

# Координационное соединение кобальт бис(цитрато)станнат — результат поиска новых противогриппозных лекарственных средств

Матюшкина М.В.<sup>1</sup>, Годован В.В.<sup>1</sup>, Сейфуллина И.И.<sup>2</sup>, Гридина Т.Л.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> — Кафедра общей и клинической фармакологии Одесского национального медицинского университета, г. Одесса, Украина

<sup>2</sup> — Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, г. Одесса, Украина

<sup>3</sup> — НИИ «Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И.И. Мечникова» МЗ Украины

**Резюме.** Изучены фармакологические свойства нового координационного соединения — биологически активного вещества — кобальт бис(цитрато)станната. В результате проведённых исследований установлено, что соединение проявляло выраженную противовирусную активность в отношении вируса гриппа человека штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) и вируса гриппа птиц H5N3 на культуре ткани хорион-алантоисных оболочек (ХАО) 11-12 суточных куриных эмбрионов и монослойной культуре клеток MDCK. Соединение относится к малотоксичным (при внутрибрюшинном введении крысам LD<sub>50</sub> = 206,63 мг/кг; пероральном — LD<sub>50</sub> = 1836,76), что дает перспективу для дальнейшего его доклинического исследования как противовирусного средства.

**Ключевые слова:** координационное соединение, олово, кобальт, лимонная кислота, вирус гриппа.

**Coordination compounds cobalt bis(citrate)stannate — are results of searching new antiinfluenza drugs**

Matyushkina M.V.<sup>1</sup>, Godovan V.V.<sup>1</sup>, Seyfullina I.I.<sup>2</sup>, Grydina T.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> — Odessa State Medical University

<sup>2</sup> — I.I. Mechnikov National University

<sup>3</sup> — RI «Ukrainian Research Institute antiplague I.I. Mechnikov» Ministry of Health of Ukraine

**Summary.** The pharmacological properties of new coordination compound — the biologically active substance — cobalt bis(citrate)stannate was studied. The result of researching are: the compound has antiviral activity against human influenza virus strains A/Hongkong/1/68 (H3N2), A/PR/8/34 (H1N1), and influenza virus H5N3 in tissue culture chorio-allantoic membranes (CAM) of chick embryos 11-12 daily and monolayer culture of MDCK cells used. Compound has a low toxicity (by intraperitoneal injection LD50 = 206,63 mg/kg; orally — LD50 = 1836,76), that gives perspective to further his preclinical studies as an antiviral agent.

**Keywords:** coordination compound, tin, cobalt, citric acid, virus of influenza.

## Автор, ответственный за переписку:

Матюшкина Марина Владимировна — аспирант, кафедра общей и клинической фармакологии Одесского национального медицинского университета, г. Одесса, Украина; тел. (+38)050-416-64-62; e-mail: shemonayeva\_56@mail.ru

## Введение

По данным ВОЗ, грипп занимает первое место по частоте и количеству случаев в мире, что предопределяет социальное и экономическое значение данной проблемы. По статистике гриппом ежегодно в мире заболевает до 500 млн. человек [1]. Смертность вследствие постгриппозных осложнений составляет 7,5-23 на 100 тыс. населения, причём большая часть этих смертей приходится на детей до 5 лет и людей старше 65 лет. Ежегодные эпидемии гриппа приводят к развитию или обострению имеющихся в анамнезе хронических заболеваний [2]. Естественно, что огромным является и экономический ущерб от эпидемий гриппа. Проблема заболеваемости

гриппом усугубляется еще и тем, что вспышки и эпидемии гриппа прогнозируются с трудом; вирусы гриппа А и В отличаются чрезвычайной антигенной изменчивостью, а наблюдающаяся реассортация между штаммами вируса гриппа А человека, млекопитающих и птиц увеличивает риск возникновения новых пандемических штаммов [3]. Кроме того, в течение 10-15 последних лет вирусы гриппа птиц в результате мутаций изменили свои биологические свойства, приобрели возможность инфицировать людей и вызывать очень тяжёлые клинические формы заболевания, значительный процент которых заканчивается летально [4]. Это сказывается на эффективности вакцинации, рекомендованной ВОЗ в качестве основного средства борьбы против гриппа.

