

НОВЫЕ АНТИ-ВИЧ ПРЕПАРАТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ – ИНГИБИТОРЫ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

С.Л. Рыбалко¹, М.П. Завелевич², С.Т. Дядюн¹, Е.В. Максименок¹,
Е.С. Антоняк¹, В.П. Атаманюк³, А.С. Шаламай⁴, Т.В. Крутских⁵

¹Институт эпидемиологии и инфекционных болезней АМН Украины

²Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им.
Р.Е. Кавецкого НАН Украины

³НПО "Экофарм"

⁴Борщаговский химико-фармацевтический завод

⁵Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Согласно данным литературы, флавоноиды и эллаготанины обладают противовирусным и противобактериальным действием [1]. В последнее время было показано, что представители этих классов природных веществ могут угнетать репродукцию ВИЧ [2]. Механизмы такого действия требуют дальнейшего изучения с учетом того, что природные вещества различных групп, обладающие сродством с ДНК, в том числе и интеркалирующей активностью, могут ингибировать ряд ферментов, субстраты и продукты которых представлены нуклеиновыми кислотами, в частности ферментов, участвующих в репликации и синтезе ДНК, в том числе и вирусной ДНК [3]. Уже идентифицированы представители флавоноидов, которые эффективно ингибируют обратнотранскриптазную активность. Показана и ингибирующая активность некоторых индивидуальных представителей эллаготанинов в отношении РНК-зависимой ДНК-полимеразы [4]. Между тем, остается невыясненным до конца вопрос о том, каков вклад ингибирования активности ревертазы в угнетение репродукции ВИЧ.

В последнее время большое внимание уделяется не только синтетическим соединениям, относящимся к указанным группам, но и

природным смесям таких веществ, на основе которых уже созданы применяемые в медицине фармацевтические композиции. Ряд таких композиций разрабатывается в настоящее время.

Целью настоящей работы было изучение анти-ВИЧ активности и ингибирующей активности в отношении обратной транскриптазы ретровирусов препаратов Протефлазид и Альтабор, созданных на основе, соответственно, природных смесей флавоноидов и эллаготанинов. Препарат Протефлазид (НПО "Экофарм") представляет собой спиртовой экстракт флавоноидов, переработанный в ПЭО-400, и содержит около 2,7 мг/мл флавоноидов, основная масса которых приходится на гликозид кверцетина. Препарат Альтабор (Борщаговский химико-фармацевтический завод) содержит гликозидные производные галловой, эллаговой (гексаоксидифеновой) и валониевой кислот в виде моно-, ди- и олигомеров.

Источником обратной транскриптазы (ревертазы) в настоящих исследованиях служил мышинный ретровирус, продуцируемый клетками NML, предоставленными д.б.н. Ю.И. Кудрявцем (ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАНУ). Определение обратнотранскриптазной активности проводили радиометрическим методом по Greenberger et al. [5] по уровню включения ^3H -ТТФ в кислотонерастворимый продукт на экзогенной матрице поли рА – олиго дТ в инкубационной смеси следующего состава: 50 мМ трис-НСl pH 7,8; 60 мМ КСl; 2 мМ дитиотреитола; 0,25 мМ MnCl_2 ; 0,1% об./об. тритон X-100; 0,020 мМ ТТФ; 37 кБк ^3H -ТТФ ("Амершам", Англия) (удельная активность 2,37 ТБк/ммоль) и 0,2 ОЕ/мл матрицы поли рА – (дТ)₁₂. Активность проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Исследуемые препараты добавляли непосредственно в инкубационную смесь на весь срок инкубации (1 час).

Результаты определения обратной транскриптазы в присутствии в инкубационной смеси препаратов приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Активность обратной транскриптазы на экзогенной матрице в присутствии Протефлазида

Инкубационная смесь	Включение ³ H-ТТФ в ТХУ-нерастворимую фракцию в имп./мин
Полная смесь (состав приведен выше)	40466
+ Протефлазид 5 мкг/мл	39257
+ Протефлазид 50 мкг/мл	25388

Таблица 2. Активность обратной транскриптазы на экзогенной матрице в присутствии препарата Альтабор

