

- uation of semen processing techniques in reducing HIV viral load. *J. Reprod. Immunol.* 1998; 41(1–2): 301–6.
18. Gur Y., Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 2006; 20(4): 411–6.
  19. Miller D., Ostermeier G.C. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update.* 2006; 12(6): 757–67.
  20. Feldman L.T., Ellison A.R., Voytek C.C., Yang L., Krause P., Margolis T.P. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(2): 978–83.
  21. Evdokimov V.V., Kovalyk V.P., Kurilo L.F., Sorokina T.M., Lebedeva A.L., Tyulenev Yu.A. et al. Distribution of human herpes viruses and human papilloma virus in men with infertility and inflammatory diseases of the urogenital tract and their influence on the basic parameters of semen. *Urologiya.* 2015; (6): 55–9. (in Russian)
  22. Dalton A.D., Harcourt-Webster J.N. The histopathology of the testis and epididymis in AIDS—a post-mortem study. *J. Pathol.* 1991; 163(1): 47–52.
  23. DeTure F.A., Drylie D.M., Kaufman H.E., Centifanto Y.N. Herpesvirus type 2: isolation from seminal vesicle and testes. *Urology.* 1976; 7(5): 541–4.

Поступила 09.11.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.281.8.03:616.98:578.826].076.9.036.8

Смирнов В.С.<sup>1</sup>, Слита А.В.<sup>2</sup>, Гаршинина А.В.<sup>2</sup>, Беляевская С.В.<sup>2</sup>, Аникин В.Б.<sup>2</sup>, Зарубаев В.В.<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА + АЛЬФА-ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАН НА ХОД ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

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

В работе изучена активность препаратов глицирризиновой кислоты (GL) и дипептида глутамил-триптофана (EW) по отдельности и в комбинации (GL + EW) на модели экспериментальной аденовирусной инфекции у сирийских хомяков. Показано, что использование препаратов GL и GL+ EW снижает репликативную активность аденовируса в печени на 0,6–1,2 Ig TCID<sub>50</sub> в зависимости от препарата и срока развития инфекции, а также приводит к нормализации структуры печени животных как на уровне световой микроскопии, так и на ультраструктурном уровне. Полученные данные позволяют рассматривать эти препараты как потенциальный компонент комплексной терапии аденовирусной инфекции.

Ключевые слова: аденовирус; животная модель; глицирризиновая кислота; глутамил-триптофан; химиотерапия.

Для цитирования: Смирнов В.С., Слита А.В., Гаршинина А.В., Беляевская С.В., Аникин В.Б., Зарубаев В.В. Влияние комбинации глицирризиновая кислота + альфа-глутамил-триптофан на ход экспериментальной аденовирусной инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (2): 125–131.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-125-131

Smirnov V.S.<sup>1</sup>, Slita A.V.<sup>2</sup>, Garshinina A.V.<sup>2</sup>, Belyaevskaya S.V.<sup>2</sup>, Anikin V.B.<sup>2</sup>, Zarubaev V.V.<sup>2</sup>

## THE EFFECT OF COMBINATION OF GLYCYRRHIZIC ACID WITH ALPHA-GLUTAMYL-TRYPTOPHAN ON THE EXPERIMENTAL ADENOVIRAL INFECTION

<sup>1</sup>MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, 191023, Russian Federation; <sup>2</sup>Influenza Research Institute, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

In this work, the activity of glycyrrhizic acid (GL) and dipeptide alpha-glutamyl-tryptophane (EW) as single preparations or in combination (GL+EW) against experimental adenoviral infection in the Syrian hamsters was studied. Application of GL and GL+EW was shown to decrease the level of the adenovirus replication in liver tissue by 0.6 – 1.2 IgTCID<sub>50</sub> depending on the composition and time point of the post infection. It was also demonstrated that normalization of the structure of the liver tissue was required, which was shown on the level of both optical and electron microscopy. The results obtained in this work suggest that GL and GL+EW may be considered as potential component of the complex therapy of adenoviral infection.

Key words: adenovirus; animal model; glycyrrhizic acid; glutamyl-tryptophan; chemotherapy.

For citation: Smirnov V.S., Slita A.V., Garshinina A.V., Belyaevskaya S.V., Zarubaev V.V. The Effect of combination of glycyrrhizic acid with alpha-glutamyl-tryptophan on the experimental adenoviral infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(3): 125–131. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-125-131

For correspondence: Vyacheslav S. Smirnov, Doctor of Medicine, Professor, Chief Research Scientist, MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, 191023, Russian Federation, E-mail: vsmirnov@cytomed.ru

### Information about authors:

Zarubaev V.V., <http://orcid.org/0000-0002-6837-5242>

**Funding.** The study of anti-viral activity of glycyrrhizic acid was supported by Cytomed, Ltd., St. Petersburg

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

Received 11 May 2015

Accepted 29 May 2015

Для корреспонденции: Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, проф., главный научный сотрудник ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед»», 191023, г. Санкт-Петербург, E-mail: vsmirnov@cytomed.ru

## Введение

Аденовирусы представляют собой семейство безоболочечных вирусов с двуцепочечным ДНК-геномом. Аденовирусы широко распространены среди людей и животных. Благодаря широкому спектру тканевой и клеточной тропности они вызывают разнообразные по клиническим проявлениям и часто тяжело протекающие заболевания. В то же время аденовирусная инфекция протекает относительно легко у иммунокомпетентных пациентов, но представляет серьезную угрозу для людей с различными формами иммуносупрессии, таких как ВИЧ-инфицированные, реципиенты донорских органов и костного мозга, пациентов, проходящих курс противоопухолевой радио- или химиотерапии. В этих случаях аденовирусы могут приводить к тяжелым последствиям вплоть до летального исхода [1]. Проблема поиска химиопрепаратов, которые бы эффективно подавляли репродукцию аденовирусов и имели при этом минимальный уровень побочных эффектов, представляет собой важную задачу для медицинской науки.

