

5. Gilbert R.J., Beales L., Blond D., Simon M.N., Lin B.Y., Chisari F.V. et al. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(41): 14783—8.
6. Kaito M., Ohba H., Chiba J., Kohara M., Tanaka H., Fujita N. et al. The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus. *Med. Mol. Morphol.* 2006; 39(3): 136—45.
7. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(1): 65—73.
8. Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J. Virol.* 1997; 71(12): 9350—7.
9. Poisson F., Severac A., Hourieux C., Coudeau A., Roingard P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology.* 1997; 228(1): 115—120.
10. Tan W.S., Dyson M.R., Murray K. Two distinct segments of the hepatitis B virus surface contribute synergistically to its association with the viral core particles. *J. Mol. Biol.* 1999; 286(3): 797—808.
11. Khan N., Guarnieri M., Ahn S.H., Li J., Zhou Y., Bang G. et al. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. *J. Virol.* 2004; 78(7): 3262—70.
12. Greiner V.J., Egelé C., Oncul S., Ronzon F., Manin C., Klymchenko A. et al. Characterization of the lipid and protein organization in HBsAg viral particles by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimie.* 2010; 92(8): 994—1002.
13. Gavilanes F., Gomez-Gutierrez J., Aracil M., Gonzalez-Ros J.M., Ferragut J.A., Guerrero E. et al. Hepatitis B surface antigen. Role of lipids in maintaining the structural and antigenic properties of protein components. *Biochem. J.* 1990; 265(3): 857—64.
14. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manizillo G., Tanzi E., et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet.* 1990; 336(8711): 325—9.
15. Zuckerman A.J., Zuckerman J.N. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutant. *J. Med. Virol.* 1999; 58: 193—5.
16. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102—12.
17. Ben-Porath E., Wands J.R., Marciniak R.A., Wong M.A., Hornstein L., Ryder R. et al. Structural analysis of hepatitis B surface antigen by monoclonal antibodies. *J. Clin. Invest.* 1985; 76(4): 1338—47.
18. Waters J.A., Kennedy M., Voet P., Hauser P., Petre J., Carman W. et al. Loss of the Common «A» Determinant of Hepatitis B Surface Antigen by a Vaccine-induced Escape Mutant. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2543—7.
19. Roohi A., Khoshnoodi J., Zarnani A.H., Shokri F. Epitope mapping of recombinant hepatitis B surface antigen by murine monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt).* 2005; 24(2): 71—7.
20. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Khats Yu.S., Godkov M.A. et al. Algorithm of serologic screening and assessment of prevalence of serologically meaningful mutations of HBsAg in hepatitis B virus carriers. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2007; (6): 30—7. (in Russian)
21. Bazhenov A.I., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina N.I., Khats Yu.S. et al. The comparative estimation of anti-HBs activity against native and recombinant type HBsAg. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2012; (2): 76—81. (in Russian)
22. Krymskiy M.A., Borisov I.A., Yakovlev M.S., Agafonov M.O., Ter-Avanesyan M.D., Suslov A.P. et al. Recombinant Hansenula polymorpha yeast strain — producer of mutant hepatitis B virus surface antigen (versions). Patent RF № 2586513 C1; 2016. (in Russian)
23. Ito S., Karnovsky M.J. Formaldehyde/glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J. Cell Biol.* 1968; 39: 168a-9a.
24. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963; 17(2): 208—12.
25. Newman G.R., Jasani B., Williams E.D. A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. *Histochem. J.* 1983; 15(6): 543—55.
26. Bendayan M., Zollinger M. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.* 1983; 31(1): 101—9.
27. Dryden K.A., Wieland S.F., Witten-Bauer C., Gerin J.L., Chisari F.V., Yeager M. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol. Cell.* 2006; 22: 843—50.
28. Böttcher B., Tsuji N., Takahashi H., Dyson M.R., Zhao S., Crowther R.A. et al. Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *EMBO J.* 1998; 17(23): 6839—45.
29. Kalinina T., Iwanski A., Will H., Sterneck M. Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology.* 2003; 38(5): 1274—81.

Поступила 30.01.17

Принята в печать 28.02.17

© СМЕРНОВ В.С., ПЕТЛЕНКО С.В., 2017
УДК 615.281.8.03:616.98:578.825.11|.076.9

Смирнов В.С., Петленко С.В.

ВЛИЯНИЕ ИМИХИМОДА НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНА И РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСАМИ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «ЦИТОМЕД», 191023, г. Санкт-Петербург

Производное имидазола — имихимод — относится к иммуномодуляторам, действующим на врожденную и адаптивную системы иммунитета. Целью исследований было изучение динамики синтеза сывороточного интерферона (ИФН) при разных режимах дозирования и оценка противовирусной активности воспроизведенного в России препарата имихимода в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) при его подкожном применении мышам и интравагинальном — морским свинкам. **Результаты.** При подкожном введении имихимода мышам в дозах 0,5; 1 и 10 мг/кг наблюдали дозозависимое увеличение выработки ИФН, пик концентрации которых достигался через 4 ч после введения. Применение имихимода защищало лабораторных животных (мышей) от внутрибрюшинного заражения ВПГ в дозах 3,2 и 32 ЛД₅₀. При этом максимальный защитный эффект (100% выживаемость) достигался при введении имихимода в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 5 дней до заражения. Топическое применение имихимода в виде 5% крема по сравнению с контрольной группой сопровождалось достоверно более быстрой и полной элиминацией вируса при интравагинальном заражении морских свинок ВПГ 2-го типа. **Заключение.** Воспроизведенный аналог имихимода обладает иммуномодулирующими и противовирусными свойствами, выявленными у первоначально синтезированного химического соединения.

