

REFERENCES

1. Lvov D.K., Gromashevskii V.L., Skvortsova T.M., Berezina L.K., Zakaryan V.A., Kondrashina N.G. et al. Kyzylagach virus (*Togaviridae, Alphavirus*) – a new arbovirus isolated from mosquitoes *Culex modestus*, collected in Azerbaydzhanskaya SSR. *Voprosy virusologii*. 1979; (5): 519–23. (in Russian)
2. Kyzylagach virus. In: Karabatsos N., ed. *International Catalogue of arboviruses and some others viruses of vertebrates*. San Antonio (Texas): American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985: 595–6.
3. *Kyzylagach State Reserve im. S.M. Kirova: to 50 years of reserve*. Baku: Azerbaydzhan state publishing house; 1979. (in Russian)
4. Lvov D.K. Arboviral zoonoses of Northern Eurasia (Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States). In: Beran G.W., ed. *Handbook of zoonoses. Section B: Viral*. Boca Raton, London, Tokyo: CRC Press; 1994: 237–60.
5. Powers A., Huang H., Roehrig J., Strauss E., Weaver S. Family *Togaviridae*. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus taxonomy. 9th Report of the International Committee on taxonomy of viruses*. London, San Diego: Elsevier Science; 2011: 1103–10.
6. Lvov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., Butenko A.M., Galkina I.V., Gromashevsky V.L. et al. *Atlas of distribution of natural-focal viruses infection on the territory of Russian Federation*. Moscow: Minzdrav RF; 2001. (in Russian)
7. Shchelkanov M.Yu., Gromashevsky V.L., Lvov D.K. The role of eco-ecological zoning in prediction of the influence of climatic changes on arbovirus habitats. *Vesnnik RAMN*. 2006; 2: 22–5. (in Russian)
8. Lvov D.K. Ecology of viruses. In: Lvov D.K., ed. *Handbook of virology. Viruses and viral infections of human and animals [Virusy i virusnye infektsii]*. Moscow: MIA; 2013: 66–86. (in Russian)
9. Kolobukhina L.V., Lvov D.N. Sindbis fever. In: Lvov D.K., ed. *Viruses and viral infections*. Moscow: MIA; 2013: 290–4. (in Russian)
10. Lvov D.K. Natural foci of arboviruses, related with the birds in USSR. In: Lvov D.K., Ilyichev V.D., eds. *Migration of the birds and transduction of contagium (Migratsii ptits i perenos vozбудителей инфекций)*. Moscow: Nauka; 1979: 37–101.
11. Lvov D.K., ed. *Organization of ecological-epidemiological monitoring in Russian Federation for anti-epidemic defense of the civilians and army*. Moscow: Minzdrav RF, The Federal Office of Biomedical and Extreme Problems, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology; 1993. (in Russian)
12. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22 (22): 4673–80.
13. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*. 2011; 28 (10): 2731–9.
14. Weaver S.C., Kang W., Shirako Y., Rumenapf T., Strauss E.G., Strauss J.H. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J. Virol*. 1997; 71 (1): 613–23.
15. Lundstrom J.O., Pfeffer M. Phylogeographic structure and evolutionary history of Sindbis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010; 10 (9): 889–907.
16. Sane J., Kurkela S., Putkuri N., Huhtamo E., Vaheri A., Vapalahti O. Complete coding sequence and molecular epidemiological analysis of Sindbis virus isolates from mosquitoes and humans, Finland. *J. Gen. Virol*. 2012; 93 (Pt 9): 1984–90.
17. Hubalek Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res*. 2008; 103 (Suppl. 1): S29–43.
18. Jost H., Bialonski A., Storch V., Gunther S., Becker N., Schmidt-Chanasit J. Isolation and phylogenetic analysis of Sindbis viruses from mosquitoes in Germany. *J. Clin. Microbiol*. 2010; 48 (5): 1900–3.
19. Shirako Y., Niklasson B., Dalrymple J.M., Strauss E.G., Strauss J.H. Structure of the Ockelbo virus genome and its relationship to other Sindbis viruses. *Virology*. 1991; 182 (2): 753–64.
20. Rumenapf T., Strauss E.G., Strauss J.H. Aura virus is a New World representative of Sindbis-like viruses. *Virology*. 1995; 208 (2): 621–33.
21. Liang G.D., Li L., Zhou G.L., Fu S.H., Li Q. P., Li F.S. et al. Isolation and complete nucleotide sequence of a Chinese Sindbis-like virus. *J. Gen. Virol*. 2000; 81 (Pt 5): 1347–51.

Received 26.10.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 615.281.8.03:616.98:578.832.1.076.9

Смирнов В.С.¹, Гаршинина А.В.², Штро А.А.², Аникин В.Б.², Галочкина А.В.², Беляевская С.В.², Зарубаев В.В.²

Протективная активность комбинации глутамил-триптофана и глицирризиновой кислоты при пероральном введении на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции у белых мышей, вызванной осельтамивирустойчивым штаммом вируса

¹ЗАО Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед», 191023, г. Санкт-Петербург, Россия; ²ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия

Вирус гриппа является ведущей причиной инфекционной респираторной патологии человека. Поиск и разработка новых противогриппозных препаратов широкого спектра активности – важная задача медицинской науки. Помимо собственно противовирусной активности соединений, большое значение имеет способ их использования. В настоящей работе изучена активность комбинации глутамил-триптофаном с глицирризиновой кислотой (препарат ГТГК) при пероральном применении в отношении осельтамивирустойчивого штамма вируса А/Владивосток/2/09 (H1N1) на модели летальной гриппозной инфекции у белых мышей. Показано, что пероральное применение ГТГК приводит к снижению специфической смертности животных (индекс защиты 43–50%), увеличению средней продолжительности жизни животных на 2,5–3,9 сут и снижению титров вируса в ткани легких на 1,5–1,9 lg EID₅₀/20 мг в зависимости от дозы вируса. Соответствующие показатели для препарата сравнения тамифлю составили 14–25%, 1,1–1,9 сут и 0,7 lg EID₅₀/20 мг. Применение ГТГК также приводило к достоверному повышению титров интерферона в крови инфицированных животных с 44,3 до 66,3 ед/мл. Результаты морфологического анализа показали, что курсовое пероральное введение ГТГК сопровождается нормализацией структуры ткани легких, ограничением признаков воспаления и цитодеструкции. Полученные данные позволяют рассматривать ГТГК как перспективное противогриппозное средство, активное в отношении лекарственно-устойчивых штаммов вируса и пригодное для перорального применения.

