, ЭД₅₀ и ЭД₉₀ проводили с помощью параметрического теста на основе t-критерия Стьюдента для выборок с нормальным распределением, или непараметрических критериев Уилкоксона-Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 и GraphPad Prism 7.0. Динамику гибели животных оценивали при помощи анализа кривых выживаемости Каплана-Мейера.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина

3.1.1. Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса гриппа *in vitro*

На первом этапе наших исследований мы изучали противовирусную активность синтетических производных цитизина в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34, относящегося к подтипу H1N1.

Для каждого из исследуемых соединений по результатам МТТ-теста и РГА рассчитывали 50% цитотоксическую концентрацию (ЦТД₅₀), 50% эффективную концентрацию (ЭД₅₀) и индекс селективности (ИС), как отношение ЦТД₅₀ к ЭД₅₀. Полученные значения сравнивали с таковыми для осельтамивира (ЦТД₅₀ = 300 мкг/мл, ЭД₅₀ = 2,5 мкг/мл, ИС=750) Активными в отношении вируса гриппа считались вещества с ИС 10 и более.

На основании химических модификаций синтетические производные (-)-цитизина были разделены на девять различных групп. Анализ химической структуры исследуемых соединений позволил выявить определенную закономерность в демонстрируемой ими противовирусной активности. На рисунке 19 представлена структурная формула (-)-цитизина, на которой цифрами пронумерованы атомы углерода в молекуле.

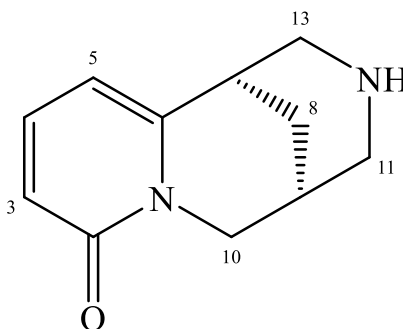
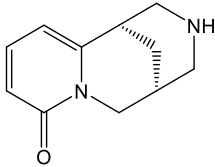
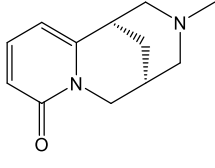
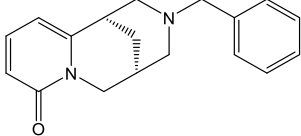
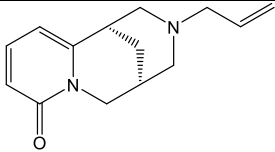
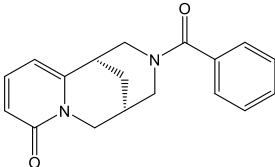
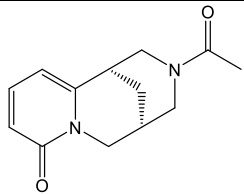
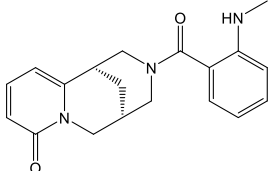
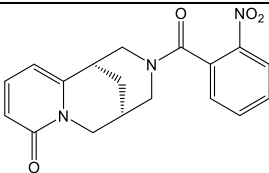


Рисунок 19 - Структурная формула (-)-цитизина

В первую группу входят 12N-замещенные производные (-)-цитизина. Все вещества этой группы по результатам метилтетразолиевого теста обладают низкой цитотоксичностью в культуре клеток MDCK. Противовирусную активность демонстрируют только два производных 2 (ИС=20) и 3 (ИС=10), где водород во вторичном атоме азота замещен на метил и бензил

соответственно. Введение в качестве радикалов других функциональных групп не приводит к выраженному вирусингибирующему эффекту соединений (таблица 1).

Таблица 1 - Цитотоксичность и противовирусная активность 12-N-замещенных производных (-)-цитизина в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1).

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
1 (Цитизин)		>330	200±18	2
2 (Метилцитизин)		>200	9,9±0,9	20
3		244±21,9	24,2±2,2	10
4		>330	154±13,9	2
5		>330	>330	1
6		>330	>330	1
7		207±18,6	>110	2
8		>330	>330	1

Продолжение таблицы 1

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
9		>300	>300	1
10		>300	175±15,8	2

Во вторую группу входят аддукты Дильса-Альдера различных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина N-фенилмалеинимидом (таблица 2). Вещества этой группы являются диастереомерами, т.е. соединениями, у которых конфигурация различается лишь у некоторых стереоцентров. На основании химической структуры молекул все аддукты второй группы делятся на « α -эндо» и на « β -эндо» (рисунок 20). По данным МТТ-теста все « α -эндо» диастереоизомеры обладают низкой токсичностью, за исключением соединения 20 (ЭД₅₀=156 мкг/мл). Все « β -эндо» аддукты за исключением производных 13 (ЦТД₅₀=35,4±3,2 мкг/мл) и 17 (ЦТД₅₀=22,7±2 мкг/мл) также обладают низкой токсичностью.

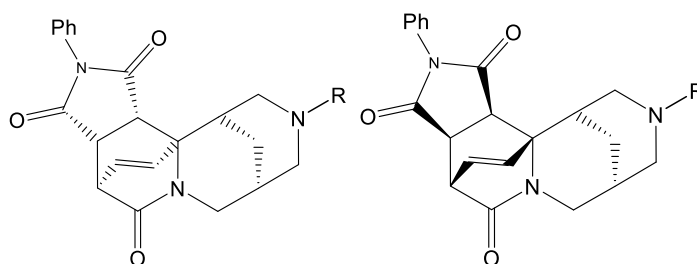
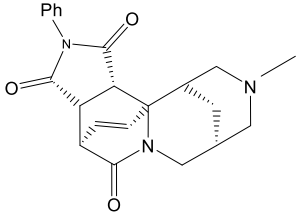
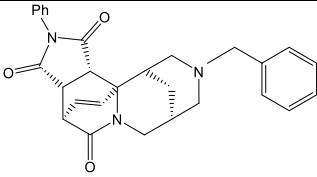
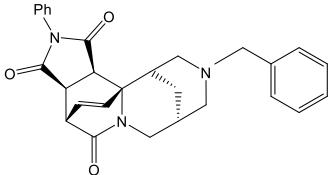
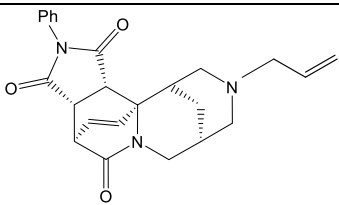
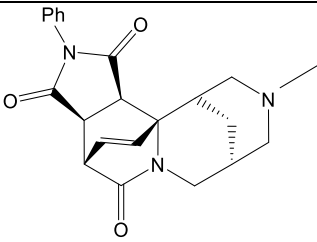
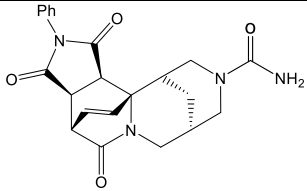


Рисунок 20 - Структурные формулы « α -эндо» и « β -эндо» аддуктов Дильса-Альдера различных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина N-фенилмалеинимидом

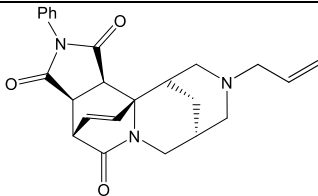
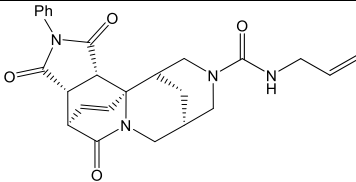
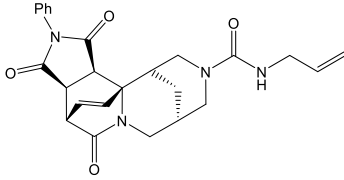
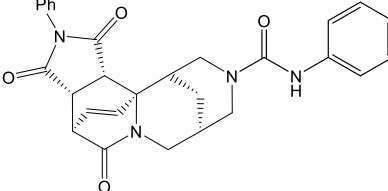
Активность в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) демонстрировали в основном вещества, находящиеся в « α -эндо» конформации. Исключение составляет лишь соединение 15 (ИС=19), которое демонстрирует умеренную активность в отношении этого вируса. Наиболее сильным вирусингибирующим действием обладали соединения 20 (ИС=156) и 14 (ИС=47), где водород во вторичном азоте был замещен фенилкарбамоилом и пропенилом соответственно. Введение других заместителей таких, как метил и бензил, в это положение

приводит к снижению противовирусного эффекта в производных под номерами 11(ИС=12) и 12 (ИС=16) (таблица 2).

Таблица 2 - Цитотоксичность и противовирусная активность 12-N-замещенных производных аддуктов Дильса-Альдера различных (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
11		>300	25±2,3	12
12		>300	18,5±1,7	16
13		35,4±3,2	>30	1
14		235±21,2	5±0,4	47
15		208±18,7	10,9±0,9	19
16		>300	200±18	2

Продолжение таблицы 2

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
17		22,7±2	4,3±0,4	5
18		>300	300±27,1	1
19		>300	>300	1
20		156,4±14,1	1,9±0,2	82

В третью группу входят аддукты Дильса-Альдера метилцитизина с N- замещенными малеинимидами (таблица 3). Соединения этой группы также находятся в двух конформациях: «α-эндо» и «β-эндо» (рисунок 21). Все вещества, по данным МТТ-теста, за исключением соединения 26 (ЦТД₅₀=49±4,4 мкг/мл), обладают низкой токсичностью. Противовирусную активность демонстрировали производные 22 (ИС=64), 23 (ИС=12) и 28 (ИС=12). Высокое вирусингибирующее действие соединения 22 (ИС=64), возможно, достигается за счет введения в качестве R 2-метоксибензила в сочетании с метильной группой во вторичном азоте. Использование в качестве R бензила и EtOH приводит к снижению ИС соединений 23 и 28 в 5 раз (таблица 3).

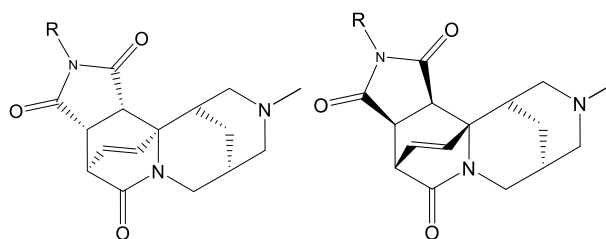
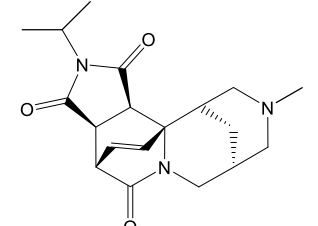
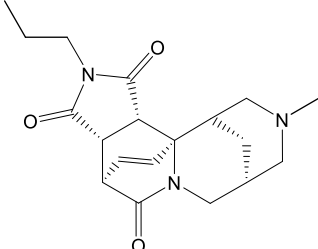
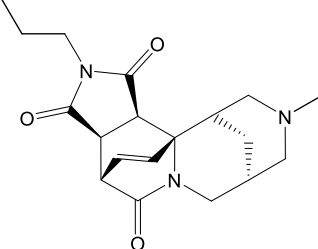
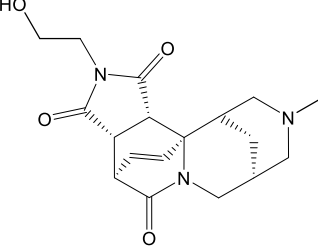
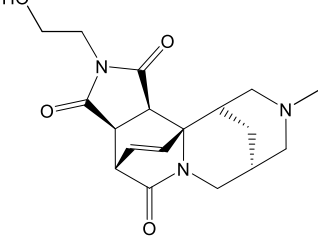
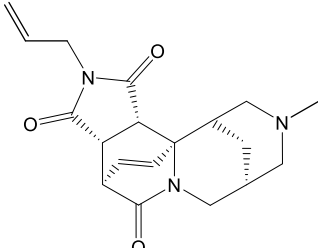


Рисунок 21 - Структурные формулы « α -эндо» и « β -эндо» аддуктов Дильса-Альдера метилцититизина с N- замещенными малеинимидами

Таблица 3 - Цитотоксичность и противовирусная активность аддуктов Дильса-Альдера метилцититизина с N- замещенными малеинимидами в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1)

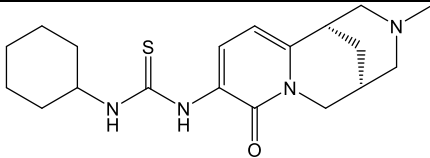
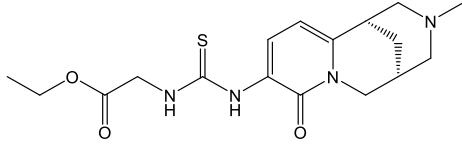
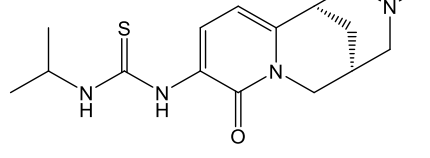
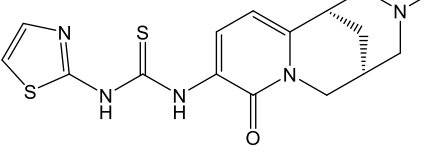
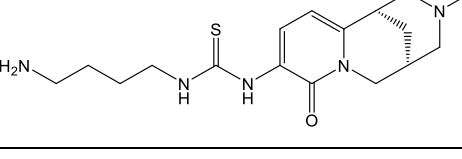
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
21		>330	140±12,6	2
22		>300	4,7±0,4	64
23		300±26,5	25±2,3	12
24		202±18,2	100±9,1	2

Продолжение таблицы 3

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
25		>300	300±25,5	1
26		49±4,4	30±2,7	2
27		>300	65,3±5,9	5
28		>330	26,5±2,4	12
29		330±29,6	>110	3
30		>300	45±4,1	7

В четвертую группу входят тиомочевины, полученные из 3-аминопроизводного метилцитизина (таблица 4). По данным МТТ-теста, все соединения этой группы обладают низкой и умеренной токсичностью. Согласно полученным результатам, ни одно вещество не обладает противовирусной активностью. Возможно, это связано с наличием сильно разветвленных углеводородных радикалов, содержащих большое количество различных функциональных групп (таблица 4).

Таблица 4 - Цитотоксичность и противовирусная активность тиомочевин, полученных из 3-аминопроизводного метилцитизина в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1)

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
31		101,3±9,1	>33	3
32		>330	>330	1
33		>300	130±11,7	2
34		93,7±8,4	>100	1
35		>330	300±27,2	1

Пятая группа включает в себя тиомочевины различной топологии (таблица 5). Тиокарбамидная группа в молекулах этих соединений присоединена ко вторичному атому азота (рисунок 22). По данным метилтетразолиевого теста, почти все тиомочевины обладают низкой токсичностью. Противовирусную активность демонстрирует только одно соединение под номером 42 (ИС=12) (таблица 5). Возможно, вирусингибирующее действие этого производного обеспечивается за счет ненасыщенного углеводородного радикала – пропенила в сочетании с атомом хлора при C5 в молекуле цитизина. Введение одного или двух атомов брома в качестве

R2 и R3 в сочетании с различными заместителями, присоединенными к тиокарбамидной группе, привело к потере противовирусной активности (ИС<10).

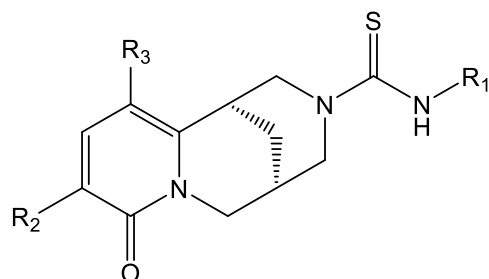


Рисунок 22 - Структурная формула молекулы тиомочевины

Таблица 5 - Цитотоксичность и противовирусная активность тиомочевин различной топологии в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1)

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
36		>330	100±9,1	3
37		>330	100±9,4	3
38		>100	40±3,6	3
39		>300	>300	1
40		>300	140±12,6	2

Продолжение таблицы 5

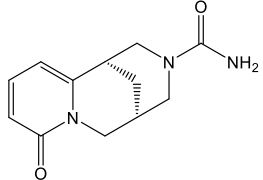
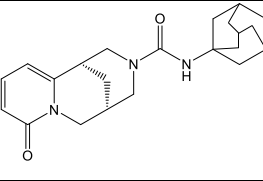
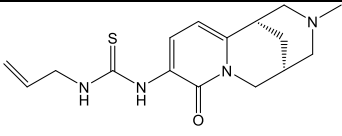
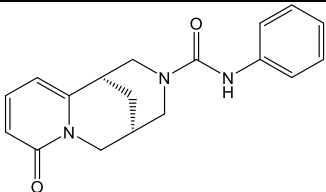
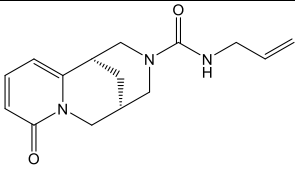
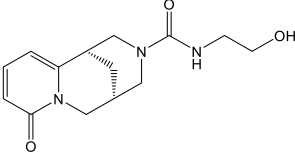
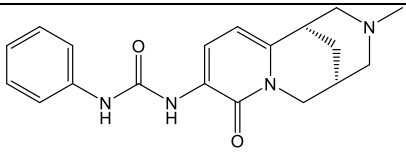
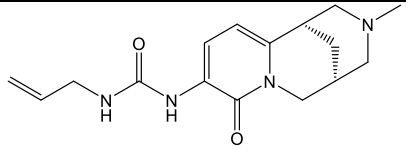
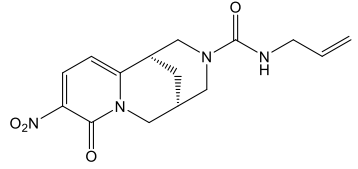
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
41		>330	>330	1
42		>330	27±2,4	12
43		>330	250±22,5	1

Шестая группа содержит мочевины различной топологии (таблица 6). Все вещества этой группы по своей химической структуре можно разделить на две подгруппы. Первая подгруппа содержит мочевины с тиокарбамидной или карбамидной функциональной группой в 2-пиридиновом ядре, а вторая подгруппа – во вторичном атоме азота. Все вещества шестой группы, за исключением производного 50 (ЦТД₅₀=80±7,2 мкг/мл), обладают низкой токсичностью.

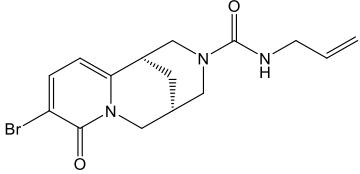
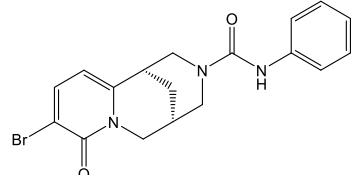
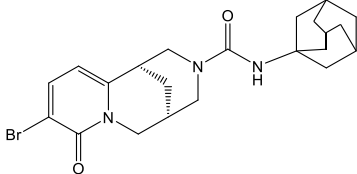
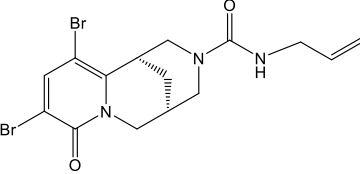
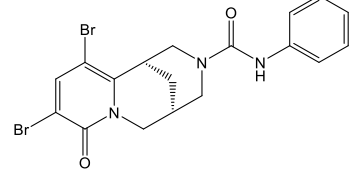
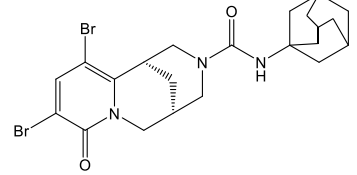
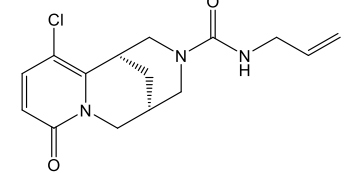
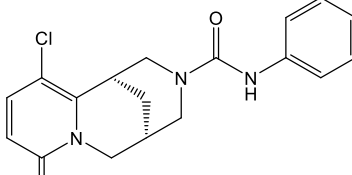
Высокую противовирусную активность демонстрировали мочевины 50 (ИС=47) и 51 (ИС=59), относящиеся к первой подгруппе. Анализ химической структуры молекул этих соединений позволил предположить, что демонстрируемое ими вирусингибирующее действие связано с использованием в качестве заместителей фенила и пропенила (таблица 6).