Ключевые слова: имихимод; вирус простого герпеса; морские свинки; мыши.

Для корреспонденции: Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, руководитель научно-исследовательского отдела ЗАО МБНПК «Цитомед». 191023, г. Санкт-Петербург. E-mail: vssmi@mail.ru

Для цитирования: Смирнов В.С., Петленко С.В. Влияние имихимода на продукцию интерферона и развитие экспериментальной инфекции, вызванной вирусами простого герпеса. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 128-134.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-128-134>

Smirnov V.S., Petlenko S.V.

INFLUENCE OF THE IMIQUIMOD ON THE INTERFERON PRODUCTION AND TREATMENT OF THE EXPERIMENTAL HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION

Biomedical Research and Production Complex «Cytomed», St. Petersburg, 191023, Russian Federation

Background. Imiquimod is an imidazole derivative acting as an immunomodulator on the level of innate and adaptive immune system. Our objective was to evaluate the antiviral activity of generically reproduced imiquimod administered subcutaneously in mice and intravaginally in guinea pigs against herpes simplex virus (HSV), as well as to study the dynamics of serum interferon (IFN) synthesis under different dosing regimens.

Results. When administered subcutaneously at doses of 0.5, 1.0 and 10 mg/kg imiquimod increased IFN production in mice in a dose-dependent manner with maximum serum IFN concentrations occurring 4 hours after dosing. Imiquimod protected mice from intraperitoneal HSV infection at doses of 3.2 and 32 LD₅₀. The utmost protection (100% survival) was observed when imiquimod was administered at a dose of 100 mg/kg daily for 5 days before infection. Topical application of imiquimod 5% cream exhibited significantly more rapid and complete virus elimination in guinea pigs intravaginally infected with HSV type 2 compared to control group.

Conclusion. Imiquimod produced as a generic possesses the same immunomodulatory and antiviral properties as the originally synthesized substance.

Key words: imiquimod; herpes simplex virus; guinea pigs; mice.

For citation: Smirnov V.S., Petlenko S.V. Influence of the imiquimod on the interferon production and treatment of the experimental herpes simplex virus infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(3): 128-134. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-128-134>

For correspondence: Vyacheslav S. Smirnov, Dr. Med. Sci., professor, Head of the Scientific Research Department of the Biomedical Research and Production Complex «Cytomed», St. Petersburg, 191023, Russian Federation. E-mail: vssmi@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20 January 2017
Accepted 19 February 2017

Введение

Около 10 лет назад произошло, на первый взгляд, малозаметное, но, как оказалось, весьма важное событие. Открытие семейства паттерн-распознающих рецепторов поставило под сомнение обоснованность широко известного термина «неспецифическая резистентность». Стало понятно, что неспецифическая резистентность в своей основе достаточно специфична и в зависимости от природы антигенного воздействия включает те или иные механизмы защиты. Рецепторным аппаратом этой системы оказались паттерн-распознающие рецепторы, действие которых заключается в распознавании «образа» того или иного антигена и соответственно мобилизации определенных рецепторных и регуляторных систем [1, 2]. Это семейство представлено достаточно широко и, по последним данным, включает Толл-подобные рецепторы (ТЛР), Nod-подобные рецепторы и др. [2, 3]. Вместе с тем преимущественное внимание все же уделяется ТЛР. Показано, что многие ТЛР связаны с противовирусной защитой [2]. Так, ТЛР4 связан с вирусами гриппа, малярии и гепатита В [4, 5], ТЛР2 — с боррелиозом и ВИЧ [6, 7]. Особый интерес представляют ТЛР7/8, с активацией которых связаны процессы иммунного воспаления при инфекционных заболеваниях, обусловленных вирусом папилломы человека (ВПЧ), вирусом простого герпеса ВПГ, ВИЧ, а также некоторыми простейшими (лейшманиями) и бактериями [8—10].

Накопленные данные послужили отправной точкой всех попыток использовать агонисты и антагонисты ТЛР в качестве терапевтических средств. Одним из первых препаратов этого семейства оказался имихимод — производное имидазол-хинолинамина — агонист ТЛР7

и ТЛР8 [11]. Первоначально разработанный для лечения бронхолегочных заболеваний [12] имихимод оказался более подходящим средством для топического лечения папилломавирусной инфекции, в первую очередь аногенитальных бородавок, а также некоторых опухолей [13]. Кроме того, в доклинических, а затем и клинических исследованиях показана его противовирусная активность при герпетической инфекции *in vivo* [14]. При анализе механизмов действия имихимода была обнаружена его способность активировать провоспалительный ответ, в том числе стимуляцию выработки интерферонов (ИФН) α , β и γ , интерлейкинов (ИЛ)-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-12 [8, 15, 16], фактора некроза опухоли (ФНО)- α , кроме того, имихимод способствовал активации Т-клеточного иммунитета и системы НК-клеток. В конечном счете имихимод был одобрен Управлением санитарного надзора за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) как средство для местного лечения аногенитальных бородавок, вызываемых преимущественно ВПЧ 6-го и 11-го типов [17].