Ключевые слова: грипп; химиотерапия; глицирризиновая кислота; глутамил-триптофан; лекарственная устойчивость.

Для корреспонденции: Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, проф.; e-mail: vsmirnov@cytomed.ru
Correspondence to: Vyucheslav Smirnov, MD, PhD, DSc, prof., e-mail: vsmirnov@cytomed.ru

Anti-viral activity of a complex of the glycirrhysic acid–alpha-glutamyltryptophan against the experimental lethal influenza infection in white mice caused by the oseltamivir-resistant strain of the virus

Smirnov V. S.¹, Garshinina A. V.², Shtro A. A.², Anikin V. B.², Galochkina A. V.², Belyaevskaya S. V.², Zarubaev V. V.²

¹ Cytomed Ltd., 191023, St. Petersburg, Russia;

²Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Russia

Influenza virus is a leading causing factor of infectious respiratory human pathology. The search and development of novel anti-influenza drugs with a wide spectrum of activity is an important goal for medical science. In addition to specific anti-viral activity of the compound, its way of application is of great importance. In this work, we present the results of the study of the activity of a combination of glutamyl-tryptophan with glycirrhizic acid (GTGA) against oseltamivir-resistant strain of the virus A/Vladivostok/2/09 (H1N1) at per os application on the model of the lethal influenza infection in white mice. The application of the GTGA was shown to decrease the specific mortality of animals (index of protection 43-50%), to increase the mean day of death to 2.5-3.9 days, and to reduce the infectious titer of the virus in the lung tissue to 1.5-1.9 Ig EID₅₀/20 mg. The corresponding values for the reference compound oseltamivir were 14-25 %, 1.1-1.9 days and 0.7 Ig EID₅₀/20 mg, respectively, depending on the dose of the virus. The use of the GTGA also led to a reliable increase of the titers of interferon in the blood from 44.3 to 66.3 ME/mL. Morphological analysis revealed that GTGA lead to normalization of the structure of the lung tissue restricting the level of the cytodestruction and inflammation. The results obtained in this work allow the combination studied to be suggested as a promising anti-influenza drug that is active against the drug-resistant virus strains and can be applied orally.

Key words: *influenza; chemotherapy; glycirrhysic acid; glutamyltryptophan; drug resistance.*

Грипп представляет собой наиболее распространенную и опасную респираторную вирусную инфекцию. Он вызывает ежегодные эпидемии и пандемии, приводящие к значительному повышению уровня заболеваемости и смертности во всех регионах Земного шара [1]. Особую опасность этой инфекции придает способность возбудителя преодолевать межвидовой барьер между животными и человеком, что на протяжении последнего десятилетия привело к вспышкам заболевания, вызванного высокопатогенными вирусами H5N1, H7N7, H7N9, а также к пандемии 2009 г., вызванной вирусом H1N1pdm09.

Согласно современным представлениям, терапия гриппозной инфекции направлена, во-первых, на элиминацию патогена из организма, во-вторых, на купирование реактивных процессов. К первой группе относятся препараты, действующие непосредственно на вирус. Имеются две основные группы подобных соединений – блокаторы ионного канала и ингибиторы вирусной нейраминидазы. Первая группа представлена препаратами ремантадин (α -метил-1-адамантил-метиламина гидрохлорид) и амантадин (1-аминоадамантан) [2]. Ко второй группе относятся занамивир, осельтамивир (тамифлю), перамивир и ланинамивир [3]. Известен также препарат Т-705 (фавипиравир), являющийся нуклеозидным аналогом, блокирующим вирусную полимеразу и обладающий широким спектром противовирусной активности [4], который проходит в настоящее время 3-ю фазу клинических испытаний в Японии.

Помимо побочных действий, присущих каждому препарату, следует отметить быстрое формирование к нему вирусной устойчивости [5]. Кроме того, важное место при разработке новых противовирусных соединений и лекарственных форм занимает проблема биодоступности. Так, сравнивая два ингибитора нейраминидазы, зарегистрированных в России, следует сказать, что занамивир обладает преимуществом перед осельтамивиром в том смысле, что устойчивость к нему вирусов гриппа формируется реже и спектр ее не перекрывается с таким для осельтамивира. Штаммы, устойчивые к осельтамивиру, чувствительны к занамивиру. Тем не менее низкая биодоступность ограничивает его применение в клинике и делает эффективным лишь аэрозольный путь использования [5, 6].

Инфекционный процесс – это всегда процесс взаи-

модействия паразита и хозяина, и по мере развития вирусной инфекции все большую роль начинает играть реакция организма, развивающаяся в ответ на репликацию вируса и его влияние на систему врожденного иммунитета. Так, вирусы гриппа способны вызывать неадекватный воспалительный ответ со стороны хозяина, известный как "цитокиновый штурм", характерными признаками которого являются высокий уровень провоспалительных цитокинов, массивная инфильтрация и отек легких [7]. Именно "цитокиновый штурм" и связанные с ним поражения респираторной системы были ведущими причинами летальных исходов при всех известных пандемиях гриппа, начиная с «испанского» гриппа 1918 г. [8, 9]. Применение указанных выше противовирусных средств способно предотвратить фатальное развитие инфекции или по крайней мере снизить тяжесть течения заболевания, но только в том случае, когда такие средства больному назначают в раннем периоде заболевания, как правило, не позднее 48–72 ч с момента появления первых клинических признаков заболевания [10, 11].

Для гашения "цитокинового штурма" и сопутствующих ему поражений в респираторном тракте уже на ранних стадиях заболевания необходимо применять препараты иммуномодулирующей направленности, воздействующие на факторы врожденного иммунитета хозяина и на процессы взаимодействия организма и вируса [12]. С этой целью используют широкий спектр препаратов разной химической природы, в частности ингибиторы циклооксигеназы (месалазин, целеококсиб), глюкокортикоиды (дексаметазон, триамцинолон), агонисты PPAR-рецепторов (гемифиброзил, пиоглитазон), агонисты толл-подобных рецепторов (эриторан, поли (И:Ц), глицирризиновая кислота) [12–14].