Другим способом профилактики и лечения гриппа является фармакотерапевтическое воздействие, включающее средства этиотропной, иммунокорректирующей и симптоматической терапии. Среди приоритетной группы этиотропных препаратов ведущее место на сегодня занимают те, которые оказывают прямое противовирусное действие. Однако арсенал противогриппозных средств на современном фармацевтическом рынке невелик и представлен фактически двумя группами: ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир, занамивир) и блокаторы  $M_2$ -каналов (амантадин, ремантадин). К сожалению, эти препараты не идеальны: имеют достаточно широкий спектр противопоказаний и нежелательных эффектов, ограничения применения (возраст, беременность, лактация), быстрое возникновение фармакорезистентности, достаточно высокая стоимость и другие [5, 6]. Можно выделить и третью группу противогриппозных препаратов, которые одновременно обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностью (умифеновир, инозин пранобекс, альтабор, интерфероны и другие) [7], но они также не лишены недостатков [8]. В связи с вышеизложенным сегодня продолжается интенсивный поиск эффективных и безопасных противогриппозных средств.

В этом плане внимание исследователей привлекают металлокомплексы, ряд которых обладает достаточно широким спектром антибактериальной и противовирусной активности [7, 9, 10]. В частности, установлено, что металлокомплексы могут действовать на вирус различными путями: инактивировать вирус, заняв на его поверхности активные центры; проникать через липидную оболочку вируса; препятствовать его размножению в клетке; разрушать вирус вне клетки [11, 12].

### Цель исследования

Цель данного исследования — это изучение противогриппозной активности нового биологически активного вещества (БАВ) — кобальт бис(цитрато)станната.

### Материалы и методы

БАВ — кобальт бис(цитрат) станната формулы  $[Co(H_2O)_6][Sn(HCit)_2] \cdot 4H_2O$  ( $M = 735,7$  г/моль) синтезировано на кафедре общей химии и биополимеров Одесского национального университета имени И.И. Мечникова под руководством заслуженного деятеля науки и техники Украины, проф. И.И. Сейфуллиной. По данным рентгеноструктурного анализа (РСА), соединение построено с центросимметрических октаэдрических катионов  $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ , анионов  $[Sn(HCit)_2]^{2-}$  и кристаллизационных молекул воды. В кристаллах комплексные катионы и анионы объединены непосредственно между собой и через кристаллизационные молекулы воды водородными связями в трёхмерный каркас [13]. Структурная формула нового соединения представлена на рис. 1.

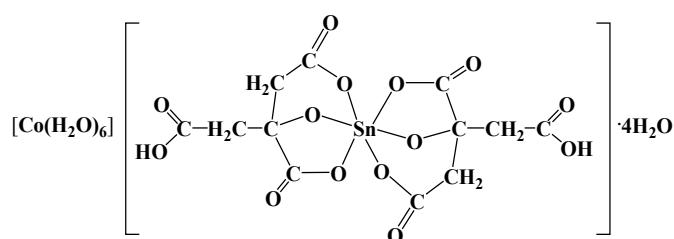


Рис. 1. Структурная формула кобальта бис(цитрато)станната

Изучение безвредности нового БАВ *in vivo* показало, что соединение относится к малотоксичным веществам (IV класс) [14] —  $LD_{50}$  при внутрибрюшинном введении крысам составило 206,63 мг/кг; пероральном — 1836,76.

Однако перед изучением специфического действия против вирусов гриппа человека и птиц нового БАВ первоначально определяли степень цитотоксичности соединения на трех клеточных моделях.

По первой модели методика проведения исследования заключалась в создании контакта водных растворов исследуемого вещества в различных концентрациях с тест-клетками — инфузориями *Colpoda steinii* (ООО «Возрождение М», Одесса, Украина) [15]. Это позволило определить максимально переносимую концентрацию (МПК) соединения по показателям их жизнеспособности через 3 ч после начала контакта и тем самым установить степень цитотоксичности БАВ. Вторая модель определения степени цитотоксичности нового БАВ проведена стандартно на культуре ткани хорион-алантоисных оболочек (ХАО) 11-14-суточных куриных эмбрионов [16]. Третьей моделью с использованием культуры клеток MDCK (культура клеток почки собаки) определялась МПК исследуемого БАВ, которую рассчитывали, исходя из наибольшей концентрации соединения, не вызывавшей дегенерацию клеток [17].

Противогриппозную активность БАВ изучали в отношении штаммов вируса гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/PR/8/34 (H1N1), а также вируса гриппа птиц H5N3, с использованием культуры ткани ХАО 11-12 суточных куриных эмбрионов [16]. Эта культура считается наиболее приближенной к уровню целого организма, которым является куриный эмбрион. Кроме того, использование культуры ткани ХАО является более экономичным методом по сравнению с использованием куриных эмбрионов для определения противовирусного действия веществ [16].