Вместе с тем история имихимода не ограничилась только бородавками, не менее важным направлением остается лечение герпетической инфекции, особенно генитального герпеса [8]. Хорошо известно, что вирус герпеса чрезвычайно широко распространен в человеческой популяции и может быть причиной тяжелых, в том числе рецидивирующих инфекций, иногда приводящих к смерти, особенно среди иммунокомпрометированных лиц (реципиенты органов, ВИЧ-инфицированные) [18]. Проблема осложняется тем, что у этих лиц вирус герпеса нередко приобретает устойчивость ко многим, если не всем, нуклеозидам [17], в этой связи топическое

применение имихимода при генитальном герпесе может быть дополнительной альтернативой.

Лекарственная субстанция и фармакологический препарат имихимода были запатентованы в США 4 августа 1987 г. [19]. В 2007 г. патентная защита закончилась, после чего это соединение было воспроизведено в Китае, странах Латинской Америки [20], а также на территории Российской Федерации под названием Вартоцид [21]. Целью данного исследования была оценка интерферон-индуцирующих и противогерпетических свойств имихимода в рамках доклинического исследования.

Материал и методы

Лекарственная субстанция 1-(2-метилпропил)-1-Нимидазол[4,5-с]хинолин-4-амина была синтезирована по стандартной методике. Молекулярная масса соответствовала оригинальному препарату и составляла 240,3. По данным инфракрасной спектроскопии в диске с калия йодидом и протонного магнитного резонанса в дейтерированном диметилсульфоксиде при 300 МГц, исследованное соединение соответствовало химической формуле $C_{14}H_{16}N_4$. Таким образом, результаты исследования показали, что исследованное соединение является полным химическим аналогом оригинальной активной субстанции — имихимода.

Лабораторные животные. В исследованиях использовали беспородных морских свинок массой 250—300 г и беспородных белых мышей-самцов массой 16—18 и 7—8 г. Перед началом исследования животных выдерживали в карантине в течение 1 нед. В процессе исследования животных содержали на стандартной диете без ограничения водопотребления в оптимальных климатических условиях и режиме освещенности 12/12 ч.

Вирусы. В исследовании использовали ВПГ 1-го типа. Вирус поддерживали пассажами на мышках-сосунках путем их интрацеребрального инфицирования. Титр вируса составлял $6 \cdot 10^3$ ЛД₅₀/мл. Для титрования ИФН 1-го типа в качестве тест-вируса применяли стандартный штамм вируса энцефаломиокардита (ЕМС).

Титрование сывороточного ИФН. Титрование сывороточного ИФН проводили биологическим микрометодом. Культуру клеток L-020, разведенную ростовой средой до необходимой концентрации ($3—4 \cdot 10^5$ кл/мл), вносили в лунки 96-луночных пластиковых панелей и инкубировали в термостате в течение 24 ч. На протяжении всего процесса титрования инкубацию культуры выполняли в одинаковых условиях: температура 37 °С в атмосфере 5% CO₂ и 98% влажности. После формирования на дне лунок монослой клеток ростовую среду удаляли и вносили поддерживающую среду, в которой производили последовательные двукратные разведения тестируемых проб (в парных лунках). После суточной инкубации тестируемые пробы удаляли и в монослой клеток вводили тест-вирус ЕМС в рабочем разведении (100 ЦПД₅₀). Через сутки учитывали результаты с помощью инвертированного микроскопа. Титр ИФН — величина, обратная последнему разведению сыворотки, в котором наблюдается 50% защита от цитопатогенного действия (ЦПД) тест-вируса.

Моделирование инфекции. Генерализованную герпетическую инфекцию моделировали путем внутрибрюшинного заражения белых беспородных мышей (ВПГ). Инкубационный период при этой инфекции составлял 4—5 сут. Развитие заболевания характеризовалось следующими признаками: животные становились мало-

подвижными, отказывались от еды и питья, у них была взъерошенная шерсть. В последующем развились явления энцефалита (парезы и параличи), и на 7—9-й день животные погибали. Наблюдение за животными проводили в течение 21 сут с момента заражения, ежедневно регистрируя количество павших животных. Противовирусную активность имихимода оценивали при инфицировании животных вирусом ВПГ в двух интервалах доз: 2—2,5—3,2 и 20—25 и 32 ЛД₅₀. Имихимод вводили однократно подкожно в дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг массы тела.

Для оценки противовирусной активности топической формы имихимода (крем для местного применения 5%) морских свинок интравагинально заражали ВПГ, а затем ежедневно интравагинально им наносили имихимод в дозе 5000 мкг/кг в течение 5 дней.

Статистический анализ. Заражающую дозу рассчитывали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [22]. Расчет средней продолжительности жизни (СПЖ) проводили по вероятностной модели в виде суммарной доли дожития при допущении, что время дожития животных, не погибших в течение всего срока наблюдения, составляло 1, при этом вес одного дня выживания одного животного был равен $1/21 = 0,048$. Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами вариационной статистики. Уровень достоверности $p = 0,95$. Иные приемы статистической обработки, когда они использовались, приведены в тексте при описании полученных данных.

Результаты

Влияние имихимода на индукцию эндогенного ИФН. Исследования проведены на белых мышках, которым однократно подкожно вводили имихимод в дозах 0,5; 1 и 10 мкг/кг. Через 1; 2; 4; 8 и 24 ч у животных брали кровь из ретробульбарного венозного сплетения и в сыворотке определяли содержание ИФН. Полученные результаты представлены на рис. 1.