Последнее соединение представляет особый интерес в качестве средства, обладающего способностью влиять на широкий круг регуляторных реакций, которые обеспечивают направление и исход инфекционного процесса [13]. Показано, что глицирризиновая кислота блокирует такой медиатор воспаления, как высокомобильный групповой белок 1 [12], подавляет активацию фактора трансляции NF-кБ [13], увеличивает ригидность клеточных мембран, затрудняя таким образом образование поры слияния [15]. В работе T. Utsunomiya и соавт. [16] показано, что глицирризиновая кислота способна эффективно

защищать мышей от острой летальной инфекции, вызванной вирусом гриппа А (H2N2). M. Michaelis и соавт. [17] продемонстрировали, что глициризиновая кислота ингибирует выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов в макрофагах, инфицированных высокопатогенным вирусом гриппа H5N1. Ранее нами отмечена высокая протективная активность комбинации дипептида глутамил-триптофана с глициризиновой кислотой (ГТГК) при гриппозной инфекции у белых мышей при внутрибрюшинном способе применения [18]. Цель настоящего исследования – оценить влияние комбинации глициризиновой кислоты с глутамил-триптофаном на течение острой экспериментальной инфекции, вызванной *in vivo* вирусом гриппа, устойчивым к осельтамивиру, при пероральном способе применения.

Материалы и методы

Препараты. В работе использовали комбинацию субстанций глициризиновой кислоты, тринатриевой соли и глутамил-триптофана натриевой соли. Аликвоты препаратов разводили в среде для клеточных культур Игла МЕМ («БиоЛоТ», Санкт-Петербург, кат. № 1.3.3). Из полученного раствора готовили необходимые разведения на среде МЕМ для эксперимента на животных. В качестве референс-препарата использовали тамифлю (осельтамивира фосфат; LaRoche, Швейцария).

Вирусы. Использовали адаптированный к мышам вирус гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1). Устойчивость вируса к осельтамивиру ранее выявлена как неспособность осельтамивира снижать активность нейраминидазы в хемилиюминесцентном тесте и наличие аминокислотной замены N274Y, обнаруженной при помощи секвенирования гена вирусной нейраминидазы. Вирус пассировали в аллантоисной полости 10–12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36°C в присутствии 10 мкг/мл осельтамивира.

Животные. Белых беспородных мышей (самки) массой 12–16 г получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и содержали на стандартном рационе в условиях вивария ФГБУ «НИИ гриппа». Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животные находились под наблюдением 1 нед.

Экспериментальная гриппозная инфекция. Для заражения животных использовали вируссодержащую аллантоисную жидкость куриных эмбрионов. Из нее готовили серию 10-кратных разведений на физиологическом растворе, после чего инфекционную активность вируса в заражающем материале определяли в отдельном эксперименте при помощи титрования по летальности на животных. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [19].

Исследуемые препараты вводили животным перорально через желудочный зонд в объеме 0,2 мл 1 раз в сутки в течение 5 дней начиная с 1-х суток после инфицирования животных. Разовые дозы составили: глутамил-триптофана 3 мг на 1 кг массы мыши; глициризиновой кислоты 30 мг на 1 кг массы тела соответственно. Препарат сравнения применяли по той же схеме. В качестве плацебо животным контрольной группы вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и подопытные.

Вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в количестве 1 LD₅₀ (45 мышей на группу) и 10 LD₅₀ (25 мышей на группу). На 3-и сутки после заражения 20 животных из группы, зараженной 1 LD₅₀, и 10 животных из группы, зараженной 10 LD₅₀, умерщвляли, вскрывали и у 10 животных из каждой

группы изолировали легкие. У 10 животных из группы, зараженной дозой вируса 1 LD₅₀, собирали кровь из сонной артерии и готовили сыворотку для последующего титрования интерферона. Из изолированных легких 5 использовали для выделения вируса (замораживали и хранили при -20°C до постановки соответствующих экспериментов), оставшиеся 5 фиксировали 10% забуференным формалином и использовали для гистологического анализа. Легкие животных, инфицированных вирусом в дозе 10 LD₅₀, использовали только для выделения вируса. На 6-е сутки после заражения по 5 животных из групп, зараженных дозой вируса 1 LD₅₀, вскрывали и использовали легкие для гистологического анализа.

Наблюдение за оставшимися животными осуществляли в течение 14 дней, т.е. срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается смертность животных. Ежедневно фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных показателей смертности в каждой группе рассчитывали процент смертности (M, отношение числа павших за 14 дней животных к общему числу зараженных животных в группе), индекс защиты (IP, отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных из расчета 14 дней наблюдения в соответствии со следующими формулами:

$$SPJ = (\Sigma N D) / Nt,$$

где N – количество животных, проживших D дней; Nt – общее число животных в группе;

$$M = M/Nt,$$

где M – число животных в группе, павших в течение 14 дней после заражения;

$$IP = ((Mc-Me)/Mc) \cdot 100\%,$$

где Mc и Me – смертность в процентах в контрольной и опытной группах соответственно.

Титрование вируса в легочной ткани. Для определения инфекционного титра вируса гриппа в легочной ткани животных легкие мышей, извлеченные на 3-и сутки после инфицирования, гомогенизировали в 10-кратном объеме стерильного физиологического фосфатного буфера и готовили из гомогенатов серию 10-кратных разведений на том же буфере. При определении титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK (ATCC# CCL-34), выращенных на 96-луночных панелях на среде МЕМ. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями гомогенатов легких от 10⁰ до 10⁻⁷ и инкубировали в термостате в течение 48 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе.

Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) эритроцитов. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную РГА, и выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы (Ig ЭИД₅₀) вируса.