Вещества 53 (ИС=16), 54 (ИС=14) и 56 (ИС=12), относящиеся ко второй подгруппе, обладали умеренной активностью в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Возможно, противовирусный эффект веществ достигается за счет сочетания брома в третьем углероде с фенилом и пропенилом в соединениях 53 и 54. При этом, введение еще одного атома брома в производном 56 в сочетании с пропенилом у карбамидной группы незначительно снижает значение ИС (таблица 6).

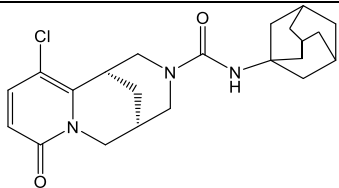
Таблица 6 - Цитотоксичность и противовирусная активность мочевинок различной топологии в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1)

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
44		>330	250±22,5	1
45		211±18,9	>110	2
46		>330	110±9,9	3
47		>330	300±27,2	1
48		>330	>330	1
49		>330	300±26,2	1
50		80±7,2	1,7±0,2	47
51		>330	5,6±0,5	59
52		>330	300±26,8	1

Продолжение таблицы 6

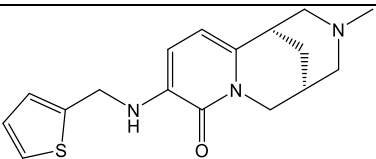
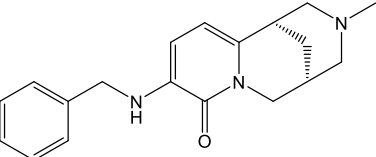
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
53		>330	21±1,9	16
54		330±29,4	23±2,1	14
55		164±14,8	109±9,8	2
56		>330	28±2,5	12
57		>330	184±16,6	2
58		>330	>330	1
59		>330	>330	1
60		>330	>330	1

Продолжение таблицы 6

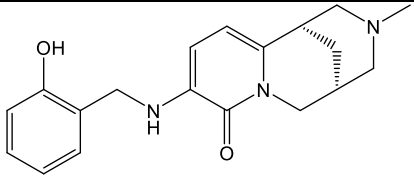
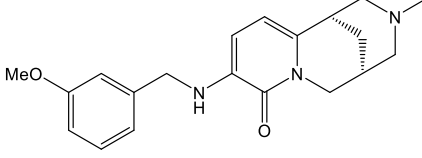
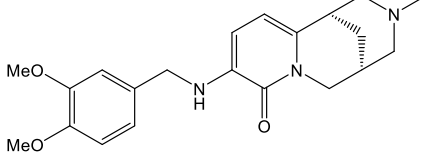
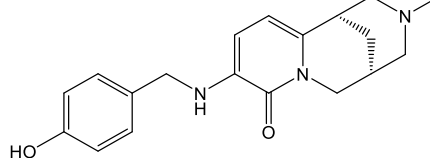
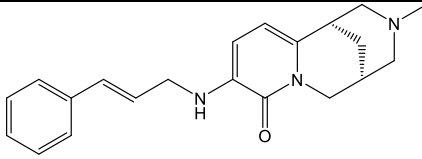
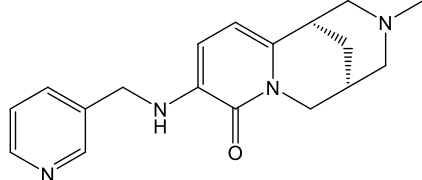
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
61		>330	>330	1

Седьмая группа включает вторичные амины, полученные алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина (таблица 7). По данным МТТ-теста вещества, входящие в эту группу, за исключением соединений 65 (ЦТД₅₀=89±8 мкг/мл), 67 (ЦТД₅₀=59±5,3 мкг/мл) и 68 (ЦТД₅₀=38±3,4 мкг/мл), обладали низкой и умеренной цитотоксичностью. Самый высокий показатель ИС был у вещества 62 (ИС=63), где в качестве радикала используется ароматический пятичленный гетероцикл, содержащий один атом серы в цикле - тиофен. Введение в качестве заместителя шестичленного ароматического цикла – 2-гидроксibenzila - незначительно понижает противовирусный эффект соединения 64 (ИС=39) по сравнению с производным 62. Использование в качестве радикалов 3,4 – диметоксибензила и 3-метоксибензила также снижает ИС в 3 и в 5 раз в соединениях 65 (ИС=12) и 66 (ИС=20). Умеренную противовирусную активность демонстрировало вещество 63 (ИС=14), где в качестве заместителя использовался простейший одновалентный радикал фенил (таблица 7).

Таблица 7 - Цитотоксичность и противовирусная активность вторичных аминов, полученных алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1).

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
62		303±27,4	4,8±0,4	63
63		115±10,4	8,4±0,8	14

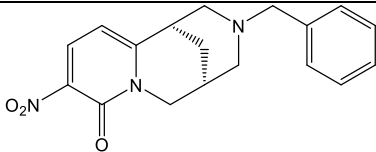
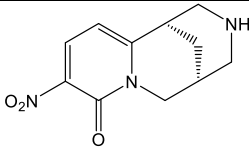
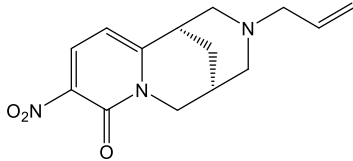
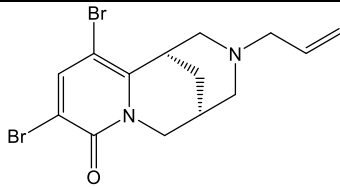
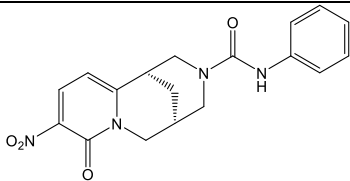
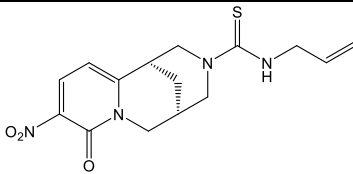
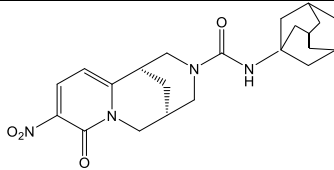
Продолжение таблицы 7

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
64		133±11,9	3,4±0,3	39
65		89±8	7,3±0,7	12
66		235±21,2	11,9±1,1	20
67		59±5,3	18±1,6	3
68		38±3,4	15,4±1,4	2
69		>300	300±27,4	1

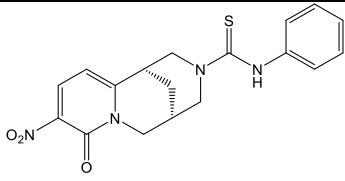
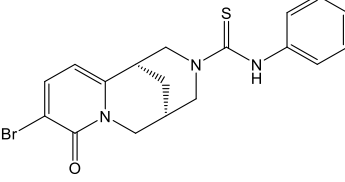
В восьмую группу входят производные 12-N-замещенных производных (-) -цитизина, модифицированные по 2-пиридиновому ядру (таблица 8). Все вещества, входящие в эту группу, имели низкую токсичность в культуре клеток MDCK. Противовирусную активность демонстрировали только два вещества под номерами 75 (ИС=11) и 77 (ИС=25). Анализ химической структуры этих соединений позволил выявить определенную закономерность в проявляемом ими противовирусном эффекте: наличие нитрогруппы в 2- пиридиновом ядре в сочетании с тиокарбамидной группой во вторичном атоме азота. Следует отметить также, что присоединение шестичленного гетероциклического ароматического радикала фенила к тиокарбамидной группе в производном 77 увеличивало его активность в 2 раза по сравнению с

веществом 75, содержащим в этом положении ненасыщенный алифатический углеводородный радикал пропенил (таблица 8).

Таблица 8 - Цитотоксичность и противовирусная активность 12-N-замещенных производных (-) -цитизина, модифицированных по 2-пиридиновому ядру, в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1)

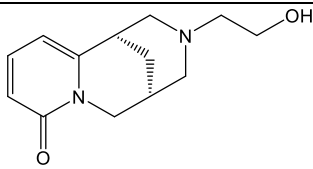
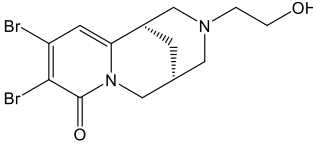
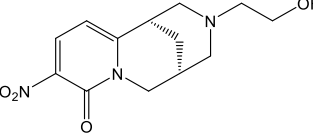
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
70		330±29,5	>110	3
71		>330	>100	3
72		>300	300±27	1
73		>300	300±27,4	1
74		>300	300±25,6	1
75		>300	26,3±2,4	11
76		>300	300±27	1

Продолжение таблицы 8

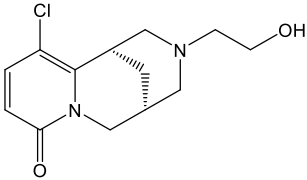
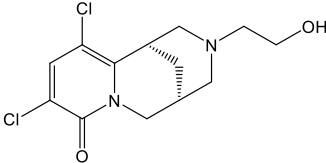
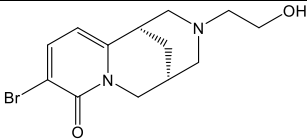
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
77		>300	12,1±1,1	25
78		237±21,3	>300	1

В девятую группу входят производные 12-N-этилоксипроизводного (-)-цитизина, модифицированные по 2-пиридиновому ядру (таблица 9). По результатам МТТ-теста, все соединения этой группы обладали низкой токсичностью в культуре клеток MDCK. Высокую противовирусную активность демонстрировало только одно вещество 79 (ИС=97). Вирусингибирующее действие этого соединения, возможно, обусловлено наличием гидроксиэтила во вторичном атоме азота, так как различные модификации по 2 пиридиновому ядру (присоединение нитрогруппы, атомов хлора и брома) приводили к потере противовирусной активности производных (таблица 9).

Таблица 9 - Цитотоксичность и противовирусная активность производных 12-N-этилоксипроизводного (-) -цитизина, модифицированные по 2-пиридиновому ядру в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1)

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
79		>300	3,1±0,3	97
80		>330	>330	1
81		>300	>300	1

Продолжение таблицы 9

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
82		>300	300±27,4	1
83		>300	300±24,5	1
84		>300	300±25,6	1

В результате проведенных исследований было показано, что большинство синтетических производных цитизина обладали низкой цитотоксичностью в культуре клеток MDCK. Исключение составили только 5 веществ – 13, 17, 26, 67 и 68.

Кроме того, по результатам первичного скрининга *in vitro*, было из 84 исследуемых веществ было выявлено 24 соединения, активных в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). При этом сам (-)-цитизин (соединение 1), являющийся исходной матрицей для всей скрининговой библиотеки, противогриппозной активностью не обладал (ИС=2). Больше всего активных веществ было выявлено во второй и седьмой группах. Как показал анализ «структура – активность», в веществах второй группы вирусингибирующее действие достигалось за счет сочетания «α-эндо» - конформации с такими заместителями во вторичном азоте, как метил (соединение 11), фенил (соединение 12), пропенил (соединение 14) и фенилкарбомаил (соединение 20). Во вторичных аминах (группа 7) высокий противовирусный эффект достигается за счет использования в качестве радикалов ароматического пятичленного гетероцикла тиофена (соединение 62), бензила (соединение 63) 2-гидроксибензила (соединение 64), 3 – метокси- и 3,4-диметоксибензила (соединения 65 и 66). Учитывая полученные результаты, для дальнейших исследований были отобраны четыре соединения-лидера, относящиеся к аддуктам Дильса-Альдера, 11, 12, 14 и 22, ΔT (снижение вирусных титров) для которых составляло 4,0, 3,5, 3,0 и 4,5 соответственно.

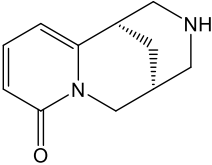
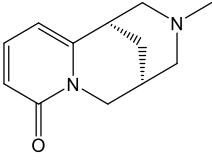
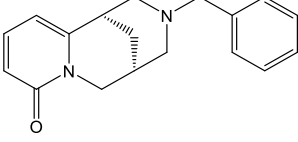
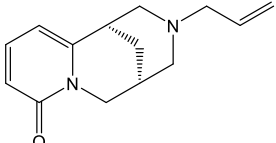
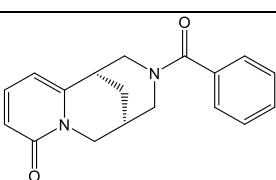
3.1.2. Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа человека третьего типа *in vitro*

На следующем этапе наших исследований мы изучали противовирусную активность синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа человека третьего типа.

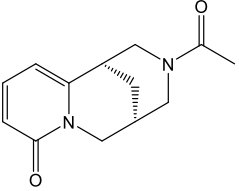
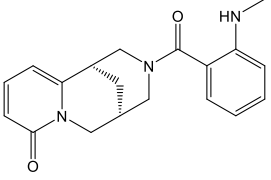
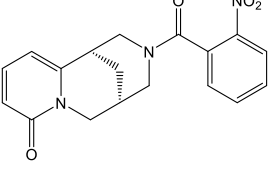
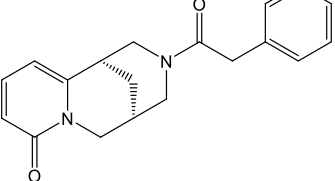
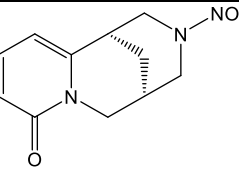
Для каждого из тестируемых соединений рассчитывали по результатам МТТ-теста ЦТД₅₀, ЭД₅₀ и ИС (отношение ЦТД₅₀ к ЭД₅₀). Полученные значения сравнивались с таковыми для рибавирина (ЦТД₅₀= >300 мкг/мл, ЭД₅₀= 2,5 мкг/мл, ИС=120) Активными считали производные с ИС 10 и более.

Соединения первой группы, представленные 12-N-замещенными производными (-)-цитизина, по данным метилтетразолиевого теста демонстрировали умеренную и низкую цитотоксичность в культуре клеток МА-104. Вирусингибирующим действием не обладало ни одно из тестируемых веществ (ИС<10) (таблица 10).

Таблица 10 - Цитотоксичность и противовирусная активность 12-N-замещенных производных (-)-цитизина в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
1 (цитизин)		230±20,7	36,8±3,3	6
2 (метилцитизин)		>300	300±27	1
3		80±7,2	>30	3
4		>100	50±4,5	2
5		118±10,6	50±4,5	2

Продолжение таблицы 10

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
6		>300	300±25,2	1
7		>100	>50	2
8		173±15,6	89±8	2
9		253±22,8	>50	5
10		303±27,3	>300	1

Соединения, относящиеся ко второй группе, за исключением веществ 13 (ЦТД₅₀=59,6±5,4 мкг/мл), 14 (ЦТД₅₀=78±7,02 мкг/мл) и 17 (ЦТД₅₀=32,5±2,9 мкг/мл), обладали низкой и умеренной токсичностью. Среди аддуктов, находящихся в «β-эндо» - конформации, только два производных (17 (ИС=32) и 19 (ИС=38)) демонстрировали активность в отношении вируса парагриппа 3 типа, где заместитель во вторичном атоме азота содержит ненасыщенный алифатический углеводородный радикал пропенил. При этом введение карбамидной функциональной группы в соединении 19 незначительно увеличивало активность этого вещества (таблица 11).

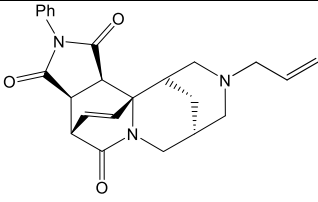
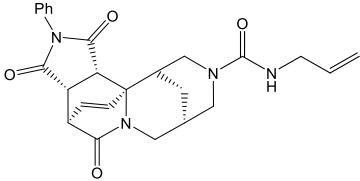
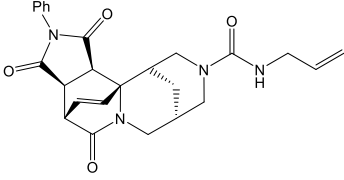
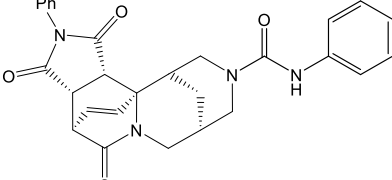
Среди «α-эндо аддуктов» активность в отношении ВПГЧЗ демонстрировали четыре соединения (11 (ИС=20), 12 (ИС=53), 18 (ИС=59) и 20 (ИС=83)). Самым активным оказалось вещество 20 (ИС=83), где в качестве заместителя во вторичном азоте использовался фенилкарбамоил – радикал, содержащий карбамидную группу с присоединенным к ней ароматическим шестичленным гетероциклом. Замена бензольного кольца на алифатический

ненасыщенный углеводород пропен, как в производном 18, приводила к снижению ИС в 1,4 раза. Введение в качестве радикала бензила снижало ИС в 1,5 раза (соединение 12), а метила – в 4 раза (соединение 11) (таблица 11).

Таблица 11 - Цитотоксичность и противовирусная активность 12-N-замещенных производных аддуктов Дильса-Альдера (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
11		198±17,8	10±0,9	20
12		100±8,9	1,9±0,2	53
13		59,6±5,4	12,2±1,1	5
14		78±7,02	36,8±3,3	2
15		170,2±15,3	>170	1
16		175,8±15,8	45±4,1	4

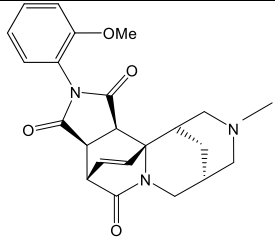
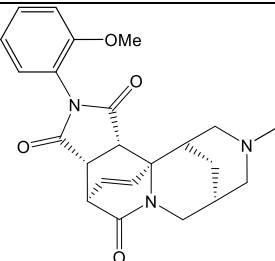
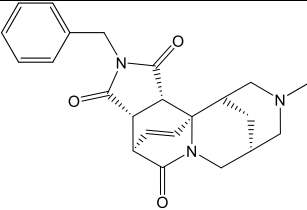
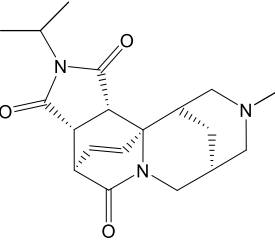
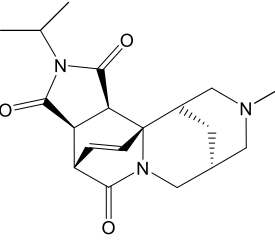
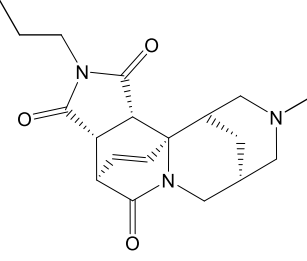
Продолжение таблицы 11

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
17		32,5±2,9	1±0,09	32
18		>300	5,1±0,5	59
19		191±17,2	5±0,45	38
20		>300	3,6±0,3	83

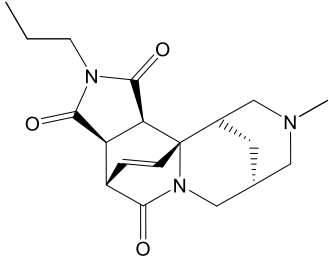
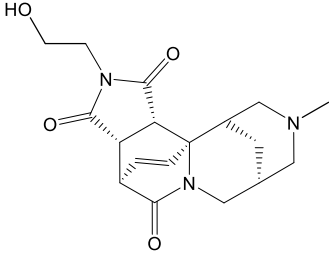
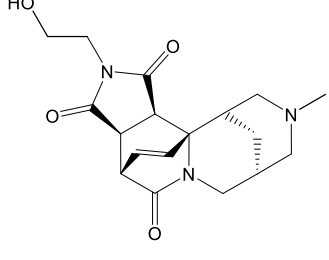
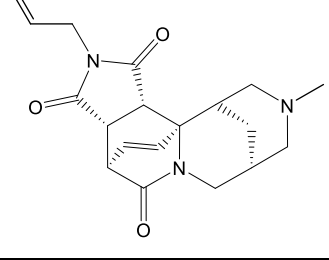
Вещества, входящие в третью группу, за исключением соединения 26 (ЦТД₅₀=46,6±4,2 мкг/мл), обладали низкой и умеренной токсичностью в культуре клеток МА-104. Среди «β-эндо» диастереомеров активными в отношении вируса парагриппа 3 типа оказались два соединения 25 (ИС=77) и 27 (ИС=21). При этом наибольший вирусингибирующий эффект достигался в том случае, где в качестве заместителя использовался наименее протяженный алифатический углеводород изопропил (вещество 25) (таблица 12).

