

- Chumakov institute of poliomyelitis and viral encephalitis.* 2006; 23: 110–5. (in Russian)
18. Domnich A., Panatto D., Arbuzova E.K., Signori A., Avio U., Gasparini R. et al. Immunogenicity against Far Eastern and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis (TBE) virus elicited by the currently available vaccines based on the European subtype: systematic review and meta-analysis. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 10(10): 2819–33.
 19. Pripuzova N.S., Gmyl L.V., Romanova L.Iu., Tereshkina N.V., Rogova Y.V., Terekhina L.L. et al. Exploring of primate models of tick-borne flavivirus infection for evaluation of vaccines and drugs efficacy. *PLoS One.* 2013; 8(4): e61094.
 20. Topchiy M.K., Korniyushenko N.P. *Guide to Practical Training in Virology [Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po virusologii]*. Kiev: Izdatel'stvo Kievskogo Universiteta; 1967. (in Russian)
 21. Fritz R., Orlinger K., Hofmeister Y., Janeckia K., Traweger A., Perez-Burgos L. et al. Quantitative comparison of the cross-protection induced by tick-borne encephalitis virus vaccines based on European and Far Eastern virus subtypes. *Vaccine.* 2012; 30(6): 1165–9.
 22. Holzmann H., Vorobyova M.S., Ladyzhenskaya I.P., Ferenczi E., Kundi M., Kunz C. et al. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine.* 1992; 10(5): 345–9.
 23. Vorob'eva M.S., Rasshchepkina M.N. The relationship of the antigenic characteristics of the tick-borne encephalitis virus to the level of the protective activity of inactivated cultured vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1992; (11–12): 35–7. (in Russian)
 24. Vorob'eva M.S., Rasshchepkina M.N., Ladyzhenskaya I.P., Gorbunov M.A., Pavlova L.I., Bektimirov T.A. Comparative study of inactivated cultured vaccines against tick-borne encephalitis manufactured in Russia and in Austria by the «Immun» firm. *Voprosy virusologii.* 1996; 41(5): 221–4. (in Russian)
 25. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Potapova O.F., Grishechkin A.E., Isaeva E.I., Aldarov K.V. et al. Evaluation of immune response and protective effect of four vaccines against the tick-borne encephalitis virus. *Vaccine.* 2014; 32(25): 3101–6.
 26. Chiba N., Osada M., Komoro K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. *Vaccine.* 1999; 17(11–12): 1532–9.
 27. Orlinger K.K., Hofmeister Y., Fritz R., Holzer G.W., Falkner F.G., Unger B. et al. A tick-borne encephalitis virus vaccine based on the European prototype strain induces broadly reactive cross-neutralizing antibodies in humans. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(11): 1556–64.
 28. Leonova G.N., Pavlenko E.V. Characterization of neutralizing antibodies to Far-Eastern of tick-borne encephalitis virus subtype and the antibody avidity for four tick-borne encephalitis vaccines in human. *Vaccine.* 2009; 27(21): 2899–904.
 29. Leonova G.N., Pavlenko E.V. Functional activity of specific antibodies in patients vaccinated against tick-borne encephalitis in relation to different virus strains. *Voprosy virusologii.* 2010; 55(3): 33–7. (in Russian)

Поступила 09.11.15
Принята в печать 19.11.15

© КРЫЛОВА Н.В., ЛЕОНОВА Г.Н., 2016

УДК 615.281.8.03:616.831-002-022:578.833.26].076.9

Крылова Н.В., Леонова Г.Н.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ С РАЗЛИЧНЫМ МЕХАНИЗМОМ ДЕЙСТВИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», 690087, г. Владивосток