Из существующих препаратов для терапии аденовирусных инфекций следует отметить цидофовир («Gilead Sciences Inc.») [2–8]. Активность в отношении аденовируса была показана *in vitro* для некоторых других аналогов нуклеотидов [9, 10]. Рибавирин, используемый в терапии гепатита С и инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом, оказался эффективным [11, 12], частично эффективным [13] или не имел эффективности [14, 15] против аденовирусной инфекции. Ганцикловир – ациклический аналог гуанозина, эффективный при цитомегаловирусной инфекции, проявляет эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* [16, 17]. Рибавирин, ганцикловир и цидофовир использовались в терапии аденовирусных гепатитов, циститов и пневмоний при иммунодефицитных состояниях у реципиентов органов [11, 12, 14, 16]. Однако выраженные побочные действия преимущественно в форме нефропатий, анемии и нейтропении ограничивают применение этих препаратов [4, 7, 18].

Другие классы соединений также проявляют антиаденовирусную активность. К ним можно отнести липиды [19], акридоны [20], имидазохинолинамины [21], аналоги нуклеозидов [9, 10, 22–25]. Низкомолекулярный нуклеотидный аналог CMX001 дает в опытах *in vitro* и *in vivo* уровень противовирусной активности, на несколько порядков превосходящий эффект цидофовира, однако еще далек от клинического применения [26]. Рост вируса в клеточной культуре может быть ингибирован катехинами зеленого чая [27, 28] путем как влияния на очищенный вирус, так и инактивации вирусной протеазы в ходе репродукции.

Аденовирусы обладают эффективными механизмами подавления интерферониндуцированного противовирусного каскада реакций [29], поэтому устойчивы к действию интерферона и его индукторов.

Ранее была показана ингибирующая активность комбинации глицирризиновой кислоты (GL) и альфа-глутамил-триптофана (EW) против вируса гриппа в опытах на животных [30]. Целью настоящего исследования была оценка противовирусной активности GL и EW и их комбинации против аденовируса человека в экспериментах *in vivo*.

## Материал и методы

**Препараты.** В работе использовали препараты натриевой соли EW (ЗАО МБНПК «Цитомед», Россия) и

тринатриевой соли GL («Mafco Worldwide Corporation», США) в виде монопрепаратов или в комбинации. В качестве плацебо использовали стерильный физиологический раствор, в качестве препарата сравнения – 6-азацитидин (6-АЦ) производства НИИ органической химии (Киев, Украина). Дозы изучаемых препаратов составили: EW – 1 мг/кг, GL – 10 мг/кг, 6-АЦ – 50 мг/кг. Дозы EW и GL были определены на основании ранее проведенных опытов, которые показали оптимальную противовирусную активность этих доз против вируса гриппа [30], доза 6-АЦ – на основании результатов экспериментов по изучению активности 6-АЦ на модели аденовирусной инфекции, использованной в настоящем исследовании [25].

**Вирусы.** В работе был использован аденовирус человека 5-го типа. Вирус пассировали в клетках Нер-2 при 36°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Животные.** Поскольку аденовирусная инфекция у животных не моделируется в виде респираторной патологии, использовали модель диссеминированной аденовирусной инфекции, протекающей с поражением печени, легких и сердца [25]. Наиболее выраженным проявлением этой инфекции является аденовирусный гепатит, параметры которого и были изучены в настоящем исследовании. Новорожденных сирийских хомяков получали от половозрелых родителей и использовали в опытах через 24–48 ч после рождения. Животных распределяли в группы опыта методом случайной выборки, предварительно отобрав животных массой от 2 до 3 г.

**Экспериментальная аденовирусная инфекция.** Вирус вводили животным подкожно в объеме 0,1 мл (10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>). В каждую группу наблюдения брали по 20 хомяков. Препараты вводили через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после инфицирования. Доза 6-АЦ составила 50 мг/кг. В качестве плацебо в контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы.

На 3-й и 7-е сутки после заражения по 10 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали печень. Полученные органы взвешивали и использовали для выделения вируса (n = 5), гистологического и ультраструктурного (n = 5) анализа (см. ниже).

**Титрование вируса.** Для определения инфекционного титра вируса печень животных гомогенизировали в 10-кратном объеме стерильного физиологического фосфатного буфера и готовили из гомогенатов серию 10-кратных разведений (10<sup>-1</sup>–10<sup>-6</sup>) на том же буфере. При определении титра вируса использовали культуру клеток Vero, выращенных на 96-луночных планшетах на среде MEM. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями гомогенатов от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup> и инкубировали в термостате в течение 96 ч. По окончании срока инкубации клетки промывали 2 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером и оценивали количество живых клеток при помощи микротетразолиевого теста (МТТ), характеризующего интенсивность митохондриального дыхания живых клеток [31]. С этой целью в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолия бромид («ICN Biochemicals Inc.», Аурора, Огайо, США) на физиологическом растворе. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч и промывали в течение 5 мин фосфатно-солевым буфером. Осадок растворяли в 100 мкл на лунку диметилсульфоксида, после чего оптическую плотность

Таблица 1

**Репликация аденовируса 5-го типа в органах новорожденных сирийских хомяков при подкожном заражении в присутствии исследованных препаратов**

