

ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КЛЕТОЧНЫЕ МИШЕНИ КАК СРЕДСТВО БОРЬБЫ С ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

В.В. Зарубаев¹, В.С. Смирнов²

¹ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

²ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Грипп представляет собой высоко контагиозное заболевание человека. На фоне использования противовирусных препаратов формируются лекарственно-устойчивые штаммы вируса, следствием чего является снижение эффективности этиотропной химиотерапии. В обзоре рассмотрены способы снижения уровня репликации вируса и тяжести патологического процесса, основанные на использовании альтернативных мишеней не вирусного, а клеточного происхождения. Описаны препараты, снижающие продукцию провоспалительных цитокинов (эриторан), ограничивающие дегрануляцию тучных клеток (кетотифен), ингибиторы циклооксигеназы (целекоксиб, месалазин, SC-560), ингибиторы сфингозин-1-фосфатного пути (AAL-R), а также повышающие стабильность сосудов путем упрочения контактов между эндотелиальными клетками (белок Slit). Особое внимание уделено ингибиторам клеточных путей, используемых вирусом для повышения репродукции, таких как NF- κ B, Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR. Описана противогриппозная активность ингибиторов киназ и процесса аутофагии, а также препаратов смешанного механизма действия — глицерризиновой кислоты и дипептида α -глутамилтриптофана. Дальнейшие исследования в области поиска и оптимизации ингибиторов клеточных компонентов как средств против гриппозной инфекции могут привести к разработке новых противовирусных препаратов высокой эффективности, широкого спектра действия и низкой вероятности развития резистентности.

Ключевые слова: грипп, клеточные мишени, воспаление, сигнальные пути, противовирусные препараты.

Грипп представляет собой высококонтагиозное заболевание человека. Ежегодно гриппом на планете переболевает 500 млн человек, умирает около 2 млн [23]. Вирус гриппа вызывает ежегодные эпидемии, а при появлении нового антигенного варианта вируса — пандемии, охватывающие все регионы земного шара и характеризующиеся высокой заболеваемостью, числом пациентов, нуждающихся в госпитализации и смертностью среди всех возрастных групп населения. Пандемия гриппа A(H1N1)pdm09 характеризовалась широким охватом населения многих стран мира, в том числе Российской Федерации, тяжелым клиническим течением и высокой летальностью [5, 16]. Неблагоприятные исходы чаще всего наблюдались не только у лиц с сопутствующими хроническими заболеваниями [16], но и у молодых людей без существенной предшествующей патологии, в том числе у бе-

ременных женщин [3, 4]. В последние годы отмечены также случаи инфицирования человека вирусами гриппа птичьего происхождения подтипов H5N1, H7N7 и H7N9 [39].

Вирионы гриппа представляют собой сферические или нитевидные частицы диаметром 80–100 нм, покрытые липидной оболочкой с интегрированными поверхностными гликопротеидами трех типов — гемагглютинином (HA) и нейраминидазой (NA) и вирусным ионным каналом M2. Оболочка вириона происходит от плазматической мембраны клетки-хозяина и содержит липидные «плотики» — участки липидного бислоя, обогащенные холестерином и имеющие высокую плотность и меньшую текучесть, отделенные друг от друга текучими участками мембраны малой плотности. Под липидной оболочкой расположен слой матриксного белка M1, контактирующего с одной стороны

Авторы:

Зарубаев В.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ, Санкт-Петербург;

Смирнов В.С., д.м.н., главный научный сотрудник ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург.

Адрес для переписки:

Зарубаев Владимир Викторович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17, ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ.
Тел.: (812) 499-15-72 (служебн.).
E-mail: zarubaev@influenza.spb.ru

поступила в редакцию 11.11.2013
принята к печати 12.11.2013

© В.В. Зарубаев,
В.С. Смирнов, 2013

с цитоплазматическими доменами NA и NA₂, а с другой — с сердцевинной вириона. Сердцевинный рибонуклеопротеин (РНП) представлен восемью сегментами генома — одноцепочечной РНК негативной полярности — в комплексе с белком нуклеопротеина и тремя субъединицами полимеразного комплекса.

При инфицировании клетки РНП попадают в цитоплазму и ядро, где происходит транскрипция, трансляция и репликация сегментов вирусного генома. Транскрипция и репликация вирусспецифических РНК осуществляются вирусным полимеразным комплексом. В отличие от полимераз эукариотических клеток, вирусная полимераз лишена механизма коррекции ошибок. Вследствие этого частота мутаций вирусного генома составляет, по разным оценкам, от 10^{-4} до 10^{-6} нуклеотидов на цикл репликации [44, 54]. Это на несколько порядков выше, чем скорость мутирования бактерий и эукариот (10^{-10} – 10^{-11}) [10]. Вследствие этих особенностей, а также короткого жизненного цикла эволюция вируса гриппа протекает быстро. Это служит причиной двух явлений. Во-первых, быстрое формирование мутаций позволяет вирусу ускользать от адаптивного иммунного ответа хозяина. Благодаря этому он способен вызывать ежегодные эпидемии, несмотря на формирование иммунной прослойки населения как следствие вакцинации и естественной заболеваемости. Во-вторых, на фоне использования противовирусных препаратов формируются лекарственно-устойчивые штаммы вируса, следствием чего является снижение эффективности противовирусной химиотерапии.

В настоящее время для профилактики и терапии гриппозной инфекции доступны препараты, обладающие различным механизмом активности. Следуя последовательности событий при развитии гриппозной инфекции, к ним необходимо отнести, во-первых, препараты интерферонов и их индукторов, стимулирующие врожденный иммунитет и ограничивающие инфекцию на ранних стадиях [55], и во-вторых, этиотропные препараты, воздействующие на специфические вирусные мишени. Международно признанными противогриппозными препаратами являются химические соединения двух групп — производные адамантана (амантадин и его аналог в России — ремантадин) [49] и ингибиторы вирусной нейраминидазы — осельтамивир (Тамифлю®) и занамивир (Реленца®) [8]. В США получено разрешение FDA на использование еще двух ингибиторов нейраминидазы — перамивира (Рапиакта®) внутривенно [50], и ланинамивира (Инавир®) ингаляционно [58]. В России ни перамивир, ни ланинамивир не сертифицированы.

Недостатком препаратов как первой, так и второй группы является снижение их эффективности при позднем начале лечения [29]. Препараты интерферонов и их индукторов про-

являют максимальный уровень защиты при использовании в качестве средств экстренной профилактики, проводимой сразу после инфицирования, еще до появления клинических симптомов. Этиотропные средства эффективны в первые 48 ч после появления клинических симптомов болезни [29]. Кроме того, к этиотропным препаратам вирус, как уже упоминалось, способен быстро вырабатывать устойчивость. С середины 90-х гг., например, отмечен рост доли ремантадин-устойчивых вирусов, и на сегодняшний день практически все изоляты вируса гриппа устойчивы к препаратам адамантанового ряда — амантадину и ремантадину [19]. То же было отмечено в пределах подтипа сезонного гриппа А(Н1N1), когда за полтора года (с ноября 2007 по март 2009 г.) уровень устойчивости к осельтамивиру вырос с 0 до 100% во всех регионах земного шара [9]. Осельтамивир-устойчивые штаммы отмечены также среди высокопатогенных вирусов гриппа птиц H5N1 [19] и H7N9 [22], а кроме того, описаны случаи формирования лекарственно-устойчивых вариантов вируса непосредственно в процессе терапии пациентов [22].

