

*В.С. Смирнов¹, А.В. Гаршинина², В.М. Гусева², Н.А. Калинина², А.А. Штро², С.В. Беляевская², В.Б. Аникин²,
В.В. Зарубаев²*

Противовирусная активность комплекса глицирризиновая кислота–глутамил-триптофан при экспериментальной летальной гриппозной инфекции у белых мышей, вызванной озельтамивирустойчивым штаммом вируса

¹ЗАО Медико-биологический НПК "Цитомед", 191023, Санкт-Петербург; ²ФГБУ "НИИ гриппа" Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург

Вирус гриппа является ведущей причиной инфекционной респираторной патологии человека. Способность к антигенной изменчивости и выработке лекарственной устойчивости делают актуальными поиск и разработку новых противогриппозных препаратов широкого спектра активности. В настоящей работе изучена активность комбинации глицирризиновой кислоты с дипептидом – глутамил-триптофаном (препарат орвилакс) в отношении озельтамивирустойчивого штамма вируса А/Владивосток/2/09(H1N1) на модели летальной гриппозной инфекции у белых мышей. Показано, что применение орвилакса в виде монопрепарата и комбинации с озельтамивиром приводит к снижению специфической смертности животных (индекс защиты 39–67% в зависимости от дозы вируса и сочетания препаратов), увеличению средней продолжительности жизни животных на 3,7–5 сут и снижению титров вируса в ткани легких на 1,3 lg EID₅₀/20 мг. Соответствующие показатели для препарата сравнения тамифлю составили 8–11%, 0,5–1,5 сут и 0,6 lg EID₅₀/20 мг. Применение орвилакса также приводило к достоверному повышению титров интерферона в крови инфицированных животных с 30,4 до 56,5 ед/мл. Полученные данные позволяют рассматривать орвилакс как перспективное противогриппозное средство, активное в отношении лекарственно-устойчивых штаммов вируса.

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

*V. S. Smirnov¹, A. V. Garshinina², V. M. Guseva², N. A. Kalinina², A. A. Shtro², S. V. Belyaevskaya²,
V. B. Anikin², V. V. Zarubaev²*

The anti-viral activity of the complex glycyrrhizic acid–alpha-glutamyl-tryptophan against Experimental lethal influenza infection in white Mice caused by oseltamivir-resistant strain of the virus

¹Cytomed, Ltd., St. Petersburg, Russia; ²Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Influenza virus is a leading causing factor of infectious respiratory human pathology. The ability to implement the antigenic drift and development of drug resistance makes it important to develop novel anti-influenza drugs of wide spectrum of activity. In this work, we present the results of the study of the activity of a combination of glycyrrhizic acid with dipeptide alpha-glutamyl-tryptophan against oseltamivir-resistant strain of the virus A/Vladivostok/2/09 (H1N1) on the model of lethal influenza infection in white mice. Application of Orvilax was shown to decrease the specific mortality of animals (index of protection 39-67% depending on the dose of the virus and drugs combination), to increase the mean day of death to 3.7-5.0 days and decrease the infectious titer of the virus in lung tissue to 1.3 lg EID₅₀/20 mg. The corresponding figures for the reference compound Tamiflu were 8-11%, 0.5-1.5 days, and 0.6 lg EID₅₀/20 mg. The use of Orvilax also led to reliable increase of the titers of interferon in the blood from 30.4 to 56.5 ME/mL. The results obtained allow the drug to be considered as a promising anti-influenza remedy that is active against the drug-resistant virus strains.

Key words: *influenza; chemotherapy; glycyrrhizic acid; glutamyl-tryptophan; drug resistance.*

Введение

Грипп представляет собой наиболее распространенную и опасную респираторную вирусную инфекцию. Он вызывает ежегодные эпидемии и пандемии, приводящие к значительному повышению заболеваемости и смертности во всех регионах Земного шара [3]. В связи с высокой генетической изменчивостью грипп остается трудно контролируемой инфекцией, несмотря на успехи, достигнутые в области химиотерапии, вакцинопрофилактики и иммунологии этого заболевания.

Вакцинация против гриппа является эффективным противоэпидемическим средством, однако вследствие

постоянной смены антигенных свойств возбудителя требуются постоянный мониторинг и разработка новых вакцинных штаммов, соответствующих циркулирующему в человеческой популяции в каждый конкретный эпидемический сезон.