Среди всех «α-эндо» аддуктов самым активным оказалось соединение 22 (ИС=134). Возможно, что вирусингибирующее действие этого вещества обеспечивается за счет введения в качестве заместителя 2-метоксибензила. Введение других заместителей в это же положение приводило к потере противовирусной активности (таблица 12).

Таблица 12 - Цитотоксичность и противовирусная активность аддуктов Дильса-Альдера метилцититизина с N-замещенными малеинимидами в отношении вируса парашриппа человека 3 типа

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
21		229±20,6	>170	1
22		201±18,1	1,5±0,1	134
23		163±14,7	>50	3
24		172±15,5	>170	1
25		>100	1,3±0,1	77
26		46,6±4,2	10,2±0,9	5

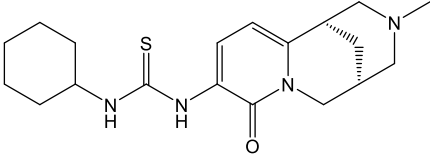
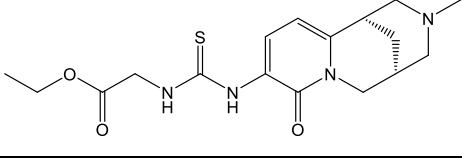
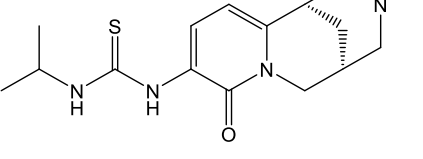
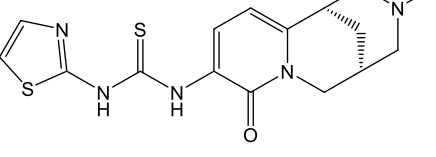
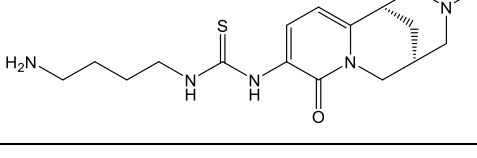
Продолжение таблицы 12

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
27		190±17,1	9,1±0,8	21
28		244±22	>170	1
29		154±13,7	>50	3
30		190±17,1	157,6±14,2	1

Все тиомочевины четвертой группы, за исключением производных 31(ЦТД₅₀=34±3,1 мкг/мл) и 34(ЦТД₅₀=41,7±3,8 мкг/мл), по данным МТТ-теста, имели умеренную токсичность в культуре клеток МА-104. Анализ химической структуры этих веществ позволил предположить, что высокая токсичность, возможно, связана с наличием менее протяженных углеводородных радикалов, присоединенных к тиокарбамидной группе. Активность в отношении вируса парагриппа 3 типа демонстрировали два вещества 32(ИС=36) и 35(ИС=64). Высокий вирусингибирующий эффект соединения 35 (ИС=64), возможно, достигался за счет использования в качестве радикала первичного амина аминопропана. При использовании в

качестве заместителя сложного эфира – этилформиата ИС вещества 32 снижался в 2 раза (таблица 13).

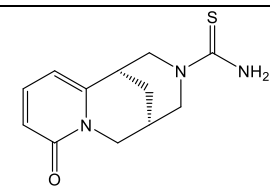
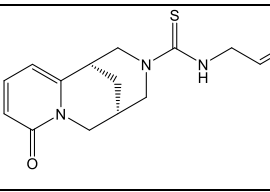
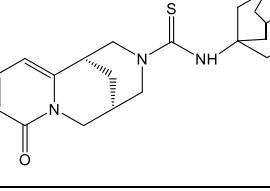
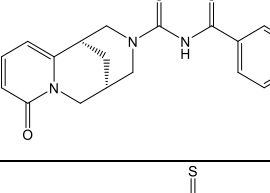
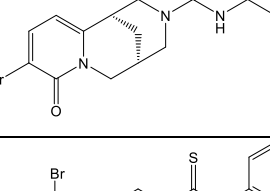
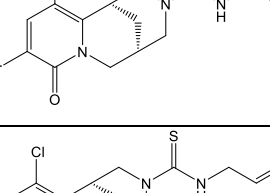
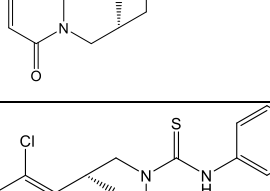
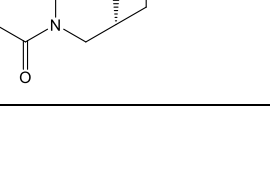
Таблица 13 - Цитотоксичность и противовирусная активность тиомочевин, полученных из 3-аминопроизводного метилцитизина в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
31		34±3,1	>17	2
32		>170	4,7±0,4	36
33		>100	>17	6
34		41,7±3,8	>17	3
35		>300	4,7±0,4	64

Вещества, входящие в пятую группу, по данным метилтетразолиевого теста, обладали умеренной и низкой цитотоксичностью в культуре клеток МА-104. Умеренную противовирусную активность демонстрировало соединение 37 (ИС=13), где к тиокарбамидной группе присоединен ненасыщенный углеводородный радикал пропенил. Присоединение брома к третьему атому углерода в сочетании с тем же ненасыщенным углеводородным радикалом в соединении 40 (ИС=56) приводило к увеличению ИС в 4 раза. Высокую противовирусную активность демонстрировали производные 39(ИС=41) и 41(ИС=94), в которых в качестве радикалов использовались шестичленные ароматические гетероциклы – фенил и фенилкарбамоил. Однако, следует отметить, что дополнительные модификации в веществе 41 такие, как присоединение двух атомов брома к третьему и пятому атомам углерода в молекуле

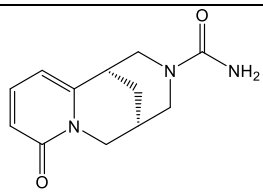
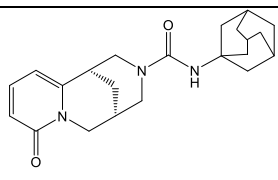
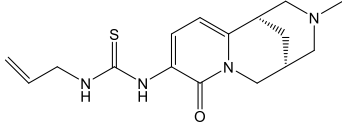
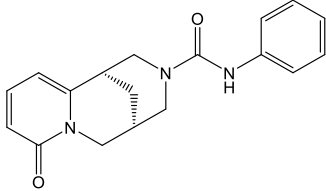
цитизина в сочетании с бензильным радикалом, значительно увеличивали его вирусингибирующее действие по сравнению с другими соединениями этой группы (таблица 14).

Таблица 14 - Цитотоксичность и противовирусная активность тиомочевин различной топологии в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

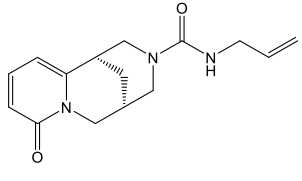
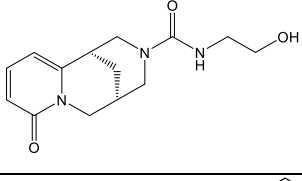
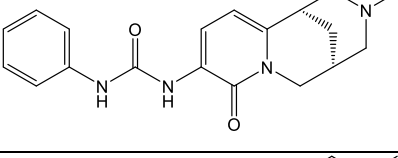
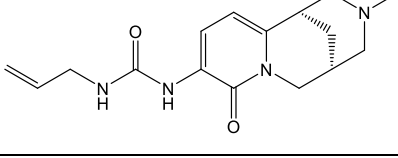
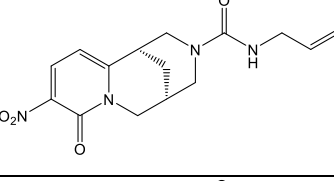
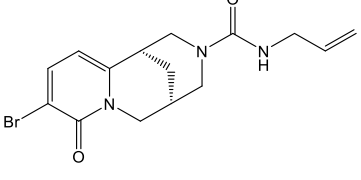
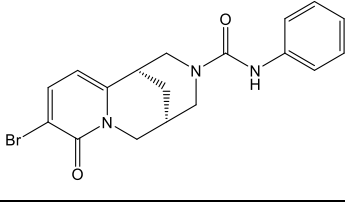
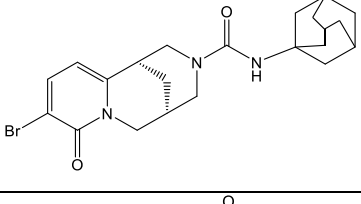
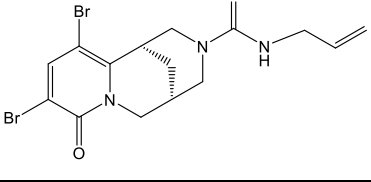
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
36		>300	>300	1
37		300±27	22,8±2,1	13
38		300±26,1	>300	1
39		>300	7,4±0,7	41
40		112±10,1	2±0,2	56
41		>300	3,2±0,3	94
42		192±17,3	>170	1
43		228±20,5	>170	1

Мочевины различной топологии, составляющие шестую группу, по результатам МТТ-теста, обладали умеренной и низкой токсичностью в культуре клеток. Исключение составляло лишь производное под номером 55 (ЦТД₅₀=56±5 мкг/мл). Высокую противовирусную активность демонстрировало соединение 48 (ИС=58), где к карбамидной группе присоединен ненасыщенный алифатический углеводородный радикал пропенил. Присоединение брома к третьему и пятому углеродам в молекуле цитизина в сочетании с этим радикалом во вторичном атоме азота, как в производном 56 (ИС=17), приводило к снижению ИС в 3 раза. Вирусингибирующий эффект достигался также за счет присоединения к карбамидной группе простейшего шестичленного ароматического радикала бензила (соединение 47 (ИС=21)). Умеренную противовирусную активность в отношении вируса парагриппа 3 типа демонстрировало вещество 55 (ИС=19). Анализ химической структуры молекулы этого производного показал, что демонстрируемый им противовирусный эффект достигался за счет следующих модификаций: присоединение адамантана к карбамидной группе и брома к третьему углероду в молекуле (-)-цитизина (таблица 15).

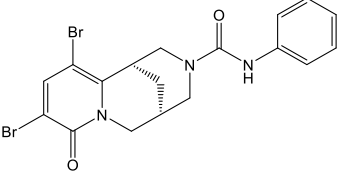
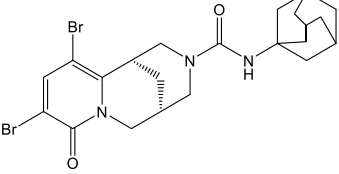
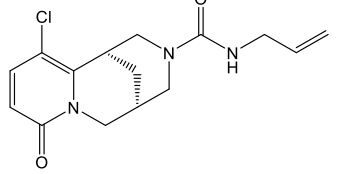
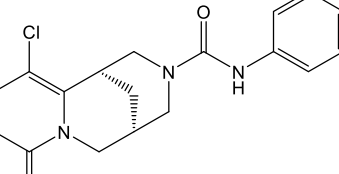
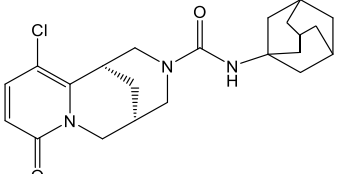
Таблица 15 - Цитотоксичность и противовирусная активность мочевины различной топологии в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ мкг/мл	ИС
44		256±23,1	85,7±7,7	3
45		149±13,4	>50	3
46		300±25,3	170	2
47		136±12,2	6,5±0,6	21

Продолжение таблицы 15

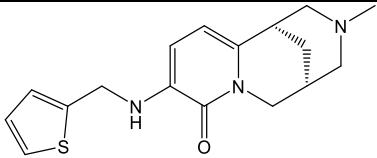
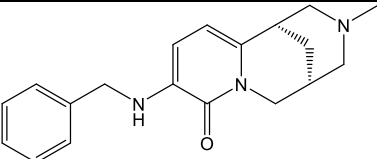
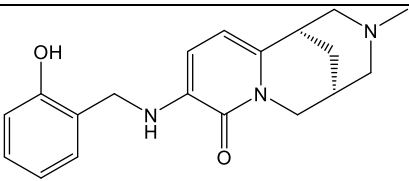
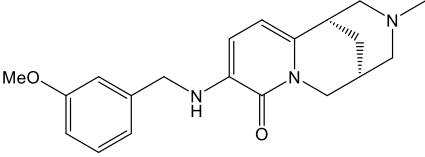
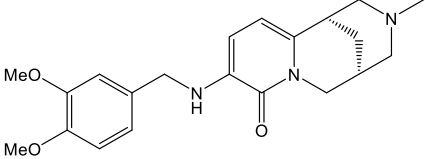
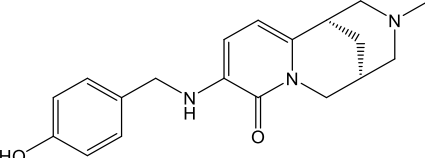
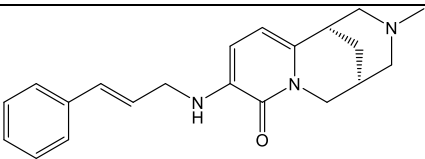
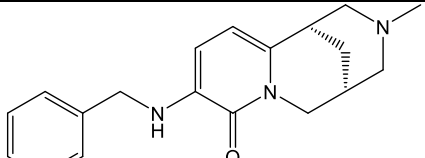
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ мкг/мл	ИС
48		>300	5,2±0,5	58
49		118±10,6	59±5,3	2
50		112±10,1	56±5	2
51		180±16,2	>170	1
52		120±10,8	>50	2
53		273±24,6	77,4±7	4
54		160±14,4	>50	3
55		56±5	2,9±0,3	19
56		143±12,9	8,4±0,8	17

Продолжение таблицы 15

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ мкг/мл	ИС
57		115±10,4	>17	7
58		120±10,8	>17	7
59		221±19,9	>50	4
60		251±22,6	>170	1
61		243±21,9	10,2±0,9	24

Все вещества седьмой группы, за исключением производных 65(ЦТД₅₀=51±4,6 мкг/мл), 66(ЦТД₅₀=51±4,6 мкг/мл), 67(ЦТД₅₀=53±4,8 мкг/мл) и 68(ЦТД₅₀=13±1,2 мкг/мл), обладали умеренной токсичностью в культуре клеток. Активность в отношении вируса парагриппа третьего типа демонстрировало только одно соединение 67(ИС=11), где в качестве заместителя использовался 4-гидроксибензил. Введение в качестве заместителей различных пяти – и шестичленных ароматических гетероциклов приводило к потере вирусингибирующего действия 3-аминопроизводных метилцитизина (таблица 16).

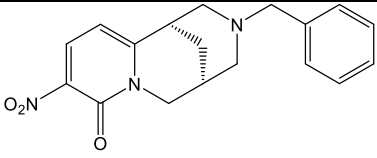
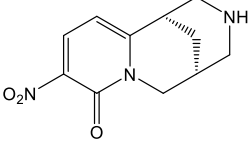
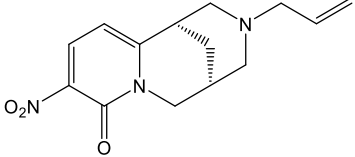
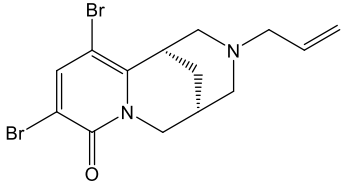
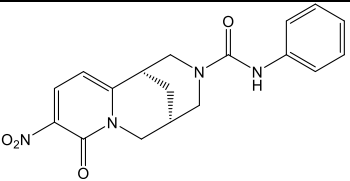
Таблица 16 - Цитотоксичность и противовирусная активность вторичных аминов, полученных алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
62		166±14,9	23,6±2,1	7
63		195±17,6	157,4±14,2	1
64		107±9,6	>50	2
65		51±4,6	9,3±0,8	6
66		80±7,2	>50	2
67		53±4,8	5±0,5	11
68		13±1,2	12±1,1	1
69		196±17,6	157,3±14,2	1

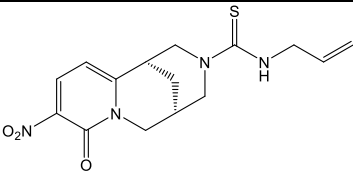
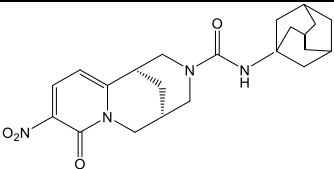
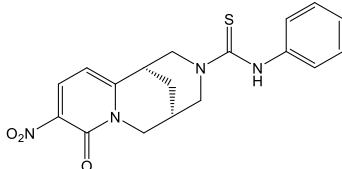
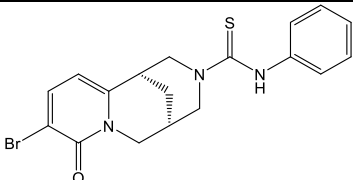
Производные 12-N-замещенных производных (-)-цитизина, модифицированные по 2-пиридиновому ядру, составляющие восьмую группу, обладали умеренной токсичностью.

Противовирусную активность в отношении ВПГЧЗ демонстрировали четыре вещества 70(ИС=11), 71(ИС=31), 72(ИС=380) и 73(ИС=20). Умеренной активностью обладало производное 70, где водород во вторичном атоме азота был замещен на бензил, а к третьему атому углерода присоединена нитрогруппа. При этом отсутствие замещения по вторичному азоту приводило к увеличению ИС примерно в 3 раза (вещество 71). Самым активным в отношении вируса парагриппа 3 типа оказалось соединение 72, в котором водород во вторичном азоте в молекуле цитизина замещен на ненасыщенный алифатический углеводородный радикал пропенил, а к третьему атому углерода присоединена нитрогруппа. Присоединение брома к третьему и пятому углеродам в 2-пиридиновом ядре в сочетании с тем же самым заместителем во вторичном азоте приводило к снижению ИС в 19 (соединение 73) (таблица 17).

Таблица 17. Цитотоксичность и противовирусная активность производных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина, модифицированных по 2-пиридиновому ядру в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

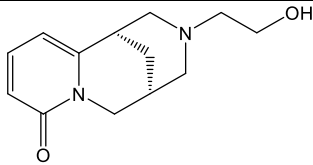
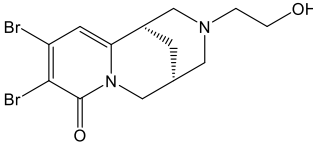
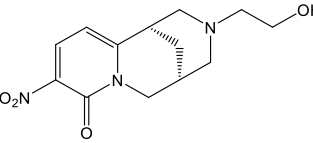
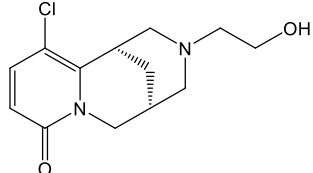
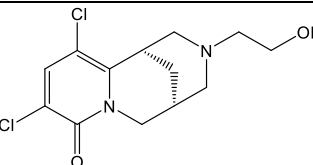
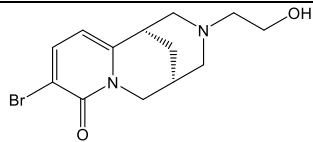
Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
70		160±14,4	14,5±1,3	11
71		116±10,4	3,7±0,3	31
72		152±13,7	0,4±0,03	380
73		162±14,6	8,1±0,7	20
74		116±10,4	>30	4

Продолжение таблицы 17

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ мкг/мл	ИС
75		171±15,4	>170	1
76		>100	>17	5
77		140±12,6	>50	3
78		>100	20,2±1,8	5

Соединения, входящие в девятую группу (производные 12-N-этилоксипроизводного (-)-цитизина, модифицированные по 2-пиридиновому ядру) обладали умеренной и низкой токсичностью в культуре клеток МА-104. Противовирусную активность демонстрировали почти все вещества, за исключением производного 84 (ИС=1). Из данных, приведенных в таблице видно, что этилоксипроизводное (-)-цитизина (79) без модификаций по 2-пиридиновому ядру имеет относительно высокий ИС (ИС=93). Присоединение брома к третьему и четвертому углеродам снижало ИС примерно в 1,5 раза (вещество 80). Увеличение противовирусного эффекта достигалось также за счет присоединения нитрогруппы к третьему углероду в этилоксипроизводном 81 (ИС=213). Однако самыми активными соединениями в отношении вируса парагриппа человека 3 типа оказались вещества 82(ИС=205) и 83(ИС=401), где в качестве заместителей в 2-пиридиновом ядре использовался хлор. При этом двузамещенное производное оказалось более активным, чем однозамещенное (таблица 18).