Как видно из представленных данных, подкожное введение препарата сопровождалось отчетливым увеличением выработки ИФН, максимум которого приходился на 4-й час после введения препарата, при этом концентрация цитокина зависела от дозы препарата. Максимальная выработка наблюдалась в ответ на введение 10 мкг/кг имихимода. Отметим, что следовая активность ИФН, индуцированного имихимодом в дозе 10 мкг/кг, наблюдалась до 24 ч.

В другом опыте этой серии мы оценивали влияние кратности введения имихимода на синтез ИФН. С этой целью, как и в работе [15], препарат в дозе 10 мкг/кг вводили подкожно 1; 2; 3 и 4 раза с интервалом 2 ч. Титр ИФН оценивали через 2 ч после введения последней дозы (рис. 2).

Как следует из представленных данных, многократное введение имихимода в течение 8 ч сопровождалось дозозависимым увеличением индукции ИФН. Максимальный уровень отмечен через 2 ч после введения 4-й дозы. Эти результаты подтверждают данные, полученные М.Ж. Reiter и соавт. [15].

Влияние имихимода на течение острой вирусной инфекции, вызванной ВПГ. Для оценки протективной активности имихимода, т. е. его способности предотвращать развитие острой генерализованной инфекции, имихимод вводили подкожно в дозах 10; 100 и 1000 мкг/кг за 4 ч до заражения ВПГ. При определении лечебной активности имихимода препарат вводили подкожно в

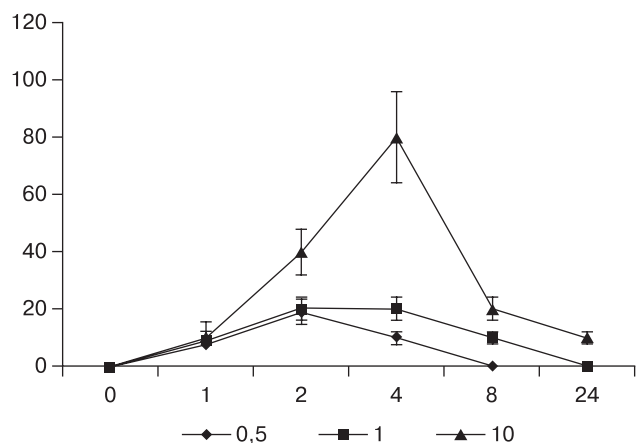


Рис. 1. Динамика содержания ИФН в сыворотке белых мышей при однократном подкожном введении имихимода.

По оси ординат: содержание интерферона, ед/мл; по оси абсцисс: время после введения препарата, ч; легенда: дозы имихимода, мкг/кг.

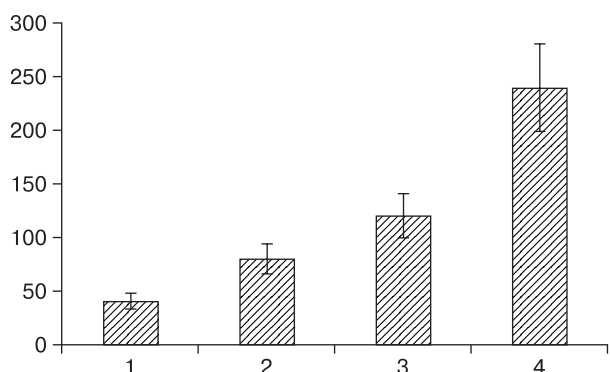


Рис. 2. Индукция ИФН при различной кратности подкожного введения имихимода в дозе 10 мкг/кг. Мышам вводили имихимод 1; 2; 3 и 4 раза. В каждую дозовую группу брали по 10 мышей. ИФН титровали в сыворотке крови, взятой через 2 ч после введения последней дозы.

По оси ординат: титр ИФН, ед/мл; по оси абсцисс: количество введенного имихимода.

дозах 100; 1000 и 10 000 мкг/кг ежедневно в течение 5 дней. Контрольным животным в соответствующие сроки подкожно вводили аликвотный объем изотонического раствора хлорида натрия.

Таблица 1

Защитная эффективность имихимода на модели ВПГ у белых мышей

Доза препарата, мкг/кг	Доза вируса, LD ₅₀	Результаты	
		мыши, взятые в опыт	выжившие мыши (% выживаемости)
10,0	32	20	4 (20)
	3,2	20	16 (80)
100	32	20	6 (30)
	3,2	20	18 (90)
1000	32	20	10 (50)
	3,2	20	20 (100)
Контроль вируса	32	20	0 (0)
	3,2	20	10 (50)

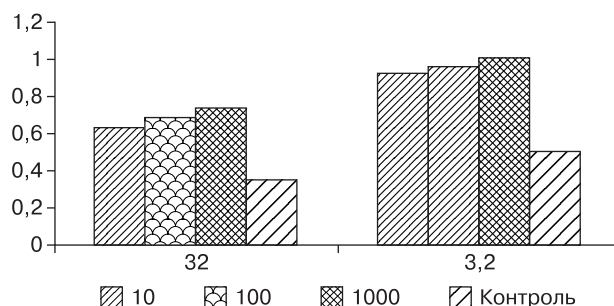


Рис. 3. СПЖ мышей, получавших имихимод за 4 ч до заражения ВПГ.

По оси ординат: показатель СПЖ, отн. ед; по оси абсцисс: доза ВПГ, LD₅₀; легенда: 10; 100; 1000 — доза имихимода, мкг/кг; контроль — контрольная группа.