Химиопрофилактику и химиотерапию гриппа применяют наряду с вакцинацией для предотвращения и лечения заболевания. Из этиотропных препаратов, т.е. средств специфической противогриппозной терапии, в клинике используют соединения двух групп, отличающиеся по механизму действия и вирусным мишеням. Препараты первой группы – ремантадин (α-метил-1-

Контактная информация:

Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, проф.; e-mail: vsmirnov@cytomed.ru

адамантил-метиламина гидрохлорид) и амантадин (1-аминоадамantan) – блокируют белок M₂ вируса гриппа, играющий роль ионного канала в вирусной мембране, препятствуя тем самым процессу расщепления гемагглютинаина и слияния мембран вируса и лизосомаальной вакуоли [14]. Препараты второй группы ингибируют вирусную нейраминидазу – фермент, обеспечивающий почкование и дальнейшее распространение вирусных частиц. К этой группе соединений относятся занамивир (действующее начало препарата реленца®), озельтамивир (тамифлю®), перамивир (рапиакта®) и ланинамивир (инавир®) [5], последних два в России не зарегистрировано. Кроме того, в Японии проходит III фазу клинических испытаний препарат T-705 (фавипиравир), являющийся нуклеозидным аналогом [10, 16, 17], направленный на вирусную полимеразу и обладающий активностью не только против вируса гриппа, но и против широкого круга других вирусов [7].

Все перечисленные соединения имеют свои недостатки. В отношении группы производных адамантана можно отметить сравнительно высокую токсичность и узкий спектр действия (препараты активны против гриппа А, но не против гриппа В, не имеющего белка M₂). Для ингибиторов нейраминидазы характерна высокая стоимость синтеза, что делает эти препараты менее доступными для широкого использования. Применение T-705, по-видимому, будет ограничено из тех соображений, что он, будучи нуклеотидным аналогом, может ингибировать не только вирусные, но и клеточные ферменты.

Общим недостатком всех этиотропных противовирусных препаратов следует считать быстрое формирование к ним вирусной устойчивости. Так, с середины 1990-х годов отмечено резкое возрастание доли ремантадинустойчивых штаммов, и в настоящее время все изоляты вируса гриппа А, за редким исключением, являются нечувствительными к препаратам адамантанового ряда [12].

То же отмечалось в отношении тамифлю в пределах вируса гриппа подтипа H1N1 в 2007 г., когда с ноября 2007 г. по март 2009 г. уровень озельтамивирустойчивости вирусов достиг 100% во всех регионах Земного шара [9, 19].

Таким образом, ситуация, сложившаяся в последние годы в отношении гриппа, свидетельствует о высокой актуальности поиска новых эффективных средств профилактики и борьбы с этой инфекцией, обладающих возможно более широким спектром активности и малой вероятностью возникновения вирусной резистентности. Ранее нами была показана высокая протективная активность комбинации дипептида глутамил-триптофан с глицирризиновой кислотой при гриппозной инфекции у белых мышей [2]. Цель настоящего исследования – оценить влияние оптимальной комбинации глицирризиновой кислоты с глутамил-триптофаном на течение острой экспериментальной инфекции, вызванной *in vivo* вирусом гриппа, устойчивым к озельтамивиру.

Материалы и методы

Препараты. В работе использовали комбинацию глицирризиновой кислоты тринатриевой соли и натриевой соли глутамил-триптофана (тимоген-натрий) в массовом соотношении 10:1 (композиция "Орвилакс") в виде белого кристаллического порошка. Аликваты препаратов разводили в среде МЕМ для клеточных культур Игла ("БиолоТ", Санкт-Петербург, кат. 1.3.3). Из полученного раствора готовили необходимые разведения на среде МЕМ для экспериментов на животных.

В качестве референс-препарата использовали тамифлю (озельтамивира фосфат, "La Roche", Швейцария).

Вирусы. В работе использовали адаптированный к мышам вирус гриппа А/Владивосток/2/09(H1N1). Устойчивость этого вируса к озельтамивиру была ранее выявлена как неспособность озельтамивира снижать активность нейраминидазы в стандартном хемилюминесцентном тесте и наличие аминокислотной замены H274Y, выявленной при помощи секвенирования гена вирусной нейраминидазы. Вирус пассировали в аллантоисной полости 10–12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36°C.

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 [13].

Исследуемые препараты вводили животным внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл по лечебной схеме (1 раз в сутки в течение 5 дней начиная с 1-х суток после инфицирования животных). Препарат сравнения применяли по той же схеме. В качестве плацебо контрольной группе животных 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 дозе 1 (45 мышей на группу) и 10 (25 мышей на группу) LD₅₀. 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 животных 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 в каждой группе рассчитывали процент смертности (М – отношение количества павших за 14 дней животных к общему количеству 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 животных (СПЖ) из расчета 14 дней наблюдения в соответствии со следующими формулами:

$$СПЖ = (\sum N D) / Nt,$$

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

$$M = M/Nt,$$

где M – количество 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 из гомогенатов готовили 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 MEM. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями легочного гомогената от 10^0 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, которое способно вызвать положительную РГА, и выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса ($\lg ЭИД_{50}$).

