

В.В. Зарубаев<sup>1</sup>, Л.А. Остроухова<sup>2</sup>, Е.Н. Медведева<sup>2</sup>, В.А. Бабкин<sup>2</sup>, О.И. Киселев<sup>1</sup>

## ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ДРЕВЕСИНЫ ЛИСТВЕННИЦЫ

<sup>1</sup>ГУ Научно-исследовательский институт гриппа РАМН (Санкт-Петербург)

<sup>2</sup>Учреждение РАН Институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)

*Исследованы противовирусные свойства биологически активных экстрактивных веществ, выделенных из древесины лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина. Показано, что биофлавоноид дигидрокверцетин и полисахарид арабиногалактан обладают выраженной противогриппозной активностью. На их основе разработан новый комплексный препарат для профилактики и лечения гриппа и острых респираторно-вирусных инфекций.*

**Ключевые слова:** древесина лиственницы, арабиногалактан, дигидрокверцетин, противовирусная активность

## ANTIVIRAL PREPARATIONS BASED ON LARCH WOOD BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

V.V. Zarubaev<sup>1</sup>, L.A. Ostrouhova<sup>2</sup>, E.N. Medvedeva<sup>2</sup>, V.A. Babkin<sup>2</sup>, O.I. Kiselyov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Institution of Influenza Scientific Research Institute of the Russian Academy of Medicine, St. Petersburg

<sup>2</sup>A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

*Antiviral properties of the extractives isolated from larch wood have been investigated. It has been shown that bioflavonoid dihydroquercetin and natural polysaccharide arabinogalactan possess the expressed anti-influenza activity. A new complex preparation for prophylaxis and treatment of influenza and acute viral respiratory infection has been developed.*

**Key words:** Larch wood, arabinogalactan, dihydroquercetin, antiviral activity

Древесина лиственницы содержит до 4,5 % флавоноидов, которые представлены однотипными по химическому строению соединениями с преобладающим (более 80 %) содержанием биофлавоноида дигидрокверцетина (ДКВ). Не менее ценным является природный полисахарид арабиногалактан (АГ), содержание которого в ядровой древесине достигает 15 %. Технология получения этих ценных биологически активных соединений из древесины лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина разработана в лаборатории химии древесины Иркутского института химии Сибирского отделения РАН и к настоящему времени доведена до промышленного уровня [1].

Арабиногалактан представляет собой уникальный растворимый природный полисахарид, характеризующийся комплексом ценных свойств, важнейшие из которых — высокая биологическая активность и низкая токсичность (не проявляет острой токсичности в дозе 5 г/кг массы тела и хронической токсичности — в дозе 500 мг/кг в сутки [5]). Арабиногалактан обладает иммуномодулирующим и пребиотическим действием, применение его способствует значительному оздоровлению желудочно-кишечного тракта, особенно толстого кишечника [10].

На основе флавоноидов, выделенных из древесины лиственницы, создан фитопрепарат Диквертин, содержащий более 90 % дигидрокверцетина [2]. Диквертин, как препарат, способствующий восстановлению резистентности капилляров, обладает противовоспалительным, противоотечным действием, оказывает положительное влияние на

функциональное состояние печени, рекомендован для патогенетической терапии при бронхолегочных заболеваниях и ишемической болезни сердца, нестабильной стенокардии и наджелудочковых нарушениях ритма сердца [3].

На базе дигидрокверцетина разработан ряд биологически активных добавок к пище (свыше 100 наименований, например, Сибларин, Капилар и др.), позволяющих существенно повысить качество питания и иммунный статус населения, проживающего в экологически неблагоприятных условиях.

Для реализации высокого потенциала биологической активности вышеописанных природных соединений было проведено изучение их противовирусного действия.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы дигидрокверцетина и арабиногалактана, выделенные из древесины лиственницы по разработанной ранее технологии [1, 2] и соответствующие по качественным показателям утвержденной нормативно-технической документации (ТУ 9354-020-39094141-07 «Дигидрокверцетин»; ТУ 9363-021-39094141-08 «Фибролар» (арабиногалактан))

В исследованиях противовирусного действия дигидрокверцетина и арабиногалактана для моделирования экспериментальной летальной гриппозной инфекции использовали беспородных белых мышей обоего пола массой 10–12 г, полученных из питомника «Рапшолово» (Ленинградская обл.). Животных содержали на стандартном рационе в

регламентированных условиях вивария Научно-исследовательского института гриппа Северо-Западного отделения РАМН. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животные находились под наблюдением 2 недели.