Расчёт  $Ig$  ТИД<sub>50</sub> (дозы, которая вызывает инфицирования 50% и более фрагментов ткани ХАО) в экспериментах *in vitro* проводили по методу Кербера Б.А. в модификации Ашмарина И.П. [18].

Оценку противовирусной активности соединения с использованием метода торможения развития вирус-индуцированного цитопатического эффекта проводили на монослойной культуре клеток MDCK, согласно общепринятой методике [17].

В качестве референс-препарата использовали Тамифлю (осельтамивир), порошок для приготовления

суспензии для приема внутрь по 12 мг в 1 мл во фл. по 30 мл фирмы Хоффманн-Ля Рош (Швейцария) в концентрации 410 мкг/мл, что соответствует  $1 \times 10^{-3}$  Моль.

Статистическую значимость антивирусной активности БАВ ( $p > 0,05$ ) определяли по непараметрическому критерию знаков для связанных выборок ( $p$  по критерию знаков — К.3.) [19].

### Результаты и обсуждения

В результате проведенных исследований выявлено, что МПК кобальта бис(цитрато)станната на культуре инфузорий *Colpoda steinii*, тканевой культуре ХАО и культуре клеток МДСК составила 7000, 7000 и 368 мкг/мл, соответственно. Вследствие полученных данных по цитотоксичности нового БАВ, для определения его противогриппозной активности в отношении штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканевой культуре ХАО были отобраны следующие дозы: 7000, 3500 и 735 мкг/мл, что соответствует  $1,0 \times 10^{-2}$ ,  $0,5 \times 10^{-3}$  и  $1,0 \times 10^{-3}$  Моль. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Установлено, что новое соединение в концентрации 7000 мкг/мл полностью подавляло репродукцию штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканевой культуре ХАО по сравнению с контролем (без применения БАВ), несколько даже превышая эффективность референс-препарата Тамифлю, который в концентрации 410 мкг/мл подавлял репродукцию вируса на  $4,17 \lg \text{ТИД}_{50}$ .

В концентрациях 3500 и 735 мкг/мл кобальт бис(цитрато)станнат статистически достоверно относительно контроля подавлял репродукцию вируса гриппа (на  $2,50$  и  $1,75 \lg \text{ТИД}_{50}$  соответственно), однако уступал по активности препарату сравнения.

Учитывая полученные в отношении штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2) результаты, для определения антивирусной активности нового БАВ относительно штамма вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) были выбраны концентрации 1750 и 184 мкг/мл. Приведенные в табл. 2 результаты свидетельствуют о том, что новое соединение в концентрациях 1750 и 184 мкг/мл в значительной степени подавляло репродукцию вируса А/PR/8/34 (H1N1) — на  $3,08$  и  $3,33 \lg \text{ТИД}_{50}$ , соответственно, по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), однако несколько уступая по эффективности Тамифлю (410 мкг/мл), который полностью подавлял репродукцию данного вируса — на  $4,17 \lg \text{ТИД}_{50}$  ( $p < 0,05$ ).

В отношении штамма птичьего гриппа H5N3 установлено, что новое соединение в концентрациях 1750 и 368 мкг/мл полностью ингибировало его репродукцию на тканевой культуре ХАО — на  $4,25$  и  $4,08 \lg \text{ТИД}_{50}$ , соответственно ( $p > 0,05$ ), превышая действие Тамифлю (410 мкг/мл) —  $3,75 \lg \text{ТИД}_{50}$  (табл. 3).

Противовирусная активность нового соединения и препарата сравнения на модели клеточной культуры МДСК представлена в табл. 4.

Поскольку МПК кобальт бис(цитрато)станната на этой модели ниже (368 мкг/мл), противогриппозное действие вещества изучали именно в этой концентрации.

Результаты исследований показали, что репродукция вируса гриппа человека штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2) подавлялась изучаемым соединением достоверно относительно контроля на  $2,2 \lg \text{ТИД}_{50}$ , однако БАВ практически в 2 раза уступало по активности референс-препарату ( $4,33 \lg \text{ТИД}_{50}$ ). В отношении штамма А/PR/8/34 (H1N1) ингибирование репродукции было несколько ниже при использовании и нового БАВ, и Тамифлю ( $1,6$  и  $3,33 \lg \text{ТИД}_{50}$ , соответственно). Но в обоих случаях торможение репродукции было статистически достоверным ( $p > 0,05$  по К.3.) по отношению к контролю.