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 ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилином и эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации, проводили через две смены ксилола 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 полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл, 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 Л-41. С этой целью 2–3-суточный монослой клеток заражали вирусом в количестве 10–100 ЦТД₅₀/мл. Клетки инкубировали до полной деструкции монослоя (24–48 ч) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 , после чего выдерживали 1 сут при 4°C . Культуральную жидкость собирали, 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 вирусосодержа-

щего материала. Разведения VSV вносили по 0,2 мл на монослой клеток Л-41 в микропланшетах. Планшеты выдерживали 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . 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 2-кратных 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 MEM с добавлением 10% фетальной сыворотки ("Биолот", Санкт-Петербург).

Клетки L-929 инкубировали с разведениями исследуемой мышиной сыворотки в течение 24 ч в CO_2 -инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 . По истечении этого срока клетки отмывали средой MEM и добавляли среду MEM, содержащую 100 ЦТД₅₀/лунку 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 определяли при помощи критерия Колмогорова–Смирнова в пакете программ Statistica 8.0. Результаты статистически обрабатывали (расчет средних значений и ошибки среднего) 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 превышало 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.

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

Данные по динамике смертности животных в контрольных и опытных группах суммированы в табл. 1. Как видно из представленных в табл. 1 данных, инфицирование животных приводило к дозозависимой смертности животных в группах опыта, начиная с 3-х суток после инфицирования. Применение препарата сравнения тамифлю не приводило к снижению смертности животных (индекс защиты 8–11% в зависимости от дозы вируса), что согласуется с информацией об устойчивости использованного штамма вируса к озельтамивиру. Использование орвилакса как в виде монопрепарата, так и в комбинации с тамифлю приводило к существенному повышению выживаемости животных по сравнению с таковой в контрольной группе. Индекс защиты при этом составил 39–67% в зависимости от дозы вируса и комбинации препаратов.

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

Препарат	Доза вируса, LD ₅₀	Число животных в группе	Смертность по дням									СПЖ, сут	Смертность, %	Индекс защиты, %	Увеличение СПЖ, сут
			3	4	5	6	7	8	9	10	11				
Орвилакс	1	15	2	2								12,2	26,7	55,6	3,9
	10	15	2	3	2			1				9,4	53,3	38,5	3,7
	Сумма доз	30	2	5	4			1				10,8	40,0	45,5	3,8
Тамифлю	1	15		3	2	2		1				9,8	53,3	11,1	1,5
	10	15	4	5	2		1					6,3	80,0	7,7	0,5
	Сумма доз	30	4	8	4	2	1	1				8,0	66,7	9,1	1,0
Орвилакс + тамифлю	1	15			1	1		1				13,3	20,0	66,7	5,0
	10	15	1	3		1	2			1		10,0	53,3	38,5	4,3
	Сумма доз	30	1	3	1	2	2	1		1		11,6	36,7	50,0	4,6
Контроль вируса	1	15	3	5	1							8,3	60,0	–	0
	10	15	4	5	2	1		1				5,7	86,7	–	0
	Сумма доз	30	7	10	3	1		1				7,0	73,3	–	0

Влияние препаратов на репродукцию вируса гриппа в организме животных. На следующем этапе исследования изучали влияние композиции "Орвилакс" на репликативную активность вируса гриппа в ткани легких инфицированных животных. С этой целью из легких животных на 3-и сутки после заражения готовили 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 $4,9-5 \log_{10} \text{EID}_{50}$ на 20 мг ткани в зависимости от инфицирующей дозы. Применение тамифлю не приводило к достоверному снижению уровня репродукции вируса, тогда как при использовании орвилакса как в виде монопрепарата, так и в сочетании с тамифлю отмечали снижение инфекционной активности вируса. Полученные данные согласуются с профилем лекарственной устойчивости модельного вируса, использованного в эксперименте, и свидетельствуют о преимуществе орвилакса перед озельтамивиром при терапии инфекций, вызванных устойчивыми штаммами вируса гриппа.

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.