Одним из возможных подходов к эффективному, патогенетически обоснованному лечению пациентов с клещевым энцефалитом (КЭ) является включение в комплексную терапию иммуотропных препаратов, выделенных из природных объектов. Проведено сравнительное изучение противовирусной активности тинростима (иммуноактивного пептида из оптических ганглиев кальмара *Berryteuthis magister*) и некоторых официальных препаратов, применяемых для профилактики и лечения КЭ (рибавирин, реферон-ЕС, циклоферон, йодантипирин, иммуноглобулин против КЭ) при экспериментальном КЭ. Все тестируемые препараты достоверно подавляли размножение высоковирулентного штамма вируса КЭ в чувствительной культуре клеток почки эмбриона свиньи: рибавирин и иммуноглобулин против КЭ ингибировали репродукцию вируса полностью – на 100%, циклоферон – на 75%, тинростим, реферон-ЕС и йодантипирин – на 50–60%. На модели острого летального КЭ у мышей оценивали терапевтическую эффективность препаратов. Применение циклоферона и иммуноглобулина против КЭ предотвращало смертность 35–45% инфицированных животных, тинростима – 25%, рибавирин, реферон-ЕС и йодантипирин – 5–10% животных. Комбинация иммуноактивного пептида тинростима с официальными препаратами (рибавирином, циклофероном) была более эффективна, чем применение отдельных препаратов, что свидетельствует о перспективности использования такой терапии при КЭ.

Ключевые слова: *противовирусная активность; иммуноактивный пептид; вирус клещевого энцефалита.*

Для цитирования: Крылова Н.В., Леонова Г.Н. Противовирусная активность препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном клещевом энцефалите. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(3): 139-144.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 139-144

Krylova N.V., Leonova G.N.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF VARIOUS DRUGS WITH DIFFERENT MECHANISMS OF ACTION IN PATIENTS WITH EXPERIMENTAL TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russian Federation

A possible approach to effective, pathogenetically valid treatment of patients with the tick-borne encephalitis (TBE) is a complex therapy with the immunotropic preparations isolated from natural objects. This work is devoted to the comparative study of the antiviral activity of the tinrostim (immunoactive peptide from the optical ganglia of the squid *Berrytiuthis magister*) and some official drugs used for prevention and treatment of the TBE

Для корреспонденции: Крылова Наталья Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории flavivirusных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», 690087, г. Владивосток, E-mail: krylovanatalya@gmail.com

(ribavirin, reaferon-EC, cycloferon, 4-jodantipyrin, immunoglobulin human against encephalitis ixodicum) in the experimental models of the TBE. All tested drugs significantly inhibited the proliferation of the highly virulent strain of the TBEV in the sensitive PK cell cultures: ribavirin and immunoglobulin against TBE completely inhibited viral replication (by 100%); cycloferon – by 75%; tinrostim, reaferon-EC, and jodantipyrin – by 5-60%. Therapeutic efficacy of the compounds was evaluated on a model of acute lethal TBE in mice: treatment with cycloferon and immunoglobulin against TBE prevented the mortality in 35-45% of infected animals; tinrostim – in 25%; ribavirin, reaferon-EC, and jodantipyrin – in 5-10%. The combination of the immunoactive peptide, tinrostim, with official drugs (ribavirin, cycloferon) was more effective than the treatment with a single drug, thereby indicating the prospects of the use of this therapy for treating TBE.

Key words: antiviral activity; immunoactive peptide; tick-borne encephalitis virus.

For citation: Krylova N.V., Leonova G.N. Antiviral activity of various drugs with different mechanisms of action in patients with experimental tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 139-144. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 139-144

For correspondence: Natalya V. Krylova, Doctor of Biology, Leading research scientist, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russian Federation, E-mail: krylovanatalya@gmail.com

Information about authors:

Krylova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Leonova G.N., <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 22 10 2015
Accepted 19 11 2015