Когда речь идет о случаях тяжелого, затяжного, осложненного гриппа, включающих последствия цитокинового шторма [56], или поздних стадий болезни, для уменьшения тяжести заболевания применяют препараты третьей группы, снижающие остроту реактивных процессов. Такие процессы индуцируются вирусом, но реализуются механизмами хозяина. К ним следует отнести такие явления, как отек легких, токсический синдром, гиперпродукцию провоспалительных цитокинов, клеточную воспалительную инфильтрацию ткани легких, геморрагический синдром и т.п. Препараты этой группы не влияют на вирусную репродукцию, а представляют собой средства, влияющие на другие факторы патогенеза гриппозной инфекции, то есть средства патогенетической терапии.

Эти соединения являются важной составляющей терапии не только гриппа, но и других заболеваний со сходным патогенезом. Так, например, в качестве средства борьбы с экспрессией провоспалительных цитокинов при сепсисе был разработан антагонист TLR4 эриторан [42]. Помимо сепсиса, однако, он оказался эффективным средством защиты и от летальной гриппозной инфекции [52]. При дозе вируса, вызывающей гибель 90% животных в контроле, в группе, получавшей эриторан со 2 суток после инфицирования, гибель составила лишь 10–20%, что обеспечивало индекс защиты 78–89%, сопоставимый с показателями препарата сравнения — этиотропного средства осельтамивира. Более того, эриторан проявлял протективную активность и на поздних стадиях инфекции, вплоть до 6-х суток после заражения, когда активность осельтамивира уже не отмечалась [52]. Использование эриторана приводило также к значитель-

ной нормализации морфологической картины легких, снижая степень отека и воспалительной инфильтрации легочной ткани. При этом инфекционная активность вируса не менялась под воздействием препарата за исключением поздних стадий развития инфекции, когда размножение вируса в ткани уже не играет ведущей патогенетической роли.

Тяжесть гриппа, как уже упоминалось, во многом обусловлена дисрегуляцией воспалительного ответа на заражение вирусом. Такая инфекция характеризуется избыточной степенью воспалительных процессов и гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, известной как «цитокиновый шторм» [56]. Одним из ведущих путей развития воспаления является каскад реакций, запускаемый ферментами циклооксигеназами COX-1 и COX-2, катализирующими превращение арахидоновой кислоты в простагландины. Ингибиторы циклооксигеназ широко используются в медицине как анальгетики и противовоспалительные средства. Классические нестероидные противовоспалительные препараты блокируют как COX-1, так и COX-2, предпочтительнее все же COX-1. В эксперименте синтетические ингибиторы COX-2 (целекоксиб) и COX-1 (SC-560) оказались способны в значительной мере снизить продукцию провоспалительных цитокинов TNF α и G-CSF в бронхолегочных смывах мышей при гриппозной инфекции [6], однако скольконибудь существенного влияния на смертность животных, а тем более на продукцию вируса в легких обнаружено не было. Больше того, избирательное угнетение COX-1 приводило даже к повышению смертности, потере веса животными и более выраженной гипотермии, возможно играющей в данном случае ключевую роль.

В другом исследовании [62] была показана дополнительная протективная активность комбинации двух ингибиторов оксигеназ — целекоксиба и месалазина — с противогриппозным препаратом прямого действия занамивиром. Целекоксиб, как уже указывалось, ингибирует фермент COX-2, месалазин способен угнетать как циклооксигеназный, так и липоксигеназный воспалительные пути, приводя к снижению продукции провоспалительных цитокинов и эйкозаноидов, и, как следствие, к деактивации воспалительных клеток, таких как макрофаги и нейтрофилы. Кроме того, месалазин ингибирует активацию фактора NF- κ B и стимулирует синтез фосфатидной кислоты, угнетая тем самым стимуляцию апоптоза церамидами [62]. При начале лечения через 48 часов после инфицирования, что моделирует реальную ситуацию в клинической практике, смертность в группе животных, получавших комбинированное лечение, была ниже, чем в группе, получавшей занамивир в виде монопрепарата. Снижение титра вируса в легких при этом сопровождалось нормализацией структуры легочной ткани и снижением степени ее воспалительной инфильтрации,

в отличие от группы занамивира, где на фоне снижения инфекционной активности вируса не отмечалось разницы в смертности животных и воспалительной реакции в легких.

Другой противовоспалительный препарат — кетотифен — ингибирует процессы дегрануляции тучных клеток [26]. Этим достигается ограничение продукции в очаге воспаления провоспалительных медиаторов, включая гистамин, IFN γ и фермент триптазу. Эти свойства кетотифена обуславливают его высокую протективную активность на модели летальной гриппозной инфекции, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа подтипа H5N1 [24]. Не влияя собственно на репродукцию вируса в легких, кетотифен, тем не менее, нормализовал показатели веса животных, снижал степень отека и воспалительной инфильтрации легочной ткани, уровень апоптотических процессов в легких и специфическую смертность животных. При этом активность кетотифена, как и в случае эриторана, превышала активность вирусспецифического препарата осельтамивира [24].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют, что необходимы дополнительные экспериментальные и/или клинические исследования, чтобы достоверно обосновать и стандартизировать применение ингибиторов циклооксигеназ в терапии тяжелого гриппа [25].

Важную роль в развитии воспаления в организме играет система реакций сфингозин-1-фосфатного пути (S1P). Компоненты этого каскада играют важную роль в самых разных аспектах клеточного сигналинга и метаболизма. О важности этого пути свидетельствует, например, тот факт, что стимуляция синтеза S1P приводит к активации факторов транскрипции NF- κ B и STAT3 с последующим формированием сигнальной петли, ведущей к злокачественному перерождению клетки. Ингибирование этого процесса фармакологическими препаратами замедляет рост и прогрессирование опухоли и уровень воспалительных медиаторов. На 2013 г. описано свыше 25 препаратов, влияющих на компоненты S1P-сигнального пути, из них 11 находятся на завершающих стадиях клинических испытаний или разрешены к применению как средства терапии опухолей, ревматоидного артрита, язвенного колита, рассеянного склероза, псориаза, то есть патологий, так или иначе основанных на избыточном или неадекватном воспалении [31]. Рецепторы S1P (S1PR1–S1PR5) участвуют в развитии сепсиса, изменении проницаемости сосудов и развитии отека легких. При этом именно последнее касается темы настоящего обзора и обосновывает правомочность регуляции этих компонентов при тяжелом гриппе, признаком которого является как раз отек легких.

Действительно, применение агониста S1P AAL-R (рис. 1), направленного против раннего иммунного ответа, приводило к существенному

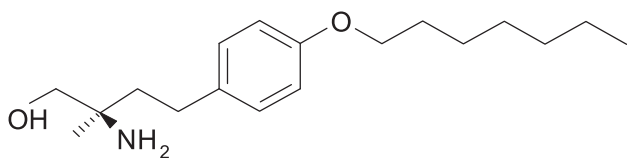


Рисунок 1. Структура агониста сфингозин-1-фосфатного пути AAL-R

снижению смертности животных в эксперименте [59], причем степень защиты (82%) превосходила соответствующий показатель для препарата сравнения — осельтамивира (50%).

Подобно кетотифену, AAL-R не влиял на репродукцию вируса в легких животных, однако в значительной степени снижал количество клеток, составляющих воспалительный экссудат. Способность к продукции противовирусных антител при этом сохранялась. Оптимальные защитные показатели были достигнуты при совместном применении осельтамивира и AAL-R. Важно также, что использование этого сфингозинового аналога оказалось эффективным даже спустя 4 суток после начала инфекции, что свидетельствует о высоком терапевтическом потенциале такого подхода при терапии поздних и осложненных форм гриппа [36].