Таблица 18 - Цитотоксичность и противовирусная активность производных 12-N-этилоксипроизводного (-)-цитизина, модифицированных по 2-пиридиновому ядру в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

Номер соединения	Структурная формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
79		>300	3,2±0,3	93
80		177±15,9	3±0,24	59
81		>170	0,8±0,07	213
82		225±20,3	1,1±0,1	205
83		160±14,4	0,4±0,04	401
84		174±15,7	>170	1

В результате проведенных исследований было установлено, что большинство синтетических производных цитизина за исключением 11 веществ (соединения 3, 13, 14, 17, 26, 31, 34, 55, 65, 67 и 68) обладали низкой цитотоксичностью в культуре клеток МА-104.

Кроме того, было показано, что 29 соединений из 84 исследуемых веществ обладали активностью в отношении вируса парагриппа 3 типа. При этом сам цитизин (соединение 1) не демонстрировал противовирусного эффекта в отношении ВПГЧЗ (ИС=6). Больше всего активных веществ, по данным первичного скрининга *in vitro*, было обнаружено в группах 2, 5 и 9. Согласно анализу «структура-активность», наибольший вирусингибирующий эффект у веществ второй группы достигается за счет сочетания «α-эндо» конформации с такими заместителями во вторичном атоме азота, как метил, бензил, пропенил и феилкарбамоил.

(соединения 11, 12, 18 и 20). Противовирусный эффект тиомочевин различной топологии (группа 5) достигался за счет замещения водорода во вторичном атоме азота на пропенил и фенилкарбамоил (соединения 37 и 39 и за счет комбинации заместителей: пропенила с бромом у С3 (соединение 40), или двух атомов брома у С3 и С5 с фенилом (соединение 41). Вирусингибирующее действие соединений девятой группы, согласно анализу «структура-активность», достигалось за счет только одной этилокси группы во вторичном атоме азота или ее комбинации с нитрогруппой, одним или двумя хлорами и бромами в С3, С4 и С5 (вещества 79,80,81, 82 и 83). Следует отметить также, что шесть веществ (11, 12, 20,22, 56 и 79) из 29 соединений-лидеров демонстрировали активность в отношении вируса гриппа А/PuertoRico/8/34 (H1N1) и, следовательно, могут быть перспективными для исследования их вирусингибирующего действия в отношении других респираторных вирусов человека.

3.2. Изучение спектра активности синтетических производных цитизина

На следующем этапе нашего исследования мы оценивали вирусингибирующее действие 24 активных синтетических производных цитизина в отношении разных подтипов вируса гриппа А (А/California/07/09 (H1N1)pdm09, А/Aichi/2/68 (H3N2), А/Mallard/Pennsylvania/10249 (H5N2)) и вируса гриппа В (В/Malaysia/2506/04, В/Florida/04/06). Для каждого из тестируемых соединений по результатам РГА рассчитывали ЭД₅₀ и ИС (отношение ЦТД₅₀ к ЭД₅₀). Полученные результаты представлены в таблице 19.

На основании полученных данных, только четыре вещества под номерами 11, 12, 14 и 54 из 24 тестируемых соединений были активны в отношении всех подтипов вируса гриппа А. Следует отметить также, что производное 12 обладало вирусингибирующим действием не только в отношении разных подтипов вируса гриппа А, но также и в отношении вирусов гриппа В и вируса парагриппа человека 3 типа. Следовательно, это вещество является наиболее перспективным для дальнейшей разработки против респираторных вирусов человека.

Таблица 19 - Противовирусная активность синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа А, В и ВПГЧЗ.

Номер соединения	ИС						
	A/PuertoRico/8/34 (H1N1)	A/California/07/09 (H1N1)pdm09	A/Aichi/2/68(H3N2)	A/Mallard/Pennsylvania/10249(H5N2)	B/Malaysia/2506/04	B/Florida/04/06	ВПГЧЗ
2	20	10	1	1	333	1	1
3	10	3	19	2	8	4	3
11	12	18	64	50	1	1	20
12	16	29	35	26	26	10	53
14	47	28	53	88	8	2	2
15	19	н/и	н/и	30	2	2	1
20	82	12	2	2	4	12	83
22	64	14	н/и	25	1	1	134
23	12	15	1	10	7	1	3
28	12	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	1
42	12	н/и	7	1	273	н/и	1
50	47	1	3	3	3	67	2
51	59	7	55	27	1	1	1
53	16	н/и	н/и	10	1	1	4
54	14	214	49	16	3	1	3

56	12	14	6	5	5	1	17
62	63	10	1	1	19	10	7
63	14	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	1
64	39	8	1	8	4	1	2
65	12	3	1	5	894	9	6
66	20	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	1
75	11	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	1
77	25	2	1	н/и	н/и	1	3
79	97	7	31	1	4	1	93

Обозначения: н/и – противовирусную активность вещества не исследовали

3.3. Изучение стадии репродукции вируса гриппа – мишени действия производных цитизина

В следующей серии экспериментов была изучена противовирусная активность синтетических производных цитизина в зависимости от их времени добавления в культуральную среду. В этом эксперименте использовали соединение 14, обладающее активностью *in vitro* в отношении вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H5N2. Исследуемое вещество в нетоксичной активной концентрации, - 80 мкг/мл, добавляли в культуру клеток MDCK в различные сроки по отношению к заражению вирусом гриппа А/PuertoRico/8/34 (H1N1). Далее оценивали титр вируса в культуре при разных сроках добавления соединения 14 (Рисунок 23). Цифрами (в часах) обозначен срок присутствия вещества в культуре клеток относительно «точки 0» - момента входа вируса в клетку.

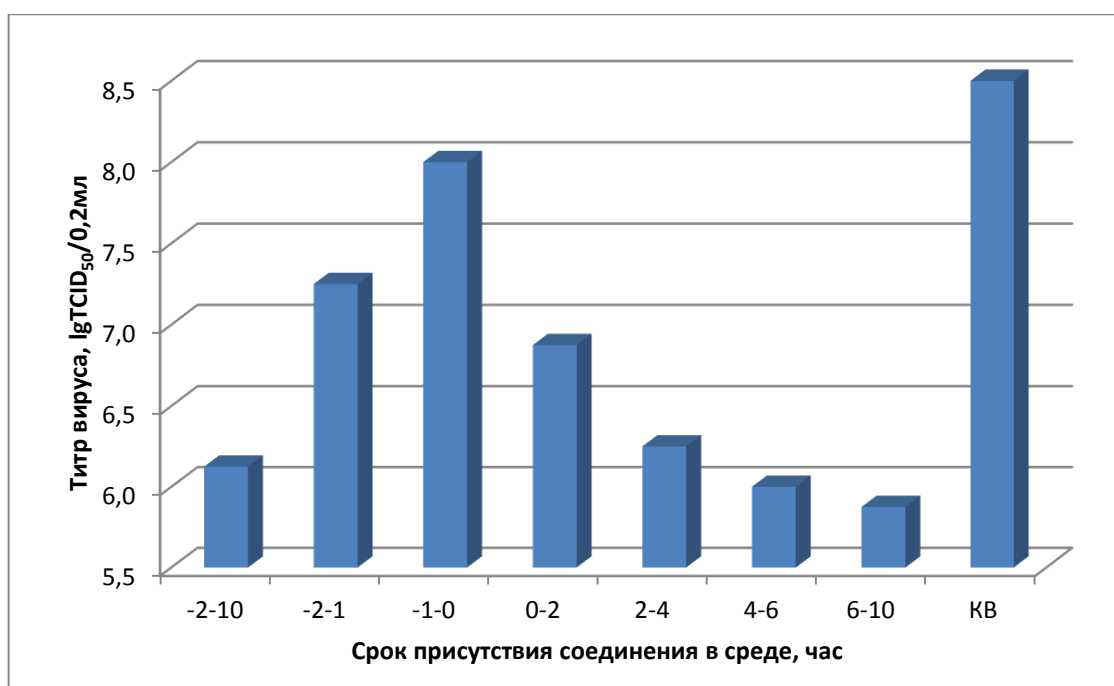


Рисунок 23 - Вирусингибирующая активность соединения 14 (80 мкг/мл) в отношении вируса гриппа А/PuertoRico/8/34 (H1N1) в зависимости от времени добавления в культуру.

Согласно полученным результатам, титр вируса в контроле составил $8,5 \pm 0,7 \log_{10}TCID_{50}/0.2 \text{ мл}$.

Статистически значимое снижение титра вируса, согласно U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$) отмечали в точках (-2)- 10, (-2)-(-1), 0-2, 2-4, 4-6 и 6-10. В положительном контроле

(точка (-2)-10), где препарат присутствовал в среде все время эксперимента, титр вируса снижался до значения $6,1 \pm 0,2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2$ мл.

Внесение препарата в точке (-2)-1 является профилактическим, и в этот момент препарат может воздействовать на мембрану клетки, препятствуя взаимодействию вирусных белков с вирусспецифичными рецепторами на ее поверхности и активировать систему врожденного иммунитета. Снижение вирусных титров в точке (-1)-0 менее выражено и говорит о том, что тестируемое вещество практически не влияет на адсорбцию вируса. Более существенное снижение вирусного титра в точках 0-2 и 2-4 может быть связано с такими стадиями вирусной репродукции, как проникновение и «раздевание» вируса. Однако максимальное снижение титров вируса, сопоставимое с положительным контролем (точка (-2)-10), было достигнуто только в пробе 6-10 и составило $5,9 \pm 0,2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2$ мл. Следовательно, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что противовирусный эффект производного 14 может быть связан с нарушением поздних стадий вирусной репродукции таких, как сборка вирионов потомства, «почкование» и выход вновь сформировавшихся вирусных частиц.

3.4. Исследование влияния синтетических производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции *in vitro*

На следующем этапе исследования мы изучали влияние синтетических производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции *in vitro* на поздних стадиях жизненного цикла вируса. Для этого вещество 14 в концентрации 50 мкг/мл и вирус гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) вносили в культуру клеток MDCK. В качестве положительного контроля были выбраны клетки, инфицированные вирусом. Через 6 часов после проникновения вируса клетки фиксировали и изучали морфогенез гриппозной инфекции.

На рисунке 24 представлена клетка MDCK, инфицированная вирусом гриппа. Как видно, на поздней стадии репродукции вируса (6 часов после инфицирования) отмечается большое количество почкующихся вирионов. Добавление производного 14 на тех же сроках вирусной инфекции приводило к значительному снижению почкующихся вирусных частиц (рисунок 25).

Исходя из представленных результатов, мы предположили, что возможными «мишенями» для действия синтетических производных цитизина могут быть нейраминидаза или матриксный белок вируса гриппа или различные транспортные белки клетки.



Рисунок 24 - Клетки MDCK, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (6ч.). Просвечивающая электронная микроскопия, ув. 20 000

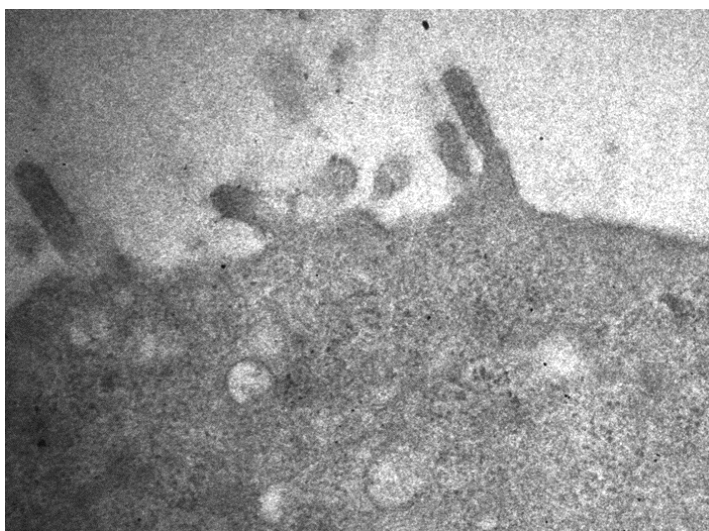


Рисунок 25 - Клетки MDCK, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в присутствии соединения 14 (6ч). Просвечивающая электронная микроскопия, ув. 20 000

3.5. Исследование ингибирующей активности синтетических производных цитизина в отношении нейраминидазы вируса гриппа

По результатам проведенных экспериментов, в которых было показано ингибирование репродукции вируса гриппа на поздних стадиях жизненного цикла, мы предположили, что возможной мишенью для действия синтетических производных цитизина является поверхностный гликопротеид вируса – нейраминидаза. Для проверки данной гипотезы мы

оценили активность вирусной нейраминидазы в присутствии и отсутствии препарата с помощью флюоресцентного MUNANA-теста. В качестве положительного контроля использовали известный ингибитор нейраминидазы осельтамивир, а в качестве отрицательного контроля – вещество 1 (цитизин), не проявляющее противовирусной активности. Для каждого из исследуемых соединений вычисляли значение 50% эффективной дозы ($ЭД_{50}$). Полученные данные представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Исследование ингибирующей активности синтетических производных цитизина в отношении нейраминидазы вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) и A/Владивосток/2/09 (H1N1)

Препарат	Вирус	$ЭД_{50}$, pM
Осельтамивир	A/PuertoRico/8/34(H1N1)	$1,8 \times 10^4$
1	A/PuertoRico/8/34(H1N1)	$5,3 \times 10^9$
14	A/PuertoRico/8/34(H1N1)	$1,6 \times 10^9$
Осельтамивир	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	3×10^{13}
1	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	$3,3 \times 10^9$
14	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	$1,1 \times 10^9$

Из полученных данных, представленных в таблице, видно, что осельтамивир эффективно ингибирует нейраминидазу вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) и не оказывает влияния на активность нейраминидазы устойчивого к нему вируса A/Владивосток/2/09 (H1N1).

Оба препарата ингибируют нейраминидазу вируса A/PuertoRico/8/34 по сравнению с осельтамивиром крайне слабо. То же самое можно сказать и про активность этих двух соединений в отношении нейраминидазы вируса A/Владивосток/2/09, устойчивость которого к осельтамивиру обуславливается мутацией H274Y. Следовательно, можно сделать вывод о том, что NA не является мишенью синтетических производных цитизина.

3.6. Селекция вирусов гриппа и парагриппа, устойчивых к синтетическим производным цитизина

Дальнейшие эксперименты были направлены на селекцию вирусных штаммов, устойчивых к производным цитизина на примере соединения 22, которое демонстрировало наибольший противовирусный эффект в опытах *in vitro* как в отношении вирусов гриппа А, так

и в отношении ВПГЧЗ. Для проведения этого эксперимента мы использовали штамм вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1).

Было проведено пять последовательных пассажей вируса с нарастающими концентрациями производного 22. В качестве положительного контроля осуществлялось пассирование исходного вируса в культуре клеток без добавления соединения. После второго, четвертого и пятого пассажей оценивали вирусингибирующее действие соединения 22 в отношении контрольного и селекционных штаммов вируса на культуре клеток MDCK. Результаты эксперимента представлены в таблице 21.

Таблица 21 - Сравнение активности соединения 22 в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) после проведения серии последовательных пассажей с нарастающими концентрациями исследуемого вещества и без него.

Номер пассажа	Концентрация вещества, мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл (контроль)	ИС (контроль)	ЭД ₅₀ , мкг/мл (вирус+соединение 22)	ИС (вирус+соединение 22)
0	0	4,7±0,4	64	4,7±0,4	64
2	30	6,9±0,6	43	6,5±0,5	46
4	120	7,4±0,7	41	7,7±0,6	39
5	240	6,5±0,5	46	6,3±0,2	48

Из данных, представленных в таблице видно, противовирусный эффект соединения 22 был одинаков от пассажа к пассажию как в отношении контрольного штамма, так и в отношении вируса, пассированного с этим веществом. Таким образом, после пяти последовательных пассажей с веществом 22 вирус не выработал устойчивости к данному соединению.

В следующей серии экспериментов мы осуществляли селекцию штаммов вируса парагриппа человека третьего типа, устойчивых к действию соединения 12, которое демонстрировало активность не только в отношении этого вируса *in vitro*, но и в отношении различных подтипов вирусов гриппа А и В.

Так же, как и для вируса гриппа, мы осуществили серию последовательных пассажей вируса с нарастающими концентрациями производного 12. В качестве положительного контроля также осуществляли пассирование исходного вируса в отсутствии исследуемого вещества. Всего было проведено пять последовательных пассажей вируса на культуре клеток МА-104. Оценку вирусингибирующего действия соединения 12 в отношении контрольного и устойчивого

штаммов ВПГЧЗ осуществляли так же, как и в предыдущем эксперименте, после второго, четвертого и пятого пассажей. Результаты эксперимента представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Сравнение активности соединения 12 в отношении ВПГЧЗ после проведения серии последовательных пассажей с нарастающими концентрациями исследуемого вещества и без него.

Номер пассажира	Концентрация вещества, мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл (контроль)	ИС (контроль)	ЭД ₅₀ , мкг/мл (вирус+соединение 12)	ИС (вирус+соединение 12)
0	0	1,9±0,2	47	1,9±0,2	47
2	8	2,2±0,1	45	2,5±0,3	40
4	32	3,2±0,3	31	3,1±0,5	32
5	64	2,8±0,3	36	2,9±0,3	34

Из данных, представленных в таблице, видно, что соединение 12 демонстрирует одинаковое вирусингибирующее действие в каждом пассаже как в отношении контрольного вируса, так и в отношении вируса, пассируемого с этим веществом. Следовательно, можно сделать вывод, о том, что после пяти последовательных пассажей с этим производным цитизина вирус парагриппа третьего типа не выработал к нему резистентности.

Отсутствие резистентности к этим двум препаратам может говорить о том, что мишенью для действия синтетических производных цитизина являются не вирусные белки. Следовательно, можно сделать вывод о том, что эти вещества имеют клеточную мишень.

3.7. Исследование влияния синтетических производных цитизина на организацию и полимеризацию актина и организацию микротрубочек в клетках

Результаты предыдущих экспериментов позволили нам сделать вывод о том, что возможной мишенью для действия синтетических производных цитизина могут быть белки клетки, участвующие в транспорте вРНП к месту сборки вирусных частиц. На основании литературных данных, мы предположили, что такими мишенями могут быть F-актин и тубулин. Большинство исследователей отмечают, что эти компоненты цитоскелета играют важную роль в жизненном цикле вируса гриппа. Во-первых, актин и тубулин участвуют в транспорте вирусных трансмембранных белков к апикальной поверхности клетки, во-вторых, они могут

взаимодействовать с М1-белком и компонентами вРНП, в-третьих, F-актин играет важную роль в морфогенезе вирусных частиц [14, 19, 106, 149]. Кроме того, сам вирус гриппа может влиять на уровни актина и тубулина в хозяйской клетке [35,184].

Для изучения влияния синтетических производных цитизина на компоненты цитоскелета клетки на поздних стадиях вирусной репродукции в культуру клеток MDCK вносили соединение 14 в концентрации 50 мкг/мл и вирус гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). В качестве положительного контроля были выбраны клетки, инфицированные вирусом, а в качестве отрицательного – интактные клетки. Через 6 часов после проникновения вируса клетки фиксировали, F-актин окрашивали АТТ0 488-фаллоидином (зеленый цвет), α -тубулин - Alexa Fluor 647 (красный цвет), а ядра клеток - DAPI (синий цвет). Визуализацию компонентов цитоскелета осуществляли с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP8 (Leica, Германия).

На рисунке 26 представлены интактные клетки MDCK, в которых F-актин организован в отчетливые многочисленные волокна, проходящие через цитозоль к мембране клетки. Тубулин расположен в перинуклеарной области.