Гистологический анализ. Для морфологического исследования легкие фиксировали 10% формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, проводили через хлороформ, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксиолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилином и эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезвоживали

Таблица 1

Изменения в динамике уровня смертности животных в ходе гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1), в условиях применения химиопрепаратов

| Препарат | Доза вируса | СПЖ, сут | Смертность, % | Индекс защиты, % | Увеличение СПЖ, сут |
|--------------------|-------------|----------|---------------|------------------|---------------------|
| ГТГК | 1 | 13,2 | 26,7 | 50,0 | 2,5 |
| | 10 | 11,0 | 53,3 | 42,9 | 3,9 |
| | Сумма доз | 12,1 | 40,0 | 45,5 | 3,2 |
| Тамифлю | 1 | 11,7 | 40,0 | 25,0 | 1,1 |
| | 10 | 9,0 | 80,0 | 14,3 | 1,9 |
| | Сумма доз | 10,4 | 60,0 | 18,2 | 1,5 |
| Плацебо (контроль) | 1 | 10,7 | 53,3 | — | 0 |
| | 10 | 7,1 | 93,3 | — | 0 |
| | Сумма доз | 8,9 | 73,3 | — | 0 |

ли в спиртах нарастающей концентрации, проводили через две смены ксиолола и заключали в бальзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах пневмонии, а также степень дегенеративных и пролиферативных процессов в ткани легких.

Титрование активности интерферона. На 3-и сутки после заражения по 5 животных из каждой группы обескровливали. Образцы крови собирали в 1,5 мл полипропиленовые пробирки, центрифугировали в течение 20 мин при 5000 об/мин в настольной центрифуге и отбирали сыворотку. Сыворотку хранили при -20°C до постановки соответствующих экспериментов.

В качестве индикаторного вируса использовали вирус везикулярного стоматита, штамм Индиана (VSV). Для подготовки инфицирующего материала вирус размножали в культуре клеток L-41. Для этого 2-3-суточный монослоистый клеток заражали вирусом в количестве 10–100 ЦТД₅₀/мл. Клетки инкубировали до полной деструкции монослоя (24–48 ч) при 37°C в атмосфере 5% CO₂, после чего выдерживали 1 сут при 4°C. Культуральную жидкость отбирали, центрифугировали 15–20 мин в настольной центрифуге при 3000 об/мин и после определения инфекционной активности подвергали лиофильному высушиванию.

Для определения инфекционной активности вируса готовили серию 10-кратных разведений вируссодержащего материала. Разведения VSV вносили по 0,2 мл на монослоистые клетки L-41 в микропланшетах. Планшеты выдерживали 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Цитопатические изменения учитывали под микроскопом. По степени сохранности монослоя клеток определяли 50% цитотоксическую дозу вируса, т.е. дозу, вызывающую за этот период деструкцию 50% клеток в лунке.

Для изучения протективных свойств образцов сыворотки из них готовили серию двукратных разведений от 1:5 до 1:2560. Клетки линии L-929 (фибросаркома мыши, ATCC CRL-2148) выращивали в 96-луночных планшетах (Costar, США) до состояния монослоя на среде МЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург).

Клетки L-929 инкубировали с разведениями исследуемой мышиной сыворотки в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. По истечении этого

срока клетки отмывали средой МЕМ и добавляли среду МЕМ, содержащую 100 ЦТД₅₀/лунка VSV. Микропланшеты вновь помещали в термостат на 24 ч. После этого из микропланшетов удаляли среду и окрашивали клетки 0,1% водным раствором кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 30 мин. Краситель экстрагировали из клеток 30% этанолом в течение 30 мин при 37°C, после чего оптическую плотность в лунках планшета измеряли на планшетном ридере для иммуноферментного анализа Victor 1420 (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны 590 нм. За титр интерферона принимали величину, обратную наибольшему разведению исходной сыворотки, при котором сохранялось 50% клеточного монослоя.

Статистическая обработка данных. Нормальность распределения величин проводили при помощи критерия Колмогорова–Смирнова в пакете программ Statistica 8.0. Статистическую обработку результатов (расчет средних значений и ошибки среднего) проводили при помощи программы Microsoft Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (Microsoft Excel) в случае нормально распределенных величин и критерия Манна–Уитни (Statistica 8.0) при распределении, отличном от нормального. Достоверными считали различия между группами, если p не превышал 0,05.

Результаты

Протективная активность препаратов в опытах на животных. В ходе опыта по определению протективной активности изученных препаратов на животных не отметили неспецифической смертности в контрольной группе интактных животных.

Клинические признаки заболевания были типичными для гриппозной инфекции. Они включали затрудненное дыхание, атаксию, тремор, а также снижение потребления корма и воды.

Данные о динамике уровня смертности животных в контрольных и опытных группах суммированы в табл. 1.

Показано, что инфицирование приводило к дозозависимой смертности животных в группах опыта начиная с 3-х суток после инфицирования. Применение препарата сравнения тамифлю не сопровождалось снижением уровня смертности животных (индексы защиты 14–25% в зависимости от дозы вируса), что свидетельствует об устойчивости использованного штамма вируса к осельтамивиру. Использование комбинации ГТГК приводило к повышению выживаемости животных по сравнению с таковой в контрольной группе. Индекс защиты при этом составил 43–50% в зависимости от дозы вируса. Одновременно увеличивался показатель СПЖ на 2,5–3,9 сут в зависимости от дозы вируса. У животных, получавших тамифлю, достоверного увеличения СПЖ относительно плацебо практически не наблюдали.

Таблица 2

Инфекционная активность вируса гриппа в ткани легких белых мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1), в условиях применения исследованных препаратов

| Препарат | Титр вируса (lg EID ₅₀ /20 мг ткани) при заражающей дозе вируса | |
|--------------------|--|---------------------|
| | 1 LD ₅₀ | 10 LD ₅₀ |
| ГТГК | 2,7 ± 0,2* | 3,6 ± 0,3* |
| Тамифлю | 3,9 ± 0,3 | 4,4 ± 0,2 |
| Плацебо (контроль) | 4,6 ± 0,4 | 5,1 ± 0,4 |

П р и м е ч а н и е . * – значения, отличия которых от контроля достоверны при $p < 0,05$.