Введение

До настоящего времени лечение клещевого энцефалита (КЭ), как и других вирусных инфекций, представляет собой сложную и нерешенную проблему. Тактика терапии КЭ предполагает обязательное проведение комплексной терапии – этиотропной, патогенетической и симптоматической [1, 2]. Современный арсенал этиотропных средств противовирусной терапии включает широкий спектр препаратов из нескольких фармакологических групп: противовирусные химиопрепараты; интерфероны и их индукторы; специфические иммуноглобулины; иммуномодуляторы [3]. Однако целесообразность применения в терапии КЭ препаратов специфических иммуноглобулинов неоднозначна [4], а существующие противовирусные средства недостаточно эффективны. В этой связи поиск препаратов, которые бы не только ингибировали репликацию вируса и элиминировали его из организма, но и корригировали индуцированное вирусом иммунодефицитное состояние, остается актуальным. Одним из возможных подходов к эффективному, патогенетически обоснованному лечению пациентов с КЭ является включение в комплексную терапию иммуноактивных соединений (белков, полисахаридов, пептидов, полифенолов и других), выделенных из природных объектов.

Изучение пептидов, полученных из природных источников и обладающих высокой биологической, в том числе иммуномодулирующей активностью, является одним из перспективных направлений иммунофармакологии. Источником уникальных биологически активных веществ широкого спектра действия являются морские гидробионты, которые в составе соединений часто превосходят аналоги наземного происхождения по биологической или фармакологической активности [5]. Дальневосточные ученые интенсивно занимаются выделением и изучением иммуноактивных пептидов из различных тканей гидробионтов: костного мозга и гормонов тимуса морских млекопитающих, из молока, печени и сердца лососевых рыб [6]. Из оптических ганглиев кальмара *Beryteuthis magister* выделен комплекс пептидов тинростим [7]. Было установлено, что это пептидное соединение стимулирует гуморальный иммунный ответ, фагоцитоз, оказывает активирующее воздействие на ферменты антиоксидантной системы, проявляет апоптозрегулирующую активность, влияет на перекисное окисление липидов, реакции сосудистотромбоцитарного гемостаза, обладает противовоспалительными свойствами [8]. В настоящее время тинростим выпускается в виде биологически активной добавки к пище и используется практическими врачами в качестве средства сопровождения базисной терапии при некоторых заболеваниях [9]. Учитывая иммуномодулирующие свойства тинростима, представляется необ-

ходимым исследовать его активность в отношении вируса КЭ и обосновать целесообразность его применения в комплексной терапии КЭ.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение противовирусной эффективности иммуноактивного пептида тинростима и некоторых официальных препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном КЭ.

Материал и методы

Вирус. В работе использован вирус КЭ дальневосточного субтипа, штамм Dal'negorsk (Dal), выделенный в 1973 г. из мозга человека, умершего от очаговой формы КЭ. Нами описана молекулярно-генетическая характеристика этого штамма (номер полногеномной последовательности в GenBank: FJ402886), изучены его биологические свойства [10]. В настоящем исследовании была использована 10% суспензия мозга инфицированных мышей-сосунков (9-й пассаж), титр которой на культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) составлял 10^7 ТЦИД₅₀/мл.

Культура клеток. Для анализа противовирусной активности препаратов *in vitro* использовали перевиваемую культуру клеток СПЭВ, высокочувствительную к вирусу КЭ. Клетки культивировали в 24-луночных пластиковых панелях с использованием среды 199 и добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров и 100 ЕД/мл гентамицина. Поддерживающая среда содержала ту же смесь, но с добавлением 1% эмбриональной сыворотки.

Животные. Изучение противовирусной активности препаратов *in vivo* проводили на 920 неинбредных мышях-самцах массой 12–14 г, полученных из питомника «Столбовая». Протокол экспериментальной части исследования на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта соответствовал принципам биологической этики, изложенным в международных и российских нормативных документах по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. Работа одобрена Этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» (протокол № 5 от 05.11.13).

Препараты. Тинростим – комплекс пептидов, выделенных из оптических ганглиев кальмара *Beryteuthis magister*, содержит 84% низкомолекулярных пептидов с молекулярной массой от 1 до 12,5 кДа и 16% свободных аминокислот, представленных в основном аспарагиновой, глутаминовой кислотой и лизином [7]. На основе тинростима получена биологически активная добавка к пище «Тинростим-СТ», производство, реализация и применение которой разрешено Минздравом РФ на территории Российской Федерации (регистрационное удостоверение № 77.99.04.928.Б.000663.08.03 от 29.08.03).