Как было показано в ходе морфологических исследований, легкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, его клетки выглядели интактными – в них отсутствовали признаки вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерные или цитоплазматические включения. В просветах бронхов не отмечали экссудата и клеточного детрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели воздушными, альвеолярные стенки не были утолщены, из клеток инфильтрата в легочной паренхиме определяли отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаруживали (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 детрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением пораженных 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, появлению очагов геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширением сосудов и спадением альвеол (рис. 2, а). К 6-м суткам пораженные клетки бронхиального эпителия начинали регенерировать, восстанавливая выстилку бронхов, тогда как процессы воспалительной инфильтрации достигали своего пика (рис. 3, а). Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии, и степень их выраженности, в частности степень дегенерации клеток бронхиального эпителия, может служить критерием для оценки тяжести процесса.

У выживших животных, не получавших лечения, к 15-м суткам развития инфекции серозный экссудат

Таблица 2

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

Препарат	Титр вируса ($\lg \text{EID}_{50}$ на 20 мг ткани) при заражающей дозе вируса	
	1 LD ₅₀	10 LD ₅₀
Орвилакс	3,2±0,3	3,7±0,3
Тамифлю	4,3±0,4	4,4±0,4
Орвилакс + тамифлю	3,0±0,2	3,7±0,4
Контроль вируса	4,9±0,2	5,0±0,3

Примечание. Жирным шрифтом выделены значения, отличные от таковых в контроле при $p < 0,05$.

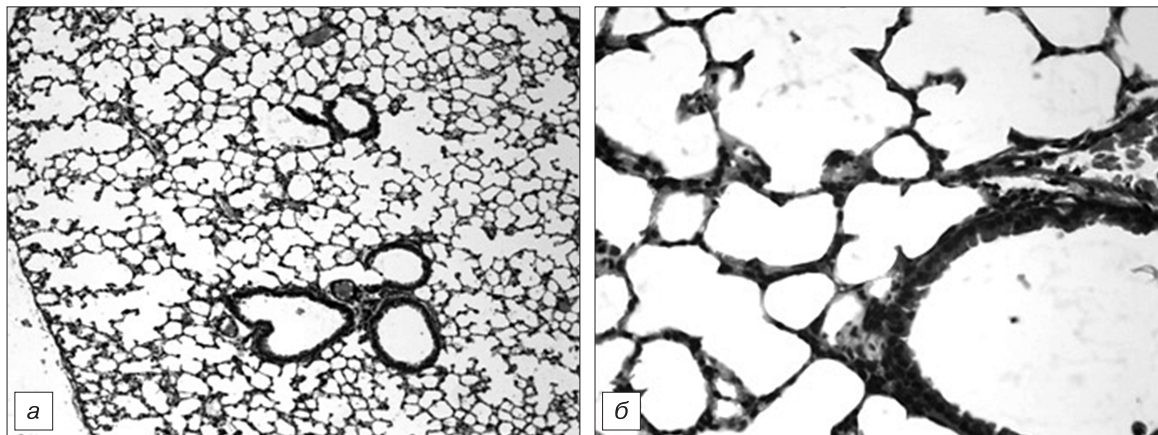


Рис. 1. Легкие интактной мыши. Поражения эпителия и воспалительные инфильтраты отсутствуют, межальвеолярные перегородки тонкие.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100 (а), 400 (б).

замещался клеточным, состоящим из нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов. Структура легочной ткани претерпевала качественные изменения по сравнению с острой стадией инфекции и по сравнению с тканью легких интактных животных. Пораженный слой бронхиального эпителия восстанавливался, образуя характерные структуры гиперплазированных клеток. Избыточные пролиферативные и репаративные процессы в ткани легких приводили к бронхиолярной метаплазии

альвеолярного эпителия, образующего аденоматозные структуры, которые были окружены массивными инфильтратами лимфоидно-макрофагальных элементов, что приводило к карнификации обширных отделов легких. Эпителий крупных бронхов гиперплазирован. Просветы бронхов заполнены экссудатом, состоящим из нейтрофилов, круглоклеточных элементов и клеточного детрита. В просветах ателектазированных альвеол в респираторных отделах отмечали мощную клеточную