### Результаты

1. Кобальт бис(цитрато)станнат в концентрации 7000 мкг/мл полностью подавлял репродукцию штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2). В концентрациях 1750 и 184 мкг/мл в значительной степени подавлял репродукцию вируса А/PR/8/34 (H1N1), а в концентрациях 1750 и 368 мкг/мл полностью подавлял репродукцию штамма вируса гриппа птиц H5N3 на тканевой культуре ХАО.

2. Во всех трех вышеперечисленных сериях экспериментов новое соединение по противовирусной активности было сопоставимо с препаратом сравнения тамифлю, статистически недостоверное несколько уступая или превышая его действие.

3. На тканевой культуре МДСК кобальт бис(цитрато)станнат в концентрации 368 мкг/мл проявлял статистически значимое относительно контроля тормозящее действие на репродукцию вируса гриппа человека штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/PR/8/34 (H1N1), однако уступало по эффективности референс-препарату.

### Основные выводы

Новое биологически активное вещество — кобальт бис(цитрато)станнат оказывает отчетливое дозозависимое противовирусное действие в отношении вируса гриппа человека штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/PR/8/34 (H1N1), а также вируса гриппа птиц H5N3 на обоих применяемых моделях.

Выявленная противовирусная активность кобальт бис(цитрато)станната, наряду с его низкой токсичностью, раскрывает перспективу дальнейшего доклинического исследования данного БАВ.

Таблица 1

**Влияние кобальт бис(цитрат)станната на репродукцию штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2) на тканевой культуре ХАО**

Вещества	Молярная масса, г/моль	Концентрация, мкг/мл (соответственно в Моль)	Подавление репродукции вируса, Ig ТИД <sub>50</sub>
Кобальт бис(цитрат)станнат	735	7000 (1x10 <sup>-2</sup> )	4,33*
		3500 (0,5x10 <sup>-2</sup> )	2,50*#
		735 (1x10 <sup>-3</sup> )	1,75*#
Тамифлю	410	410 (1x10 <sup>-3</sup> )	4,17*

**Примечание:** \* — достоверность различий по отношению к контролю (p<0,05)  
# — достоверность различий по отношению к референс-препарату (p<0,05)

Таблица 2

**Влияние кобальт бис(цитрат)станната на репродукцию штамма вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) на тканевой культуре ХАО**

Вещества	Молярная масса, г/моль	Концентрация, мкг/мл (соответственно в Моль)	Подавление репродукции вируса, Ig ТИД <sub>50</sub>
Кобальт бис(цитрат)станнат	735	1750 (0,25x10 <sup>-2</sup> )	3,08*
		184 (0,75x10 <sup>-3</sup> )	3,33*
Тамифлю	410	410 (1x10 <sup>-3</sup> )	4,17*

**Примечание:** \* — достоверность различий по отношению к контролю (p<0,05)

Таблица 3

**Влияние кобальт бис(цитрат)станната на репродукцию штамма вируса птичьего гриппа H5N3 на тканевой культуре ХАО**

Вещества	Молярная масса, г/моль	Концентрация, мкг/мл (соответственно в Моль)	Подавление репродукции вируса, Ig ТИД <sub>50</sub>
Кобальт бис(цитрат)станнат	735	1750 (0,25x10 <sup>-2</sup> )	4,25*
		368 (0,5x10 <sup>-3</sup> )	4,08*
Тамифлю	410	410 (1x10 <sup>-3</sup> )	3,75*

**Примечание:** \* — достоверность различий по отношению к контролю (p<0,05)

Таблица 4

**Влияние кобальт бис(цитрат)станната на репродукцию штаммов вируса гриппа человека штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/PR/8/34 (H1N1) на тканевой культуре МДСК**

Вещества	Молярная масса, г/моль	МПК, мкг/мл (соответственно в Моль)	Концентрация, мкг/мл (соответственно в Моль)	Подавление репродукции вируса H3N2, Ig ТИД <sub>50</sub>	Подавление репродукции вируса H1N1, Ig ТИД <sub>50</sub>
Кобальт бис(цитрат)станнат	735	368 мкг/мл (0,5x10 <sup>-3</sup> М)	368 мкг/мл (0,5x10 <sup>-3</sup> М)	2,20*#	1,60*#
Тамифлю	410	410 мкг/мл (1,0x10 <sup>-3</sup> М)	205 мкг/мл (0,5x10 <sup>-3</sup> М)	4,33*	3,33*