Отдельного внимания заслуживает еще один подход к терапии тяжелого гриппа — повышение способности организма к преодолению патологического процесса путем минимизации вредного действия воспалительных медиаторов на сосуды. Известно, что характерным свойством гриппа является резкое повышение проницаемости гистогематического барьера, что ведет к развитию множественных геморрагий и обуславливает полиорганную недостаточность при тяжелом гриппе [28]. Для компенсации этой повышенной проницаемости сосудов в организме существуют сигнальные пути противоположной направленности, стабилизирующие состояние эндотелия и базальных мембран. Так, например, последовательность реакций, запускаемая белком Slit и опосредуемая эндотелиальным рецептором Robo4, была идентифицирована как путь, модулирующий стабильность сосудов путем упрочения контактов между эндотелиальными клетками. Активация такого пути оказалась эффективной для снижения проницаемости капилляров, мультиорганного отека и смертности при многих формах экспериментальных инфекций, включая высокопатогенный грипп H5N1 [32]. При этом сам белок Slit не влиял на продукцию вируса. Более того, что особенно важно, он не оказывал воздействия даже на уровень провоспалительных цитокинов в легких, что свидетельствует о том, что самого по себе ограничения реакции сосудов на гиперцитокинемию достаточно для снижения тяжести заболевания и уровня смертности. В описанных опытах, например, было достигнуто снижение смертности на 40–50%.

В целом, перечисленные препараты применяются как патогенетические средства для терапии тяжелого гриппа. Отличительная их особенность — высокий терапевтический эффект на поздних сроках заболевания и в случаях тяжелого и осложненного гриппа — основана на конкретных мишенях их действия и особенностях патогенеза таких форм инфекции. Известно, что с точки зрения патогенеза любой инфекционный процесс является суммой действия собственно патогена и ответной реакции организма. Как уже упоминалось, препараты прямого противовирусного действия активны лишь в первые дни заболевания, когда в организме протекают интенсивные процессы вирусной репродукции. Однако при уже запущенных реактивных процессах — цитокиновом шторме и массовой деструкции клеток, сформированном отеке легких и нарушениях микроциркуляции органов — основной вклад в патогенез гриппа вносит уже не вирусный, а именно реактивный компонент. Поэтому естественно, что препараты, направленные против этих факторов патогенеза имеют терапевтическую активность.

Выделяется, однако, еще одна, четвертая группа химических препаратов, которая заслуживает отдельного упоминания. Так же, как и препараты предыдущей группы, эти соединения воздействуют не на вирусные, а на клеточные мишени. Особенность этих мишеней состоит в том, что выполняя функции, важные для клетки, они являются необходимыми для жизненного цикла самого вируса. Емкость вирусного генома очень ограничена, и в ходе репродукции он вынужден использовать многие клеточные компоненты, в том числе метаболические и сигнальные механизмы клетки-хозяина. Естественно, что их ингибирование снижает инфекционную активность вируса и уровень его репликации.

Чтобы пояснить зависимость вирусной репродукции от клеточных метаболических путей, приведем наиболее очевидный пример — трансляция вирусных мРНК, полностью обеспечиваемая клеточной системой белкового синтеза. Угнетение этого процесса закономерно приводит к резкому снижению вирусной репродукции. Этот путь используется клеткой, например, в ходе развития антивирусного статуса при воздействии на клетки интерферона [46]. Однако селективность такого воздействия невелика, и действие интерферонов затрагивает как вирусные, так и клеточные процессы. В клетке, находящейся в антивирусном статусе, в равной степени разрушены и вирусные, и клеточные мРНК, благодаря чему подавлен синтез как вирусных, так и клеточных белков.

С развитием методических подходов к изучению внутри- и межклеточных механизмов передачи сигнала было выяснено, что многие вирусы способны использовать для собственной репликации и другие метаболические и сиг-

нальные клеточные сети [47]. В результате многочисленных исследований были разработаны специфические ингибиторы каждого из них, а за последние несколько лет была обнаружена и охарактеризована их противогриппозная активность. Приведем наиболее изученные в этом отношении примеры.

При инфицировании клетки вирусом гриппа активируется центральный и наиболее изученный путь регуляции врожденного противовирусного иммунитета — сигнальный путь NF-κB. В клетках он контролирует экспрессию генов, регулирующих острый воспалительный ответ, адгезию и дифференцировку клеток, апоптоз и ответ на вирусную инфекцию. На ранних стадиях инфекция приводит к активации комплекса PI3K/Akt и последующей активации экспрессии NF-κB. Он, в свою очередь, регулирует экспрессию многих генов, включая, в том числе, проапоптотические факторы TRAIL, Fas и FasL. Два последних активируют эффекторные белки апоптоза — каспазы, ферменты, осуществляющие специфическую деградацию комплекса ядерных пор в инфицированной клетке [12, 13, 51, 63]. Такая деградация является одним из первых этапов многоступенчатого процесса программируемой клеточной гибели. При помощи этого механизма ценой гибели инфицированной клетки достигается ограничение размножения вируса во всем организме.

Однако следует учитывать, что в ядре зараженной клетки происходят процессы транскрипции и репликации вирусного генома, и присутствуют многочисленные фрагменты вирусных РНП, которым предстоит выйти через ядерные поры в цитоплазму для участия в сборке вирионов потомства. На последней стадии описанного каскада реакций — деградации ядерных пор благодаря активности каспаз — диффузия вирусных РНП через разрушенные поры существенно облегчается по сравнению с порами интактными. Таким образом, являясь исходно противовирусным сигнальным путем, призванным ограничивать вирусную репродукцию, NF-κB в определенный момент, напротив, способствует более активной реализации жизненного цикла вируса [38]. Угнетение этого сигнального пути мешает реализации вирусной программы репликации и снижает эффективность продукции вирионов потомства.

Препараты-ингибиторы этого пути принадлежат к различным химическим группам и воздействуют на различные компоненты каскада [18]. Одни из них (SC75741) нарушают связывание NF-κB с ДНК, препятствуя тем самым индукции факторов апоптоза и активации каспаз, другие (PS-341 (бортезомиб), MG132, VL-01 и др.) являются ингибиторами протеасом, препятствуя убиквитин-зависимой деградации IκB или ингибируют NF-κB-активирующую киназу IKK (ацетилсалициловая кислота, LASAG), что в дальнейшем приводит к угнетению процесса

фосфорилирования и деградации IκB. В целом, независимо от конкретной точки приложения, ингибирование тех или иных компонентов пути NF-κB приводит к снижению вирусной продукции в клетке [17].

Другим примером использования клеточных путей вирусом гриппа является сигнальный путь Raf/MEK/ERK [33]. Как известно, трансляция вирусных белков происходит в цитоплазме инфицированной клетки. Синтезированные поверхностные белки вириона — мембранный белок M1, гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA) — транспортируются к плазматической мембране, встраиваются в нее и формируют кластеры. РНП потомства транспортируются к сайтам скопления поверхностных белков, взаимодействуют с белком M1 и цитоплазматическими доменами HA и NA, что приводит к искривлению мембраны и дальнейшему почкованию вирионов потомства [48].