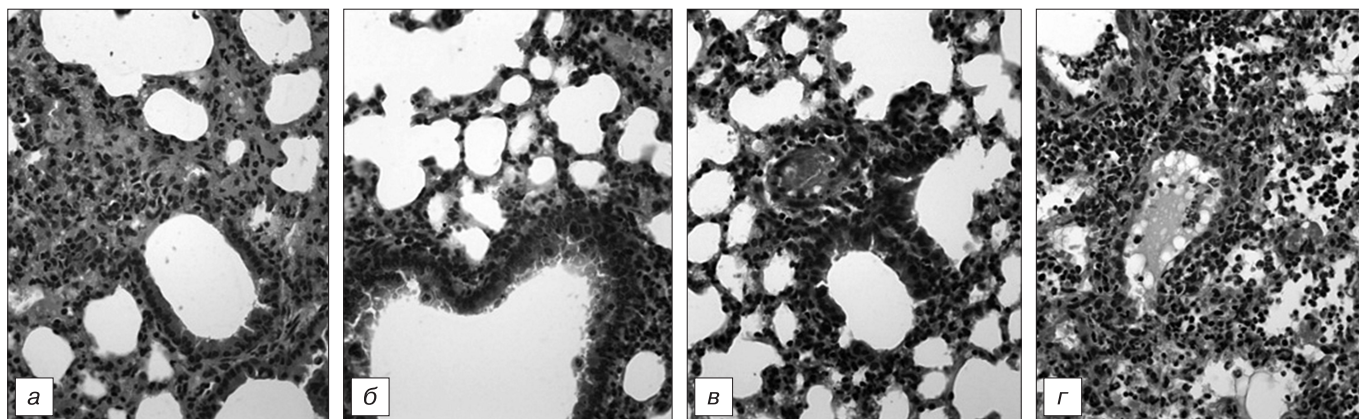


Рис. 2. Очаги гриппозной пневмонии в легком мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1) без лечения (а) и в условиях применения орвифлакса (б), орвифлакса с тамифлю (в) и тамифлю (г).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

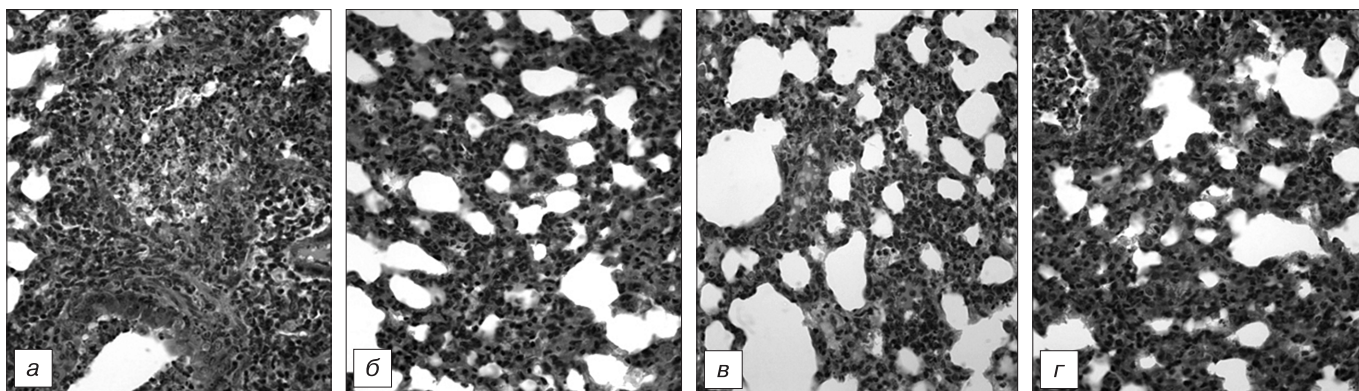


Рис. 3. Очаги гриппозной пневмонии в легком мышей на 6-е сутки после инфицирования вирусом гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1) без лечения (а) и в условиях применения орвифлакса (б), орвифлакса с тамифлю (в) и тамифлю (г).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Таблица 3

Активность интерферона в сыворотке крови мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Владивосток/01/09 (H1N1), в условиях применения химиопрепаратов

Группа опыта	Титр интерферона, МЕ/мл	<i>p</i> *
Интактные животные	2,5±0,6	0
Контроль вируса	39,4±4,0	—
Тамифлю	30,4±3,6	0,111
Орвилакс	56,5±4,6	0,010

Примечание. * – коэффициент Стьюдента при сравнении с группой контроля вируса.

воспалительную реакцию и большое количество клеточного детрита (рис. 4, а).

При использовании орвилакса в виде монопрепарата или в комбинации с тамифлю отличия морфологической структуры легких животных, прошедших лечение, от таковых в контрольных группах были сходными. Основное отличие от группы животных, не получавших лечения, заключалось в резком 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, б, в, рис. 3, б, в) в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных животных. Сами очаги воспаления занимали меньшую в сравнении с контролем площадь. Согласно полученным данным, наиболее выраженную способность к нормализации структуры ткани легких проявляла комбинация орвилакса с тамифлю. В то же время сам по себе тамифлю не приводил к существенному улучшению архитектоники легких (рис. 3, г), что подтверждает данные об устойчивости использованного модельного штамма к озельтамивиру. При использовании орвилакса в виде монопрепарата или в комплексе с тамифлю на поздних стадиях патологического процесса прослеживали те же тенденции, что и на стадии острой пневмонии. Очаги поражения легких были значительно ограничены в размере по сравнению с таковыми у контрольных животных. При морфологическом исследовании выявляли умеренную метаплазию эпителия и инфильтрацию легочного интерстиция интактными нейтрофилами и круглоклеточными элементами (рис. 4, б, в). Инфильтративные процессы выражены в гораздо меньшей степени, чем у контрольных животных (без препаратов). Межальвео-