Препарат, концентрация	Титр вируса в печени, lgTCID <sub>50</sub> /20 мг	
	3-и сутки	7-е сутки
EW	4,1±0,3 (p = 0,360)* (n = 5)	3,2±0,3 (p=0,806) (n = 5)
GL	3,9±0,2 (p = 0,041) (n = 5)	2,5±0,1 (p=0,034) (n = 5)
EW + GL	3,3±0,4 (p = 0,015) (n = 5)	1,6±0,6 (p=0,060) (n = 5)
6-АЦ 50 мг/кг	3,1±0,3 (p = 0,015) (n = 5)	1,7±0,1 (p=0,022) (n = 5)
Плацебо	4,2±0,4 (p = 0,521) (n = 5)	3,2±0,2 (p=0,789) (n = 5)

Примечание. \* – коэффициент Стьюдента при сравнении с группой плацебо

в лунках планшетов измеряли на многофункциональном ридере Victor 1420 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при длине волны 535 нм. Вирус считали присутствующим в лунке, если ее оптическая плотность была в 2 и более раз меньше, чем в лунках с интактными клетками. На основании полученных данных рассчитывали титр аденовируса, который выражали в десятичных логарифмах 50% тканевой цитотоксической инфекционной дозы (lg TCID<sub>50</sub>). О противовирусной активности соединений судили по снижению инфекционного титра аденовируса.

**Гистологический анализ.** Ткань 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 2 смены ксилола и заключали в балзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах гепатита, а также степень дегенеративных процессов в ткани печени.

Поскольку в поздних стадиях аденовирусной инфекции (7-е сутки) выраженность патологических изменений печени снижается по сравнению с ранними стадиями (3-и сутки) [25], для морфометрического исследования использовали печень животных только на 3-и сутки после инфицирования. На каждом срезе печени на сроке 3 сут после инфицирования подсчитывали общее число очагов аденовирусного гепатита. Размеры (по длинной и короткой оси) очагов измеряли в миллиметрах на экране монитора при ув. 40. Условный объем очага рассчитывали по формуле

$$V = ab^2/2,$$

где  $V$  – искомый объем очага,  $a$  и  $b$  – размеры очага в миллиметрах по длинной и короткой оси соответственно, и выражали в полученных условных единицах. Кроме того, в каждом очаге подсчитывали количество инфицированных клеток с увеличенным гиперхромным ядром и включениями в ядре и цитоплазме.

**Электронно-микроскопические исследования.** Кусочки ткани фиксировали 2,5% раствором OsO<sub>4</sub>, обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон/аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut («Reichert», Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S («JEOL», Япония) при инструментальном ув. 5000–8000. Фотосъемку производили на пленку ФТ-41МД.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку результатов (расчет средних значений и стандартных отклонений) проводили при помощи программы Microsoft Excel. Достоверность раз-

личий оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия между группами, если значение  $p$  не превышало 0,05.

**Результаты**

**Влияние препаратов на репродукцию аденовируса в организме животных.** В ходе опыта по определению протективной активности препаратов на животных не было отмечено неспецифической смертности в контрольной группе интактных животных.

Данные о репликации вируса в ткани печени лабораторных животных приведены в табл. 1.

Из представленных результатов видно, что аденовирус человека 5-го типа эффективно размножался в печени новорожденных хомяков, достигая к 3-м суткам после инфицирования титров 4,5 lg TCID<sub>50</sub>/20 мг ткани. К 7-м суткам

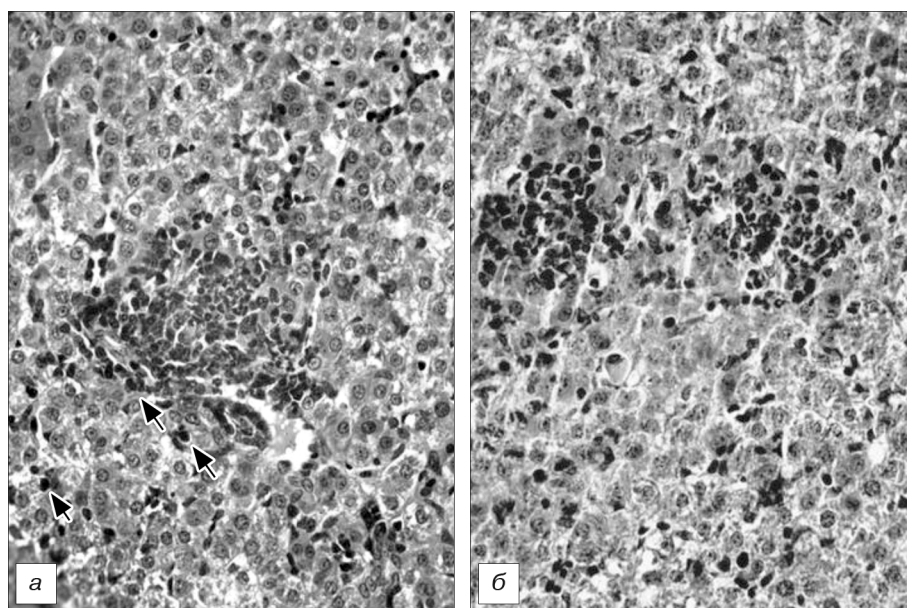


Рис. 1. Очаговый аденовирусный гепатит у новорожденного сирийского хомяка на 3-й (а) и 7-й (б) день после заражения аденовирусом 5-го типа. Очаговая воспалительная инфильтрация печеночной стромы, специфическое аденовирусное поражение ядер печеночных клеток (указаны стрелками), выраженная вакуолизация гепатоцитов. Здесь и на рис. 2 и 3: окраска гематоксилином и эозином; ув. 400.