Формирование вирусных РНП происходит в ядре инфицированной клетки. С одной стороны, для полноценного формирования им необходимо находиться в ядре достаточно долго, чтобы образовать полноценную сердцевину будущих вирионов. С другой стороны, к моменту образования кластеров HA и NA на плазматической мембране им необходимо транспортироваться к сайтам сборки и почкования вирионов, то есть должен существовать механизм, запускающий или подавляющий ядерный экспорт РНП в зависимости от стадии развития инфекционного процесса в клетке. Таким механизмом и является сигнальный путь Raf/MEK/ERK. Его активация индуцируется сборкой агрегатов вирусных гликопротеидов на поверхности клетки, и его компоненты направляют транспорт РНП к плазматической мембране. На сегодняшний день неясно, каким именно образом это происходит. Однако ингибиторы этого сигнального пути в значительной степени препятствуют нормальному протеканию вирусной инфекции и накоплению вируса в высоких титрах [35, 45].

Одним из первых этапов пути Raf/MEK/ERK, является активация белка Raf при помощи ГТФ-связанной формы белка Ras. Поскольку примерно половина новообразований человека содержит в клетках мутации в генах *raf* или *ras*, разработка ингибиторов этих генов велась исключительно в аспекте онкологических проблем. Так, шесть препаратов, доведенных до II фазы клинических исследований в области противораковой химиотерапии, оказались эффективными ингибиторами гриппозной инфекции. Это соединения, близкие между собой по химической структуре — U0126, препараты CI-1040 и PD-0325901, AZD-6244 и AZD-8330, а также препарат RDEA-119 (рис. 2). Их 50% ингибирующие концентрации в отношении вируса гриппа лежат в пределах от 1200 до 4 нМ, что свидетельствует об их высокой противовирусной активности [11, 20].

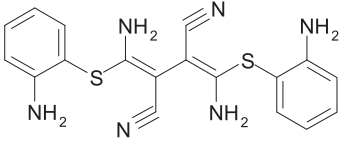
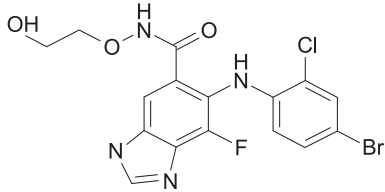
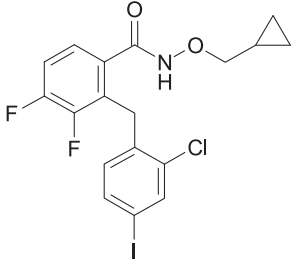
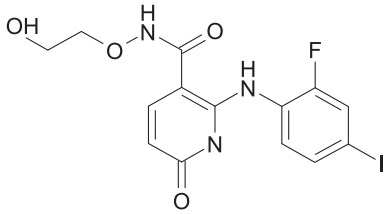
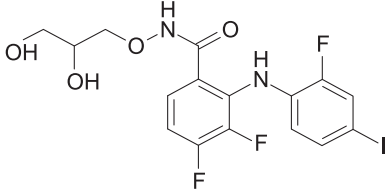
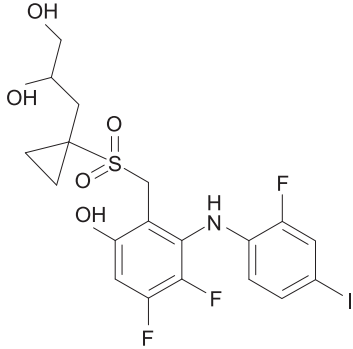
U0126		AZD-6244	
CI-1040		AZD-8330	
PD-0325901		RDEA-119	

Рисунок 2. Ингибиторы сигнального пути Raf/MEK/ERK, доведенные до стадии клинических исследований

Еще один сигнальный путь — PI3K/АКТ/mTOR — также используется вирусом гриппа для обеспечения собственной репликации [12]. В клетке этот путь регулирует дифференцировку, метаболизм и инициацию трансляции, а также во многом пересекается с другими сигнальными путями, такими как Raf/MEK/ERK и NF-κB. В ходе вирусной репродукции этот путь используется на ранних этапах вирусной инфекции — для регуляции проникновения вируса в клетку, а также на поздних стадиях — для правильной локализации вирусных РНП и предотвращения преждевременного апоптоза инфицированных клеток. Бактериальный метаболит вортманнин и морфолиновое про-

изводное кверцетина LY294002, хотя и не были доведены до стадии клинических исследований из-за низкой биодоступности, явились, тем не менее, важным инструментом для фундаментальных исследований, связанных с передачей сигнала посредством PI3K-пути, а также основой для разработки оптимизированных производных [34]. Одно из них, NVP-BE2235 (рис. 3), проходит II фазу клинических исследований в качестве противоракового препарата [47].

Описан еще один сигнальный путь, связанный с гриппозной инфекцией. Инфицирование вирусом гриппа активирует сигнальный белок C-Jun терминальную киназу (JNK). Она, в свою очередь, активирует фактор транскрипции AP-1, который стимулирует экспрессию интерферона-β, играющего важную роль в противовирусном ответе клетки. Ингибирование JNK, следовательно, должно приводить к повышению вирусной продукции. Тем не менее, синтетические ингибиторы SP600125 и AS601245 (рис. 4), напротив, снижали уровень репродукции вирусов гриппа независимо от их подтипа. Противовирусная активность этих препаратов была обусловлена их способностью ингибировать синтез вирусных РНК при помощи не выясненного пока механизма [43]. Известно также, что SP600125 не влияет напрямую на активность вирусной РНК-полимеразы, а подавляет активность вирусного белка NS1, что, по-видимому,

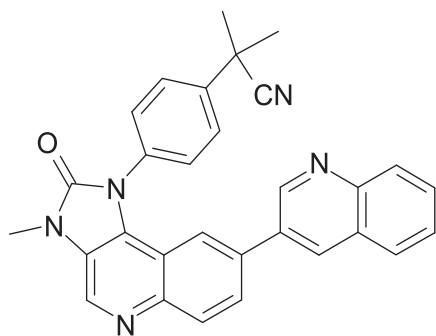


Рисунок 3. Структура NVP-BE2235 — ингибитора PI3K/АКТ/mTOR [47]

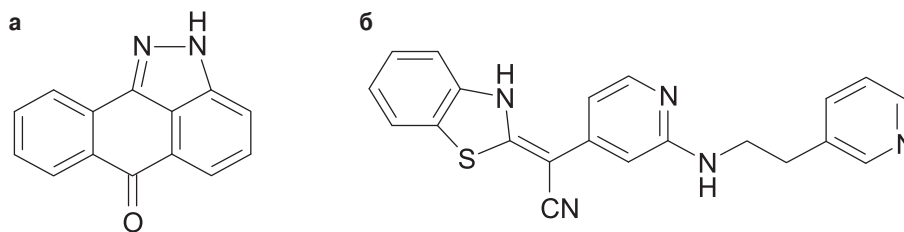


Рисунок 4. Структуры SP600125 (а) и AS601245 (б) [43]

приводит к большей эффективности системы противовирусного врожденного иммунитета. Эти результаты были подтверждены в опытах на животных, где SP600125 снижал вирусную нагрузку в легких мышей по сравнению с контрольной группой.

В работе Kumar et al. [30] были идентифицированы два ингибитора тирозинкиназных рецепторов, также проявляющих выраженную противогриппозную активность. Один из них, AG879, является селективным ингибитором сигнального пути, обусловленного рецептором фактора роста нервов и рецептором эпидермального фактора роста 2 (TrkA/HER2), другой — тирфостин A9 — ингибирует сигнальный путь фактора роста тромбоцитов (PDGFR). Каждый из этих ингибиторов угнетает по крайней мере три внутриклеточных стадии жизненного цикла вируса — оба ингибируют синтез всех трех типов вирусспецифических РНК, блокируют ядерный экспорт вирусных РНП, а также предотвращают почкование дочерних вирусных частиц, воздействуя на путь, направляемый ферментом биосинтеза липидов — фарнезилдифосфатсинтетазой.