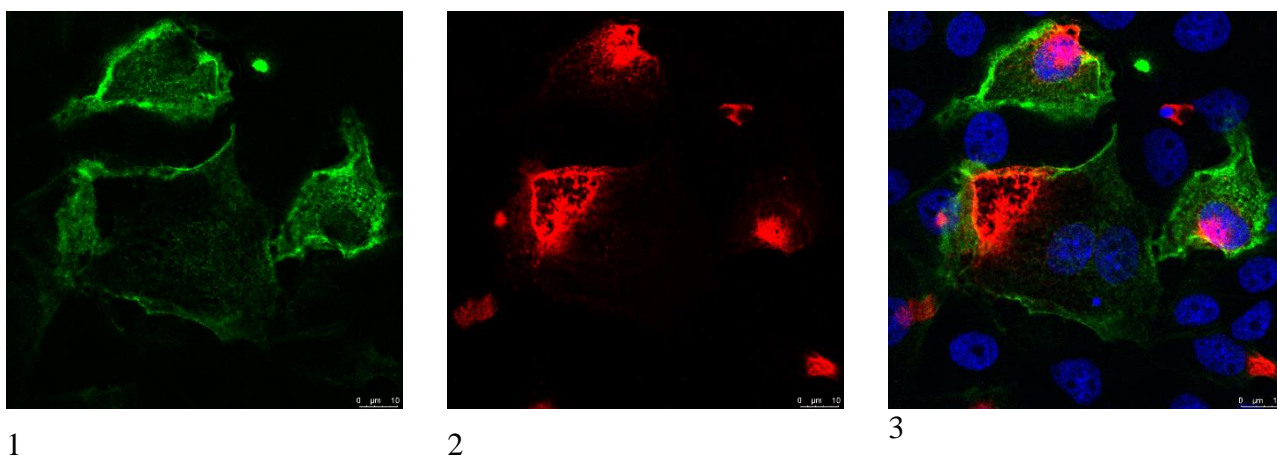
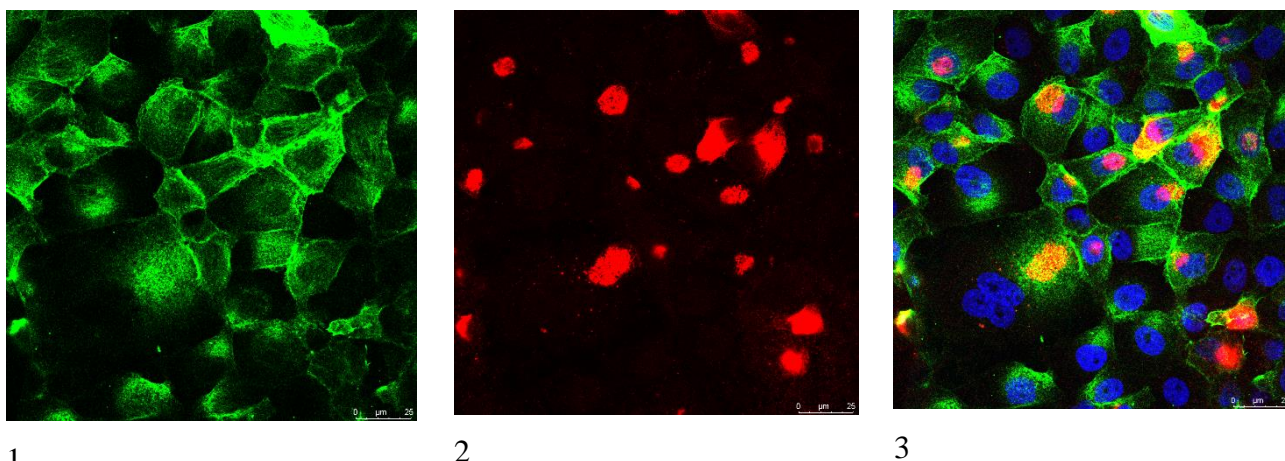


Рисунок 26 - Локализация F-актина и α -тубулина в интактных клетках MDCK. 1-F-актин (Phalloidin-АТТ0488, зеленый); 2- α -тубулин (Alexa Fluor 647, красный); 3-совмещение (ядра покрашены DAPI (синий)) (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия)

В зараженных клетках через 6 часов после проникновения вируса отмечалось резкое увеличение числа актиновых волокон и формирование стресс-фибрилл (рисунок 27). Тубулин так же, как и в интактных клетках, был расположен в перинуклеарной зоне.



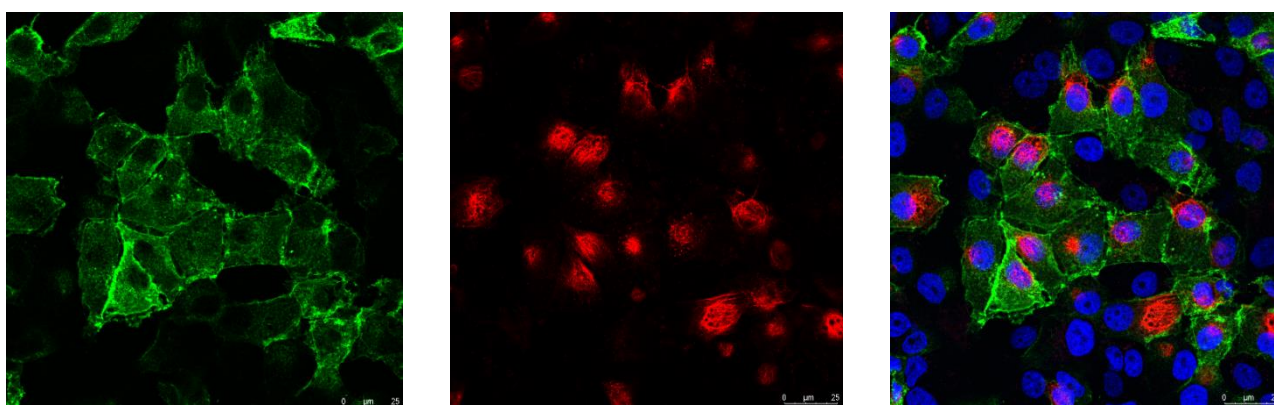
1

2

3

Рисунок 27 - Локализация F-актина и α -тубулина в клетках MDCK, инфицированных вирусом гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) (6ч.). 1-F-актин (Phalloidin-ATTO488, зеленый); 2- α -тубулин (Alexa Fluor 647, красный); 3-совмещение (ядра покрашены DAPI (синий)) (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия)

Добавление соединения 14 в инфицированные клетки на тех же сроках вирусной репродукции приводило к характерным изменениям в структуре цитоскелета. Во-первых, не отмечалось увеличение числа актиновых волокон и формирование стресс-фибрилл, как в положительном контроле, во-вторых, на поверхности клеток формировались редкие микроворсинки и наблюдалась агрегация F-актина по краям клеток. Тубулин в перинуклеарной зоне имел вид параллельных тяжей, как в интактных клетках (рисунок 28).



1

2

3

Рисунок 28 - Локализация F-актина и α -тубулина в клетках MDCK, инфицированных вирусом гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) в присутствии препарата 14 (6 ч.). 1-F-актин (Phalloidin-ATTO488, зеленый); 2- α -тубулин (Alexa Fluor 647, красный); 3-совмещение (ядра покрашены DAPI (синий)) (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия).

Полученные в ходе этого эксперимента результаты позволяют сделать вывод о том, что синтетические производные цитизина могут влиять на организацию и полимеризацию актина и организацию микротрубочек в клетках, инфицированных вирусом гриппа, что может приводить к нарушению транспорта вРНП к месту сборки вирусных частиц.

3.8. Исследование активности синтетических производных цитизина на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей

На следующем этапе исследования была изучена противовирусная активность синтетических производных цитизина *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Для опыта были использованы соединения 11 и 14, имеющие максимальную противогриппозную активность в опытах *in vitro*. Оба вещества по своей химической структуре относятся к аддуктам Дильса-Альдера 12-N-замещенных производных (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом.

В предварительных экспериментах определяли значение 50% токсической дозы (LD_{50}). Для производных 11 и 14 эти значения составили 250 и 500 мг/кг соответственно. На основании полученных значений высчитывали рабочие концентрации исследуемых соединений (1/5 и 1/10 от LD_{50}). Для вещества 11 были использованы рабочие концентрации 25 и 50 мг/кг, а для вещества 14 – 50 и 100 мг/кг.

Оценку активности исследуемых соединений осуществляли по следующим критериям: снижение смертности в опытной группе по сравнению с контрольной, увеличение средней продолжительности жизни. В эксперименте использовали высокую заражающую дозу вируса $10LD_{50}$ ($2,5 \times 10^3$ TCID₅₀/мышь). Полученные результаты представлены в таблице 23 и на рисунке 29.

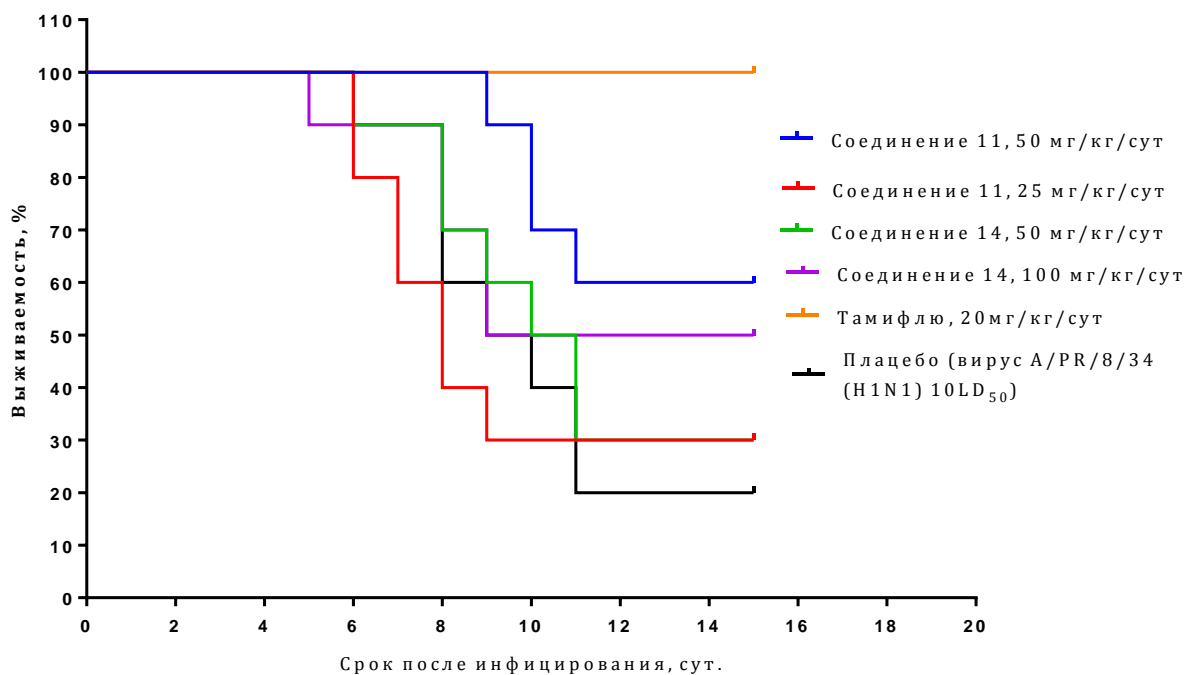


Рисунок 29 - Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции в условиях применения химических соединений.

Из результатов, представленных в таблице 23 и по кривой смертности на рисунке 29 следует, что исследуемые соединения 11 и 14 снижали смертность животных по сравнению с контрольной группой. Оба вещества демонстрировали активность в отношении вируса гриппа при наибольших использованных концентрациях (50 мг/кг для соединения 11 и 100 мг/кг для соединения 14) и имели индексы защиты 50 и 37,5. При этом, достоверные отличия от группы плацебо ($p=0,0448$) были продемонстрированы лишь для группы животных, получавших соединение 11 в максимальной из используемых доз (50 мг/кг/сут.). Таким образом, исследуемые производные цитизина демонстрируют противовирусную активность при высокой заражающей дозе 10 LD₅₀ вируса A/PR/8/34(H1N1). Однако, их активность существенно уступала эффективному противогриппозному препарату Тамифлю, индекс защиты которого составил 100% (таблица 23).

Таблица 23 - Протективная активность синтетических производных цитизина на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Вирус A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Доза вируса 10LD₅₀

Препарат	Доза, мг/кг	Смертность, %	Средняя продолжительность жизни, сут.	Индекс защиты, %	P
Контроль вируса	0	80	9,3	0	1,0000
11	25	70	7,3	12,5	0,7635
11	50	40	8,8	50	0,0448
14	50	70	9,4	12,5	0,6042
14	100	50	7,6	37,5	0,3060
Тамифлю	20	0	>14	100	0,0003

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях была изучена противовирусная активность 84 синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа человека 3 типа. Все тестируемые соединения по своей химической структуре были разделены на девять различных групп в зависимости от базовой структуры. В результате первой серии экспериментов *in vitro* были выявлены соединения, активные в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Согласно данным метилтетразолиевого теста, 79 соединений из 84 тестируемых обладали низкой цитотоксичностью в культуре клеток MDCK. Исключение составили пять соединений (13, 17, 26, 67 и 68), однако все они относятся к разным группам и имеют разные химические структуры. В этой связи трудно сделать вывод о том, связана ли их высокая цитотоксичность в культуре клеток с характером заместителей в молекуле.

При помощи анализа «структура-активность» был оценен вклад различных боковых заместителей в молекуле (-)-цитизина в противовирусную активность синтетических производных цитизина.

В первой группе, куда входят 12-N-замещенные производные (-)-цитизина, противовирусную активность демонстрировали 2 соединения из 10 (20%) - вещества 2 и 3. Анализ «структура-активность» показал, что вирусингибирующее действие этих производных цитизина достигается за счет замещения водорода во вторичном азоте на метил и бензил.

Во второй группе вирусингибирующий эффект демонстрировали 5 из 10 (50%) соединений. В эту группу входят аддукты Дильса-Альдера различных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом и, как было отмечено ранее, делятся по химической структуре на « α -эндо» и « β -эндо» диастереомеры. Наиболее активными в отношении вируса гриппа были соединения, находящиеся в « α -эндо» конформации, где в качестве заместителей во вторичном атоме азота использовались метил, бензил, пропенил и фенилкарбамоил. Среди « β -эндо» аддуктов вирусингибирующим эффектом обладало только одно вещество 15, где атом водорода во вторичном азоте был замещен на метильную группу. Возможно, противовирусный эффект в этих соединениях достигается не только за счет определенных заместителей, но также и за счет нахождения молекулы в определенной конформации, а именно в « α -эндо».

Среди соединений третьей группы, включающую в себя аддукты Дильса – Альдера метилцитизина с N-замещенными малеинимидами, активностью в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 обладали только 2 препарата (22 и 23) из 8 (25%). Согласно анализу «структура-активность», противовирусный эффект в этих веществах связан с использованием в

качестве заместителей бензила и 2-метоксибензила. Кроме того, следует отметить, что противовирусное действие соединений этой группы связано также с нахождением молекулы в « α -эндо»-конформации.

Вещества четвертой группы, куда входят тиомочевины, полученные из 3-аминопроизводного метилцитизина, по результатам опытов *in vitro*, не обладают противогриппозной активностью. Анализ структуры молекул этих веществ позволил предположить, что отсутствие противовирусного эффекта связано с наличием сильно разветвленных углеводородных радикалов, которые могут затруднять связывание молекулы с соответствующей мишенью.

Среди мочевины различной топологии, входящих в пятую группу, противовирусным эффектом обладало только вещество 42. Его умеренная противовирусная активность обеспечивается за счет ненасыщенного углеводорода пропенила в сочетании с хлором в С5 в молекуле цитизина.

В шестой группе, которую составляют мочевины различной топологии, противогриппозную активность демонстрировали 5 соединений из 18 (28%) (вещества 50, 51, 53, 54 и 56). Эти вещества отличаются по расположению функциональной карбамидной группы в молекуле, что, в свою очередь, может влиять на противовирусный эффект. В более активных соединениях 50 и 51 карбамидная группа присоединена к С3, а в умеренно активных (вещества 53, 54 и 56) – ко вторичному атому азота. Кроме того, использование в качестве радикалов фенила и пропенила, в свою очередь, тоже вносит вклад в активность первых двух веществ. В соединениях 53 и 54 противогриппозное действие обуславливается за счет сочетания брома в С3 с пропенилом и фенилом. Введение еще одного атома брома в С5 в сочетании с ненасыщенным углеводородным радикалом пропенилом в производном 56 приводит уже к незначительному снижению противовирусной активности.

В седьмой группе, содержащей вторичные амины, полученные алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина, противогриппозную активность *in vitro* демонстрировали 5 соединений из 8 (62,5%) (вещества 62, 63, 64, 65 и 66). Согласно анализу «структура активность» противовирусный эффект этих соединений достигался за счет использования в качестве радикалов тиофена, бензила, 3-метоксибензила, 3,4-диметоксибензила и гидроксibenзила.

Среди соединений восьмой группы, куда входят производные 12-N-замещенных производных (-)-цитизина, модифицированные по 2-пиридиновому ядру, активность в отношении вируса гриппа была показана только для веществ 75 и 77. Анализ структуры этих веществ показал, что их противовирусный эффект достигается за счет нитрогруппы у С3 в сочетании с тиокарбамидной группой. Кроме того, значительный вклад в активность этих

соединений вносят ненасыщенный углеводородный радикал пропенил (соединение 75) и фенил (соединение 77).

В последней девятой группе противовирусной активностью обладало только одно вещество - 12-N- этилоксипроизводное (-) цитизина (соединение 79). Дополнительные модификации этого вещества, заключающиеся в присоединении нитрогруппы, хлора и брома к разным атомам углерода в 2-пиридиновом ядре не привели к усилению вирусингибирующего действия.

Таким образом, в результате скрининга производных цитизина *in vitro* выявлены 24 соединения, обладающие противовирусной активностью в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Наибольшей противогриппозной активностью *in vitro* обладали семь синтетических производных цитизина (соединения 14 (ИС=47), 20 (ИС=82), 22 (ИС=64), 50 (ИС=47), 51(ИС=59), 62(ИС=63), 64(ИС=39) и 79 (ИС=97). Однако если сравнивать значения ИС этих соединений с ИС осельтамивира (ИС=750), то они значительно уступают ему в противогриппозной активности. Тем не менее, полученные в ходе эксперимента результаты говорят о том, что синтетические производные цитизина являются весьма перспективными соединениями для дальнейшего изучения и разработки. Возможно, что введение разнообразных заместителей в молекулу (-)-цитизина и ее дальнейшие модификации при синтезе новых производных позволят получить вещества с такой же или сопоставимой активностью в отношении вируса гриппа, как осельтамивир. Кроме того, учитывая различие в химической структуре аналогов сиаловых кислот – ингибиторов нейраминидазы и производных цитизина, можно полагать, что они имеют разные мишени и механизмы действия, и ожидать, что последние будут иметь преимущество с точки зрения развития вирусной резистентности.

Учитывая данные первичного скрининга *in vitro*, для дальнейших исследований мы отобрали четыре соединения – лидера 11, 12, 14 и 22, для которых показатель ΔT составил 4,0, 3,5, 3,0 и 4,5 соответственно. Все эти вещества по своей химической структуре являются аддуктами Дильса-Альдера, находящимися в « α -эндо» - конформации.

В следующей серии экспериментов была изучена активность 84 синтетических производных цитизина *in vitro* в отношении другого респираторного вируса - вируса парагриппа человека 3 типа. Результаты этого исследования позволили выявить соединения-лидеры и соединения с широким спектром противовирусной активности.

Согласно данным МТТ-теста, из 84 соединений только 11 веществ (3, 13, 14, 17, 26, 31, 34, 55, 65, 67 и 68) обладали высокой цитотоксичностью в культуре клеток МА-104. Кроме того, значения ЦТД₅₀ исследуемых веществ в культуре клеток МА-104 были сходными с таковыми в культуре клеток MDCK или имели максимум трехкратную разницу. В дальнейшем мы провели

анализ «структура – активность», чтобы оценить вклад различных заместителей в молекуле (-)-цитизина в демонстрируемый противовирусный эффект исследуемых веществ.

В первой группе не удалось выявить перспективных соединений. Ни сам цитизин, ни его 12-N-замещенные производные не обладали вирусингибирующим действием.

Во второй группе противовирусная активность была выявлена у шести соединений из десяти, четыре из которых относятся к « α -эндо» аддуктам, а два – к « β -эндо». В результате анализа структуры этих веществ удалось выявить определенную закономерность в демонстрируемом ими противовирусном эффекте. Вирусингибирующее действие « α -эндо» аддуктов Дильса – Альдера связано с использованием во вторичном атоме азота в качестве заместителей метила, бензила, пропенил – и фенилкарбамоила (соединения 11, 12, 18 и 20), а « β -эндо» (соединения 17 и 19) – с использованием пропенила и пропенилкарбамоила. В третьей группе противовирусная активность была выявлена только у одного вещества (соединение 22), находящегося в « α -эндо» конформации и, как следует из анализа «структура-активность», она связана с использованием в качестве радикала 2- метоксибензила. Вирусингибирующее действие « β -эндо» аддуктов обеспечивается за счет простых алифатических углеводородных радикалов – пропила и изопропила.

В четвертой группе активностью в отношении вируса парагриппа третьего типа обладали две тиомочевины. Анализ их химической структуры позволил предположить, что демонстрируемый ими противовирусный эффект обеспечивается присоединением к тиокарбамидной группе более протяженных углеводородных радикалов – метилформиата и аминокпропана (соединения 32 и 35).