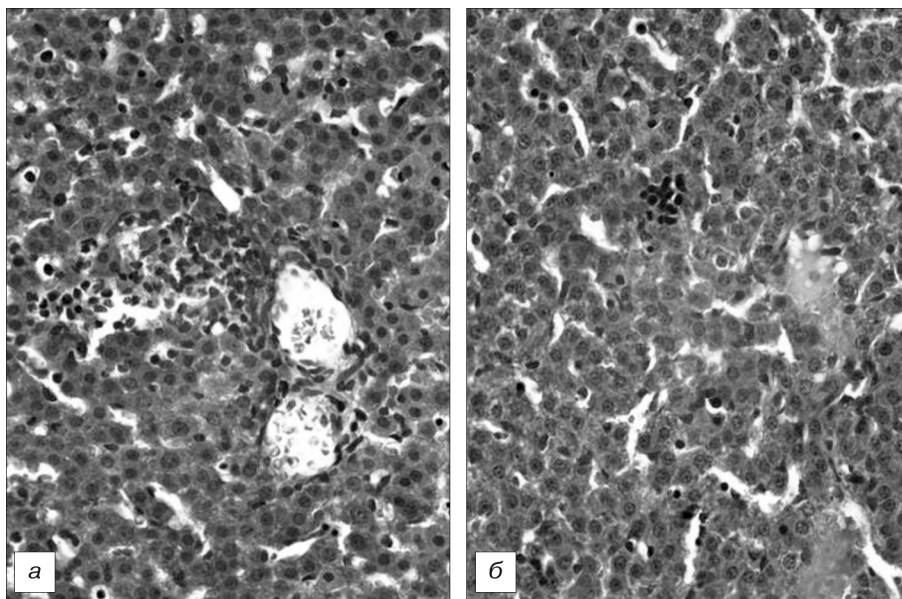


Рис. 2. Очаговый аденовирусный гепатит у новорожденного сирийского хомяка на 3-й (а) и 7-й (б) день после заражения аденовирусом 5-го типа при использовании препарата EW + GL. Интактные гепатоциты, прилежащие к зоне воспаления, низкий уровень некроза и воспалительной инфильтрации.

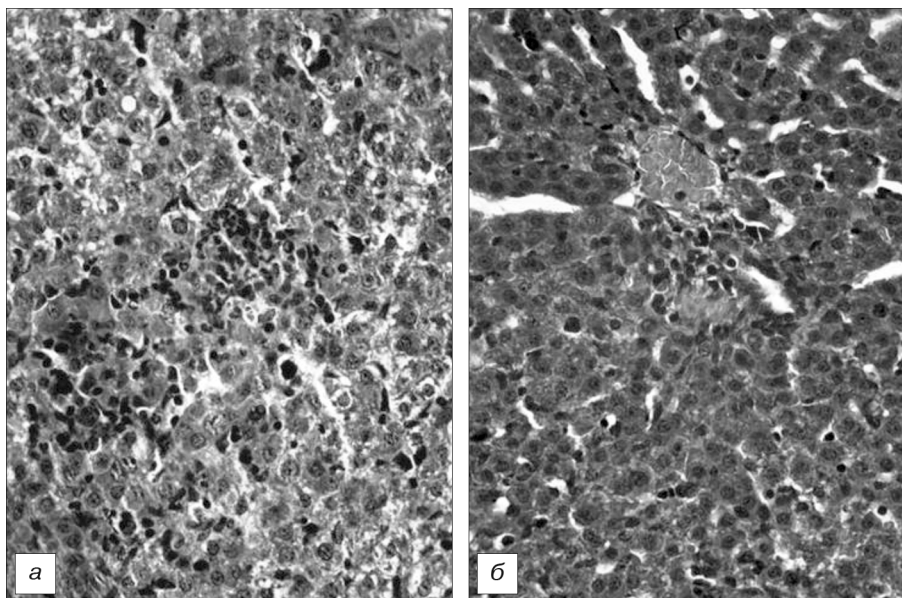


Рис. 3. Очаговый аденовирусный гепатит у новорожденного сирийского хомяка на 3-й (а) и 7-й (б) день после заражения аденовирусом 5-го типа при использовании 6-АЦ. Интактные гепатоциты, прилежащие к зоне воспаления, низкий уровень некроза и воспалительной инфильтрации.

инфекционная активность вируса снижалась и составляла в этот срок  $3,3 \lg \text{TCID}_{50}/20$  мг ткани.

Применение препарата сравнения 6-АЦ достоверно снижало уровень репликации аденовируса в оба срока исследования приблизительно на 1,5 порядка.

Исследуемые препараты влияли на репродукцию вируса в печени животных в разной степени. Так, инфекционная активность аденовируса в печени животных, получавших препарат EW, не отличалась достоверно от таковой в группе плацебо. В то же время использование препаратов

GL и EW + GL снижало репликативную активность вируса на  $0,6-1,2 \lg \text{TCID}_{50}/20$  мг ткани в зависимости от собственно препарата и срока развития инфекции. Наибольшую активность проявил препарат EW + GL, который снижал продукцию вируса примерно на полтора порядка, т. е. по активности был сопоставим с препаратом сравнения.

*Влияние исследованных препаратов на морфогенез экспериментальной аденовирусной инфекции у животных.* В печени интактных животных, не инфицированных вирусом, печеночные дольки были представлены центральными венами с радиально расположенными печеночными балками. Гепатоциты выглядели интактными, имели гомогенную цитоплазму или были слабо вакуолизированы. Купферовские клетки расположены равномерно. Признаков цитодеструкции или воспалительной инфильтрации не отмечалось.