Говоря о роли клеточных киназ в цикле репликации вируса гриппа, следует также упомянуть об исследовании König et al. [27], в котором при помощи полногеномного скрининга были идентифицированы 295 клеточных факторов, необходимых для репликации вируса. Большая часть этих белков является киназами, то есть ферментами, регулирующими большинство клеточных сигнальных путей. В дальнейшем путем анализа стандартной библиотеки из 300 киназ [37] были изучены ингибиторы киназ широкого спектра, в результате чего идентифицировано вещество ON108110, эффективно ингибирующее 25 из 300 проанализированных киназ. При этом 8 из них оказались ранее охарактеризованы как необходимые для репликации вируса.

Дальнейшее тестирование показало, что ON108110 угнетает ядерный экспорт вирусных рибонуклеопротеинов и/или репликацию вирусных РНК, частично воздействуя также на клеточные механизмы транскрипции. Однако вирусный полимеразный комплекс оказался гораздо более чувствителен к воздействию препарата, что позволяет использовать его в дозах, лежащих ниже порога токсичности. Кроме того, ON108110 снижал продукцию двух других РНК-геномных вирусов — вируса везикулярного

стоматита и вируса болезни Ньюкасла, что указывает на его роль в ингибировании киназ, необходимых для репродукции не только вируса гриппа, но и других вирусов.

Одной из форм реакции клеток на стрессорные воздействия является аутофагия — высококонсервативный для всех эукариотических клеток процесс. Исходно аутофагия была идентифицирована как процесс, индуцированный голоданием клетки. Однако к настоящему времени известно, что он играет важную роль в физиологии и патофизиологии и является клеточным ответом на самые разные стимулы, в том числе на вирусную инфекцию. Он также может играть роль в поддержании репродукции вируса гриппа в клетках. В условиях угнетения аутофагических процессов фармакологическими препаратами или при помощи РНК-интерференции выход вирусного потомства и синтез вирусных белков значительно снижаются. Аутофагия, таким образом, является одним из ключевых процессов, обеспечивающих репликацию вируса гриппа.

Zhou et al. [64] было показано, что гриппозная инфекция запускает в зараженных клетках образование аутофагосом и стимулирует синтез белка LC3-II — специфического маркера этих органелл. Обработка таких клеток 3-метиладенином или вортманнином — ингибиторами аутофагии — снижала выход вирусных частиц в 2–5 раз, а инфекционность вирусного потомства — приблизительно на порядок. Сходные результаты были получены при инактивации гена LC3 при помощи специфических siRNA. Механизмы подобных взаимоотношений вируса и клетки остаются до конца не выясненными.

Группой исследователей [7] была даже сконструирована система скрининга противогриппозных препаратов на основе анализа взаимодействия между компонентами аутофагического

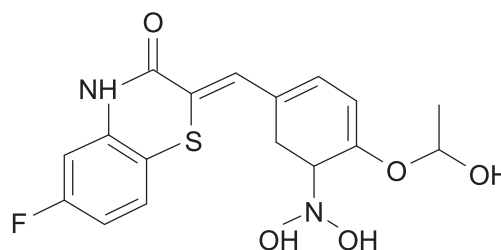


Рисунок 5. Структура киназного ингибитора ON108110 [37]

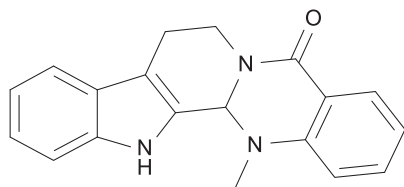


Рисунок 6. Структура эводиамин — ингибитора аутофагии, обладающего противогриппозной активностью [7]

пути. Способность химических соединений угнетать взаимодействие белков Atg5, Atg12 и Atg16 была трактована как потенциальная противогриппозная активность. На панели из 83 растительных препаратов традиционной китайской медицины было идентифицировано соединение эводиамин (рис. 6) — алкалоид, содержащийся в экстракте эвдии (*Evodia rutecarpa Benth.*) способное ингибировать образование аутофагосом, индуцированное гриппозной инфекцией, а также обладающее противовирусной активностью в отношении широкой панели вирусов гриппа разных подтипов. При этом токсичность эводиамин составила 100 мкг/мл, а показатель 50% эффективной дозы — 1,6 мкг/мл, что дает индекс селективности около 60 и свидетельствует о высоком противовирусном потенциале этого соединения и возможности дальнейшей оптимизации его структуры для повышения активности.

Таким образом, как видно из приведенных примеров, помимо воздействия непосредственно на вирусные мишени, размножение вируса гриппа может быть подавлено при помощи модуляции клеточных сигнальных путей. Следует отметить, что несмотря ни на доказанный противовирусный потенциал, ни на разрешенное клиническое применение, большинство из перечисленных соединений не используется в качестве средства для терапии гриппа. В первую очередь, это связано с высокой комплексностью сигнальных путей-мишеней. Подавляющее большинство этих препаратов разработаны для использования в области онкологии, то есть способны вмешиваться в работу важных для клетки и организма сигнальных систем, регулирующих такие принципиальные процессы, как апоптоз, деление и дифференцировка, ангиогенез и т.д. Воздействие на них, помимо ограничения продукции вируса, приводит ко многим побочным эффектам, которые могут существенно сдвигать соотношение «выгода/риск» в сторону риска для здоровья. Кроме того, особенности фармакологического рынка диктуют необходимость разделения препаратов для лечения опухолей и респираторных вирусных инфекций. Иными словами, в практике фармакологии стремятся избежать одним и тем же действующим веществом лечить и онкологические заболевания, и грипп. Эти аспекты в некоторой степени ограничивают разработку эффективных противогриппозных препаратов, направленных на клеточные мишени.

Некоторые соединения, как было уже упомянуто, сочетают в себе несколько типов активности, каждая из которых приводит к снижению вирусной нагрузки, уменьшению интенсивности воспалительных процессов, нормализации структуры ткани при тяжелой гриппозной инфекции, и т.п. Так, например, глицирризиновая кислота (ГК) является эффективным и малотоксичным индуктором $IFN\gamma$. В работе Utsunomiya et al. [57] было показано, что благодаря этой способности глицирризиновая кислота на 100% предотвращает смертность мышей от гриппозной инфекции при заражении дозой вируса A(H2N2) 10 LD₅₀. Параллельная обработка животных антителами к $IFN\gamma$ полностью снимала протективный эффект ГК, что доказывает механизм ее защитного действия. С другой стороны [40], показано, что ГК является мощным иммуномодулятором. В терапевтических дозах на модели гриппозной инфекции макрофагов человека, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа H5N1, ГК снижала продукцию провоспалительных цитокинов CXCL10, IL-6 и CCL-5, а также ингибировала вирусиндуцированный апоптоз. При этом не было отмечено никакого влияния этого соединения на продукцию вируса в клетках.