Инкубационная смесь	Включение ³ H-ТТФ в ТХУ-нерастворимую фракцию в имп./мин
Полная смесь (состав приведен выше)	9243
+ Альтабор (конечная концентрация 20 мкг/мл)	3874
+ Альтабор (конечная концентрация 70 мкг/мл)	1113
+ Альтабор (конечная концентрация 200 мкг/мл)	1101

Таким образом, протефлазид в концентрации 50 мкг/мл вызывал торможение включения ³H-ТТФ в ТХУ-нерастворимую фракцию в обратнотранскриптной реакции на экзогенной матрице в стандартной системе на 37% по сравнению с активностью фермента, определяемой в отсутствие препарата. В концентрации 5 мкг/мл ингибирующая активность этого препарата не выявлялась.

Препарат Альтабор в концентрации 70 мкг/мл вызывал практически полное (почти на 90%) торможение включения ³H-ТТФ в ТХУ-нерастворимую фракцию в обратнотранскриптной реакции в указанной системе, в концентрации 20 мкг/мл ингибирующий эффект составил около 60%.

Исследования возможного ингибирующего эффекта препаратов на репродукцию ВИЧ проводили на модели продуктивной инфекции ВИЧ-1 в культуре клеток острого лимфобластного лейкоза человека МТ-4. Через 30

мин инкубации при комнатной температуре с указанными препаратами клетки инфицировали ВИЧ-1 и инфицированные клетки инкубировали при 37° С в течение 5 суток. Затем в каждой пробе определяли инфекционный титр путем заражения клеток МТ-4 десятикратными разведениями проб. Через 5 суток культивирования в термостате в каждой лунке определяли антиген р24 в системе Vironostika, Organon Teknika (Нидерланды). Результаты определения инфекционного титра ВИЧ-1 в присутствии Протефлазида, Альтабора и препарата сравнения Ретровира (Glaxo Wellcome) представлены в табл. 3.

Таблица 3. Влияние Протефлазида и Альтабора на репродукцию ВИЧ в культуре клеток МТ-4

Препарат, доза	Ингибция инфекционного титра в lg ID50
Положительный контроль ВИЧ	–
Протефлазид 0,16 мкг/мл	1,6
Протефлазид 0,32 мкг/мл	2,8
Протефлазид 0,64 мкг/мл	1,0
Альтабор 10 мкг/мл	1,7
Препарат сравнения Ретровир 0,0625 мкг/мл	2,8

Как видно из приведенных данных, Протефлазид в дозе 0,32 мкг/мл оказывает выраженное ингибирующее действие в отношении репродукции ВИЧ-1 в исследуемой системе, сопоставимое с таковым для препарата сравнения Ретровира. Интересно заметить, что у препарата Протефлазид не было отмечено строгой дозозависимости ингибирующего действия.

Вместе с тем, при сравнении препаратов Протефлазид и Альтабор не показано корреляции между ингибирующим действием в отношении репликации вируса и ингибированием ревертазной активности в бесклеточной системе. Препарат Альтабор вызывал значительную ингибицию ревертазной активности, однако, лишь в слабой степени

ингибировал репликацию вируса. Таким образом, помимо прямого действия на РНК-зависимую ДНК-полимеразу, существуют и другие механизмы ингибирования репликации вируса, которые могут играть важную роль в проявлении механизмов анти-ВИЧ активности новых препаратов природного происхождения. Вероятно, скрининг новых препаратов на предмет анти-ВИЧ активности должен проводиться на основе нескольких критериев.

Литература

1. **Pietta PG.** Flavonoids as antioxidants. *J Nat. Prod.* 2000; 63(7):1035-42
2. **Souza J Jr, Santos RH, Ferreira MM, Molfetta FA, Camargo AJ, Honorio KM, da Silva AB.** A quantum chemical and statistical study of flavonoid compounds (flavones) with anti-HIV activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2003; 38(11-12): 929-38.
3. **Formica JV, Regelson W.** Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 1995; 33(12): 1061-80.
4. **Notka F, Meier G, Wagner R.** Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Res.* 2004; 64(2): 93-102.
5. **Greenberger JS, Stephenson JR, Moloney WC, Aaronson SA.** Different hematological diseases induced by type C viruses chemically activated from embryo cells of different mouse strains. *Cancer Res.* 1975; 35(1): 245-52.