Макроскопически при обследовании внутренних органов у всех животных на 3-й день после заражения обнаруживали светлые очажки воспаления в печени. Микроскопически они представляли собой участки деструкции печеночной паренхимы, вызванной специфическим поражением гепатоцитов и неспецифическим повреждением печеночных балок местной воспалительной реакцией. Специфическое поражение печеночных клеток проявлялось увеличением размеров ядер, их деформацией и формированием в них эозинофильных или базофильных внутриядерных включений, аналогичных по своей структуре включениям, образуемым в культуре клеток, и характеризующих вирусную репродукцию в этих клетках. Неспецифическое повреждение гепатоцитов было связано с лейкоцитарной инфильтрацией печеночной паренхимы и ферментативной деструкцией клеток в очаге воспаления с образованием телец Каунсилмена (рис. 1, а). На 7-е сутки деструктивные процессы были менее выражены и нейтрофильная инфильтрация сменялась круглоклеточными элементами – преимущественно лимфоцитами (рис. 1, б), нередко расположенными по периферии желчных протоков или периваскулярно.

Исследуемые препараты оказывали влияние на морфогенез аденовирусного гепатита в разной степени. Так, использование EW заметно не влияло на размер и клеточный состав очагов воспаления. В то же время применение препаратов GL и EW + GL, а также препарата сравнения 6-АЦ приводило к заметной нормализации структуры органов инфицированных животных. Очаги деструкции

Таблица 2

**Морфометрические показатели ткани печени новорожденных сирийских хомяков при экспериментальном аденовирусном гепатите в условиях применения исследованных препаратов на 3-и сутки после заражения**

Препарат	Число очагов в печени	<i>p</i> (КВ)*	Размер очага при инструментальном ув. 40, усл. ед.	<i>p</i> (КВ)*	Число инфицированных клеток в очаге	<i>p</i> (КВ)*
EW	9,8 ± 1,5 (n = 5)	0,488	108 076,8 ± 8766,7	0,328	2,6 ± 0,7	0,393
GL	8,8 ± 0,9 (n = 5)	0,795	56 018,1 ± 5843,5	0,000	1,7 ± 1,4	0,001
EW + GL	10,8 ± 1,7 (n = 5)	0,278	46 017,4 ± 6262,2	0,000	1,6 ± 1,5	0,000
6-АЦ	7,8 ± 0,6 (n = 5)	0,738	54 336,5 ± 7178,7	0,000	1,2 ± 0,2	0,000
Плацебо	8,4 ± 1,2 (n = 5)	1,000	96 190,2 ± 8306,8	1,000	3,1 ± 0,2	1,000

Примечание. \* КВ – коэффициент вариации.

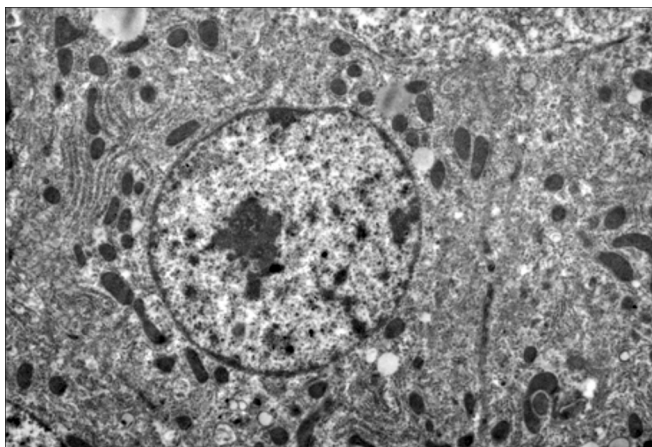


Рис. 4. Гепатоцит печени интактного животного. Органеллы выражены четко, вакуолизация клеток отсутствует. Здесь и на рис. 5 и 6: ув. 4000.

ткани в печени занимали меньшую площадь и содержали намного меньше вирусинфицированных клеток по сравнению с контролем без препаратов. За пределами очагов аденовирусного гепатита в отличие от сильно вакуолизованных гепатоцитов контрольных животных клетки печени выглядели интактными (рис. 2, 3).

Морфометрические показатели аденовирусного гепатита в контрольных и опытных группах животных суммированы в табл. 2.

Как видно из приведенных данных, ни один из изученных препаратов не снижал общего количества очагов воспаления в печени. По-видимому, первичное инфицирование вирусом приводит к инициации развития таких очагов уже в течение 1-х суток, когда лечение еще не проводится. Однако в дальнейшем развитие первичных очагов претерпевало существенные изменения по сравнению с контролем, причем влияние изучаемых препаратов на этот процесс было различным. Так, препарат EW не приводил к достоверному снижению морфометрических показателей аденовирусного гепатита – размеров очагов и количества пораженных клеток. Препарат сравнения 6-АЦ, хотя не менял количества очагов гепатита, однако в значительной мере ограничивал как их размер, так и обсемененность инфицированными клетками. Препараты GL и EW + GL также достоверно снижали эти два показателя, что в комбинации с ранее полученными данными о снижении под их влиянием титров вируса в ткани печени позволяет говорить об их ингибирующем влиянии на изучаемую вирусную патологию.

Электронно-микроскопические исследования. При электронно-микроскопическом исследовании печени животных было установлено, что гепатоциты интактных животных имели гексагональную форму с четко выраженными синусоидальными и билиарными полюсами, обращенными к кровеносному сосуду и желчному каналцу соответственно. Мембрана гепатоцитов имела многочисленные микроворсинки, особенно выраженные на синусоидальном полюсе. В цитоплазме содержалось много органелл и включений. Ядро было округлое и светлое, располагалось в центральной части гепатоцита и имело хорошо заметную ядерную оболочку, немногочисленные мелкие глыбки хроматина и от 1 до 4 округлых ядрышек (рис. 4).