Среди тиомочевин различной топологии, входящих в пятую группу, по результатам экспериментов *in vitro*, противовирусным эффектом обладало 4 соединения из 8 (50%) (производные 37, 39, 40 и 41). Вирусингибирующее действие вещества 37 обеспечивается за счет присоединения ненасыщенного углерода – пропенила. Дополнительная модификация – присоединение атома брома к C3 в сочетании с таким же радикалом приводила к увеличению активности в 4 раза (соединение 40). Кроме того, противовирусный эффект достигался также за счет присоединения к тиокарбамидной группе фенилкарбамоила (вещество 39). Максимальная активность может достигать за счет нескольких модификаций в молекуле тиомочевины: присоединение фенила к тиокарбамидной группе и двух атомов брома к C3 и C5 (производное 41).

В шестой группе противовирусная активность была выявлена у четырех соединений. Анализ «структура-активность» показал, что наибольший вирусингибирующий эффект в этих соединениях достигается за счет использования в качестве радикалов фенила и пропенила

(вещества 47 и 48). Комбинация пропенила с атомами брома в положениях С3 и С5 снижала противовирусный эффект (соединение 56). Умеренная активность достигается также за счет сочетания адамантила и брома в С3.

Среди соединений седьмой группы умеренную активность в отношении ВПГЧЗ демонстрирует только одно соединение. Его активность, возможно, связана с использованием в качестве радикала 4-метоксибензила (соединение 67).

В восьмой группе активность в отношении ВПГЧЗ демонстрировали 4 производных (соединения 70, 71, 72 и 73). Вирусингибирующее действие трех соединений восьмой группы (производные 70, 71, 72), согласно проведенному анализу «структура-активность», обеспечивается за счет комбинации нитрогруппы у С3 с такими радикалами, как бензил, водород и пропенил. Кроме того, противовирусный эффект может достигаться за счет другого сочетания заместителей: пропенил во вторичном азоте и двух атомов брома у С3 и С5 (соединение 73).

В девятой группе почти все 12-N-этилоксипроизводные (-)-цитизина, за исключением соединения 84 обладают вирусингибирующим действием в отношении ВПГЧЗ. Анализ молекулярной структуры этих веществ показал, что отсутствие противовирусной активности связано с наличием только одного атома брома в С3.

Таким образом, в ходе экспериментов *in vitro* из 84 синтетических производных цитизина было выявлено 29 соединений, активных в отношении ВПГЧЗ. Наибольшим противовирусным эффектом обладали 16 соединений из 29 (вещества 12, 18, 20, 22, 25, 35, 39, 40, 41, 48, 72, 79, 80, 81, 82, 83). Из всех активных соединений только 5 (22 (ИС=134), 72(ИС=380), 81 (ИС=213), 82 (ИС=205) и 83(ИС=401)) имели значения ИС больше, чем для «Рибавирина» (ИС=120), и, следовательно, являются перспективными для дальнейшей разработки. Кроме того, 6 соединений (вещества 11, 12, 20, 22, 56 и 79) демонстрировали не только активность в отношении вируса парагриппа 3 типа, но и в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1), и, таким образом, являются веществами с широким спектром действия.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение вирусингибирующего действия активных синтетических производных (-)-цитизина в отношении разных подтипов вируса гриппа А (A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Mallard/Pennsylvania/10249 (H5N2)) и двух линий вирусов гриппа В (B/Malaysia/2506/04, B/Florida/ 04/06). Для проведения этих экспериментов были отобраны 24 соединения, обладающие активностью *in vitro* в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1). Согласно полученным результатам, 10 веществ (2, 11, 12, 14, 20, 22, 23, 54, 56, 62) демонстрировали вирусингибирующее действие в отношении пандемического штамма вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, 7 веществ (3, 11, 12, 14, 51, 54, 79) – в отношении вируса A/Aichi/2/68 (H3N2), 9 веществ (11, 12, 14, 15, 22, 23, 51, 53, 54)

– в отношении вируса птичьего гриппа A/Mallard/Pennsylvania/10249(H5N2), 5 веществ (2, 12, 42, 62, 65) – в отношении вируса гриппа B/Malaysia/2506/04, 4 вещества (12, 20, 50, 62) – в отношении вируса гриппа B/Florida/04/06. Кроме того, из 24 тестируемых соединений было выявлено четыре вещества (11, 12, 14 и 54), обладающих активностью в отношении всех подтипов вируса гриппа А. Одно из этих соединений (производное 12) демонстрировало также вирусингибирующее действие в отношении вирусов гриппа В и вируса парагриппа человека, и, следовательно, оно является наиболее перспективным для дальнейшей разработки и изучения в качестве потенциального препарата против других респираторных вирусов человека.

В литературных источниках часто упоминается о том, что противовоспалительные, нейротропные, спазмолитические, противовирусные свойства (-)-цитизина и его производных обеспечиваются за счет взаимодействия этих молекул с различными рецепторами (гистаминовыми, серотониновыми, мускариновыми и др.). Vakhitova Y. V. *et al.* в результате своих исследований установили, что (-)-цитизин и его производные могут активировать или ингибировать активность NF- κ B и STAT1 и таким образом влиять на регуляцию экспрессии генов, продукты которых участвуют в развитии воспалительной реакции и на синтез IFN – α/β . При этом в экспериментах использовалась трансформированная культура клеток HEK293, экспрессирующая на своей поверхности цитокиновые рецепторы. Однако в нашем эксперименте мы использовали другие культуры клеток, и противовирусная активность исследуемых соединений была связана скорее всего с тем, что они могут взаимодействовать с белками вируса или с компонентами клетки, участвующими в вирусной репродукции. Чтобы подтвердить эту гипотезу мы провели опыты на «время добавления», которые позволили нам определить стадию репродукции вируса гриппа – мишени действия синтетических производных цитизина. Для проведения этого эксперимента было выбрано вещество 14, которое обладало противовирусной активностью в отношении разных подтипов вируса гриппа А (H1N1, H3N2, H5N2). В ходе эксперимента соединение 14 в нетоксичной концентрации добавляли в культуру клеток в различные сроки по отношению к заражению вирусом гриппа. Максимальное снижение инфекционного титра вируса отмечалось только в одной точке, соответствующей временному интервалу 6-10 часов. Полученный результат говорит о том, исследуемый препарат может нарушать сборку вирионов потомства, «почкование» и выход вновь сформированных вирусных частиц.

Электронномикроскопическое исследование позволило определить, как влияют синтетические производные цитизина на морфогенез гриппозной инфекции *in vitro* на поздних стадиях жизненного цикла вируса. В результате этого эксперимента было показано, что на инфицированных клетках в присутствии производного 14 количество почкующихся вирионов

значительно ниже, чем в контроле. Все это говорит о том, что «мишенями» для действия синтетических производных цитизина могут быть нейраминидаза и/или матриксный белок вируса гриппа или различные транспортные белки клетки.

Для того, чтобы подтвердить или опровергнуть гипотезу о том, что мишенью синтетических производных цитизина является нейраминидаза вируса гриппа, был проведен флюоресцентный MUNANA-тест. В этом эксперименте исследовали ингибирующую активность соединений 14 и 1 в отношении NA двух различных вирусов гриппа осельтамивирчувствительного A/PuertoRico/8/34(H1N1) и осельтамивирстойчивого A/Владивосток/2/09(H1N1). В качестве препарата сравнения использовался осельтамивир. Оба исследуемых производных цитизина, по результатам эксперимента, ингибировали NA осельтамивирчувствительного вируса гриппа крайне слабо. Похожие результаты были получены и в отношении осельтамивирстойчивого вируса A/Владивосток/2/09. Следовательно, нейраминидаза не является мишенью для синтетических производных.

Если не вирусная нейраминидаза является мишенью для действия синтетических производных цитизина, то возможно такими мишенями на поздних стадиях репродукции вируса могут быть другие вирусные белки. Для проверки этой гипотезы было проведено пассирование вирусов гриппа и парагриппа 3 типа в присутствии нарастающих концентраций соединений. В случае формирования резистентности к исследуемым веществам можно было бы определить мутации в генах вирусных белков, ответственных за ее формирование. Однако в результате пяти последовательных пассажей противовирусный эффект соединения 22 в отношении контрольного штамма вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 и в отношении вируса, пассированного с этим веществом, был одинаков. Все это говорит о том, что вирус не выработал резистентности к этому соединению. Не удалось также получить устойчивые штаммы вируса парагриппа при последовательном пассировании в присутствии соединения 12. Таким образом, отсутствие резистентности к этим двум веществам у двух разных вирусов может свидетельствовать о том, что белки вируса не являются мишенью для синтетических производных цитизина. Следовательно, эти вещества имеют клеточную мишень.

Данные, полученные в результате электронно-микроскопического исследования и опыта «на время добавления», позволили нам предположить, что возможной мишенью для действия синтетических производных цитизина могут быть компоненты внутриклеточного транспорта хозяйской клетки, участвующие в доставке вРНП к месту сборки вирусных частиц. Из большинства литературных источников известно, что вирус гриппа, подобно другим вирусам, использует на протяжении всего своего жизненного цикла компоненты цитоскелета. [19, 33, 114]. Многочисленные исследования показали, что на поздних стадиях вирусной репродукции важную

роль играют F-актин и тубулин [9, 10,123]. Оба этих белка цитоскелета часто обнаруживаются в составе зрелых вирусных частиц [143]. F-актин и тубулин на поздних стадиях жизненного цикла вируса участвуют в транспортировке трансмембранных вирусных белков (НА, NA и M2) к апикальной мембране клеток [19]. Было также показано, F-актин может взаимодействовать с M1 белком и обеспечивать доставку комплекса M1-вРНП к месту сборки зрелых вирусных частиц [14]. Сам вирус гриппа, в свою очередь, может оказывать влияние на количество актина и тубулина в клетке [35,184]. Учитывая все это, мы предположили, что F-актин и/или тубулин могут быть возможными мишенями для синтетических производных цитизина. Для проверки этой гипотезы мы провели сканирующую конфокальную микроскопию. В результате этого эксперимента было показано, что через 6 часов после проникновения вируса гриппа в клетку наблюдалось резкое увеличение числа актиновых филаментов и формирование стресс-фибрилл. Количество тубулина также резко возрастало по сравнению с интактными клетками. Добавление соединения 14 в инфицированные клетки в те же часы после проникновения вируса приводило уже к другим изменениям в структуре цитоскелета. Во-первых, не регистрировалось увеличение числа актиновых филаментов, а, во-вторых, по краям клеток отмечается агрегация F-актина и формирование редких микроворсинок. Тубулин в перинуклеарной области имел вид параллельных тяжей, как в интактных клетках. Полученные данные говорят о том, что синтетические производные цитизина могут влиять на организацию и полимеризацию актина и организацию микротрубочек в клетках, инфицированных вирусом гриппа. В результате этого происходит нарушение транспорта комплекса M1-вРНП к месту сборки вирусных частиц. Однако гипотеза о такой клеточной мишени не соотносится с ранее полученными данными по спектру активности исследуемых соединений. Возможным объяснением разной активности синтетических производных цитизина в отношении разных вирусов гриппа и вируса парагриппа 3 типа является то, что разные штаммы вирусов могут по-разному использовать компоненты цитоскелета [19, 123, 149]. Однако для того, чтобы подтвердить или опровергнуть это предположение, необходимо провести в дальнейшем дополнительные исследования.

В дальнейшем было проведено исследование активности синтетических производных цитизина 11 и 14 *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. В качестве препарата сравнения использовался препарат Тамифлю. В результате эксперимента было установлено, что соединения 11 в концентрации 50 мг/кг и 14 в концентрации 100 мг/кг (ИЗ=37,5) приводят к снижению специфической смертности по сравнению с контролем. Однако активность этих соединений оказалась намного ниже, чем у препарата сравнения Тамифлю (ИЗ =100%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили изучить противовирусную активность синтетических производных цитизина в отношении респираторных вирусов человека - вирусов гриппа и вируса парагриппа человека 3 типа. Из 84 соединений в ходе первичного скрининга *in vitro* 24 вещества демонстрировали активность в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Показано, что наибольшую противогриппозную активность проявляют аддукты Дильса-Альдера с N-фенилмалеинимидом, находящиеся в « α -эндо» - конформации, имеющие в качестве заместителя во вторичном атоме азота метил, бензил, пропенил и фенилкарбамоил; вторичные амины, содержащие циклические заместители – тиофен, фенил, 2-гидроксibenзил, 3,4- диметокси – и 3-метоксибензил.

Из 84 проанализированных соединений было выявлено 29 производных цитизина, обладающих активностью *in vitro* в отношении ВПГЧЗ. Наибольшую активность проявляют аддукты Дильса-Альдера с N-фенилмалеинимидом, находящиеся в « α -эндо» - конформации с метилом, фенилом, пропенилом и фенилкарбамоилом во вторичном азоте; тиомочевины различной топологии, содержащие фенилкарбамоил, пропенил, фенил во вторичном азоте и бром в C3, C3 и C5; 12-N – этилоксипроизводные с нитрогруппой, хлором и бромом в C2, C3 и C4.

Далее в ходе экспериментов было показано, что соединение 14 обладает наибольшей активностью на поздних стадиях репродукции вируса гриппа. Действие этого вещества связано с нарушением процессов почкования и выхода зрелых вирусных частиц. Однако соединение 14 крайне слабо ингибирует нейраминидазу вируса гриппа.

Пассирование вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в присутствии нарастающих концентраций соединения 22 и ВПГЧЗ в присутствии нарастающих концентрации соединения 12 в течение 5 пассажей не приводило к появлению устойчивых штаммов.

С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии было показано, что вещество 14 в клетках, инфицированных вирусом гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) влияет на организацию и полимеризацию актина на поздних стадиях вирусной репродукции.

Для активных соединений, относящихся к аддуктам Дильса-Альдера с N – фенилмалеинимидом, была изучена противовирусная активность *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. В результате этих экспериментов было показано, что введение препаратов 11 и 14 по лечебно-профилактической схеме приводило к снижению смертности и увеличению продолжительности жизни животных. Однако эти вещества обладают умеренной противовирусной активностью, поскольку их индекс защиты составляет 13-50%.

В заключение следует отметить, что синтетические производные цитизина являются весьма перспективными веществами для дальнейшего изучения и разработки с целью получения новых лекарственных препаратов, которые были бы более безопасны и эффективны, чем имеющиеся в настоящее время, а также обладали бы более широким спектром действия.

ВЫВОДЫ

1. Большинство синтетических производных цитизина обладает низкой цитотоксичностью в культурах клеток MDCK и MA-104. Показано, что низкой токсичностью в культуре клеток MDCK ($IC_{50} > 300$) обладают 12N-замещенные производные (-)-цитизина, аддукты Дильса-Альдера в « α -эндо» конформации, тиомочевины и мочевины различной топологии и этилоксипроизводные (-)-цитизина. Низкая цитотоксичность в культуре клеток MA-104 ($IC_{50} > 300$) показана для 12N-замещенных производных (-)-цитизина, тиомочевин различной топологии.

2. Высокой вирусингибирующей активностью ($SI > 10$) *in vitro* в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) обладают 24 из 84 изученных синтетических производных цитизина.

3. Высоким противовирусным эффектом *in vitro* в отношении вируса парагриппа человека обладают 29 из 84 синтетических производных цитизина.

4. Противовирусное действие синтетических производных цитизина зависит от характера заместителей в молекуле. Максимальной противовирусной активностью обладают аддукты Дильса-Альдера с N-фенилмалеинимидом в « α -эндо» конформации. Наибольшее вирусингибирующее действие достигается за счет замещения водорода во вторичном атоме азота на фенилкарбамоил.

5. Синтетические производные цитизина 11, 12, 14 и 54 активны в отношении подтипов вирусов гриппа А (подтипы H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N2). Соединение 12, кроме того, обладает вирусингибирующим действием и в отношении вирусов гриппа В, относящихся к двум различным линиям (В/Ямагата и В/Виктория), и в отношении ВПГЧЗ.

6. Активные синтетические производные цитизина проявляют максимальную вирусингибирующую активность на поздних стадиях жизненного цикла вируса гриппа (6-10 часов после заражения). Действие соединений связано с нарушением процессов «почкования» и выхода зрелых вирусных частиц.

7. Последовательное серийное пассирование вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) в присутствии соединения 22 (30-240 мкг/мл) и ВПГЧЗ в присутствии соединения 12 (8-64 мкг/мл) не приводит к формированию вирусной резистентности.

8. Синтетические производные цитизина влияют на организацию и полимеризацию актина в клетках, инфицированных вирусом гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1).

9. Синтетические производные цитизина 11 и 14 при введении по лечебно-профилактической схеме проявляют умеренную противовирусную активность ($IZ = 25-50\%$) *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты проведенных исследований могут служить основой для дальнейших работ в этом направлении. Так, в качестве дальнейших перспектив разработки данной темы необходимо провести изучение противовирусной активности синтетических производных цитизина *in vitro* в отношении других вирусов – возбудителей респираторных заболеваний человека: респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы, риновирусы и аденовирусы. Все эти вирусы так или иначе используют для репродукции компоненты клеточного цитоскелета, поэтому результаты этих исследований позволят выявить соединения с широким спектром противовирусной активности.

Для активных синтетических производных цитизина других химических модификаций необходимо определить стадию вирусной репродукции, на которой они ингибируют размножение вируса гриппа в культуре клеток в опытах на «время добавления», а также изучить их влияние на морфогенез гриппозной инфекции *in vitro* с помощью электронной микроскопии.

Кроме того, необходимо изучить токсичность активных производных цитизина *in vivo* и определить основные токсикометрические показатели исследуемых соединений для оценки их фармакологического потенциала.

В дальнейшем планируется провести изучение противовирусной активности производных цитизина других химических модификаций на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей и оценить эффективность этих соединений по следующим показателям: снижение смертности в опытных группах по сравнению с контрольной, уменьшение площади очагов поражения в легких, уменьшение вирусных титров в легочной ткани, нормализация морфологической структуры легочной ткани. При обнаружении соединений-лидеров необходимо исследовать их противовирусную активность в отношении различных подтипов вируса гриппа А и В. Эти исследования позволят выявить производные с широким спектром действия. Далее необходимо определить при какой схеме введения (профилактической, лечебно-профилактической и лечебной) и при каком способе введения (пероральном, внутривенном, внутримышечном) соединения демонстрируют наибольший противовирусный эффект.

Кроме того, необходимо исследовать соединения –лидеры *in vivo* на модели парагриппозной пневмонии. В этих экспериментах эффективность соединений будет оцениваться по снижению титров вируса в легочной ткани, а также по нормализации морфологической структуры легочной ткани.