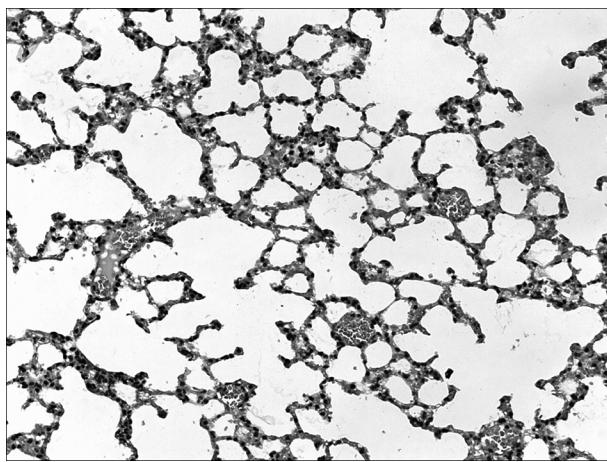


Рис. 1. Легкие интактной мыши. Поражения эпителия и воспалительные инфильтраты отсутствуют, межальвеолярные перегородки тонкие.

Здесь и на рис. 2, 3: окраска гематоксилином и эозином. Ув. 240.

Влияние препаратов на репродукцию вируса гриппа в организме животных. На следующем этапе исследования изучали влияние комплекса ГТГК на репликативную активность вируса гриппа в ткани легких инфицированных животных. С этой целью из легких животных на 3-и сутки после заражения приготовили гомогенаты, в которых затем определяли инфекционный титр вируса в культуре клеток.

Данные об уровне репликации модельного вируса гриппа в организме животных приведены в табл. 2.

Как видно из приведенных результатов, модельный вирус размножался в легочной ткани мышей до титров

4,6–5,1 \log_{10} EID₅₀/20 мг ткани в зависимости от инфицирующей дозы. Применение тамифлю не приводило к существенному снижению уровня репродукции вируса, тогда как при использовании ГТГК отмечали достоверное снижение инфекционной активности вируса. Полученные данные согласуются с профилем лекарственной устойчивости модельного вируса, использованного в эксперименте, а также с данными, полученными в эксперименте по смертности животных.

Влияние препаратов на морфогенез экспериментальной гриппозной инфекции у животных. На следующем этапе исследований изучали особенности морфогенеза гриппозной инфекции в организме животных в условиях применения исследуемых препаратов.

Легкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, его клетки выглядели интактными – в них не отмечали признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических включений. В просветах бронхов не выявили экссудата и клеточного дегрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели воздушными, альвеолярные стенки не утолщены, из клеток инфильтрата в легочной паренхиме отмечали отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаружили (рис. 1).

У зараженных животных, не получавших лечения, морфологические изменения легочной ткани на 3-и сутки после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений нейтрофилов и клеточного дегрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением по-

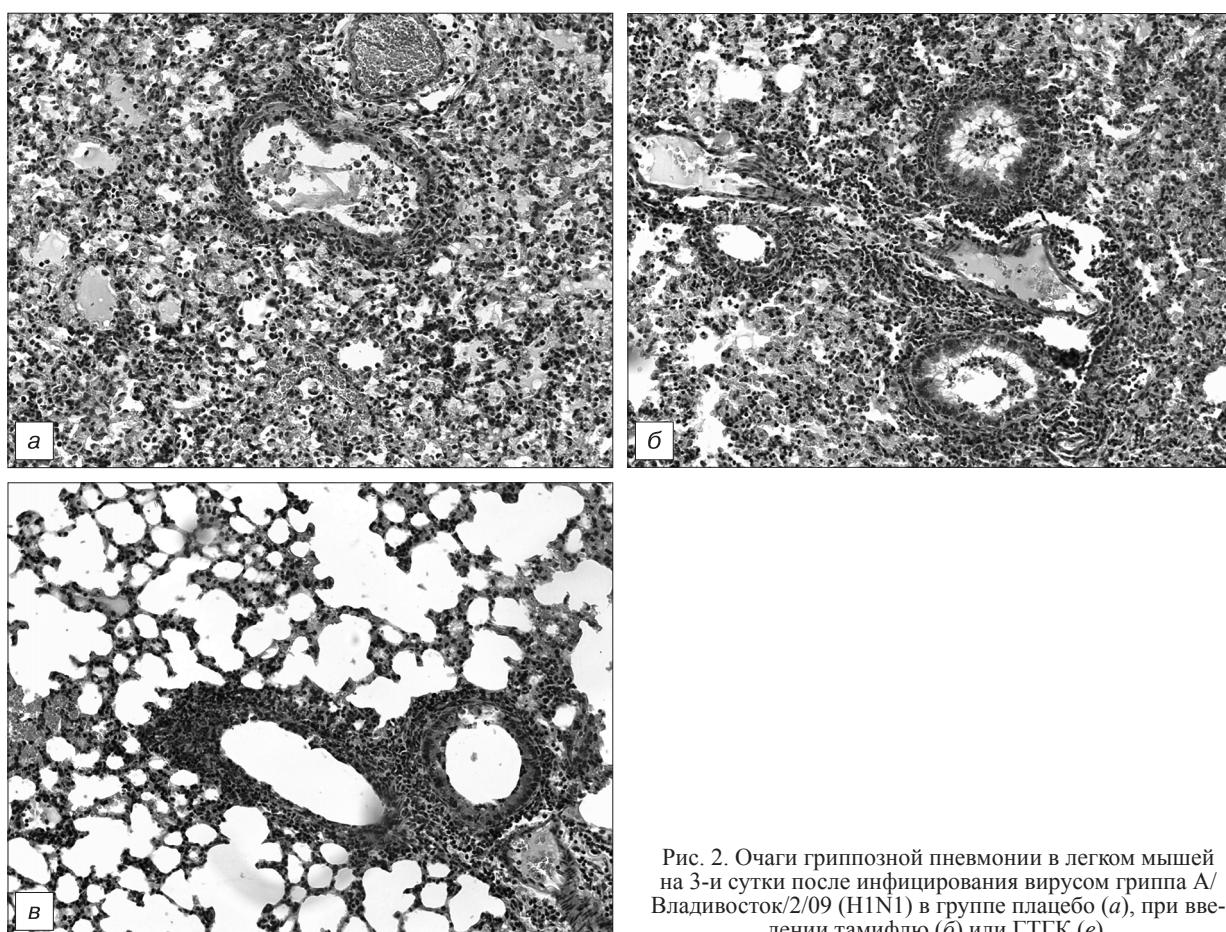


Рис. 2. Очаги гриппозной пневмонии в легком мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа A/Владивосток/2/09 (H1N1) в группе плацебо (а), при введении тамифлю (б) или ГТГК (в).