Кроме того показано [41], что в клетках A549, являющихся аналогом альвеолоцитов человека, ГК ингибировала репликацию высокопатогенного вируса гриппа H5N1, снижала степень вирусиндуцированного апоптоза клеток и экспрессию провоспалительных цитокинов. Неясно, является ли такая активность следствием или независима от собственно ее противовирусной активности. Известно, что оболочечные вирусы в процессе слияния вирусной и клеточной мембран нуждаются в определенной текучести липидного бислоя и следовательно, зависят от реологических свойств клеточной мембраны. Так, снижение текучести мембраны на 5% ингибировало размножение ВИЧ-1 на 56%, а 5%-ное повышение текучести напротив, повышало инфекционность вируса в 2,4 раза [21]. Показано также, что те же закономерности применимы и в случае гриппозной инфекции [61]. В высоких концентрациях ГК препятствует интернализации вирионов гриппа, взаимодействуя с мембранами и снижая их текучесть. Эти свойства объясняют также активность ГК *in vitro* в отношении других вирусов — SARS-ассоциированного коронавируса, ВИЧ-1, респираторно-синцитиального вируса, вируса гепатита В, арбовирусов, вируса осповакцины, вирусов группы герпеса (вирус варицелла-зостер, вирус простого герпеса 1 типа, вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирус саркомы Капоши) и вируса везикулярного стоматита [15]. В дополнение к уже описанным механизмам подавления вирусной репродукции, известно, что ГК снижает мембранный транспорт и сialiрование поверхностного антигена

вируса гепатита В, а также ингибирует ферменты фосфорилирования при инфекции, вызванной вирусом везикулярного стоматита [15].

Таким образом, несмотря на противоречивые сведения о наличии у ГК прямой противовирусной активности в отношении вируса гриппа, можно говорить, что она является, тем не менее, потенциально важным компонентом комплексной противогриппозной терапии благодаря наличию других типов биологической активности, важных при лечении тяжелой и осложненной инфекции. В наших собственных исследованиях [1, 2] продемонстрирована протективная активность ГК против вирусов гриппа А(H1N1) pdm09 и А(H3N2). Снижение титра вируса в ткани легких при этом составило приблизительно 1 порядок. При этом достоверного противовирусного действия в культуре клеток МДСК отмечено не было. Добавление к ГК иммуномодулирующего дипептида α -глутамилтриптофана повышало противовирусную активность комбинации, снижая вирусный титр на 5–6 порядков по сравнению с контролем и гибель животных — на 77%. Таким образом, комбинация двух препаратов, неактивных *in vitro*, имела выраженный эффект *in vivo*, и механизмы этой активности следует расшифровывать в дальнейших исследованиях.

Преимущества описанного подхода к терапии гриппа очевидны. В отличие от этиотропных соединений, против которых вирус способен вырабатывать устойчивость, препараты против клеточных мишеней лишены этого недостатка. По сравнению с вирусом гриппа, клетка — гораздо более сложная система, обладающая многими уровнями контроля за возникновением мутаций и их коррекции, вплоть до гибели клетки, несущей эти изменения. Во-вторых, в дополнение к антивирусной активности, многие препараты этой группы обладают другими видами биологической активности — противовоспалительной, цитопротекторной и др. Такая активность не столь важна в случаях заболеваний средней тяжести, однако становится жизненно важной, когда речь идет о случаях позднего, тяжелого и осложненного гриппа, где ведущую роль в патогенезе играют не вирусные, а реактивные процессы. Список препаратов — потенциальных кандидатов для комплексной терапии гриппа, разумеется, не исчерпывается соединениями, перечисленными в настоящем обзоре. С развитием представлений о патогенезе

гриппозной инфекции как о сложном процессе, включающем связанные и взаимозависимые каскады реакций, появляются основания включать все больше число ингибиторов каждого из них в число лекарств, способных нормализовать течение гриппа. Сюда относятся статины, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента и блокаторы ангиотензинового рецептора, агонисты рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами и агонисты АМФ-активируемых протеинкиназ, и др. [14].

В настоящем обзоре мы ограничились терапией одной только гриппозной инфекции. Описанные соединения, однако, воздействуют на процессы, общие для тяжелых воспалительных заболеваний, независимо от конкретной этиологии — продукцию провоспалительных цитокинов, миграцию клеток в очаг воспаления, и т.п. Поэтому следует ожидать, что соединения, активные при гриппе, окажутся также эффективными и при других вирусных заболеваниях сходного патогенеза, как это имеет место в случае ГК. Следовательно, дальнейшие исследования в области поиска и оптимизации ингибиторов клеточных компонентов как средств против гриппозной инфекции могут привести к разработке новых противовирусных препаратов высокой эффективности, широкого спектра действия и низкой вероятности развития резистентности.

Таким образом, препараты для терапии гриппозной инфекции следует разделять как по механизмам действия, так и по срокам применения. Во-первых, это препараты, наиболее эффективные для профилактики и экстренной профилактики (интерфероны и их индукторы). Во-вторых, это препараты этиотропного механизма, использование которых необходимо на всех сроках гриппа после постановки диагноза, но эффективно лишь на ранних стадиях заболевания. Наконец, в-третьих, на дальних стадиях и в случаях тяжелой и осложненной инфекции необходимо использование соединений патогенетического механизма действия, которые могут снижать или не снижать собственно вирусную репродукцию. При этом применение препаратов, действующих на систему врожденного иммунитета, является абсолютно целесообразным как в раннем периоде терапии, так и в более поздние сроки, при этом сочетанное применение специфических и неспецифических препаратов представляет собой оптимальный путь повышения эффективности терапии гриппа.

Список литературы

1. Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штро А.А. Влияние комбинации глутамил-триптофана с глицерризиновой кислотой на течение острой инфекции у мышей, вызванной вирусом гриппа (H3N2) // Вопросы вирусологии. — 2012. — № 3. — С. 23–27.
2. Смирнов В.С., Гаршинина А.В., Штро А.А., Аникин В.Б., Галочкина А.В., Беляевская С.В., Зарубаев В.В. Протективная активность комбинации глутамил-триптофана и глицерризиновой кислоты при пероральном введении на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции у белых мышей, вызванной осельтамивир-устойчивым штаммом вируса // Вопросы вирусологии. — 2014 (в печати).

3. Черняев А.Л., Зайратьянц О.В., Полянко Н.И. Патологическая анатомия гриппа А/Н1N1 // Архив патологии. — 2010. — № 3. — С. 3–6.
4. Яковлев А.А., Рахманова А.Г., Цинзерлинг В.А. О пандемии гриппа А/Н1N1 у иммунодепрессивных лиц в Санкт-Петербурге (апрель–декабрь 2009 г.) // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. — 2010. — Т. 2, № 1. — С. 94–101.

Ссылки 5–64 см. в References (с. 24–26). See References for numbers 5–64 at pp. 24–26.

Infekciã i immunitet (Infection and Immunity)
2014, vol. 4, no. 1, pp. 15–26

REVIEWS

INFLUENCE ON CELLULAR TARGETS FOR TREATING INFLUENZA INFECTION

Zarubaev V.V.^a, Smirnov V.S.^b

^a Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^b MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Influenza is a highly contagious infection of humans. The use of specific antivirals leads to emergence of drug-resistant strains following by the decrease of efficacy of ethiotropic chemotherapy. In this review the data about the decrease of the level of viral replication and severity of pathological process based on the use of alternative targets of cellular instead of viral origin are presented. The medicines for decreasing the production of proinflammatory cytokines (eritoran), restricting the degranulation of mast cells (ketotifen), inhibitors of cyclooxygenases (celecoxib, mesalazine, SC-560), inhibitors of sphingosine-1-phosphate pathway (AAL-R) and compounds increasing the capillars stability by strengthening the contacts between endothelial cells (Slit protein) have been described in the review. The special attention is paid to the inhibitors of cellular pathways that are used by the virus to provide its reproduction, such as NF-κB, Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR. Information concerning anti-influenza activity of kinase and autophagy inhibitors is summarised as well as data about the preparations of combined mechanism of activity — glycyrrhizic acid and dipeptide alpha-glutamyl-tryptophane. Further studies in the field of search and optimization of inhibitors of cellular components as remedies against influenza infection could lead to the development of novel antivirals with high efficacy, broad spectrum of activity and low probability of virus resistance.