При инфицировании животных аденовирусом морфо-

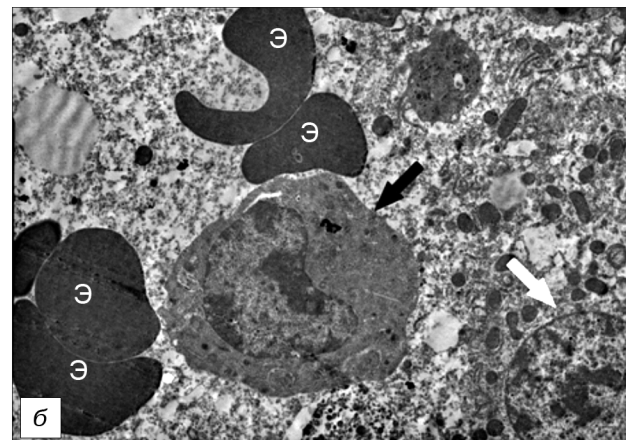
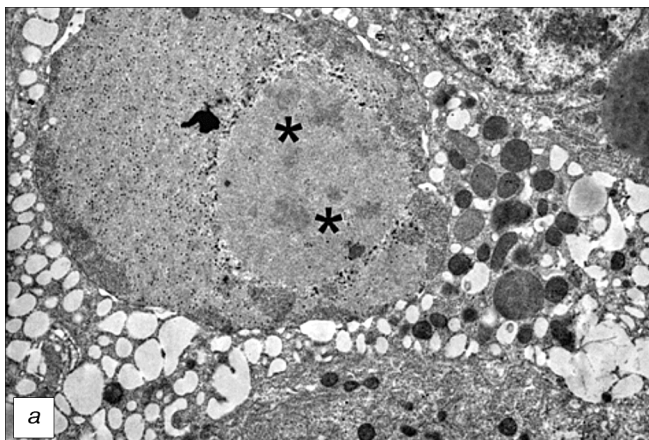


Рис. 5. Деструкция печени новорожденных сирийских хомяков на 3-и сутки после инфицирования аденовирусом человека 5-го типа. а – вирусспецифические включения (отмечены звездочками) и вирионы потомства в ядре, вакуолизация цитоплазмы гепатоцита и деструкция органелл; б – расширение синусоидального капилляра, разрушающийся гепатоцит (белая стрелка) и клетка воспалительного инфильтрата (черная стрелка). Э – эритроциты.

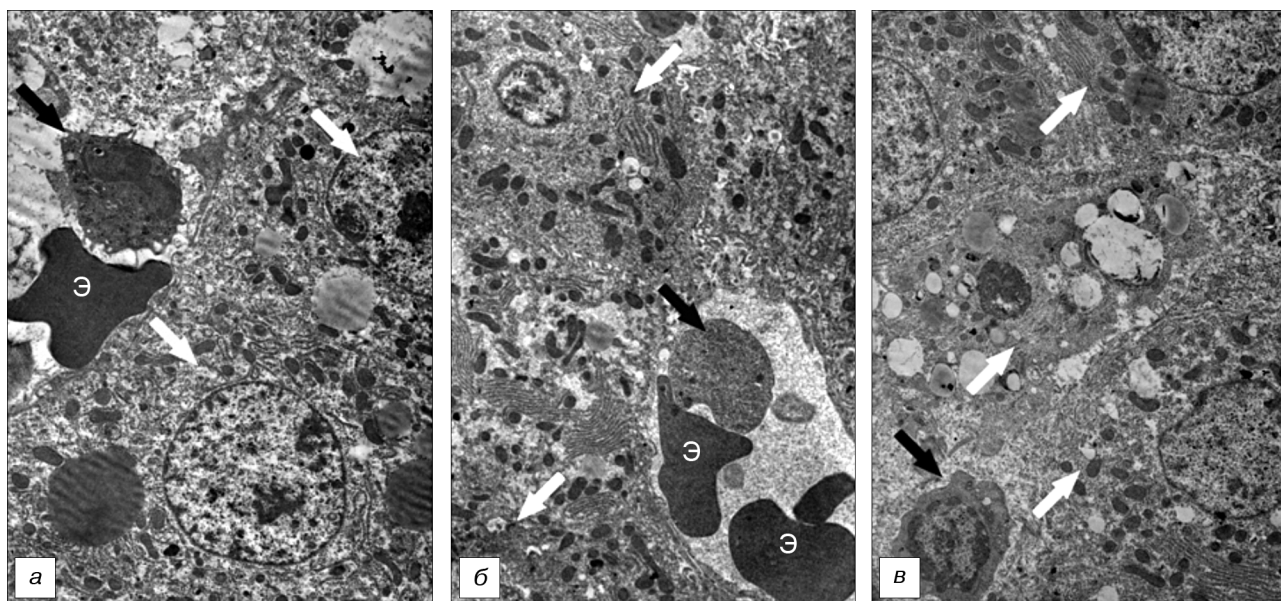


Рис. 6. Структура паренхимы печени новорожденных сирийских хомячков на 3-и сутки после инфицирования аденовирусом человека 5-го типа при применении препарата GL (а), EW + GL (б) и 6-АЦ (в). Белыми стрелками указаны гепатоциты, Э – эритроциты, черные стрелки – клетки воспалительного инфильтрата.