лярные перегородки при этом были хорошо различимы, воздухоносные полости выражены и содержали повышенное количество альвеолярных макрофагов. Все перечисленные признаки резко отличали этих животных от мышей, зараженных вирусом, но не получавших лечения. При этом сам по себе тамифлю, как и на ранних стадиях инфекции, практически не вызывал улучшение архитектоники ткани по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных (рис. 4, г).

Таким образом, использование орвилакса приводило к ограничению размера очагов хронической постгриппозной пневмонии у животных, сохранению структуры легочной ткани, в том числе степени воздушности респираторных отделов.

Влияние препаратов на выработку интерферона.

Для более полной комплексной оценки протективной активности орвилакса провели титрование активности интерферона в сыворотке крови животных при помощи биологического метода. Результаты суммированы в табл. 3.

Как видно из представленных результатов, интактные животные практически не имели в крови активного интерферона. Инфицирование озельтамивирустойчивым вирусом гриппа приводило на 3-и сутки заболевания к резкому возрастанию титров интерферона (более чем на порядок). 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. В то же время применение орвилакса вызывало повышение продукции интерферона приблизительно на 50% по сравнению с аналогичным показателем в группе животных, не получавших лечения. Полученные данные позволяют предполагать наличие у изучаемого препарата способности к активации врожденного иммунитета, обуславливающей его протективные свойства при гриппозной инфекции.

Обсуждение

В проведенном исследовании показана протективная активность комбинации дипептида глутамил-триптофана с глицирризиновой кислотой при экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной озельтамивирустойчивым штаммом вируса. Снижение специфической смертности животных сопровождалось снижением уровня репродукции вируса в ткани легких, нормализацией структуры легких, а также повышением уровня интерферона в сыворотке крови. Препарат сравнения тамифлю при этом не влиял на ход патологического процесса.

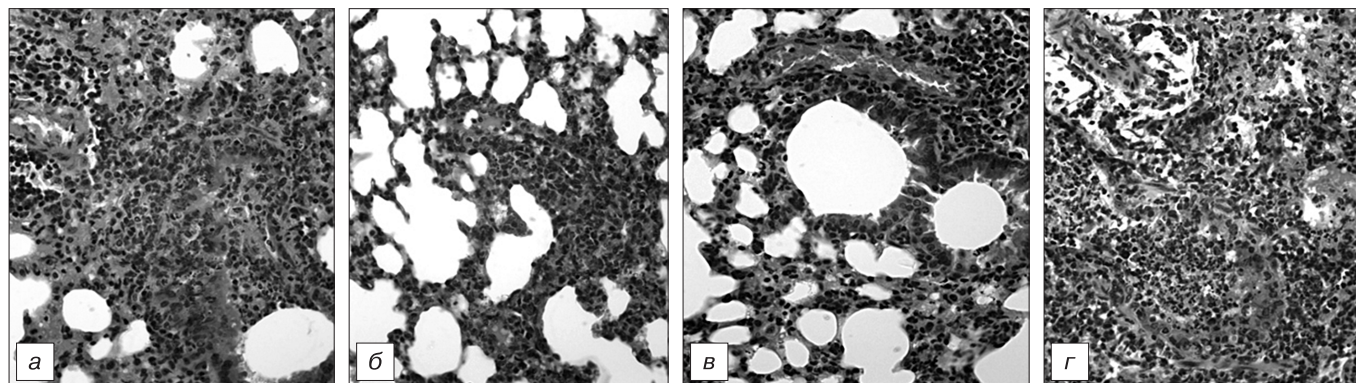


Рис. 4. Очаги гриппозной пневмонии в легком мышей на 15-е сутки после инфицирования вирусом гриппа А/Владивосток/2/09 (H1N1) без лечения (а) и в условиях применения орвилакса (б), орвилакса с тамифлю (в) и тамифлю (г).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Ранее нами была показана активность комбинации этих препаратов в отношении гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А(Н3N2) [2]. Сходная активность в отношении двух вирусов, различающихся по антигенным свойствам и чувствительности к озельтамивиру, позволяет говорить о широком спектре противогриппозной активности препарата и мишени, отличной от ранее описанных. Более того, повышение уровня интерферона в сыворотке крови животных свидетельствует о том, что мишенью для действия орвилакса служат не только вирусные компоненты, но и клеточные.