**Примечание:** \* — достоверность различий по отношению к контролю (p<0,05)  
# — достоверность различий по отношению к референс-препарату (p<0,05)

## Литература

1. Петров П.В. Вакцинация против гриппа: проблемы и успехи. // Лечащий врач. — 2007. — №9. — С. 93–96.
2. Viboud C., Bolle P.Y., Cauchemez S., et al. Risk factors of influenza transmission in households. // Br. J. Gen. Prac. — 2004. — № 54 (506). — P. 684-689.
3. Осидак Л.В., Дринецкий В.П., Ерофеева М.К. Грипп как проблема XXI века. // Детские инфекции. — 2009. — Т. 8. №3. — С. 3–9.
4. Sturm-Ramirez K.M., Ellis T., Bousfield B., et al. Re-emerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. // J. Virol. — 2004. — №78. — P. 4892-4901.
5. Whitley R. J., Hayden F.G., Reisinger K.S. Oral oseltamivir treatment in children. // Ped. Inf. Dis. — 2001. — N 2. — P. 127–133.
6. Bright R.A., Shay D., Shu B., et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. // Journal of the American Medical Association. — 2006. — vol.295 (doi:10.1001/jama.295.8.joc60020).
7. Добра Е.А. Противовирусные лекарственные средства в фармакотерапии гриппа и ОРВИ. // Провизор. — 2011. — № 2. — С. 33–36.
8. Еришов Ф.И., Романцов М.Г. Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях. — М.: «Гэотар-Медиа», 2007. 320 с.
9. Бурачева С.А., Прискарь И.И., Цапиров В.И. Синтез и противомикробная активность координационных соединений меди с тиосемикарбазонами замещенных салицилового альдегида. Бурачева. // Химико-фармацевтический журнал, 2005. — Т. 6. — №39. — С. 30–33.
10. Леглер Е.В., Казаченко А.С., Казбанов В.И. Синтез и антимикробная активность комплексных соединений серебра с аргинином и глутаминовой кислотой. // Хим-фарм.журнал. — 2001. — Т.35. — №9 — С.35–36.
11. Eds. M. Gielen, E. R. T. Tiekink. Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 598 p
12. Зинченко А. И., Паруль Д.А. Основы молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии. — Мн.: Выш. шк., 2005. 214 с.
13. Марцинко Е.Э., Миначева Л.Х., Чебаненко Е.А., Сейфуллина И.И. и др. Условия образования гетерометаллических комплексов в системах  $\text{GeCl}_4$  ( $\text{SnCl}_4$ ) — лимонная кислота —  $\text{M}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  —  $\text{H}_2\text{O}$ . Кристаллическая и молекулярная структура  $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Ge}(\text{HCit})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{M} = \text{Mg}, \text{Mn}, \text{Co}, \text{Cu}, \text{Zn}$ ) и  $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Sn}(\text{HCit})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{M} = \text{Mg}, \text{Co}, \text{Ni}$ ) // Журн. неорганической химии. — 2013. — Т. 58, № 5. — С.588-595.
14. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. Рекомендации / под. ред. чл.-кор. АМН Украины А.В. Стефанова — К. Авісена. 2002. 567 с.
15. Пат. 15629 А Україна, МПК G01N 33/15, C12Q 1/18. Спосіб оцінки ступеня цитотоксичності біологічно активних сполук та фармакологічних препаратів. Лозицький В.П., Григорашева І.М., Федчук А.С. [та ін.]; заявник-патентотримувач Український наук.-досл. Протичумний ін.-т, ТОВ „Відродження М”. — №u2005 12542; заявл. 26.12.05; опубл. 17.07.06, Бюл. №7.
16. Ильенко В.И. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа: методические рекомендации. Всесоюзный НИИ гриппа МЗ СССР. — Ленинград, 1977. 36 с.
17. Kaverin N.V., Webster R.G. Impairment of multicycle influenza virus growth in Ver (WHO) cells by loss of trypsin activity. J Virol, 1995; 69: 4: 2700–2703.
18. Ашмарин И.П. Вычисление  $\text{ED}_{50}$  при малом числе подопытных животных. // Ж. микробиол. — 1959. — №2. — С.102–108.
19. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В.Гублер, А.А.Генкин. — Л.: Медицина, 1973. — 142с.