Необходимо также определить конкретную мишень действия соединений-лидеров и провести компьютерное моделирование их взаимодействия с помощью специального

программного обеспечения. Это позволит определить структурные основы связывания низкомолекулярных лигандов с рецепторами, что, в свою очередь, позволит провести направленную оптимизацию химических структур лигандов для повышения их аффинности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АД – артериальное давление
- АЖ – аллантоисная жидкость
- АТ – антитело
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
- ВПГЧ – вирус парагриппа человека
- вРНК – вирусная рибонуклеопротеиновая кислота
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ИЗ – индекс защиты
- ИС – индекс селективности
- ИФН – интерферон
- МПК – максимально переносимая концентрация
- мРНК – матриксная рибонуклеопротеиновая кислота
- МТТ – метилтетразолиевый тест
- н. о. – нуклеотидный остаток
- ОРДС – острый респираторный дистресс – синдром
- РГА – реакция гемагглютинации
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РНП – рибонуклеопротеин

ЦНС – центральная нервная система

ЦПД – цитопатогенное действие

ЦТД₅₀ – 50% цитотоксическая доза

ЭД₅₀ – 50% эффективная доза

ЭИД₅₀ – 50% эмбриональная инфекционная доза

Akt – RAC – альфа серин/треонин протеиновая киназа

CPSF30 – фактор 30 специфичности и полиаденилирования

CRM1 – белок поддержания структуры хромосом 1

eIF4F – эукариотический фактор инициации 4F

DAPI – 2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамидин дигидрохлорид

Dpr – 1 – динамин – родственный белок 1

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HA – гемагглютинин

HEF – hemagglutinin-Esterase-Fusion

HN – гемагглютинин-нейраминидаза

IFN – интерферон

Ig - иммуноглобулин

IL - – интерлейкин

IMP - инозинмонофосфат

IRF3 – регуляторный фактор интерферона

ISGF3 – интерферон – стимулируемый генетический фактор 3

LD₅₀ – 50% летальная доза

MAVS – митохондриальный белок противовирусной сигнализации

MES – морфолино – 2- этансульфоновая кислота

MHC I – главный комплекс гистосовместимости

MUNANA – 4-метилумбеллиферил- α -D-N-ацетилнейраминовая кислота

NA – нейраминидаза

NEP – ядерный экспортный белок

NES – сигнал ядерного экспорта

NF- κ B – ядерный фактор κ B

NLS – сигнал ядерной локализации

NP – нуклеопротеин

NS – неструктурный белок

ORF – открытая рамка считывания

PI3K – фосфоинозитид – 3 -киназа

PKR – протеинкиназа R

PBS – фосфатно-солевой буфер

RIG – 1 – ген 1, индуцируемый ретиноевой кислотой

SH – малый гидрофобный белок

STAT – переносчик сигнала и активатор транскрипции

TCID₅₀ – 50% тканевая цитопатогенная доза

TNF- α – фактор некроза опухолей α

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая// А.Н. Миронов, А.С. Бунатян и др. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
2. Фармакология : учебник / под. ред. Р. Н. Аляутдина. –М.: Гэотар-Медиа, 2010. - 832 с.
3. Чешик С.Г. Грипп/ С. Г. Чешик// Детские инфекции. – 2005. -№4. - С. 56-63.
4. Abed Y. Treatment of respiratory virus infections/ Y. Abed, G. Boivin// Antiviral Research. – 2006. – Vol. 70. –P.1–16.
5. Ali A., Nayak D. P. Assembly of Sendai virus: M protein interacts with F and HN proteins and with the cytoplasmic tail and transmembrane domain of F protein/ A. Ali, D. P. Nayak// Virology. – 2000. – Vol. 276. – P. 289-303.
6. Alymova I. V. Efficacy of novel hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX2798 and BCX2855 against human parainfluenza viruses in vitro and in vivo/ I. V. Alymova, G. Taylor, T. Takimoto et al.//Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2004. – Vol. 48. – P. 1495-1502.
7. Alymova I.V. Efficacy of the novel parainfluenza virus haemagglutinin-neuraminidase inhibitor BCX 2798 in mice - further evaluation/ I. V. Alymova, M. Watanabe, K. L. Boyd, P. Chand, Y. S. Babu, A. Portner// Antiviral therapy. – 2009. –Vol.14. –P.891–898.
8. Amarasinghe G.K. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018/ G.K. Amarasinghe, N. G. Aréchiga Ceballos, A.C. Banyard, C. F. Basler, S. Bavari et all// Archives of virology. – 2018. – Vol.163. –P.2283-2294.
9. Amorim M.J. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA/ M. J. Amorim, E. A. Bruce, E. K. Read, A. Foeglein, R. Mahen, A. D. Stuart et all.// Journal of virology. – 2011. –Vol. 85. –P.4143–4156.
10. Amorim M. J. Nucleozin targets cytoplasmic trafficking of viral ribonucleoprotein-Rab11 complexes in influenza A virus infection/ M.J. Amorim, R.Y. Kao, P. Digard//Journal of virology. – 2013. – Vol. 87. – P.4694–4703.
11. Anderson D.J., Arneric S.P: Nicotinic receptor binding of [3H]cytisine, [3H]nicotine and [3H]methylcarbamylcholine in rat brain/ D. J. Anderson, S. P. Arneric// European journal of pharmacology. – 1994. –Vol. 253. –P. 261–267.
12. Antiviral Methods and Protocols/edit by E.Y. Gong. – New Jersey: Humana press, 2013. – 452 p.

13. Arguedas A. Parainfluenza type 3 meningitis. Report of two cases and review of the literature/ A. Arguedas, H. R. Stutman, J. R. Blanding// *Clinical pediatrics (Phila)*. -1990. –Vol. 29. –P. 175–178.
14. Avalos R.T. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells/ R. T. Avalos, Z. Yu, D. P. Nayak// *Journal of virology*. – 1997. –Vol. 71. –P. 2947–2958.
15. Babu Y.S. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design/ Y. S. Babu, P. Chand, S. Bantia et al// *Journal of medicinal chemistry*. – 2000. –Vol. 43. P.3482–3486.
16. Barlow R.B., Johnson O: Relations between structure and nicotine-like activity: X-ray crystal structure analysis of (–)-cytisine and (–)-lobeline hydrochloride and a comparison with (–)-nicotine and other nicotine-like compounds/ R. B. Barlow, O. Johnson// *British journal of pharmacology*. – 1989. –Vol. 98. –P. 799–808.
17. Barroso L. Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment/ L. Barroso, J. Treanor, L. Gubareva et al// *Antiviral therapy*. – 2005. –Vol.10. –P.901-910.
18. Basu A. Molecular Mechanism Underlying the Action of Influenza A Virus Fusion Inhibitor MBX2546// A. Basu, G. Komazin-Meredith, C. McCarthy, A. Antanasijevic et al// *ACS infectious disease*. - 2017. – Vol.3. - P. 330-335.
19. Bedi S., Ono A. Friend or Foe: The Role of the Cytoskeleton in Influenza A Virus Assembly/ S. Bedi, A. Ono// *Viruses*. – 2019. – Vol.11. –P. 1-21.
20. Beigel J.H. Avian influenza A (H5N1) infection in humans/ L. H. Beigel, J. Farrar, A. M. Han, F.G. Hayden, R. Hyer et al//*The New England journal of medicine*. – 2005. –Vol.353. –P.1374-1385.
21. Bishop K. A. and Broder C.C. Hendra and Nipah: lethal zoonotic paramyxoviruses/ K. A. Bishop, C.C. Broder// *Emerging infections/ Ed. by W.M.Scheld et al*. – Washington, D. C.:American Society for Microbiology, 2008. – P.155-187.
22. Boeck R. The parainfluenza virus type 1 P/C gene uses a very efficient GUG codon to start its C' protein/ R. Boeck, J. Curran, Y. Matsuoka et al//*Journal of virology*. – 1992. – Vol. 66. – P. 1765-1768.
23. Boltz D .A. Drugs in development for influenza/ D. A. Boltz, J. R. Aldridge Jr, R. G. Webster et al// *Drugs*. -2010. –Vol.70. – P.1349–62.

24. Boriskin Y.S. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion/ Y. S. Boriskin, I.A. Leneva, E.I. Pecheur, S.J. Polyak// *Current medicinal chemistry*. – 2008. – Vol.15. – P.997–1005.
25. Bottcher E. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium/ E. Bottcher, T. Matrosovich, M. Beyerle, H. D. Klenk, W. Garten, M. Matrosovich// *Journal of virology*. – 2006.- Vol. 80. –P.9896–9898.
26. Bouvier N.M. The biology of influenza viruses/ N. M. Bouvier, P. Palese// *Vaccine*. – 2008. - Vol.26. – P.49-53.
27. Brady M. T. Survival and disinfection of parainfluenza viruses on environmental surfaces/ M. T. Brady, J. Evans, J. Cuartas// *American journal of infection control*. – 1990. – Vol.18. – P. 18-23.
28. Burgui I.PABP1 and EIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes/I. Burgui, T. Aragon, J. Ortin, A. Nieto// *The journal of general virology*. – 2003. – Vol. 84. –P. 3263–3274.
29. Chakrabarti S. Pre-emptive oral ribavirin therapy of paramyxovirus infections after haematopoietic stem cell transplantation: a pilot study/ S. Chakrabarti, K. E. Collingham, K. Holder, C. D. Fegan, H. Osman, D. W. Milligan// *Bone marrow transplantation*. – 2001. –Vol.28. –P.759–763.
30. Chanock R. M. and McIntosh K. Parainfluenza viruses/ R. M. Chanock, K.McIntosh// *Virology*/ Ed. by B.N. Fields. – New York: Raven Press, 1985. – P.1241.
31. Chazal N. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts/ N. Chazal, D. Gerlier// *Microbiology and molecular biology reviews* -. 2003. –Vol. 67. –P. 226–237.
32. Chen W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death/ W. Chen, P.A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Shubert et al.// *Nature medicine*. – 2001. –Vol. 7. –P. 1306–1312.
33. Collins A. Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis/ A. Collins, A. Warrington, K. A. Taylor, T. Svitkina// *Current biology*. – 2011. –Vol. 21. –P. 1167–1175.
34. Colman P.M. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors/ P.M. Colman// *Protein science*. - 1994. – Vol. 3. – P.1687–1696.
35. Coombs K.M. Quantitative proteomic analyses of influenza virus-infected cultured human lung cells/ K. M. Coombs, A. Berard, W. Xu, O. Krokhin et al// *Journal of virology*. – 2010.n – Vol. 84. –P. 10888–10906.
36. Cros J.F. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses/ J. F. Cros, P. Palese// *Virus research*. -2003. –Vol. 95. –P. 3–12.

37. Cros J.F An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein/ J.F. Cross, A. Garcia-Sastre, P. Palese// *Traffic*. -2005. - Vol. 6. – P.205–213.
38. Curran J., Kolakofsky D. Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C m RNA/ J. Curran, D. Kolakofsky//*The EMBO journal*. – 1988. – Vol.7. – P. 245-251.
39. Dallemagne M. J.; Heymans C. Respiratory Stimulants. In *The Alkaloids*/ M. Dallemagne, C. Heymans, Ed. R. H. F. Manske. - New York: Academic Press, 1955. - pp 109–139.
40. De Clercq E. Antiviral activities of 5-ethynyl-1-p-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related compounds/ E. De Clercq, M. Cools, J. Balzarini, R. Snoeck, G. Andrei, M. Hosoya, S. Shigeta et al//*Antimicrobial agents and chemotherapy*. - 1991. -Vol. 35. –P.679-684.
41. De Vincenzo J.P. Therapy of respiratory syncytial virus infection/ J.P. De Vincenzo//*The Pediatric infectious disease journal*. – 2000. – Vol.19. – P.786-790.
42. Deng T. Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication/ T. Deng, F.T. Vreede, G. G. Brownlee//*Journal of virology*. – 2006. –Vol. 80. –P.2337–2348.
43. Denny F.W.Acute lower respiratory tract infections in nonhospitalized children/ F. W. Denny, W.A. Clyde//*The journal of pediatrics*. – 1986. –Vol. 108. –P.635–646.
44. Didcock L. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signaling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation/ L. Didcock, D. F. Young, S. Goodbourn et al.//*Journal of virology*. – 1999. – Vol. – 73. – P. 9928-9933.
45. Dorig R.E. CD46, a primate-specific receptor for measles virus/ R. E. Dorig, A. Marciel, C. D. Richardson// *Trends in microbiology*. – 1994. – Vol. 2. – P. 312-318.
46. Dou D. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement/ D. Dou, R. Revol, H. Östbye, H. Wang, R. Daniels// *Frontiers in Immunology*. - 2018.- Vol. 9. - P 1-17.
47. Dubois J. Influenza Viruses and mRNA Splicing: Doing More with Less/ J. Dubois, O. Terrier, M. Rosa-Calatrava// *MBio*. – 2014. –Vol.5. – P.1-13.
48. Durbin A. Minimum protein requirements for transcription and RNA replication of a minigenome of human parainfluenza virus type 3 and evaluation of a rule of six / A. Durbin, J.M. McAuliffe, P.L. Collins et al.// *Virology*. – 1997. – Vol. 234. – P. 74-83.
49. Eaton B. T. Hendra and Nipah viruses: different and dangerous/ B.T. Eaton, C. C. Broder, D. Middleton et al.// *Nature reviews. Microbiology*. – 2006. – Vol. 4. – P.23-35.
50. Einarson C. Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airway hyperresponsiveness / C. Einarson, G. P. Geba, Z. Zhu et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 1996. – Vol. 97. – P. 915-924.

51. Fearn R. Polymerases of paramyxoviruses and pneumoviruses/ R. Fearn, R. K. Plemper// *Virus research*. – 2017. –Vol. 234. –P. 87–102.
52. Fields B.N, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*/ B.N. Fields, D. M. Knipe, P.M. Howley. - Philadelphia: Wolters Kluwer Health/LippincottWilliams &Wilkins; 2007. – P.3177.
53. Fontana J. M. Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus/J.M. Fontana, B. Bankamp, W. J. Bellini et al.//*Virology*. – 2008. – Vol. 374. – P.71-81.
54. Fontana J. M. Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses/ J. M. Fontana, B. Bankamp, P. A. Rota // *Immunological reviews*. – 2008. – Vol.225. – P.46-67.
55. Frank J. A. Disseminated parainfluenza infection in a child with severe combined immunodeficiency/ J.A. Frank, R. W. Warren, J. A. Tucker et al.// *American journal of. Diseases of. children*. – 1983. – Vol. 137. – P. 1172-1174.
56. Furuta Y. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase/ Y. Furuta, T. Komeno, T. Nakamura// *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. -2017. – Vol. 93. –P. 449–463.
57. Galinski M. S. RNA editing in the phosphoprotein gene of the human parainfluenza virus type 3/ M. Galinski, R. M. Troy, A. K. Banerjee// *Virology*. – 1992. – Vol. 186. – P. 543-550.
58. Gasparini R. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part I: influenza life-cycle and currently available drugs/ R. Gasparini, D. Amicizia, P.L. Lai, N. L. Bragazzi, D. Panatto// *Journal of preventive medicine and hygiene*. – 2014. –Vol. 55. –P. 69-85.
59. Gibbs M.J. Molecular virology: was the 1918 pandemic caused by a bird flu? / M.J. Gibbs, A.J. Gibbs//*Nature*. -2006. –Vol.440. –P.E8–E10.
60. Glushkov R.G. Arbidol: antiviral immunostimulant interferon inducer/ R. G. Glushkov// *Drugs Future*. – 1992. –Vol.17. –P.1079–81.
61. Gorai T. F1FO-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding/ T. Gorai, H. Goto, T. Noda, T. Watanabe, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, R. Takano, G. Neumann, S. Watanabe, Y. Kawaoka// *Proceedings of the National . Academy of Sciences of the USA*. – 2012. –Vol. 109. –P. 4615–4620.
62. Govorkova E.A. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses/ E. A. Govorkova, I. A. Leneva, O. G. Goloubeva et all// *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2001. –Vol.45. – P.2723–2732.

63. Greengard, O. The anti-influenza virus agent 4-GU-DANA (zanamivir) inhibits cell fusion mediated by human parainfluenza virus and influenza virus HA/ O. Greengard, N. Poltoratskaia, E. Leikina, J. Zimmerberg, A. Moscona// *Journal of virology*. -2000. –Vol. 74. –P. 11108–11114.
64. Gubareva L.V. Influenza virus neuraminidase inhibitors/ L.V. Gubareva, L. Kaiser, F. G. Hayden// *Lancet*. – 2000. –Vol.355. –P.827–835.
65. Guilligay D. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2/ D. Guilligay, F Tarendeau, P. Resa-Infante, R. Coloma, T. Crepin, P. Sehr et all// *Nature structural & molecular biology*. – 2008. –Vol. 15. –P.500–506.
66. Guo Z. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I/ Z. Guo, L. M. Chen, H. Zeng, J. A. Gomez, J. Plowden, T. Fujita, J. M. Katz, R.O. Donis, S. Sambhara// *American. Journal of respiratory cell and molecular biology*. -2007. – Vol. 36. – P. 263–269.
67. Hall C.B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus/ C.B. Hall//*The New England journal of medicine*. – 2001. – Vol.344. – P.1917-1928.
68. Haller O. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses/ O. Haller, G. Kochs, F. Weber//*Virology*. – 2006. – Vol. 344. – P. 119-130.
69. Hause B.M. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family/ B. M. Hause, E. A. Collin, R. Liu, B. Huang, Z. Sheng, W. Lu et all// *mBio*. – 2014. – Vol. 5: - P.1-10.
70. Hayden F.G. Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development/ F.G. Hayden, N. Shindo// *Current opinion in infectious diseases*. – 2019. – Vol.32. - P.176-186.
71. Henrickson K. J. Epidemiology and cost of human parainfluenza virus type one and two infections in young children/ K.J. Henrickson, S.M. Kuhn, L.L. Savatski//*Clinical infectious diseases*. – 1994. – Vol.18. – P. 770-779.
72. Henrickson K.J. Parainfluenza viruses/ K. J. Henrickson// *Clinical microbiology reviews*. – 2003. – Vol. 16. - P. 242-264.
73. Horikami S. M. The Sendai virus C protein binds the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis/ S. Horikami, R. E. Hector, S. Smallwood// *Virology*. – 1997. – Vol. 235. – P. 261-270.
74. Horvath C.M. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide/ C. M. Horvath, M. A. Williams, R. A. Lamb// *The EMBO journal*. – 1990. –Vol. 9. –P. 2639–2647.
75. Hu J. PA-X: a key regulator of influenza A virus pathogenicity and host immune responses / J. Hu, C. Ma, X. Liu//*Medical microbiology and immunology*.- 2018.- Vol. 207. –P. 255-269.

76. Hu Y. Influenza A virus nucleoprotein: a highly conserved multi-functional viral protein as a hot antiviral drug target/ Y. Hu, h. Sneyd, R. Dekant, J. Wang// *Current topics in medicinal chemistry*. – 2017.- Vol. 17. – P.2271-2285.
77. Huotari J., Helenius A. Endosome maturation/ J. Huotari, A. Helenius// *The EMBO journal*. -2011. –Vol.30. –P. 481-500.
78. Influenza virus. Methods and protocols/edit. by Y.Yamauchi. – New Jersey: Humana Press, 2018. – 663 p.
79. Ison M.G. Antiviral treatments/ M.G. Ison// *Clinics in chest medicine*. – 2017. – Vol. 38. –P.139-153.
80. Ison M. G. Antivirals and resistance: influenza virus/ M. G. Ison// *Current Opinion in Virology*. - 2011. –Vol. 1. –P. 563-573.
81. Ison M.G. Therapeutic options for the management of influenza/ M. G. Ison, F. G. Hayden// *Current opinion in pharmacology*. – 2001. –Vol.1. –P.482-490.
82. Izaddoost M. Structure and toxicity of alkaloids and amino acids of *Sophora secundiflora* seeds/ M. Izaddoost, B. G. Harris, R. W. Gracy//*Journal of pharmaceutical sciences*. – 1976. –Vol. 65. –P. 352–354.
83. Jin W. K. Rubulavirus: mumps virus/W. K. Jin et al. //Microbiology and microbial infections/ edit. by B. W. J. Mahy, V. TerMeulen et al. – UK: Hodder Arnold, 2005. – P.744-762.
84. Jochmans D. Antiviral Activity of Favipiravir (T-705) against a Broad Range of Paramyxoviruses In Vitro and against Human Metapneumovirus in Hamsters/ D. Jochmans, S. van Nieuwkoop, S. L. Smits, J. Neyts, R. A. M. Fouchier et all//. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. –Vol 60. - P.4620-4629.
85. Jones B.G. Inhibition of Primary Clinical Isolates of Human Parainfluenza Virus by DAS181 in Cell Culture and in a Cotton Rat Model/ B. G. Jones, R.T. Hayden, J. L. Hurwitz// *Antiviral research*. – 2013. – Vol. 100. – P.562-566.
86. Kadam R.U. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol/ R. U. Kadam, I. A. Wilson// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. - 2017. – Vol.114. –P.206-214.
87. Kamal R. P. Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2 / R. P. Kamal, I. V. Alymova, I. A. York// *International journal of molecular sciences*.- 2017. – Vol.19. – P.1-15.
88. Karasin A. I. Identification of human H1N2 and human-swine reassortant H1N2 and H1N1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005) / A. I. Karasin, S. Carman, C. W. Olsen//*Journal of clinical microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – P. 1123-1126.