Разработка препаратов, направленных на нормализацию реактивных процессов в организме при гриппе и в более широком смысле на сигнальные механизмы клетки, является отдельным направлением в терапии гриппа. В особенности это касается его тяжелых форм, в том числе вызванных высокопатогенными штаммами. Известно, что вирус гриппа способен эффективно противостоять системе врожденного иммунитета хозяина, блокируя индукцию интерферона [8]. Это способствует быстрой репродукции вируса на ранних этапах инфекции и развитию в дальнейшем так называемого цитокинового шторма – неадекватно интенсивного воспалительного ответа, обуславливающего высокую тяжесть заболевания вплоть до летального исхода [18, 20]. Таким образом, интерферон, играя до инфицирования или на ранних стадиях заболевания защитную роль, становится одним из факторов патогенеза гриппа на поздних его этапах. Именно поэтому индукторы интерферона на этих сроках не оказывают действия на ход инфекции и не должны применяться в клинической практике как ведущие лечебные препараты. В использованных экспериментах орвилакс применялся не по профилактической схеме, а по лечебной (после заражения), и его применение приводило к стимуляции выработки интерферона по сравнению с животными, не получавшими лечения. В то же время инфекционная активность вируса в ткани легких мышей, получавших орвилакс, была существенно ниже, чем в группе плацебо, что предполагает активацию соответствующих противовирусных механизмов либо, напротив, ингибирование провирусных сигнальных и метаболических путей [4, 6]. Поскольку вирус гриппа ингибирует выработку интерферона для активной репликации на ранних стадиях инфекции, ее стимуляция орвилаксом может рассматриваться как противодействие этой активности вируса и представлять собой защитную реакцию организма.

Обращает на себя внимание разница в клеточном составе очагов вирусной пневмонии в контрольных и опытных группах. Если в контроле большая часть клеток воспалительного инфильтрата представлена полиморфно-ядерными лейкоцитами, то у животных, получавших орвилакс, среди инфильтрующих элементов отмечаются преимущественно лимфоциты и макрофаги (см. рис. 2, 3). Это различие может отражать, с одной стороны, способность орвилакса снижать прямо или опосредованно уровень деструктивных процессов в очаге воспаления, с другой – возможна модуляция этим препаратом клеточных воспалительных реакций.

Учитывая эти данные, следует предполагать наличие у орвилакса альтернативных механизмов противовирусного действия, таких, например, как активация отдельных сигнальных и эффекторных звеньев врожденного иммунитета. В основе этих механизмов лежит способность каждого из компонентов композиции "Орвилакс" оказывать противовирусное действие, основанное на модуляции факторов врожденного иммунитета. Так, показано противовирусное и иммуномодулирующее действие глицирризиновой кислоты при ее введении

животным, инфицированным вирусом гриппа [21]. Препарат, введенный внутривентриально за 24 ч до заражения, а также на 2-е и 4-е сутки после заражения, не только способствовал выживаемости животных, инфицированных вирусом в дозах до 20 ЛД₅₀, но и подавлял активность экспрессии провоспалительных цитокинов [11, 21]. Считается, что одним из возможных механизмов противовирусного действия глицирризиновой кислоты является ее способность ингибировать проникновение вируса в клетку за счет снижения текучести клеточных и вирусной мембран [22]. Кроме того, показано, что глицирризиновая кислота обладает способностью угнетать Толл-подобные рецепторы (TLR) 2 и 4, участвующие в экспрессии провоспалительных рецепторов [15]. Что касается глутамил-триптофана, то он, являясь вероятным агонистом глутаматного метаболитного рецептора III типа, также способствует аттенуации экспрессии провоспалительных цитокинов [1]. Сочетанное действие двух компонентов усиливает провоспалительный потенциал каждого, а снижение текучести клеточных мембран при одновременном или связанном с этим угнетением экспрессии TLR является дополнительным фактором подавления репликации патогенного вируса.