логия печени существенно изменялась. В печеночной паренхиме присутствовали гепатоциты, содержащие в ядре типичные структурированные вирусные включения, белковые паракристаллы и многочисленные вирионы аденовируса в ядре и цитоплазме (рис. 5, а). Признаки неспецифического поражения печени проявлялись появлением обширных участков вакуолизации гепатоцитов, обусловленным расширением эндоплазматического ретикулума в сочетании с его очаговым лизисом. Некоторые клетки имели морфологические признаки апоптоза в виде пикноза и конденсации хроматина или, наоборот, полного лизиса хроматина с формированием пузырьковидных форм. Митохондриальный матрикс во многих случаях был вакуолизирован, кристы дезорганизованы или полностью разрушены, многие митохондрии поглощены аутофагосомами. Расширенные щели между гепатоцитами были заполнены детритом, значительная часть десмосом, скрепляющих межклеточные контакты, находилась в состоянии лизиса.

Синусоидные капилляры были расширены и заполнены клеточным детритом. В пространстве Диссе в повышенном количестве выявлялись клетки лимфоидно-моноцитарного ряда (рис. 5, б). В просвете желчных капилляров обнаружен детрит и миелиноподобные частицы, свидетельствующие о распаде мембранных структур. Значительная часть эндотелиоцитов синусоидных капилляров находилась в состоянии апоптоза, на что указывали конденсация хроматина, остаточные тельца на месте ядер и многочисленные вакуоли в цитоплазме.

Как и в ранее проведенных тестах, применение изучаемых препаратов в разной степени влияло на ультраструктурные особенности морфогенеза аденовирусного гепатита. Так, структура печени животных, получавших EW, практически не отличалась от таковой в группе плацебо. Как и в контрольной группе, гепатоциты в пределах очагов воспаления находились в разных стадиях дегенерации, печеночные синусы были расширены и содержали большое количество клеток воспалительного инфильтрата. В то же время использование препаратов GL, EW + GL и 6-АЦ

нормализовало структуру печеночной паренхимы (рис. 6). Вакуолизация гепатоцитов была выражена в меньшей степени, просветы синусоидных капилляров сужены, количество клеток воспалительного инфильтрата снижено.

### Обсуждение

В результате проведенных исследований показано, что применение GL снижало проявления экспериментального аденовирусного гепатита. В более ранних экспериментах установлено, что GL, будучи мембранотропным агентом, оказывает ингибирующее действие на оболочечные вирусы. Оболочечные вирусы в процессе слияния вирусной и клеточной мембран нуждаются в определенной текучести липидного бислоя и, следовательно, зависят от реологических свойств клеточной мембраны. Так, снижение текучести мембраны на 5% ингибировало размножение ВИЧ-1 на 56%, а 5% повышение текучести, напротив, повышало инфекционность вируса в 2,4 раза [32]. Те же закономерности наблюдались и в случае гриппозной инфекции [33], а также в отношении других вирусов – респираторно-синцициального, SARS-ассоциированного коронавируса, вируса гепатита В, арбовирусов, вируса осповакцины, вирусов группы герпеса и других [34]. Известно также, что GL снижает мембранный транспорт и сialiрование поверхностного антигена вируса гепатита В, а также ингибирует ферменты фосфорилирования при инфекции, вызванной вирусом везикулярного стоматита [34]. Таким образом, по многочисленным данным, GL обладает комплексным механизмом противовирусной активности.

В нашем исследовании использован аденовирус, не имеющий липидной оболочки. В отношении безоболочечных вирусов активность GL также была продемонстрирована [35–37], хотя и в меньшем объеме, как *in vitro*, так и *in vivo*. В частности, показан эффект GL при гепатите С, что может быть обусловлено как прямыми противовирусными, так и цитопротекторными и/или противовоспалительными свойствами соединения.

Таким образом, исследования показали, что использо-

вание препаратов GL и GL + EW снижает репликативную активность аденовируса в печени, а также приводит к нормализации структуры печени животных как на уровне световой микроскопии, так и на ультраструктурном уровне. Несмотря на очевидное протективное действие изученных препаратов на морфологическом и ультраструктурном уровне, их прямое противовирусное действие было незначительным и снижение инфекционного титра вируса не превышало значений, полученных при использовании этиотропного препарата сравнения 6-АЦ. Возможно в случае аденовирусной инфекции оптимальные действующие дозы изучаемых соединений отличаются от использованных при гриппозной инфекции [30]. Для оптимизации дозировок, а также выработки окончательных выводов относительно перспективности использования этих препаратов против аденовируса человека необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

**Финансирование.** Работа по исследованию противовирусной активности глицирризиновой кислоты была поддержана ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–29, 31–37 см. REFERENCES)

30. 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 вирусологии*. 2012; 3: 23–7.

#### REFERENCES

1. Hierholz J.C. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5 (3): 262–74.

2. Hillenkamp J., Reinhard T., Ross R.S., Böhringer D., Cartsburg O., Roggendorf M. et al. The effect of cidofovir 1% with and without cyclosporin a 1% as a topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis: a controlled clinical pilot study. *Ophthalmology*. 2002; 109 (5): 845–50.

3. Hoffman J.A., Shah A.J., Ross L.A., Kapoor N. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2001; 7 (7): 388–94.

4. Romanowski E.G., Gordon Y.J., Araullo-Cruz T., Yates K.A., Kinchington P.R. The antiviral resistance and replication of cidofovir-resistant adenovirus variants in the New Zealand white rabbit ocular model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42 (8): 1812–5.

5. Romanowski E.G., Yates K.A., Gordon Y.J. Antiviral prophylaxis with twice daily topical cidofovir protects against challenge in the adenovirus type 5/New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* 2001; 52 (3): 275–80.

6. Safrin S., Cherrington J., Joffe H.S. Cidofovir. Review of current and potential clinical uses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 458: 111–20.