Для сравнительного изучения противовирусной эффективности тинростима были использованы официальные препараты, применяемые для профилактики и лечения КЭ, из вышеперечисленных фармакологических групп. Из группы химиопрепаратов выбран рибавирин® (ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург), из группы интерферонов – реаферон-ЕС® (ЗАО «Вектор-Медика», Новосибирск), из эндогенных индукторов интерферона – циклоферон® (ООО НТФФ «Полисан», Санкт-Петербург) и йодантипирин® (ООО «НТМ», Томск). Группа специфических иммуноглобулинов представлена иммуноглобулином против КЭ® (НПО «Микроген», Хабаровск). Тинростим рассматривали как препарат из группы иммуномодуляторов.

Определение цитотоксичности препаратов. На неинфицированную односуточный монослой культуры клеток СПЭВ нанесли различные концентрации исследуемых препаратов и помещали при 37°C в CO₂-инкубатор на 5 сут. Результаты учитывали по появлению цитодеструктивных изменений монослоя клеток. Контролем являлся монослой клеток, на который была нанесена поддерживающая среда без препарата. В качестве показателя токсичности каждого препарата для данной культуры клеток служила максимально переносимая концентрация (МПК), которая составляет 1/2 максимальной концентрации препарата, не оказывающей на клетки токсичного действия (по данным прижизненного морфологического исследования и нарушению поглощения клетками витального красителя) [11].

Определение противовирусной активности препаратов *in vitro*. Монослой культуры клеток инфицировали 10-кратными разведениями штамма Dal вируса КЭ с инфекционным титром 7 lg ТЦИД₅₀/мл. После 1 ч контакта вируса с клетками при 37°C монослой клеток трижды отмывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,2. Исследуемые препараты в различных концентрациях (опыт) или поддерживающую среду (контроль) наносили на инфицированные клетки, пластиковые панели помещали на 5 сут в CO₂-инкубатор. Противовирусное действие препаратов рассчитывали по соотношению инфекционной активности вируса в опытных и контрольных образцах. Все опыты проводили в трехкратной повторности.

Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vitro* являлись следующие показатели [11]: снижение инфекционного титра вируса под воздействием препарата (Δ , lg), коэффициент ингибирования (Ки, %) и химиотерапевтический индекс (ХТИ). Снижение уровня накопления вируса под влиянием препарата (Δ , lg) определяли по формуле:

$$\Delta = A_k - A_o,$$

где A_k – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду изучаемого препарата (в lg ТЦИД₅₀/мл); A_o – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого препарата (в lg ТЦИД₅₀/мл). Ки рассчитывали по формуле:

$$Ki = (A_k - A_o) / A_k \cdot 100\%.$$

За величину ХТИ препарата принимали соотношение МПК/МЭК, где МЭК – минимально эффективная вирусингибирующая концентрация препарата, снижающая титр вируса не менее чем на 2 lg ТЦИД₅₀ [11].

Определение противовирусной активности препаратов *in vivo*. Для моделирования экспериментального КЭ неинбредных мышей подкожно инфицировали штаммом Dal вируса КЭ в дозе 100 LD₅₀/0,2 мл. Животные получали исследуемые препараты через 1 ч после заражения вирусом. Препараты вводили в дозах, рекомендуемых для применения в клинике и пересчитанных на массу тела животного. Способы введения препаратов указаны в табл. 1. Контролем служила группа мышей, инфицированных вирусом КЭ и не получавших препараты. За животными наблюдали 21 день. В каждой группе было по 10 животных, опыты повторялись трехкратно.

Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vivo* являлись показатели летальности (отношение павших животных к общему количеству мышей в группе, %) и средней продолжительности жизни (СПЖ) животных в группе (в сут) [11].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета про-

грамм Statistica 6.0 и Excel. Для оценки значимости различий количественных признаков использовали критерий Вилкоксона для связанных выборок и логранговый критерий z (с поправкой Йетса) для сравнения выживаемости животных двух групп.