Инкубационный период при этой инфекции составляет 4—5 сут. Развитие заболевания характеризуется следующими признаками: животные становятся малоподвижными, с взъерошенной шерстью, отказываются от еды и питья. В последующем у них развиваются парезы и параличи и наступает гибель, чаще всего на 7—9-е сутки после заражения. Результаты оценки защитной активности имихимода приведены в табл. 1.

Полученные результаты показали, что введение имихимода до заражения сопровождалось дозозависимым возрастанием выживаемости зараженных мышей. Так, при введении имихимода в дозе 10 мкг/кг выживало до 20% мышей, зараженных ВПГ в дозе 32 LD₅₀, а при введении препарата в дозе 1000 мкг/кг выживаемость достигала 50% при 100% гибели животных в контроле (рис. 3).

Как следует из представленных данных, показатель СПЖ возрастал одновременно с увеличением дозы имихимода и зависел от дозы вируса. Так, при заражении животных ВПГ в дозе 3,2 LD₅₀ СПЖ достигала максимального значения 1 отн. ед. (ни одно животное не погибло), в то время как при дозе 32 LD₅₀ максимальная выживаемость составила 0,74% (погибло 50% животных), но при этом не умершие животные жили дольше, чем при меньших дозах имихимода. В контрольной группе, зараженной вирусом в дозе 32 LD₅₀, погибли все животные, а при введении вируса в дозе 3,2 LD₅₀ — только 50% животных. Таким образом, полученные результаты

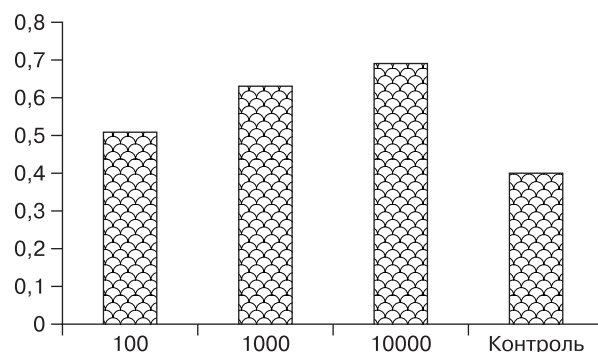


Рис. 4. СПЖ мышей, получавших имихимод в течение 5 дней после заражения ВПГ.

По оси ординат: показатель СПЖ, отн. ед; по оси абсцисс: разовая доза имихимода, мкг/кг.

Таблица 2

Лечебная эффективность имихимода при заражении белых мышей ВПГ в дозе 10 ЛД₅₀

Доза препарата, мкг/кг	Результаты		
	мыши, взятые в опыт	выжившие мыши	выживаемость, %
100	10	2	20
1000	10	4	40
10 000	10	6	60
Контроль	10	0	0

показали, что однократное подкожное введение имихимода за 4 ч до заражения оказывает отчетливое защитное действие в отношении острой инфекции, вызванной ВПГ.

Целью второй серии исследований была оценка терапевтической эффективности имихимода при его курсовом назначении после заражения животных ВПГ. Для этого животных заражали ВПГ в дозе 10 ЛД₅₀. Начиная с 24 ч после заражения и в течение последующих 5 сут животным подкожно вводили одну из доз имихимода: 100; 1000 и 10 000 мкг/кг. Животным контрольной группы вводили аликвотный объем изотонического раствора хлорида натрия. В каждую дозовую группу было взято по 10 животных (табл. 2).

Полученные результаты показали, что при острой инфекции ВПГ имихимод оказывает дозозависимое терапевтическое действие. Так, в группе животных, которым вводили имихимод в дозе 10 мкг/кг, выжило только 20% животных, тогда как среди мышей, которым вводили 10 000 мкг/кг, выжило 60%. В контрольной группе при этом погибли все 10 (100%) мышей. Сходные зависимости выявлены и при расчете СПЖ (рис. 4).

Как видно на рис. 4, наименьший показатель СПЖ отмечен в контрольной группе, что вполне объяснимо, поскольку все животные погибли и инфекционный процесс у них развивался наиболее быстро. Курсовое введение имихимода в дозе 100 мкг/кг не было особенно эффективным — выжило 20% животных, взятых в опыт, при этом показатель СПЖ у них относительно контроля увеличился только в 1,3 раза, а наибольшая продолжительность выживания инфицированных животных отмечена при курсовом введении имихимода в дозе 10 000 мг/кг массы ($p < 0,05$).

Топическая форма имихимода (5% крем) была испытана на генитальной герпетической инфекции у морских свинок — наиболее распространенной модели для исследования противогерпетических средств [8]. С целью воспроизведения инфекции животным вводят вирулентный штамм ВПГ-2 в дозе около $1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$ отн. ед. Как правило, при такой дозе вирулентного вируса уже через 12 ч наблюдается шеддинг вируса, который можно идентифицировать иммуноферментным методом или с помощью полимеразной цепной реакции.

Для оценки противогерпетической активности 5% крема имихимода морским свинкам, зараженным вирулентным штаммом ВПГ-2, ежедневно интравагинально применяли имихимод в дозе 5000 мкг/кг в течение 5 дней. У контрольных животных никаких препаратов не применяли. Ежедневно начиная с 1-го дня после первого применения 5% крема имихимода, определяли динамику интравагинального выделения вируса (рис. 5).