7. Gordon Y.J., Naesens L., De Clercq E., Mandel P.C., Veckeneer M. The treatment of adenoviral conjunctivitis with topical cidofovir. *Cornea*. 1996; 15 (5): 546.

8. Hitchcock M.J.M., Jaffe H.S., Martin J.C., Stagg R.J. Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity. *Antivir. Chem. Chemother.* 1996; 7 (3): 115–27.

9. Das A., Trousdale M.D., Ren S., Lien E.J. Inhibition of herpes simplex virus type 1 and adenovirus type 5 by heterocyclic Schiff bases of aminohydroxyguanidine tosylate. *Antiviral Res.* 1999; 44 (3): 201–8.

10. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I. et al. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines. *Antiviral Res.* 1987; 8 (5–6): 261–72.

11. Arav-Boger R., Echavarría M., Forman M., Charache P., Persaud D. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000; 19 (11): 1097–100.

12. Shetty A.K., Gans H.A., So S., Millan M.T., Arvin A.M., Gutierrez K.M. Intravenous ribavirin therapy for adenovirus pneumonia. *Pediatr. Pulmonol.* 2000; 29 (1): 69–73.

13. Gavin P.J., Katz B.Z. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics*. 2002; 110 (1, Pt. 1): 1–8.

14. Bordigoni P., Carret A.S., Venard V., Witz F., Le Faou A. Treatment of

adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (9): 1290–7.

15. La Rosa A.M., Champlin R.E., Mirza M., Gajewski J., Giralt S., Rolston K.V. et al. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (6): 871–6.

16. Chen F.E., Liang R.H., Lo J.Y., Yuen K.Y., Chan T.K., Peiris M. Treatment of adenovirus-associated haemorrhagic cystitis with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20 (11): 997–9.

17. Trousdale M.D., Goldschmidt P.L., Nobrega R. Evaluation of ganciclovir against human adenovirus type 5 infection in cell culture and cotton rat eyes. *Antiviral Res.* 1993; 20 (Suppl. 1): 48.

18. Coca S., Perazella M.A. Rapid communication: acute renal failure associated with tenofovir: evidence of drug-induced nephrotoxicity. *Am. J. Med. Sci.* 2002; 324 (6): 342–4.

19. Kaneko H., Kato K., Mori S., Shigeta S. Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus in vitro. *Antiviral Res.* 2001; 52 (3): 281–8.

20. Zarubaev V.V., Slita A.V., Krivitskaya V.Z., Sirotkin A.K., Kovalenko A.L., Chatterjee N.K. Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6 in vitro. *Antiviral Res.* 2003; 58 (2): 131–7.

21. Rautenschlein S., Miller R.L., Sharma J.M. The inhibitory effect of the imidazoquinolinamine S-28828 on the pathogenesis of a type II adenovirus in turkeys. *Antiviral Res.* 2000; 46 (3): 195–205.

22. Naesens L., Lenaerts L., Andrei G., Snoeck R., Van Beers D., Holy A. et al. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49 (3): 1010–6.

23. Mentel R., Kinder M., Wegner U., Janta-Lipinski M., Matthes E. Inhibitory activity of 3-fluoro-2-deoxythymidine and related nucleoside analogues against adenoviruses in vitro. *Antiviral Res.* 1997; 34 (3): 113–9.

24. Alexeeva I., Dyachenko N., Nosach L., Zhovnovataya V., Rybalko S., Lozitskaya R. et al. 6-azacytidine-compound with wide spectrum of antiviral activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001; 20 (4–7): 1147–52.

25. Zarubaev V.V., Slita A.V., Sukhinin V.P., Nosach L.N., Dyachenko N.S., Povnitsa O.Y. et al. Effect of 6-azacytidine on the course of experimental adenoviral infection in newborn Syrian hamsters. *J. Chemother.* 2007; 19 (1): 44–51.

26. Dropulic L.K., Cohen J.I. Update on new antivirals under development for the treatment of double-stranded DNA virus infections. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010; 88 (5): 610–9.

27. Weber J.M., Ruzindana-Umunyana A., Imbeault L., Sircar S. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Res.* 2003; 58 (2): 167–73.

28. Steinmann J., Buer J., Pietschmann T., Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 168 (5): 1059–73.

29. Zhang Y., Schneider R.J. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis and the specific translation of late viral mRNAs. *Semin. Virol.* 1993; 4 (4): 229–36.

30. Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штро А.А. Effect of combinations glutamyl-tryptophan glycyrrhizic acid on during acute infection in mice caused by influenza virus (H3N2). *Voprosy virusologii*. 2012; 3: 23–7. (in Russian)

31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65 (1–2): 55–63.

32. Harada S., Yusa K., Monde K., Akaike T., Maeda Y. Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 329 (2): 480–6.

33. Wolkerstorfer A., Kurz H., Bachhofner N., Szolar O.H. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res.* 2009; 83 (2): 171–8.

34. Fiore C., Eisenhut M., Krause R., Ragazzi E., Pellati D., Armanini D. et al. Antiviral effects of Glycyrrhiza species. *Phytother. Res.* 2008; 22 (2): 141–8.

35. Ashfaq U.A., Masoud M.S., Nawaz Z., Riazuddin S. Glycyrrhizin as antiviral agent against Hepatitis C Virus. *J. Transl. Med.* 2011; 9: 112.

36. Wang J., Chen X., Wang W., Zhang Y., Yang Z., Jin Y. et al. Glycyrrhizic acid as the antiviral component of Glycyrrhiza uralensis Fisch. against coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 147 (1): 114–21.

37. Zhang H., Song Y., Zhang Z. Glycyrrhizin administration ameliorates coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *Am. J. Med. Sci.* 2012; 344 (3): 206–10.