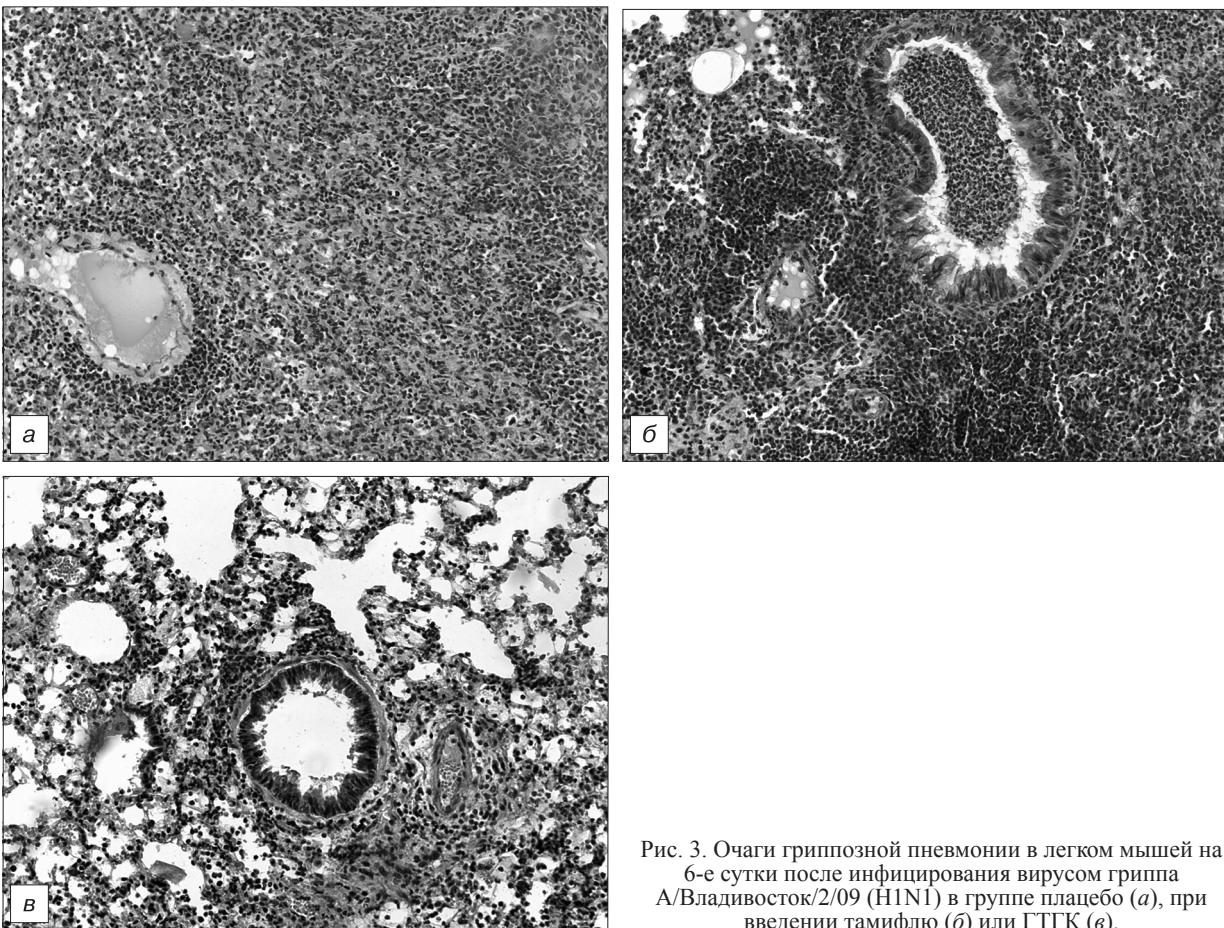


Рис. 3. Очаги гриппозной пневмонии в легком мышей на 6-е сутки после инфицирования вирусом гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1) в группе плацебо (a), при введении тамифлю (б) или ГТГК (в).

раженных клеток в просвет бронха. Базальная мембрана при этом обнажалась, что способствовало повышению ее проницаемости и миграции в просвет бронхов и альвеол клеточных элементов. Эти процессы приводили к интенсивному серозному интерстициальному отеку, появление очагов геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширению сосудов и спадению альвеол (рис. 2, a). К 6-м суткам полиморфно-ядерный экссудат частично замещался круглоклеточным, тогда как в целом процессы воспалительной инфильтрации достигали своего пика (рис. 3, a). Просветы альвеол были целиком заполнены клетками, межальвеолярные перегородки выглядели утолщенными и отечными. Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии, и степень их выраженности, в частности степень дегенерации клеток бронхиального эпителия и воспалительной инфильтрации, может служить критерием для оценки тяжести процесса.

При использовании ГТГК отличия морфологической структуры легких животных, прошедших лечение, от таковых в контрольных группах были сходными. Основное отличие от группы животных, не получавших лечения, заключалось в ограничении признаков вирусспецифического и реактивного поражения ткани легких на острой стадии гриппозной пневмонии. Как на 3-и, так и на 6-е сутки после инфицирования клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными (рис. 2, в, 3, в) в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у животных контрольной группы (плацебо). Сами очаги воспаления занимали меньшую площадь по сравнению с таковой в контроле. В то же время препарат сравнения тамифлю не приводил к существенному улучшению архитектоники легких (рис.

2, б, 3, б), что подтверждает данные об устойчивости использованного модельного штамма к осельтамивиру.

Влияние препаратов на содержание интерферона в сыворотке крови животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции. Для комплексной оценки протективной активности ГТГК провели титрование активности интерферона в сыворотке крови животных при помощи биологического метода. Результаты суммированы в табл. 3.