Из представленных данных следует, что в опытной группе уже к 4-му дню отмечено достоверное уменьшение количества выделяемого вируса, которое к 5—6-му дню практически прекращалось. В этот же период у контрольных животных наблюдались активная репликация и выделение вируса. Можно полагать, что в результате применения имихимода происходила существенная мобилизация местных механизмов врожденного иммунитета, в частности активная стимуляция выработки и секреции эндогенного ИФН- α , сопровождающаяся быстрой редукцией инфекционного процесса. Представленные результаты полностью согласуются с данными других авторов. Так, в частности, применение имихимода дважды в день начиная с 12 ч после интравагинальной инокуляции ВПГ-2 сопровождалось полной элиминацией вируса.

Обсуждение

В совокупности молекулярных механизмов, объясняющих действие имихимода, одним из ведущих факторов наряду с выбросом провоспалительных цитокинов является индукция ИФН [14, 15].

Исследования имихимода, выполненные на этапе его доклинического изучения, показали, что это соединение активирует каскад провоспалительных цитокинов, в первую очередь ИФН- α , ФНО- α и др. [8, 23, 24]. Эти данные нашли подтверждение в наших экспериментах, показавших дозозависимую индукцию ИФН через 4 ч после однократного введения. С другой стороны, интенсивность синтеза ИФН существенно зависела от кратности его введения, при которой максимальная выработка наблюдалась при 4-кратном введении имихимода. Полученные результаты хорошо согласуются с признанными механизмами действия препарата [8, 13].

Результаты доклинических исследований показали, что имихимод не обладает прямой противовирусной активностью, но в результате активации механизмов врожденного иммунитета, в том числе Th1-ответа в очаге поражения, оказывает защитное действие при моделировании герпетической и ряда других инфекций как при системном, так и при местном применении [8, 9, 13, 24]. В то же время другие исследователи получили свидетельства прямого противовирусного действия имихимода при его применении *in vivo*, по крайней мере в отно-

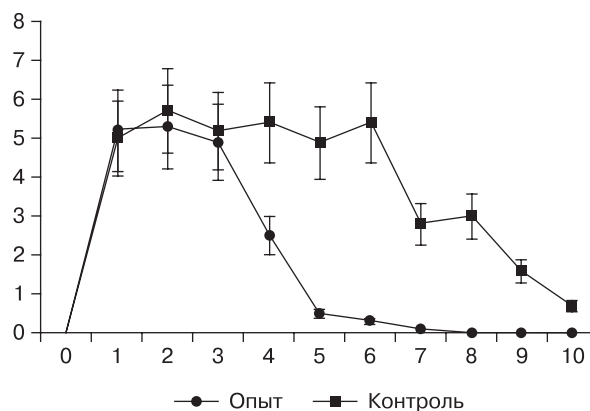


Рис. 5. Динамика вагинального выделения вируса у морских свинок, зараженных ВПГ-2 и леченных 5% кремом имихимода. По оси ординат: титр вируса, log₁₀; по оси абсцисс: срок наблюдения, сут. Имихимод применяли с 1-го по 5-й день после заражения.

шении ВПГ [24]. Показано, что это действие не зависит от TLR7 и вызвано индукцией цистатина A_1 , который ингибирует цистеиновую протеазу хозяина через негативный сигналинг аденозиновых рецепторов A_1 [24].

Особый интерес представляет применение имихимода при лечении вирусных инфекций, особенно вызванных ВПЧ и ВПГ, существующие схемы лечения которых далеко не всегда обеспечивают клинически приемлемые результаты. Это связано либо с высокой частотой рецидивирования (аногенитальные бородавки), склонностью к малигнизации (плоскоклеточный рак кожи) или быстро формирующейся резистентностью к противовирусным препаратам (ВПГ). В этих ситуациях имихимод может стать дополнительной альтернативой недостаточной эффективной или совсем неэффективной терапии [8, 24, 25], что особенно актуально при лечении атипичных форм генитального герпеса у ВИЧ-инфицированных больных, для которых характерны торпидное течение, высокий риск рецидивов и множественная лекарственная устойчивость [25].

Уже в самых первых исследованиях было установлено, что имихимод оказывает как защитное, так и лечебное действие на модели острой ВПГ-инфекции у мышей [26]. В целом эти результаты согласуются с поздними публикациями, которые свидетельствуют о том, что имихимод способен эффективно контролировать острую герпетическую инфекцию [27].

При исследовании протективной активности имихимода, вводимого за 4 ч до заражения ВПГ, получено отчетливое увеличение СПЖ относительно контроля, причем 50% выживаемость зараженных мышей наблюдали в ответ на введение 1000 мкг/кг и последующего заражения животных ВПГ в дозе 32 ЛД₅₀, среди контрольных мышей в ответ на эту дозу наблюдалась гибель 100% животных. При 10-кратном уменьшении дозы вируса выживало 90% животных опытной группы и только 50% — контрольной. При терапевтическом применении препарата в дозе 1000 мкг/кг в течение 5 дней начиная с 24 ч после заражения вирусом в дозе 10 ЛД₅₀ выживало 60% мышей при 100% гибели в контроле.

Принимая во внимание, что системное применение имихимода сопряжено с множеством побочных реакций, препарат стали применять местно в виде 5% крема, известного в США под брендом Альдара®, в России воспроизведенный аналог получил название Вартоцид [21]. Интравагинальное заражение морских свинок вирулентной культурой ВПГ 2-го типа в дозе $1 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$ отн. ед. с последующим применением 5% крема имихимода в дозе 5000 мкг/кг ежедневно в течение 5 дней приводило к достоверно более быстрой элиминации вируса, чем у контрольных животных. Эти данные согласуются с имеющимися результатами относительно того, что применение имихимода при остром генитальном герпесе вызывает практически полную элиминацию вируса, при этом не развивается его персистенция в нервной ткани, а в катамнезе не наблюдается рецидивов инфекции [8].