Результаты и обсуждение

Изучение активности препаратов *in vitro* в отношении вируса КЭ. При исследовании цитотоксического действия изучаемых препаратов (в концентрациях от 1 до 8000 мкг/мл) на неинфицированную культуру клеток СПЭВ установлено, что их МПК составляли 1000 мкг/мл или более, т. е. эти препараты были нетоксичны для используемой культуры клеток.

Сравнительную оценку вирусингибирующей активности различных препаратов проводили на данной культуре клеток, инфицированную высоковирулентным штаммом Dal вируса КЭ (табл. 1). Установлено, что эффективность подавления репродукции вируса КЭ препаратами, различающимися по своему химическому составу и механизму действия, имела дозозависимый характер. Внесение в культуру клеток противовирусного химиопрепарата рибавирин в концентрации 500 мкг/мл полностью подавляло репродукцию вируса КЭ (на 6,0 lg ТЦИД₅₀/мл), а минимальная вирусингибирующая концентрация этого препарата составила 31 мкг/мл (см. табл. 1). Известно, что рибавирин (синтетический аналог нуклеозидов 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) характеризуется широким спектром противовирусного действия в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Отмечено ингибирующее действие этого препарата на репликацию ряда флавивирусов в различных клеточных культурах [12, 13]. Предполагают, что противовирусная активность рибавирина может быть обусловлена тремя различными механизмами действия [14, 15]. Во-первых, препарат ингибирует активность фермента хозяина инозинмонофосфат дегидрогеназы, что снижает внутриклеточные запасы гуанозинтрифосфата и тем самым опосредованно угнетается синтез нуклеиновых кислот вируса. Во-вторых, он может изменять синтез РНК с последующим нарушением транскрипции вируса. В-третьих, установлено прямое угнетающее влияние рибавирина на активность полимеразы вирусом [14, 15].

Применение реаферона-ЕС (рекомбинантного интерферона – ИФН-α2b) в максимальной концентрации (10⁴ МЕ/мл) вызывало снижение титров вируса КЭ на 3,5 lg ТЦИД₅₀/мл (Ки = 58,3%) (см. табл. 1). Механизм противовирусного действия реаферона-ЕС, как и других ИФН-α, заключается в том, что данные препараты, взаимодействуя со специфическими рецепторами на поверхности клеток, инициируют ряд внутриклеточных изменений, включающих синтез цитокинов и ферментов (2–5-аденилатсинтетазы и протеинкиназы), действие которых блокирует образование вирусных белков и вирусной РНК в клетке [16, 17].

Внесение в культуру клеток индукторов ИФН циклоферона (метилглюкамина акридоната) и йодантипирина (1-фенил-2,3-диметил-4-йодпирозолона) в различной степени снижало репродукцию вируса КЭ (см. табл. 1). Ингибирование репликации вируса на 75% (71,7–78,3%) зарегистрировано при применении 125 мкг/мл циклоферона, противовирусное действие которого обусловлено индукцией эндогенных ИФН-α/β и прямым воздействием на репликацию вируса путем блокирования инкорпорации вирусных РНК в капсиды и увеличения количества дефектных вирусных частиц [18]. Максимальный эффект йодантипирина – снижение репродукции вируса КЭ на 50% (46,7–55,0%) – наблюдали при концентрации препарата 1000 мкг/мл. Полагают [19], что йодантипирин не прямо, а опосредованно усиливает продукцию эндогенных ИФН-α/β, вероятно, за счет способности подавлять синтез простагландинов, оказывающих ингибирующее действие на продукцию ИФН. Данный препарат способен подавлять репродукцию ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов и оказывает стабилизирующее действие на биологические мембраны, что может также обуславливать торжественное проникновения вируса в клетку [19].