В работе использовали вирусы гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) и В/Lee/40, адаптированные к белым мышам.

Навеску препарата суспендировали в минимальном количестве твина-80, затем прибавляли необходимое количество физиологического фосфатного буфера до конечной концентрации 30 мг/мл. Исследуемый препарат вводили животным 2 раза в сутки с 12-часовым интервалом по 50–100 мкл внутривентриально, начиная со срока 24 часа до заражения и заканчивая сроком 5 дней после заражения. В качестве плацебо в контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер в равном объеме. В качестве препарата сравнения использовали ремантадин в дозе 50 мг/кг внутривентриально.

Вирус предварительно титровали на животных и определяли его концентрацию по летальности мышей. Для эксперимента вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 0,2 и 5 LD<sub>50</sub>. В каждую группу наблюдения брали по 10 мышей.

Наблюдение за животными осуществляли на протяжении 15 дней, т.е. срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается смертность животных. Ежедневно фиксировали вес и смертность животных в контрольных и опытных группах.

Испытание эффективности комплексного препарата ДКВ/АГ/АсК (дигидрохверцетин/арабиногалактан/аскорбиновая кислота) для профилактики гриппа и других острых респираторно-вирусных инфекций проводилось в полном соответствии с требованиями Всемирной Организации Здравоохранения и Комитета по медицинским иммунобиологическим препаратам Минздрава

России, в частности, в отношении слепого контроля, т.е. формирования групп наблюдения методом случайной выборки и применения зашифрованных препаратов.

Исследуемый препарат — таблетки массой 1 г. Действующее вещество: дигидрохверцетин — 0,015 г; арабиногалактан — 0,260 г; аскорбиновая кислота — 0,015 г. Вспомогательные вещества: сорбит — 700 мг, кальция стеарат — 10 мг.

Плацебо — таблетки с таким же содержанием вспомогательных веществ, но без действующего вещества.

Испытуемые препараты применяли в коллективах с организованным питанием два раза в день по 2 таблетки во время еды. Под наблюдением находились молодые мужчины в возрасте 18–25 лет в коллективе интернатного типа с тесным круглосуточным общением в учебных классах, спальнях помещений и при ограниченных внешних контактах с населением города. В исследование были включены члены коллектива, от которых получено информированное согласие на участие и при условии, что они удовлетворяли критериям включения и исключения.

Оценку безопасности проводили на основе субъективных жалоб, побочных эффектов и объективных данных клинического обследования.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение противовирусных свойств дигидрохверцетина на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции у белых мышей, вызванной вирусами гриппа А и В показало, что в случае гриппа А (рис. 1) противовирусная активность дигидрохверцетина была равна или даже превосходила таковую для препарата сравнения ремантадина (индексы защиты 30–50% при инфицировании животных 5 LD<sub>50</sub> вируса, и 87% — при дозе вируса 1 LD<sub>50</sub> при активности ремантадина 60–82,5% в зависимости от дозы вируса). В случае инфекции животных, вызванной вирусом гриппа В (рис. 2), устойчивым к ремантадину, показатели