Key words: influenza, host targets, inflammation, signal pathways, antivirals.

Authors:

Zarubaev V.V. ✉, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Anti-Viral Chemotherapy, Research Institute of Influenza, 197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professor Popov str., 15/17.
Phone: (812) 499-15-72 (office). E-mail: zarubaev@influenza.spb.ru;

Smirnov V.S., PhD, MD (Medicine), Principal Scientist, MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, Russian Federation.

References

1. Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Anfimov P.M., Shtro A.A. Vliyanie kombinatsii glutamil-triptofana s glitsirrizinovoy kislotoy na techenie ostroy infektsii u myshey, vyzvannoy virusom grippa (H3N2) [Effect of a combination of glutamyl-tryptophan and glycyrrhizic acid on the course of acute infection caused by influenza (H3H2) virus in mice]. *Voprosy virusologii — Problems of Virology*, 2012, vol. 57, no. 3, pp. 23–27.
2. Smirnov V.S., Garshina A.V., Shtro A.A., Anikin V.B., Galochkina A.V., Belyaevskaya S.V., Zarubaev V.V. Protektivnaya aktivnost' kombinatsii glutamil-triptofana i glitsirrizinovoy kisloty pri peroral'nom vvedenii na modeli eksperimental'noy letal'noy grippoznoy infektsii u belykh myshey, vyzvannoy osel'tamivir-ustoychivym shtammom virusa (v pechati) [Antiviral activity of complex of glycyrrhizic acid–alpha-glutamyltryptophan against experimental lethal influenza infection in white mice caused by oseltamivir-resistant strain of the virus (in press)]. *Voprosy virusologii — Problems of Virology*, 2014.
3. Chernyaev A.L., Zayrat'yants O.V., Polyanko N.I. Patologicheskaya anatomiya grippa A/H1N1 [Pathological anatomy of influenza virus A(H1N1)]. *Arkhiv patologii — Archive of Pathology*, 2010, no. 3, pp. 3–6.
4. Yakovlev A.A., Rakhmanova A.G., Tsinerling V.A. O pandemii grippa A/H1N1 u immunodepressivnykh lits v Sankt-Peterburge (aprel'-dekabr' 2009 g.) [On the influenza pandemic A(H1N1) among immunosuppressed patients in St. Petersburg (April–December 2009)]. *VICH-infektsiya i immunosupressii — HIV-infection and immunosuppression*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 94–101.
5. Arias C.F., Escalera-Zamudio M., de los Dolores Soto-Del Rio M., Cobián-Güemes A.G., Isa P., López S. Molecular Anatomy of 2009 Influenza Virus A (H1N1). *Archives of Medical Research*, 2009, vol. 40, pp. 643–654.
6. Carey M.A., Bradbury J.A., Rebolloso Y.D., Graves J.P., Zeldin D.C., Germolec D.R. Pharmacologic inhibition of COX-1 and COX-2 in influenza A viral infection in mice. *PLoS One*, 2010, vol. 5(7), e11610.
7. Dai J.P., Li W.Z., Zhao X.F., Wang G.F., Yang J.C., Zhang L., Chen X.X., Xu Y.X., Li K.S. A drug screening method based on the autophagy pathway and studies of the mechanism of evodiamine against influenza A virus. *PLoS One*, 2012, vol. 7(8), e42706.

8. De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, vol. 5, pp. 1015–1025.
9. Dixit R., Khandaker G., Ilgoutz S., Rashid H., Booy R. Emergence of oseltamivir resistance: control and management of influenza before, during and after the pandemic. *Infect. Disord. Drug Targets*, 2013, vol. 13, no. 1, pp. 34–45.
10. Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 1998, vol. 148, no. 4, pp. 1667–1686.
11. Droebner K., Pleschka S., Ludwig S., Planz O. Antiviral activity of the MEK inhibitor U0126 against pandemic H1N1v and highly pathogenic avian influenza virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.*, 2011, vol. 92, pp. 195–203.
12. Ehrhardt C., Ludwig S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell. Microbiol.*, 2009, vol. 11, pp. 863–871.
13. Ehrhardt C., Wolff T., Pleschka S., Planz O., Beermann W., Bode J.G., Schmolke M., Ludwig S. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, pp. 3058–3067.
14. Fedson D.S. Treating influenza with statins and other immunomodulatory agents. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 99, no. 3, pp. 417–435.
15. Fiore C., Eisenhut M., Krausse R., Ragazzi E., Pellati D., Armanini D., Bielenberg J. Antiviral effects of Glycyrrhiza species. *Phytother. Res.*, 2008, vol. 22, no. 2, pp. 141–148.
16. Gill J.R., Sheng Z.M., Ely S.F., Guinee D.G.Jr., Beasley M.B., Suh J., Deshpande C., Mollura D.J., Morens D.M., Bray M., Travis W.D., Taubenberger J.K. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2010, vol. 134, pp. 235–243.
17. Gilmore T.D., Garbati M.R. Inhibition of NF-kappaB signaling as a strategy in disease therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2011, vol. 349, pp. 245–263.
18. Gilmore T.D., Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene*, 2006, vol. 25, pp. 6887–6899.
19. Govorkova E.A., Baranovich T., Seiler P., Armstrong J., Burnham A., Guan Y., Peiris M., Webby R.J., Webster R.G. Antiviral resistance among highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses isolated worldwide in 2002–2012 shows need for continued monitoring. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 98, no. 2, pp. 297–304.
20. Haasbach E., Hartmayer C., Planz O. Combination of MEK inhibitors and oseltamivir leads to synergistic antiviral effects after influenza A virus infection in vitro. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 98, pp. 319–324.
21. Harada S., Yusa K., Monde K., Akaike T., Maeda Y. Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 329, pp. 480–486.
22. Hay A.J., Hayden F.G. Oseltamivir resistance during treatment of H7N9 infection. *Lancet*, 2013, vol. 381, no. 9885, pp. 2230–2232.
23. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en>.
24. Hu Y., Jin Y., Han D., Zhang G., Cao S., Xie J., Xue J., Li Y., Meng D., Fan X., Sun L.Q., Wang M. Mast cell-induced lung injury in mice infected with H5N1 influenza virus. *J. Virol.*, 2012, vol. 86, no. 6, pp. 3347–3356.
25. Hui D.S., Lee N., Chan P.K. Adjunctive therapies and immunomodulatory agents in the management of severe influenza. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 98, no. 3, pp. 410–416.
26. Huston D.P., Bressler R.B., Kaliner M., Sowell L.K., Baylor M.W. Prevention of mast-cell degranulation by ketotifen in patients with physical urticarias. *Ann. Intern. Med.*, 1986, vol. 104, no. 4, pp. 507–510.
27. Konig R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H.H., Bhattacharyya S., Alamares J.G., Tscherne D.M., Ortigoza M.B., Liang Y., Gao Q., Andrews S.E., Bandyopadhyay S., De Jesus P., Tu B.P., Pache L., Shih C., Orth A., Bonamy G., Miraglia L., Ideker T., Garcia-Sastre A., Young J.A., Palese P., Shaw M.L., Chanda S.K. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*, 2010, vol. 463, pp. 813–817.
28. Kuiken T., Riteau B., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Curr. Opin. Virol.*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 276–286.
29. Kumar A. Early versus late oseltamivir treatment in severely ill patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1): speed is life. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, vol. 66, no. 5, pp. 959–963.
30. Kumar N., Liang Y., Parslow T.G., Liang Y. Receptor tyrosine kinase inhibitors block multiple steps of influenza a virus replication. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 6, pp. 2818–2827.
31. Kunkel G.T., Maceyka M., Milstien S., Spiegel S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, vol. 12, no. 9, pp. 688–702.
32. London N.R., Zhu W., Bozza F.A., Smith M.C., Greif D.M., Sorensen L.K., Chen L., Kaminoh Y., Chan A.C., Passi S.F., Day C.W., Barnard D.L., Zimmerman G.A., Krasnow M.A., Li D.Y. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci. Transl. Med.*, 2010, vol. 2, no. 23, 23ra19.
33. Ludwig S., Wolff T., Ehrhardt C., Wurzer W.J., Reinhardt J., Planz O., Pleschka S. MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett.*, 2004, vol. 561, pp. 37–43.
34. Maira S.M., Finan P., Garcia-Echeverria C. From the bench to the bed side: PI3K pathway inhibitors in clinical development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2010, vol. 347, pp. 209–239.
35. Marjuki H., Yen H.L., Franks J., Webster R.G., Pleschka S., Hoffmann E. Higher polymerase activity of a human influenza virus enhances activation of the hemagglutinin-induced Raf/MEK/ERK signal cascade. *Virol. J.*, 2007, vol. 4, pp. 134.
36. Marsolais D., Hahm B., Walsh K.B., Edelmann K.H., McGavern D., Hatta Y., Kawaoka Y., Rosen H., Oldstone M.B. A critical role for the sphingosine analog AAL-R in dampening the cytokine response during influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2009, vol. 106, no. 5, pp. 1560–1565.
37. Martinez-Gil L., Alamares-Sapuay J.G., Ramana Reddy M.V., Goff P.H., Premkumar Reddy E., Palese P. A small molecule multi-kinase inhibitor reduces influenza A virus replication by restricting viral RNA synthesis. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 100, no. 1, pp. 29–37.
38. Mazur I., Wurzer W.J., Ehrhardt C., Pleschka S., Puthavathana P., Silberzahn T., Wolff T., Planz O., Ludwig S. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell. Microbiol.*, 2007, vol. 9, pp. 1683–1694.
39. Mei L., Song P., Tang Q., Shan K., Tobe R.G., Selotlegeng L., Ali A.H., Cheng Y., Xu L. Changes in and shortcomings of control strategies, drug stockpiles, and vaccine development during outbreaks of avian influenza A H5N1, H1N1, and H7N9 among humans. *Biosci. Trends.*, 2013, vol. 7, no. 2, pp. 64–76.