В целом полученные результаты позволяют рассматривать орвилакс как перспективное средство терапии гриппозной инфекции и говорить о комплексном механизме его противовирусной активности и преимуществах перед тамифлю при терапии гриппа, вызванного лекарственно-устойчивыми штаммами вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов В.С., ред. Клиническая фармакология тимогена. СПб.: ФАРМИНдекс; 2004.
2. Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штро А.А. Влияние комбинации глутамил-триптофана с глицирризиновой кислотой на течение острой инфекции у мышей, вызванной вирусом гриппа (H3N2). Вопросы вирусол. 2012; 3: 23–7.
3. 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.
4. Alleva L.M., Gualano R.C., Clark I.A. Current work and future possibilities for the management of severe influenza: using immunomodulatory agents that target the host response. Future Virol. 2011; 6: 843–54.
5. Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. Recomm. Rep. 2011; 60(1): 1–26.
6. Forst C.V. Influenza infection and therapy: a system approach. Future Virol. 2012; 7: 973–88.
7. 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.
8. Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. J. Gen. Virol. 2008; 89: 2359–76.
9. Hauge S.H., Dudman S., Borgen K. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses (H1N1), Norway, 2007–08. Emerg. Infect. Dis. 2009; 15: 155–62.
10. Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y. et al. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010; 107: 882–7.
11. Michaelis M., Geiler J., Naczek 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: 291–7.
12. Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza drug resistance. Semin. Respir. Crit. Care Med. 2011; 32: 409–22.
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 1938; 27: 493–7.
14. 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.
15. 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.

16. Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M. et al. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 2517–24.
17. Smeets D.F., Hurst B.L., Wong M.H. et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 126–33.
18. Teijaro J.R., Walsh K.B., Cahalan S. et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell.* 2011; 146: 980–91.
19. Thorlund K., Awad T., Boivin G., Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 134.
20. 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.
21. 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.
22. Wolkerstorfer A., Kurz H., Bachhofner N., Szolar O.H.J. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res.* 2009; 83: 171–8.
8. Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2359–76.
9. 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.
10. Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y. et al. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 882–7.
11. Michaelis M., Geiler J., Naczek 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: 291–7.
12. Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza drug resistance. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 32: 409–22.
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
14. 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.
15. 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.
16. Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M. et al. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 2517–24.
17. Smeets D.F., Hurst B.L., Wong M.H. et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 126–33.
18. Teijaro J.R., Walsh K.B., Cahalan S. et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell.* 2011; 146: 980–91.
19. Thorlund K., Awad T., Boivin G., Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 134.
20. 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.
21. 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.
22. Wolkerstorfer A., Kurz H., Bachhofner N., Szolar O.H.J. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res.* 2009; 83: 171–8.

REFERENCES

1. Smirnov V.S., ed. *Clinical pharmacology of Thymogen*. Spb. PHARMIndex; 2004.
2. Smirnov V.S., Zarubae 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 (H3N2) virus in mice. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(3): 23–7.
3. 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.
4. Alleva L.M., Gualano R.C., Clark I.A. Current work and future possibilities for the management of severe influenza: using immunomodulatory agents that target the host response. *Future Virol.* 2011; 6: 843–54.
5. Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. *Recomm. Rep.* 2011; 60(1): 1–26.
6. Forst C.V. Influenza infection and therapy: a system approach. *Future Virol.* 2012; 7: 973–88.
7. 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.

Получена 15.01.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013
УДК 578.832.1:578.53].083.2:615.371.012.6

И.В. Киселева, Е.А. Баженова, Н.В. Ларионова, Е.А. Федорова, И.А. Дубровина, И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко

Особенности реассортации современных штаммов вируса гриппа с донорами аттенуации живой гриппозной вакцины

ФГБУ "НИИ экспериментальной медицины" СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург

Современные живые гриппозные вакцины представляют собой реассортанты, полученные при скрещивании актуального циркулирующего вируса гриппа с холодоадаптированным донором аттенуации. Два донора аттенуации – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 – применяются в России для подготовки вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины методами классической реассортации. Вакцинный штамм 6:2 содержит 2 поверхностных антигена – гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) от актуального вируса гриппа и 6 генов, кодирующих внутренние белки, – от донора аттенуации.

В настоящем исследовании проведен анализ сложностей в подготовке вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины, связанных с постоянно меняющимися биологическими свойствами циркулирующих вирусов гриппа.

Показано, что наиболее высокий процент получения реассортантных вакцинных штаммов 6:2 достигается, если эпидемические родительские вирусы устойчивы к неспецифическим гамма-ингибиторам.

Методами классического скрещивания вирусов H5N1-PR8 с донором аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) не удалось получить реассортанты 6:2, содержащие HA и NA птичьего происхождения. Это может объясняться особенностями жесткой констелляции генов указанных вирусов. Была выявлена прочная связь между генами PB2/PR8 и птичьей NA, которые всегда наследовались реассортантами вместе. Если же в геном реассортантного вируса включался ген PB2 донора аттенуации, NA также наследовалась от него.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; реассортация; констелляция генов; несовместимость генов.