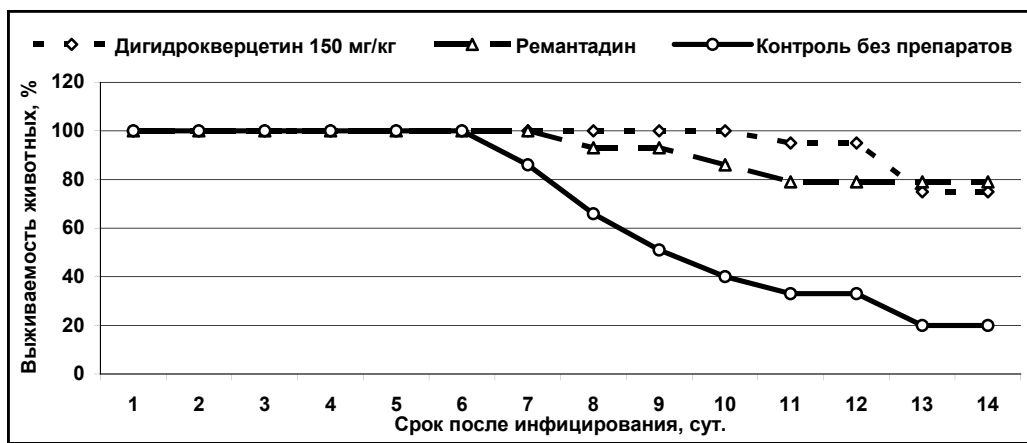


Рис. 1. Динамика смертности животных от летальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А, в условиях применения дигидрохверцетина при заражающей дозе вируса 5 LD<sub>50</sub>.

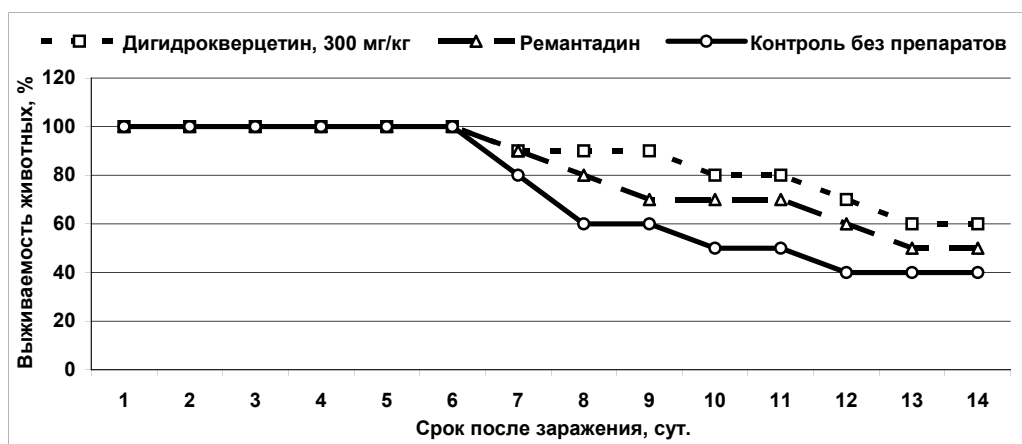


Рис. 2. Динамика смертности животных от летальной гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа В, в условиях применения дигидрокверцетина при заражающей дозе вируса 1 LD<sub>50</sub>.

активности дигидрокверцетина были ниже, однако также превосходили показатели активности ремантадина, который в случае гриппа В неэффективен. Таким образом, показано, что дигидрокверцетин проявляет противовирусные свойства на модели экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, независимо от того, вызвана она вирусом гриппа типа А или В [11].

Исследование иммуномодулирующих свойств арабиногалактана, выделенного из древесины лиственницы сибирской, выявило эффективность его по отношению к реакциям клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа [6]. Он существенно повышает уровень специфических антител и фагоцитарную активность макрофагов [5].

Известно, что некоторые растительные полисахариды обладают противовирусными свойствами, угнетая гемагглютинацию и размножение вируса гриппа А. Предполагают, что в основе механизма действия лежит прямое адсорбционное комплексобразование полисахарида и вируса [4]. При исследовании противовирусной активности арабиногалактана показано, что он проявляет защитные свойства на модели летальной гриппозной инфекции при использовании разных доз вируса. При этом активность арабиногалактана составляла 50 % при малой инфицирующей дозе и 22 % — при высокой. Учитывая низкую токсичность этого препарата, можно говорить о перспективности его использования для профилактики и/или терапии гриппа и рекомендовать дальнейшую разработку арабиногалактана как средства комплексной терапии гриппа. Применение препаратов на основе арабиногалактана открывают новые перспективы надежной защиты от вирусных заболеваний.