89. Kawaoka Y. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics/ Y. Kawaoka, S.Krauss, R.G. Webster// *Journal of virology*. – 1989. –Vol.63. –P. 4603–4608.
90. Kingsbury D.W. Orthomyxo- and Paramyxoviruses and their replication/ D. V. Kingsbury// *Virology*/ Ed. by B. N. Fields. – New York: Raven Press, 1985. – P.157.
91. Klemm C. Immunomodulatory Nonstructural Proteins of Influenza A Viruses/C. Klemm, Y. Boergeling, S. Ludwig, C. Ehrhardt// *Trends in microbiology*. – 2018.- Vol.26. –P.624-636.
92. Komatsu T. Sendai virus blocks alpha interferon signaling to signal transducers and activators transcription/T. Komatsu, K. Takeuchi, J. Yokoo et al.// *Journal of virology*. – 2000. – Vol.74. – P. 2477-2480.
93. Komatsu T. C and V proteins of Sendai virus target signaling pathways leading to IRF-3 activation for the negative regulation of interferon-beta production/T.Komatsu, K. Takeuchi, J. Yokoo et al.//*Virology*. – 2004. – Vol.325. – P. 137-148.
94. Koutsakos M., Thi HO Nguyen, Wendy S Barclay & Katherine Kedzierska. Knowns and unknowns of influenza B viruses// M. Koutsakos, T. H. Nguyen, W. S. Barclay, K. Kedzierska// *Future Microbiology*. – 2016. – Vol.11. – P.119-135.
95. Koyama A. H. Virus multiplication and induction of apoptosis by Sendai virus: role of the C proteins/A. H. Koyama, H. Irie, A. Kato et al.// *Microbes and infection*. – 2003. – Vol. 5. – P. 373-378.
96. Kuiken T. Pathology of human influenza revisited/ T.Kuiken, J. K. Taubenberger// *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. –P.D59–D66.
97. Lamb R. A., Kolakofsky D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication/R.A. Lamb, D.Kolakofsky// *Virology*/ Ed. by D. M. Knipe et al. – Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001. – P. 1305-1340.
98. Lamb R. A., Jardetzky T. S. Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F/ R. A. Lamb, T. S. Jardetzky// *Current opinion in structural biology*. – 2007. – Vol. 17. – P. 427-436.
99. Lekcharoensuk P. Novel swine influenza virus subtype H3N1, United States /P. Lekcharoensuk, K. M. Lager, R. Vemulapalli, M. Woodruff, A.L. Vincent, J.A. Richt// *Emerging infectious diseases*. – 2006. – Vol. 12. – P. 787-794.
100. Liu T. A Small-Molecule Compound Has Anti-influenza A Virus Activity by Acting as a "PB2 Inhibitor"/ T. Liu, M. Liu, F. Chen et all// *Molecular pharmaceuticals*. – 2018. – Vol.15. – P. 4110-4120.

101. Lo C.Y. Structure and Function of Influenza Virus Ribonucleoprotein/ C. Y. Lo, Y.S. Tang, P.C. Shaw// *Sub-cellular biochemistry*. – 2018. –Vol.88. –P.95-128.
102. Malakhov M.P. Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection/ M. P. Malakhov, L. M. Aschenbrenner, D. F. Smee// *Antimicrobial agents and chemotherapy*. -2006. –Vol.50. –P.1470–1479.
103. Malinowski M.D., Hostoffer R.W. Home care based treatment with short course inhaled ribavirin of parainfluenza virus in a patient with severe combined immunodeficiency/ M. D. Malinowski, R.W. Hostoffer// *The journal of allergy and clinical immunology*. – 2001. – Vol.107. – P. 633-645.
104. Manzoor R. Influenza A Virus M2 Protein: Roles from Ingress to Egress/ R. Manzoor, M. Igarashi A. Takada//*International journal of molecular sciences*. - 2017. – Vol. 18. – P.1-16.
105. Mazur I. The proapoptotic influenza a virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the pb1 protein/ I. Mazur, D. Anhlan, D. Mitzner, L. Wixler, U. Shubert, S. Ludwig// *Cellular microbiology*. – 2008. –Vol. 10. –P. 1140–1152.
106. Mayer, D. Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches/ D. Mayer, K. Molawi, L. Martinez-Sobrido, A. Ghalem, S. Thomas et al// *Journal of proteome research*. - 2007. – Vol. 6. –P.672–682.
107. McCullers J.A. Preventing and treating secondary bacterial infections with antiviral agents/ J.A. McCullers// *Antiviral therapy*. – 2011. –Vol.16. –P.123–135.
108. Mills C.E. Transmissibility of 1918 pandemic influenza/ C. E. Mills, J. M. Robins, M. Lipsitch// *Nature*. - 2004. –Vol. 432. –P.904–906.
109. Min J.Y. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis/ J. Y. Min, S. Li, G. C. Sen, R. M. Krug// *Virology*. – 2007. –Vol. 363. –P. 236–243.
110. Min J.Y. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 20–50 oligo (A) synthetase/RNase L pathway/ J. Y. Min, R. M. Krug// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2006. – Vol. 103. –P.7100–7105.
111. Mo X.Y. Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia/ X. Y. Mo, S. R. Sarawar, P. C. Doherty// *Journal of virology*. – 1995. – Vol. 69. – P. 1288-1291.
112. Moghadami M. A. Narrative Review of Influenza: A Seasonal and Pandemic Disease/ M. A. Moghadami// *Iranian journal of medical sciences*. - 2017. - Vol 42. – P. 2-13.
113. Momose F. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome/ F. Momose, T. Sekimoto, T. Ohkura, S. Jo, A. Kawaguchi, K. Nagata et al.// *PLoS one*. – 2011. – Vol.6: - P.1-15.

114. Mooren O.L. Roles for actin assembly in endocytosis/ O. L. Mooren, B. J. Galletta, J. A. Cooper// *Annual review of biochemistry*. – 2012. –Vol. 81. –P. 661–686.
115. Monto, A.S. The role of antivirals in the control of influenza/A. S. Monto// *Vaccine*. - 2003. –Vol.21. –P.1796–1800.
116. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays/ T. Mosmann//*Journal of immunological methods*. – 1983. – Vol. 65. –P. 55-63.
117. Muramoto Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA/ Y. Muramoto, T. Noda, E. Kawakami, R. Akkina, Y. Kawaoka// *Journal of virology*. -2013. - Vol. 87. –P.2455–2462.
118. Naniche D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as cellular receptor for measles virus/ D. Naniche et al. // *Journal of virology*. – 1993. – Vol. 67. – P. 6025-6032.
119. Nayak D.P. The role of lipid microdomains in virus biology/ D. P. Nayak, E.K. Hui// *Sub-cellular biochemistry*. - 2004. – Vol. 37. – P. 443–491.
120. Nayak D.P. Influenza virus morphogenesis and budding/ D.P. Nayak, R.A. Balogun, H. Yamada, Z.H. Zhou, S. Barman// *Virus research*. – 2009. – Vol.143. – P.147- 161.
121. Negrete O. A. Ephrin B2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus/ O. A. Negrete et al.// *Nature*. – 2005. – Vol.436. – P. 401-405.
122. Nemeroff M.E. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs/ M. E. Nemeroff, S. M. Barabino, Y. Li, W Keller, R. M. Krug// *Molecular cell*. – 1998. – Vol. 1. – P.991–1000.
123. Nturibi E. Intracellular Colocalization of Influenza Viral RNA and Rab11A Is Dependent upon Microtubule Filaments/ E. Nturibi, A. R. Bhagwat, S. Coburn, M. M. Myerburg, S.S. Lakdawala// *Journal of virology*. – 2017. –Vol. 91. –P.1-20.
124. Obenauer J.C. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates/ J.C. Obenauer, J. Denson, P.K. Mehta, X.Su, S. Mukatira, D. B. Finkelstein et all// *Science*. -2006. –Vol.311. –P.1576–1580.
125. Ortmann D. Proteolytic cleavage of wild type and mutants of the F protein of a human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, Furin and Kex2/ D. Ortmann, M. Ohuchi, H. Angliker et al.// *Journal of virology*. – 1994. – Vol.68. – P. 2772-2776.
126. Palgen J. L. Unity in diversity: Shared mechanism of entry among paramyxoviruses/ J. L. Palgen, E. M. Jurgens, A. Moscona, L. M. Palermo, M. Porotto// *Progress in molecular biology and translational science*. – 2015. –Vol. 129. –P. 1–32.

127. Parks G. D. and Lamb R.A. Defective assembly and intracellular transport of mutant paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase proteins containing altered cytoplasmic domains/ G. D. Parks, R. A. Lamb//*Journal of virology*. – 1990. – Vol. 64. – P. 3605-3616.
128. Pelet T. The P gene of bovine parainfluenza virus 3 expresses all three reading frames from a single mRNA editing site/ T. Pelet, J. Curran, D. Kolakofsky//*The EMBO journal*. – 1991. – Vol. 10. – P. 443-448.
129. Peteranderl C. Human Influenza Virus Infections/ C. Peteranderl, S. Herold, C. Schmoldt// *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. -2016. - Vol. 37. –P.487-500.
130. Presti R. M. Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae/ R. M. Presti, G. Zhao, W. L. Beatty, K. A. Mihindukulasuriya, A. P. da Rosa, V. L. Popov et al// *Journal of virology*. – 2009. –Vol. 83. –P. 11599–11606.
131. Prince G. A., Porter D. D. Treatment of parainfluenza type 3 bronchiolitis and pneumonia in a cotton rat model using topical antibody and glucocorticosteroid/ G.A. Prince, D. D. Porter//*The journal of infectious diseases*. – 1996. – Vol. 173. – P. 598-608.
132. Randal R. E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signaling, antiviral responses and viruses countermeasures/ R.E. Randal, S. Goodbourn// *The journal of general virology*. – 2008. – Vol. 89. – P. 1-47.
133. Rodriguez J. J. Hendra virus V protein inhibits interferon signaling by preventing STAT1 and STAT2 nuclear accumulation/ J. J. Rodriguez, L. F. Wang, C. M. Horvath// *Journal of virology*. – 2003. – Vol. 77. – P. 11842-11845.
134. Roeder P.L. and Taylor W.P. Rinderpest/ P.L. Roeder, W.P. Taylor// *The Veterinary clinics of North America. Food animal Practice*. – 2002. – Vol. 18. – P.515-547.
135. Rossman J.S. Influenza virus assembly and budding/ J. S. Rossman, R.A. Lamb// *Virology*. -2011. –Vol.411. – P.229–236.
136. Rouden J. (-)-Cytisine and derivatives: synthesis, reactivity, and applications/J. Rouden, M. C. Lasne, J. Blanchet, J. Baudoux// *Chemical reviews*. – 2014. –Vol.114. –P. 712-778.
137. Russel C.J. Acid-Induced Membrane Fusion by the Hemagglutinin Protein and Its Role in Influenza Virus Biology/ C. J. Russel//*Current topics in microbiology and immunology*. -2014. – Vol.385. – P.93-116.
138. Russell R.J. Structure of influenza Hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion/ R. J. Russel, P. S. Kerry, D.J. Stevens, D. A. Steinhauer, S. R. Martin, S.J. Gamblin, J.J. Skehel// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. -2008. –Vol. 105. –P. 17736–17741.

139. Saladino R. Recent advances in the chemistry of parainfluenza – 1(Sendai) virus inhibitors/ R. Saladino, U. Ciambecchini, L. Nencioni, A. T. Palamara// *Medicinal research reviews.* – 2003. – Vol. 23, N4. – P. 427-425.
140. Scholtissek C. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2/C. Scholtissek, W. Rohde, V. Von Hoyningen, R. Rott// *Virology.* -1978. –Vol.87. –P.13–20.
141. Selman M. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing/ M. Selman, S. K. Dankar, N.E. Forbes, J.J. Jia, E.G. Brown// *Emerging microbes and infections.* -2012. – Vol.1. – P. 1-10.
142. Shao W. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment/ W. Shao, X. Li, M. U. Goraya, S. Wang, J. L. Chen// *International journal of molecular sciences.* – 2017. –Vol.18. – P.1-13.
143. Shaw M.L. Cellular proteins in influenza virus particles/ M. L. Shaw, K. L. Stone, C. M. Colangelo et al// *PLoS pathogens.* - 2008. –Vol. 4. –P. 1-13.
144. Shimizu T. Crucial role of the influenza virus NS2(NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP/ T. Shimizu, N. Takizawa, K. Watanabe, K. Nagata, N. Kobayashi// *FEBS letters.* - 2011. –Vol. 585. –P. 41–46.
145. Shinya K. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway/ K. Shinya, M.Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai, Y. Kawaoka// *Nature.* – 2006. - Vol.440. – P.435-436.
146. Shuto S. New neplanocin analogues. IX. A practical preparation of (6'R)-6'-C-methylneplanocin A (RMNPA), a potent antiviral agent, and the determination of its 6'-configuration. Diastereoselective deamination by adenosine deaminase/ S. Shuto, T. Obara, S. Yaginuma, A. Matsuda// *Chemical & pharmaceutical bulletin (Tokyo).* – 1997. – Vol. -45.- P.138-42.
147. Sieczkarski S.B. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis/ S. B. Sieczkarski, G.R. Whittaker// *Journal of virology.* - 2002. –Vol.76 – P.10455-10464.
148. Sieg S. The role of interleukin-10 in the inhibition of T-cell proliferation and apoptosis mediated by parainfluenza virus type 3/ S. Sieg, C. King, Y. Huang, D. Kaplan// *Journal of virology.* – 1996. – Vol. 70. – P.4845-4848.
149. Simpson-Holley M. A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions/ M. Simpson-Holley, D. Ellis, D. Fisher, D. Elton, J. McCauley, P. Digard// *Virology.* – 2002. –Vol. 301. –P. 212–225.
150. Smrt S.T. The influenza hemagglutinin fusion domain is an amphipathic helical-hairpin that functions by inducing membrane curvature/ S. T. Smrt, A.W. Draney, J.L. Lorieau// *The journal of biological chemistry.* – 2015. – Vol.290. – P.228-238.

151. Spriggs M. K. Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses: contributions of the individual proteins to host immunity/ M. K. Spriggs, B. R. Murphy, G. A. Prince et al.//*Journal of virology*. – 1987. – Vol. 61. – P. 3416-3423.
152. Stankova J. Long-term therapy with aerosolized ribavirin for parainfluenza 3 virus respiratory tract infection in an infant with severe combined immunodeficiency/ J. Stankova, A. S. Carret, D. Moore et al.//*Pediatric transplantation*. – 2007. – Vol.11. – P.209–213.
153. Stieneke-Grober A. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease/ A. Stieneke-Grober, M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts et al.// *The EMBO journal*. -1992.- Vol. 11. –P.2407–2414.
154. Storey D. J. Structural characterization of virion proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3/ D.J. Storey, K. Dimock, C.Y. Kang//*Journal of virology*. – 1984. – Vol. 52. – P. 761-766.
155. Strauss E. G., Strauss J. H. *Viruses and human disease*/ E. G. Strauss, J. H. Strauss. – Canada: Academic Press, 2007. – P.480.
156. Streeter D. J. Mechanism of action of Virazole, a new broad-spectrum antiviral agent/ D. J. Streeter, T. J. Witkowski, G.P. Khare et al.//*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1973. – Vol. 70. – P. 1174-1178.
157. Su S. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics/ S. Su, X. Fu, G.Li, F.Kerlin, M. Veit// *Virulence*. - 2017.- Vol.8. – P. 1580-1591.
158. Takeda M. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion/ M. Takeda, G.P. Leser, C.J. Russell, R.A. Lamb// *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2003. – Vol. 100. – P.14610–14617.
159. Taubenberger, J.K. The pathology of influenza virus infections / J.K. Taubenberger, D.M. Morens // *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease* - 2008. – Vol.3. – P. 499-522
160. ter Meulen V. Fusion of cultured multiple-sclerosis brain cells with indicator cells: Presence of nucleocapsids and virions and isolation of parainfluenza-type virus/ V. ter Meulen, H. Koprowski, Y. Iwasaki, Y.M. Käckell, D. Müller// *Lancet*. -1972. –Vol.2. –P.1–5.
161. *Textbook of influenza*. Second edition/edit. by R.G. Webster, A.S. Monto, T.J. Braciale, R. A. Lamb.- UK: Wiley Blackwell, 2013. – 522 p.
162. Tong S. New world bats harbor diverse influenza A viruses/ S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al.// *PLoS pathogens*. -2013. –Vol. 9: -P.1-12.
163. Toovey S. Influenza-associated central nervous system dysfunction: A literature review/ S. Toovey//*Travel medicine and infectious disease*.- 2008. –Vol.6. –P.114–124.

164. Trifonov V. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus/ V. Trifonov, H. Khiabani, R. Rabadan// *The New England journal of medicine*. – 2009. –Vol.361. –P. 115–119.
165. Tutka P. Cytisine for the treatment of nicotine addiction: from a molecule to therapeutic efficacy/ P. Tutka, W. Zatoński// *Pharmacological reports*. – 2006. –Vol. 58. - P. 777-798.
166. Vakhitova Y.V. Search for (-)-cytisine derivatives as potential inhibitors of NF- κ B and STAT1/ Y.V. Vakhitova, E.I. Farafontova, L. F. Zainullina, V. A. Vakhitov et al // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2015. – Vol. 41.– P. 297-304.
167. Varga Z.T. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein/ Z. T. Varga, I. Ramos, R. Hai, M. Schmolke, A. Garcia-Sastre et al.// *PLoS pathogens*. – 2011. – Vol.7. –P. 1-16.
168. Veit M. Association of influenza virus proteins with membrane rafts/ M. Veit, B. Thaa// *Advances in virology*. – 2011. –Vol. 2011. –P.1-14.
169. Vidal S. Editing of the Sendai virus P/C mRNA by G insertion occurs during mRNA synthesis via a virus-encoded activity/S. Vidal, J. Curran, D. Kolakofsky// *Journal of virology*. – 1990. – Vol. 64. – P.239-246.
170. Vreede R.W. Isolation of human parainfluenza virus type 3 from cerebrospinal fluid/ R.W. Vreede, H. Schellekens, M. IuiJderwijk// *The journal of infectious diseases*. – 1992. – Vol.165. – P.1166.
171. Wang M. Hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) protein of influenza C virus/M. Wang, M. Veit// *Protein & cell*.- 2015.- Vol.7(1). – P.28-45.
172. Wang C. The ion channel activity of the influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block/ C. Wang, K. Takeuchi, L.H. Pinto, R. A. Lamb// *Journal of virology*. -1993. – Vol. 67. –P.5585–5594.
173. Wang X. Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013–17: An epidemiological study of laboratory-confirmed case series/ X. Wang, H. Jiang, P. Wu, T. M. Uyeki, L. Feng et al// *Lancet. Infectious diseases*. – 2017. –Vol.17. – P. 822–832.
174. Watanabe A. A randomized double-blind controlled study of laninamivir compared with oseltamivir for the treatment of influenza in patients with chronic respiratory diseases/ A. Watanabe// *Journal of infection and chemotherapy*. – 2013. –Vol.19. –P.89–97.
175. Wester A. Peramivir injection in the treatment of acute influenza: a review of the literature/ A. Wester, A. K. Shetty// *Infection and drug resistance*. – 2016. –Vol.9. –P.201-214.

176. White M. C. Lowen Implications of segment mismatch for influenza A virus Evolution/ M. C White, A. C. Lowen// *Journal of General Virology*. – 2018. –Vol.99. –P.3–16.
177. Wilbur J.D. New faces of the familiar clathrin lattice/ J. D. Wilbur, P. K. Hwang, F. M. Brodsky// *Traffic*/ - 2005. -Vol.6. –P.346-350.
178. Wilson R. L. Function o small hydrophobic proteins of paramyxovirus/ R. L. Wilson et al.// *Journal of virology*. – 2006. – Vol.80 – P.1700-1709.
179. Wise H. M. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA/ H. M. Wise, A. Foeglein, J. C. Sun, R. M. Dalton, S. Patel et all.// *Journal of virology*. – 2009. –Vol. 83. –P.8021–8031.
180. Wise H.M. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain/ H. M. Wise, E. C. Hutchinson, B. W. Jagger, A. D. Stuart, Z. H. Kang et all.// *Plos pathogens*. – 2012. –Vol.8. – P.1-14.
181. Yamashita M: Laninamivir and its prodrug, CS-8958: longacting neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza/ M. Yamashita// *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 21. –P.71-84.
182. Young A. Structural insights into the clathrin coat/ A. Young// *Seminars in cell & developmental biology*. – 2007. –Vol.18. –P.448-458.
183. Yu H. Isolation and genetic analysis of human origin H1N1 and H3N2 influenza viruses from pigs in China / H. Yu, G. H. Zhang, R. H. Hua, Q. Zhang, T. Q. Liu et all//*Biochemical and biophysical research communications*. – 2007. – Vol. 356. – P. 91-96.
184. Yu G. Proteomic Analysis of Differential Expression of Cellular Proteins in Response to Avian H9N2 Virus Infection of A549 Cells/ G. Yu, W. Liang, J. Liu, D. Meng et all// *Frontiers in microbiology*. – 2016. – Vol. 7. –P. 1-6.
185. Zhao M. Influenza A Virus–Host Protein Interactions Control Viral Pathogenesis/ M. Zhao, L. Wang, S. Li// *International journal of molecular sciences*. – 2017. –Vol.18. – P.1-15.
186. Zielinska-Jencylic J. The influence of environment on parainfluenza 3 virus and its replication in tissue cultures/ J. Zielinska-Jencylic// *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. – 1970. – Vol. 199. – P. 525-545.