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили сделать вывод о том, что воспроизведенный в Российской Федерации препарат имихимод вызывает синтез эндогенного интерферона *in vivo* и оказывает отчетливое противовирусное действие при моделировании герпетической инфекции у мышей и морских свинок.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—20, 23—27 см. REFERENCES)

1. Лебедев К.А., Понякина И.Д. *Иммунология образраспознающих рецепторов (интегральная иммунология)*. М.: Librokom; 2009.
2. Смирнов В.С., Петленко С.В. Сравнительное влияние топических препаратов имихимода на неповрежденную кожу морских свинок. *Российский иммунологический журнал*. 2016; 10(3): 346—8.
22. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях Ленинград: Медгиз; 1962.

REFERENCES

1. Lebedev K.A., Ponyakina I.D. *Immunology Pattern Recognition Receptors (Integrated Immunology) [Immunologiya obrazraspoznayushchikh retseptorov (integral'naya immunologiya)]*. Moscow: Librokom; 2009. (in Russian)
2. Dowling J.K., Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Translat. Immunol.* 2016; 5(5): e85.
3. Wei L.J., Tan X., Fan G.J., Jiang Y.N., Shah Q.A. Role of the NOD1/NF- κ B pathway on bovine neutrophil responses to crude lipopolysaccharide. *Vet. J.* 2016; 214: 24—31.
4. Boland G., Beran J., Lievens M., Sasadeusz J., Dentico P., Nothdurft H., et al. Safety and immunogenicity profile of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04. *Vaccine*. 2004; 23(3): 316—20.
5. Morefield G.L., Hawkins L.D., Ishizaka S.T., Kissner T.L., Ulrich R.G. Synthetic Toll-like receptor 4 agonist enhances vaccine efficacy in an experimental model of toxic shock syndrome. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14(11): 1499—504.
6. Abbott A. Lyme disease: uphill struggle. *Nature*. 2006; 439(7076): 524—5.
7. Borsutzky S., Ebensen T., Link C., Becker P.D., Fiorelli V., Cafaro A. et al. Efficient systemic and mucosal responses against the HIV-1 Tat protein by prime/boost vaccination using the lipopeptide MALP-2 as adjuvant. *Vaccine*. 2006; 24(12): 2049—56.
8. Miller R.L., Meng T.C., Tomai M.A. The Antiviral Activity of Toll-Like Receptor 7 and 7/8 Agonists. *Drug News Perspect.* 2008; 21(2): 68—79.
9. Craft N., Birnbaum R., Quanquin N., Erfe M.C., Quant C., Haskell J. et al. Topical resiquimod protects against visceral infection with *Leishmania infantum* chagasi in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(9): 1314—22.
10. Sepelhi Z., Kiani Z., Alavian S.M., Arababadi M.K., Kennedy D. The link between TLR7 signaling and hepatitis B virus infection. *Life Sci.* 2016; 158: 63—9.
11. Gibson S.J., Lindh J.M., Riter T.R., Gleason R.M., Rogers L.M., Fuller A.E. et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol.* 2002; 218(1-2): 74—86.
12. Stokes J.R., Sorkness R.L., Kaplan M.R., Castleman W.L., Tomai M.A., Miller R.L., et al. Attenuation of virus-induced airway dysfunction in rats treated with imiquimod. *Eur. Respir. J.* 1998; 11(2): 324—9.
13. Schön M., Schön M.P. The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14(6): P681-7.
14. Bernstein D.I., Harrison C.J. Effects of the Immunomodulating Agent R837 on Acute and Latent Herpes Simplex Virus Type 2 Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33(9): 1511—5.
15. Reiter M.J., Testerman T.L., Miller R.L., Weeks C.E., Tomai M.A. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *J. Leukoc. Biol.* 1994; 55(2): 234—40.
16. Miao X., Luo D., Min W., Lin X., Wang D., Xu Y., et al. Potential efficacy of imiquimod on immunity-related cytokines in murine skin *in vivo* and in human Langerhans cells *in vitro*. *Int. J. Dermatol.* 2012; 51(9): 1116—22.
17. Diamantis M.L., Bartlett B.L., Tying S.K. Safety, efficacy and recurrence rates of imiquimod cream 5% for treatment of anogenital warts. *Skin Therapy Lett.* 2009; 14(5): 1—3, 5.
18. Bechtel M.A., Trout W. Sexually Transmitted Diseases. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2015; 58(1): 172—84.
19. Gerster J.F. 1H-Imidazo[4,5-c]quinolin-4-amines and antiviral use. Patent US № 4689338; 1987.
20. Harrison L.I., Stoesz J.D., Battiste J.L., Nelson R.J., Zarraga I.E. A pharmaceutical comparison of different commercially available imiquimod 5% cream products. *J. Dermatolog. Treat.* 2009; 20(3): 1—5.