Являясь растворимым диетическим волокном, арабиногалактан проявляет пребиотические свойства, т.е. способность избирательно стимулировать рост и активность полезной микрофлоры кишечника — лакто- и бифидобактерий (пробиотиков). Благодаря этому, он способствует сохранению желудочно-кишечного тракта в здоровом состоя-

нии. Регулярный прием арабиногалактана может нормализовать иммунитет не только через прямое воздействие, но и через эффекты на микрофлору кишечника, которые, в свою очередь, помогают иммунной системе человека функционировать более надежно [10]. Эти свойства арабиногалактана были использованы при создании ряда биологически активных добавок к пище человека, таких как Фибролар, Пробаланс и др.

В модельных экспериментах арабиногалактан из лиственницы показал высокую мембранотропность [7]. Благодаря этому, его можно использовать для повышения всасываемости других лекарственных средств, характеризующихся низкой биодоступностью. Показано, что арабиногалактан может служить целенаправленным носителем для доставки диагностических и терапевтических агентов, а также ферментов, нуклеиновых кислот, витаминов или гормонов, к определенным клеткам, в частности, к гепатоцитам (паренхимным клеткам печени). При этом образуется комплекс между доставляемым агентом и арабиногалактаном, способным взаимодействовать с асиалогликопротеиновым рецептором клетки [8, 9]. Иммунологическая специфичность макромолекулы полисахарида напрямую связана со степенью разветвленности галактанового кора, так как на разветвленной области происходит локализация иммунодетерминантных групп. Наряду с наличием сложных разветвлений в макромолекуле существенную роль играют боковые цепи, построенные из остатков L-арабинофуранозы.

На основании приведенных выше литературных данных и результатов собственных исследований нами предложена новая модифицированная форма комплексного препарата, содержащего натуральные растительные компоненты: дигидрокверцетин, арабиногалактан и аскорбиновую кислоту.

В нашем исследовании в результате приема ДКВ-АГ-АсК наблюдалось снижение частоты случаев гриппа и острых респираторно-вирусных инфекций.

Таблица 1

**Заболеваемость ОРВИ среди лиц, принимавших и не принимавших препарат ДКВ-АГ/АсК с профилактической целью**

Препарат, число наблюдаемых (n)	Показатель	Период приема препарата 1 мес.	После профилактики	За весь период (2 мес.)
ДКВ/АГ/АсК n = 75	%	2,7	2,7	5,3
	Индекс эффективности	1,8	1,4	1,6
		$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Плацебо n = 80	%	5,0	3,7	8,7

Таблица 2

**Длительность заболеваний и количество осложненных форм среди лиц, принимавших и не принимавших препарат ДКВ/АГ/АсК**

Препарат	Всего заболело, чел.	Из них с осложнениями				Продолжительность заболеваний в днях			Общее число дней нетрудоспособности	Средняя длительность заболеваний
		гайморит	лакунарная ангина	всего		8	9	11		
				абс.	%					
ДКВ/АГ/АсК	2	0	0	–	–	1	1	–	17	8,5
Плацебо	4	1	1	2	50,0	1	2	1	37	9,25

После окончания приема препарата число инфицированных людей и положительных находок в группе плацебо оказалось больше в 1,3 раза (17,8 %), чем в группе принимавших препарат (13,6 %) (табл. 1). Эти данные можно расценивать как положительный результат приема препарата на уровень инфицированности. Результаты клинико-эпидемиологического наблюдения показали, что прием препарата способствовал снижению заболеваемости в 1,8 раза (индекс эффективности).

Грипп и острые респираторно-вирусные инфекции приводят к снижению иммунологической резистентности организма, и, как следствие, к возникновению бактериальных осложнений — бронхита, пневмонии, гайморита, ангины и др.