Как следует из представленных в табл. 3 данных, интактные животные имели в крови очень малое количество активного интерферона. Инфицирование осельтамивирустойчивым вирусом гриппа приводило через 3 сут к 20-кратному возрастанию этого показателя. При использовании тамифлю индукция интерферона была выражена несколько слабее, чем у инфицированных животных, не получавших препаратов, однако разница в титрах интерферона не достигала достоверных значений, что, возможно, обусловлено устойчивостью использованного штамма к тамифлю. У животных, полу-

Таблица 3

Активность интерферона в сыворотке крови мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Владивосток/02/09 (H1N1), в условиях применения химиопрепаратов

| Препарат | Титр интерферона, МЕ/мл | p |
|--------------------|-------------------------|-------|
| ГТГК | $66,3 \pm 4,2$ | 0,000 |
| Тамифлю | $38,5 \pm 3,0$ | 0,249 |
| Плацебо (контроль) | $44,3 \pm 3,7$ | 1,000 |
| Интактные животные | $3,4 \pm 0,7$ | 0,000 |

Причина . p – коэффициент Стьюдента при сравнении с показателями в группе контроля вируса.

чавших ГТГК, титры интерферона были примерно на 50% выше, чем у животных, не получавших лечения. Полученные данные позволяют предполагать наличие у изучаемого препарата способности к активации врожденного иммунитета, обусловливающей его протективные свойства при гриппозной инфекции.

Обсуждение

В результате проведенного исследования продемонстрирована активность комбинации ГТГК при пероральном применении на модели летальной гриппозной пневмонии, вызванной осельтамивирустойчивым штаммом вируса гриппа. Показано, что такая комбинация обладает протективной активностью на использованной модели, снижая уровень смертности животных на 46% по сравнению с таковой в группе плацебо. При этом повышение продолжительности жизни и снижение уровня специфической смертности сопровождались снижением инфекционной активности вируса гриппа в легочной ткани животных, а также нормализацией морфологической структуры легочной ткани на 3-и и 6-е сутки развития гриппозной пневмонии. Это проявлялось ограничением протяженности очагов пневмонии, снижением степени отека легких и воспалительной клеточной инфильтрации ткани. Кроме того, отмечена иммуномодулирующая активность ГТГК, проявляющаяся выраженной стимуляцией синтеза интерферона у инфицированных животных.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при пероральном применении ГТГК сохраняет как противовирусную, так и иммуномодулирующую активность, показанную ранее при внутрибрюшинном введении [16, 18]. Вопрос о конкретной лекарственной форме противовирусного препарата стоит особенно остро, когда речь идет о средстве, предназначенном для широкого использования в клинике. В ранее проведенных исследованиях установлено, что дипептид глутамил-триптофана, помимо иммуномодулирующих, проявляет ранозаживляющие свойства [20], что может быть свидетельством его воздействия на базовые механизмы регуляции клеточного цикла. В работе W. Rose и соавт. [21] описана противовирусная активность глутамил-триптофана в отношении герпетической инфекции у животных, причем этот препарат проявлял активность при пероральном, но не при подкожном использовании. Это может свидетельствовать о том, что метаболизм дипептида играет роль в проявлении его протективных свойств. В то же время в наших опытах активность ГТГК при пероральном применении оказалась несколько ниже, чем при внутрибрюшинном [18]. Это можно объяснить различиями в патогенезе герпетической и гриппозной инфекции, различными ключевыми точками, воздействие на которые имеет максимальные последствия для патологического процесса, а также присутствием в составе ГТГК второго компонента – глицирризиновой кислоты, активность которой может изменять акценты в механизме действия комплексного препарата по сравнению с монопрепаратами.

Показано также, что глутамил-триптофан усиливает противовирусное действие 2-бензил-бензимидазола гидрохlorида (бендалоз) [22]. Комбинированный препарат цитовир-3, включающий глутамил-триптофан, бендалоз и аскорбиновую кислоту, успешно применяется в качестве средства экстренной профилактики и раннего лечения острых респираторных вирусных инфекций и гриппа [23].

Таким образом, сочетание глутамил-триптофана с другими иммуномодулирующими соединениями, и в частности с глицирризиновой кислотой, открывает новые перспективы раннего и, возможно, отсроченного лечения острых респираторных вирусных инфекций и гриппа. Особый интерес представляет выявленная

в данном исследовании эффективность комбинации глутамил-триптофана и глицирризиновой кислоты при пероральном применении на фоне гриппа, вызванного вирусом, который резистентен к ингибитору нейраминидазы – осельтамивирусу.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahmed R., Oldstone M.B., Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 1188–93.
- Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res.* 1998; 37: 83–95.
- Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. *MMWR Recomm. Rep.* 2011; 60(1): 1–24.
- Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* 2009; 82: 95–102.
- Hauge S.H., Dudman S., Borgen K. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 155–62.
- Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.* 2013; 98: 174–85.
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P. et al. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76: 16–32.
- Kumar A., Zarychanski R., Pinto R. et al. Critically ill patients with 2009 influenza A (H1N1) infection in Canada. *JAMA.* 2009; 302: 1872.
- Perrone L.A., Plowden J.K., Garcia-Sastre A. et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000115. doi: 10.1371/journal.ppat.1000115.
- Aoki F.Y., Macleod M.D., Paggiaro P. et al. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51(1): 123–9.
- Kandun I.N., Tresnaningsih E., Purba W.H. et al. Factors associated with case fatality of human H5N1 virus infections in Indonesia: a case series. *Lancet.* 2008; 372(9640): 744–9.
- Darwish I., Mubareka S., Liles W. C. Immunomodulatory therapy for severe influenza. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011; 9(7): 807–22.
- Schröfelbauer B., Raffetseder J., Hauner M. et al. Glycyrrhizin, the main active compound in licorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling. *Biochem. J.* 2009; 421: 473–82.
- Tuvim M.J., Gilbert B.E., Dickey B.F., Evans S.E. Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia. *PLoS One.* 2012; 7(1): e30596. doi: 10.1371/journal.pone.0030596.
- Harada S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem. J.* 2005; 392: 191–9.
- 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; 41(3): 551–6.
- Michaelis M., Geiler J., Naczk P. et al. Glycyrrhizin inhibits highly pathogenic H5N1 influenza A virus-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010; 199 (4): 291–7.
- Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штрод А.А. Влияние комбинации глутамил-триптофана с глицирризиновой кислотой на течение острой инфекции у мышей, вызванной вирусом гриппа (H3N2). *Вопросы вирусологии.* 2012; 3: 23–7.
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
- Alterovitz G., Tuthill C., Rios I., Modelska K., Sonis S. Personalized medicine for mucositis: Bayesian networks identify unique gene clusters which predict the response to gamma-D-glutamyl-L-tryptophan (SCV-07) for the attenuation of chemoradiation-induced oral mucositis. *Oral Oncol.* 2011; 47(10): 951–5.
- Rose W.A. 2nd, Tuthill C., Pyle R.B. An immunomodulating dipeptide, SCV-07, is a potential therapeutic for recurrent genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 32: 262–6.
- Смирнов В.С., Селиванов А.А. Биорегуляторы в профилактике и лечении гриппа. СПб.: Наука; 1996. 69 р.
- Смирнов В.С. *Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций.* СПб.: АЙСИНГ; 2010.