21. Smirnov V.S., Petlenko S.V. Comparative influence of imiquimod topical preparations of intact skin guinea pigs. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2016; 10(3): 346—8. (in Russian)
22. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Studies [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)
23. Schacker T.W., Conant M., Thoming C., Stanczak T., Wang Z., Smith M. Imiquimod 5-percent cream does not alter the natural history of recurrent herpes genitalis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(10): 3243—8.
24. Kan Y., Okabayashi T., Yokota S., Yamamoto S., Fujii N., Yamashita T. Imiquimod suppresses propagation of herpes simplex virus 1 by upregulation of cystatin A via the adenosine receptor A1 pathway. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10338—46.
25. van der Snoek E.M., den Hollander J.C., van der Ende M.E. Imiquimod 5% cream for five consecutive days a week in an HIV-infected observational cohort up to 32 weeks in the treatment of high-grade squamous intraepithelial lesions. *Sex Transm. Infect.* 2015; 91(4): 245—7.
26. Harrison C.J., Jenki L., Voychehovski T., Bernstein D.I. Modification of immunological responses and clinical disease during topical R-837 treatment of genital HSV-2 infection. *Antiviral Res.* 1988; 10(4-5): 209—23.
27. Leeyaphan C., Surawan T.M., Chirachanakul P., Prasertworonun N., Punyaratabandhu P., Omcharoen V. et al. Clinical characteristics of hypertrophic herpes simplex genitalis and treatment outcomes of imiquimod: a retrospective observational study. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 33: 165—70.

Поступила 20.01.17

Принята в печать 19.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.841.1.083.2

Колосов А.В., Терновой В.А., Швалов А.Н., Моисеева А.А., Сафатов А.С., Михеев В.Н.

АДАПТАЦИЯ ВИРУСА ОДИНОЧНО-КАПСИДНОГО ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА АМЕРИКАНСКОЙ ХЛОПКОВОЙ СОВКИ (*HELICOVERPA ZEA* SNPV) ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОПУЛЯЦИИ ХЛОПКОВОЙ СОВКИ (*HELICOVERPA ARMIGERA*)

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Роспотребнадзора, 630559, раб. поселок Кольцово, Новосибирская область

Вирус одиночно-капсидного ядерного полиэдроза (ВЯП) американской хлопковой совки (АХС) (*Helicoverpa zea* (Boddie, 1850)) был адаптирован к хлопковой совке Старого Света (ХС) *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) с помощью 5 слепых пассажей на личинках. Была определена полная геномная последовательность полученного штамма ХС-18 (GenBank № KJ004000.1). По биологической активности штамм ХС-18 превосходит как все ранее созданные в России варианты ВЯП, так и штамм HearSNPV-G4 на основе ВЯП хлопковой совки. Гусеницы хлопковой совки III и IV возрастов при заражении их штаммом ХС-18 гибнут значительно быстрее, чем при заражении эталонным штаммом HearSNPV-G4. Основным отличием генома ХС-18 от ближайшего родственного штамма ВЯП АХС, использованного в препарате Элькар, является наличие повтора из 18 пар нуклеотидных оснований внутри рамки считывания гена *RING-finger*, что подтверждает высокую изменчивость этого региона. Три другие вставки и обнаруженные 7 замен нуклеотидных оснований наблюдались ранее, 6 замен ранее не встречались. Мутации расположены в генах *ORF42*, *lef-9*, *ORF58*, *VP39*, *PIF-4*, *P48*, *SOD*, *ORF111*, *ORF129* и *ORF138*. Среди всех нуклеотидных замещений только одна является синонимичной, что свидетельствует о присутствии селективного давления на вирус. Полученный штамм ХС-18 рекомендован в качестве биопестицида для контроля численности ХС на полях хлопчатника.

Ключевые слова: бакуловирусы; штамм; вирус ядерного полиэдроза; хлопковая совка.

Для цитирования: Колосов А.В., Терновой В.А., Швалов А.Н., Моисеева А.А., Сафатов А.С., Михеев В.Н. Адаптация вируса одиночно-капсидного ядерного полиэдроза американской хлопковой совки (*Helicoverpa zea* SNPV) для контроля популяции хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*). *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 134-137.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-134-137>

Kolosov A.V., Ternovoy V.A., Shvalov A.N., Moiseeva A.A., Safatov A.S., Mikheev V.N.

ADAPTATION OF THE CORN EARWORM SINGLE NUCLEOCAPSID NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (*HELICOVERPA ZEA* SNPV) FOR THE CONTROL OF THE COTTON BOLLWORM (*HELICOVERPA ARMIGERA*) POPULATION

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, 630559, Novosibirsk Region, Russian Federation

Helicoverpa zea (Boddie, 1850) (Hz) single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (SNPV) was adapted to the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*, (Hübner, 1805) (Ha)) by five blind passages on larvae. The full genomic sequence of the resulting strain HS-18 has been determined (GenBank acc. №: KJ004000.1). Biological activity of the HS-18 strain is higher than the activity of all other Russian strains of NPV, as far as cotton bollworm strain HearSNPV-G4. HS-18-infected caterpillars at the 3-rd and 4-th ages died much faster than those infected with HearSNPV-G4 strain. A major difference of HS-18 genome is an 18 bp repeat in the RING-finger ORF that confirms high variability of this region. Three other insertions and seven base substitutions were observed earlier, while six base substitutions are new. Mutations are located at ORF42, *lef-9*, ORF58, VP39, PIF-4, P48, SOD, ORF111, ORF129 and ORF138 genes. Among

Для корреспонденции: Колосов Алексей Владимирович, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область. E-mail: kolosov_av@vector.nsc.ru