В нашем наблюдении в период приема препарата отмечено более легкое течение заболеваний, отсутствие осложненных форм (табл. 2). Среди получавших плацебо было зарегистрировано два случая осложненного течения острой респираторно-вирусной инфекции — один гайморит и один случай лакунарной ангины, что составило 50 % на всю группу заболевших в группе плацебо. Это является подтверждением противовоспалительного, противовирусного и иммуномодулирующего действия препарата ДКВ-АГ-АсК и позволяет рекомендовать его в составе комплексной терапии гриппа и других острых респираторно-вирусных инфекций.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полимерная природа арабиногалактана, водорастворимость, проницаемость через клеточные мембраны организма может существенно расширить фармакокинетические возможности иммунизированных на его матрице лекарственных средств — повысить биодоступность, изменить распределение в организме, пролонгировать действие

и увеличить их избирательность, а также в ряде случаев уменьшить токсичность. При этом может наблюдаться усиление терапевтического действия фармакона. Это открывает новый путь развития химии арабиногалактана, связанный с синтезом на его основе физиологически активных соединений.

Показанная противовирусная активность дигидрокверцетина также значительно расширяет возможности применения этого уникального природного антиоксиданта.

Таким образом, создание на основе арабиногалактана и дигидрокверцетина комплексных препаратов, сочетающих уникальные свойства этих природных биологически активных веществ, представляется весьма перспективным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ресурсосберегающая и экологически безопасная переработка древесины и коры лиственницы / В.А. Бабкин [и др.] // Наука — производству. — 2004. — № 1. — С. 52 — 58.
2. Пат. 2174403 Российская Федерация Способ получения диквертина — нового фитопрепарата широкого терапевтического действия / В.А. Бабкин, Л.А. Остроухова, Д.В. Бабкин. Оpub. 10.10.2001, Бюл. № 28.
3. Диквертин — новое антиоксидантное и капилляропротекторное средство // В.К. Колхир [и др.] // Хим.-фарм. журнал. — 1995. — № 9. — С. 61 — 64.
4. Криштанова Н.А. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств / Н.А. Криштанова, М.Ю. Сафонова, В.Ц. Болотова // Вестник ВГУ. — 2005. — № 1. — С. 212 — 221. — Серия: Химия. Биология. Фармация.

5. Медведева Е.Н. Арабиногалактан лиственницы — свойства и перспективы использования: (Обзор) / Е.Н. Медведева, В.А. Бабкин, Л.А. Остроухова // Химия растительного сырья. — 2003. — № 1. — С. 27—37.

6. Получение высокочистого арабиногалактана лиственницы и исследование его иммуномодулирующих свойств / Е.Н. Медведева [и др.] // Химия растит. сырья. — 2004. — № 4. — С. 17—23.

7. Нурминский В.Н. Влияние мембранотропных соединений на стабильность и электрофизиологические свойства вакуольных мембран: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Иркутск. — 2003. — 20 с.

8. Enriquez P.M. Directed delivery of radioprotectants using a receptor — specific carrier / P.M. En-

riquez, C.W. Jung, E.V. Groman // US Pat. 5 490 991. 1996. CA. — 1996. — Vol. 124. — P. 225—273.

9. Arabinogalactan for hepatic drug delivery / E.V. Groman [et al.] // Bioconjugate Chem. — 1994. — № 5. — P. 547—556.

10. Robinson R.R. Nutritional benefits of larch arabinogalactan / R.R. Robinson, J. Causey, J.L. Slavin // Advanced Dietary Fiber Technology. — Ed. McCleary B.V., Prosky L. Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK, 2001. — P. 443—451.

11. Заявка на Патент РФ № 2008135221. Средство для профилактики и лечения гриппа А и В / О.И. Киселев, В.А. Бабкин, В.В. Зарубаев [и др.] // положительное решение о выдаче Патента РФ от 20.07.2009

#### Сведения об авторах

**Зарубаев Владимир Викторович** — заведующий лабораторией химиотерапии ГУ НИИ гриппа РАМН, кандидат биологических наук

**Остроухова Людмила Андреевна** — старший научный сотрудник лаборатории химии древесины ИрИХ СО РАН, кандидат химических наук (660033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ СО РАН, тел.: 51-14-27 (раб.))

**Медведева Елена Николаевна** — старший научный сотрудник лаборатории химии древесины ИрИХ СО РАН, кандидат химических наук

**Бабкин Василий Анатольевич** — заведующий лабораторией химии древесины ИрИХ СО РАН, доктор химических наук, профессор (e-mail: babkin@irioch.irk.ru)

**Киселев Олег Иванович** — директор НИИ гриппа РАМН, академик РАМН, профессор