Поступила 16.09.13

REFERENCES

- Ahmed R., Oldstone M.B., Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat. Immunol.* 2007; 8: 1188–93.
- Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res.* 1998; 37: 83–95.
- Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. *MMWR Recomm. Rep.* 2011; 60(1): 1–24.
- Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* 2009; 82: 95–102.
- Hauge S.H., Dudman S., Borgen K. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15: 155–62.
- Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.* 2013; 98: 174–85.
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P. et al. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76: 16–32.
- Kumar A., Zarychanski R., Pinto R. et al. Critically ill patients with 2009 influenza A (H1N1) infection in Canada. *JAMA.* 2009; 302: 1872.
- Perrone L.A., Plowden J.K., Garcia-Sastre A. et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000115. doi: 10.1371/journal.ppat.1000115
- Aoki F.Y., Macleod M.D., Paggiaro P. et al. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 51(1): 123–9.
- Kandun I.N., Tresnaningsih E., Purba W.H. et al. Factors associated with case fatality of human H5N1 virus infections in Indonesia: a case series. *Lancet.* 2008; 372(9640): 744–9.
- Darwish I., Mubareka S., Liles W.C. Immunomodulatory therapy for severe influenza. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2011; 9(7): 807–22.
- Schröfelbauer B., Raffetseder J., Hauner M. et al. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling. *Biochem. J.* 2009; 421: 473–82.
- Tuvim M.J., Gilbert B.E., Dickey B.F., Evans S.E. Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia. *PLoS One.* 2012; 7(1): e30596. doi: 10.1371/journal.pone.0030596.
- Harada S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem. J.* 2005; 392: 191–9.
- 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; 41(3): 551–6.
- Michaelis M., Geiler J., Naczk P. et al. Glycyrrhizin inhibits highly pathogenic H5N1 influenza A virus-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 2010; 199 (4): 291–7.
- Smirnov V.S., Zarubaev V.V., Anfimov P.M., Shtro A.A. 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.* 2012; 57(3): 23–7. (in Russian)
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
- Alterovitz G., Tuthill C., Rios I., Modelska K., Sonis S. Personalized medicine for mucositis: Bayesian networks identify unique gene clusters which predict the response to gamma-D-glutamyl-L-tryptophan (SCV-07) for the attenuation of chemoradiation-induced oral mucositis. *Oral Oncol.* 2011; 47(10): 951–5.
- Rose W.A. 2nd, Tuthill C., Pyles R.B. An immunomodulating dipeptide, SCV-07, is a potential therapeutic for recurrent genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 32: 262–6.
- Smirnov V.S., Selivanov A.A. *Bioregulators in prophylaxis and treatment of influenza.* Sankt-Petersburg: Nauka; 1996. 69 p. (in Russian)
- Smirnov V.S. *Prophylaxis and treatment of influenza and acute respiratory viral infections.* Sankt-Petersburg: AYSING; 2010. (in Russian)

Received 16.09.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 578.833.26.083.2

Белова О.А.^{1,2}, Буренкова Л.А.¹, Карань Л.С.³, Колясникова Н.М.^{1,3}, Топычканова Н.Г.⁴, Кувшинова И.Н.⁴,
Тимофеев Д.И.⁴, Рукавишников М.Ю.⁴, Гришаев М.П.⁴, Карганова Г.Г.^{1,2}

Эффективность детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах (*Acari: Ixodidae*) с помощью иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции в реальном времени

¹ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН, 142782, г. Москва; ²Биологический факультет
МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва; ³ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва;

⁴ЗАО «Вектор-Бест», 630117, г. Новосибирск

Согласно данным Роспотребнадзора, иммуноферментный анализ (ИФА) выявляет вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) в клещах значительно чаще, чем полимеразная цепная реакция (ПЦР). Цель работы – сравнить эффективность обнаружения ВКЭ в иксодовых клещах разных видов с помощью коммерческих наборов на основе ИФА и ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы. Клещи пяти видов были парентерально заражены ВКЭ европейского или сибирского подтипа. Из зараженных и незараженных особей составляли зашифрованные серии и в слепом эксперименте анализировали их на наличие ВКЭ с использованием наборов реагентов на основе ИФА и ПЦР-РВ.

Результаты. Эффективность детекции ВКЭ обоими методами не зависела от пола, вида клеща и его степени насыщенности кровью. Наборы на основе ИФА оказались менее чувствительными, чем на основе ПЦР-РВ. Отмечена зависимость чувствительности ИФА от подтипа ВКЭ. Наличие ложноположительных реакций и чувствительность ИФА зависели от протокола проведения анализа.

Заключение. Вопрос о причинах расхождения данных по вирусофорности клещей из природы и снятых с людей, полученных разными методами, остается дискуссионным.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; иксодовые клещи; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция в реальном времени; вирусофорность клещей.

Для корреспонденции: Белова Оксана Андреевна, науч. сотр.; e-mail: mikasusha@bk.ru
Correspondence to: Oksana Belova, research associate; e-mail: mikasusha@bk.ru