40. Michaelis M., Geiler J., Naczek P., Sithisarn P., Ogbomo H., Altenbrandt B., Leutz A., Doerr HW., Cinatl J Jr. Glycyrrhizin inhibits highly pathogenic H5N1 influenza A virus-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2010, vol. 199, no. 4, pp. 291–297.
41. Michaelis M., Geiler J., Naczek P., Sithisarn P., Leutz A., Doerr H.W., Cinatl J. Jr. Glycyrrhizin exerts antioxidative effects in H5N1 influenza A virus-infected cells and inhibits virus replication and pro-inflammatory gene expression. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 5, e19705.
42. Mullarkey M., Rose J.R., Bristol J., Kawata T., Kimura A., Kobayashi S., Przetak M., Chow J., Gusovsky F., Christ W.J., Rossignol D.P. Inhibition of endotoxin response by E5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, vol. 304, pp. 1093–1102.
43. Nacken W., Ehrhardt C., Ludwig S. Small molecule inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) possess antiviral activity against highly pathogenic avian and human pandemic influenza A viruses. *Biol. Chem.*, 2012, vol. 393, no. 6, pp. 525–534.
44. Nobusawa E., Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 7, pp. 3675–3678.
45. Olschlager V., Pleschka S., Fischer T., Rziha H.J., Wurzer W., Stitz L., Rapp U.R., Ludwig S., Planz O. Lung-specific expression of active Raf kinase results in increased mortality of influenza A virus-infected mice. *Oncogene*, 2004, vol. 23, pp. 6639–6646.
46. Pitha P.M., Kunzi M.S. Type I interferon: the ever unfolding story. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2007, vol. 316, pp. 41–70.
47. Planz O. Development of cellular signaling pathway inhibitors as new antivirals against influenza. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 98, no. 3, pp. 457–468.
48. Rossman J.S., Lamb R.A. Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 2011, vol. 411, no. 2, pp. 229–236.
49. Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res.*, 1998, vol. 37, pp. 83–95.
50. Shetty A.K., Peek L.A. Peramivir for the treatment of influenza. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2012, vol. 10, pp. 123–143.
51. Shin Y.K., Li Y., Liu Q., Anderson D.H., Babiuk L.A., Zhou Y. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, pp. 12730–12739.
52. Shirey K.A., Lai W., Scott A.J., Lipsky M., Mistry P., Pletneva L.M., Karp C.L., McAlees J., Giannini T.L., Weiss J., Chen W.H., Ernst R.K., Rossignol D.P., Gusovsky F., Blanco J.C., Vogel S.N. The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*, 2013, vol. 497, no. 7450, pp. 498–502.
53. Smeets D.F., Julander J.G., Tarbet E.B., Gross M., Nguyen J. Treatment of oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus infections in mice with antiviral agents. *Antiviral Res.*, 2012, vol. 96, no. 1, pp. 13–20.
54. Smith D.B., Inglis S.C. The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: an analytical review. *J. Gen. Virol.*, 1987, vol. 68, pt 11, pp. 2729–2740.
55. Tazulakhova E.B., Parshina O.V., Guseva T.S., Ershov F.I. Russian experience in screening, analysis, and clinical application of novel interferon inducers. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2001, vol. 21, no. 2, pp. 65–73.
56. Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012, vol. 76, no. 1, pp. 16–32.
57. Utsunomiya T., Kobayashi M., Pollard R.B., Suzuki F. Glycyrrhizin, an active component of licorice roots, reduces morbidity and mortality of mice infected with lethal doses of influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, vol. 41, no. 3, pp. 551–556.
58. Vavricka C.J., Li Q., Wu Y., Qi J., Wang M., Liu Y., Gao F., Liu J., Feng E., He J., Wang J., Liu H., Jiang H., Gao G.F. Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, e1002249.
59. Walsh K.B., Tejjaro J.R., Wilker P.R., Jatzek A., Fremgen D.M., Das S.C., Watanabe T., Hatta M., Shinya K., Suresh M., Kawaoka Y., Rosen H., Oldstone M.B. Suppression of cytokine storm with a sphingosine analog provides protection against pathogenic influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 29, pp. 12018–12023.
60. Warner T.D., Mitchell J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.*, 2004, vol. 18, pp. 790–804.
61. Wolkerstorfer A., Kurz H., Bachhofner N., Szolar O.H. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antivir Res.*, 2009, vol. 83, pp. 171–178.
62. Zheng B.J., Chan K.W., Lin Y.P., Zhao G.Y., Chan C., Zhang H.J., Chen H.L., Wong S.S., Lau S.K., Woo P.C., Chan K.H., Jin D.Y., Yuen K.Y. Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, no. 23, pp. 8091–8096.
63. Zhirnov O.P., Klenk H.D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis*, 2007, vol. 12, pp. 1419–1432.
64. Zhou Z., Jiang X., Liu D., Fan Z., Hu X., Yan J., Wang M., Gao G.F. Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy*, 2009, vol. 5, no. 3, pp. 321–328.