Применение иммуноглобулина против КЭ (антитела против КЭ класса IgG, титры не менее 1:80) полностью подавляло репродукцию вируса КЭ (см. табл. 1). Даже при максимальном

Т а б л и ц а 1

Оценка влияния препаратов на репродукцию вируса КЭ в культуре клеток СПЭВ

Препараты	Концентрация препаратов	Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Подавление репродукции вируса, Δ, lg	Ки, %
Контроль (без препаратов)	–	6,0 (5,5–7,0)	–	–
Рибавирин	500 мкг/мл	0	6,0 (5,5–6,5)	100
	250 мкг/мл	1,0 (0,8–1,2)*	5,0 (4,7–5,3)	83,3 (81,5–85,5)
	125 мкг/мл	2,0 (1,8–2,3)*	4,0 (3,7–4,2)	66,7 (62,1–70,0)
	62 мкг/мл	3,1 (2,8–3,3)*	2,9 (2,7–3,2)	50,0 (47,0–53,1)
	31 мкг/мл	4,0 (3,8–4,3)*	2,0 (1,7–2,2)	33,3 (28,2–36,7)
Реаферон-ЕС	10 ⁴ МЕ/мл	2,5 (2,0–3,0)*	3,5 (3,0–4,0)	58,3 (50,0–66,7)
	10 ³ МЕ/мл	3,0 (2,7–3,2)*	3,0 (2,8–3,3)	50,0 (46,7–55,0)
	10 ² МЕ/мл	4,1 (3,8–4,5)*	1,9 (1,7–2,0)	31,6 (28,3–33,3)
	10 МЕ/мл	5,0 (4,6–5,2)	1,0 (0,9–1,3)	16,7 (15,0–21,7)
Циклоферон	125 мкг/мл	1,5 (1,2–1,8)*	4,5 (4,3–4,7)	75,0 (71,7–78,3)
	60 мкг/мл	3,0 (2,6–3,4)*	3,0 (2,9–3,1)	50,0 (48,3–52,7)
	12,5 мкг/мл	3,9 (3,5–4,2)*	2,1 (1,8–2,4)	35,0 (30,0–40,0)
	1,25 мкг/мл	6,0	0	0
Йодантипирин	1000 мкг/мл	3,0 (2,7–3,2)*	3,0 (2,8–3,3)	50,0 (46,7–55,0)
	100 мкг/мл	4,2 (3,8–4,4)*	1,8 (1,6–2,2)	30,0 (26,7–36,7)
	10 мкг/мл	5,0 (4,6–5,2)	1,0 (0,9–1,3)	16,7 (15,0–21,7)
	1 мкг/мл	6,0	0	0
Иммуноглобулин против КЭ, титры	Цельный	0	6,0 (5,5–6,5)	100
	1:10	1,0 (0,9–1,2)*	5,0 (4,8–5,3)	83,3 (81,5–87,3)
	1:100	2,0 (1,8–2,1)*	4,0 (3,7–4,3)	66,7 (65,1–68,5)
	1:1000	2,3 (2,0–2,5)*	3,7 (3,5–4,0)	61,7 (58,5–63,6)
Тинростим	100 мкг/мл	4,0 (3,5–4,5)*	2,0 (1,5–2,5)	33,3 (25,0–41,6)
	10 мкг/мл	2,5 (2,0–3,0)*	3,5 (3,0–4,0)	58,3 (50,0–66,7)
	1 мкг/мл	3,3 (3,0–3,5)*	2,7 (2,5–3,0)	45,0 (41,7–50,0)
	0,1 мкг/мл	3,9 (3,5–4,2)*	2,1 (1,8–2,4)	35,0 (30,0–40,0)
Рибавирин + Тинростим	30 мкг/мл	2,0 (1,6–2,4)*	4,0 (3,6–4,4)	66,7 (60,0–73,3)
	0,1 мкг/мл			

Примечание. Препараты вносили через 1 ч после инфицирования культуры клеток штаммом Dal вируса КЭ. * – различия значимы по отношению к контролю ($p \leq 0,05$). Использован критерий Вилкоксона для связанных выборок.

разведении препарата (1:1000) Ки репликации вируса составил 61,7% (58,5–63,6%). Фармакологическое действие специфических иммуноглобулинов, в том числе иммуноглобулина против КЭ, основано на связывании и нейтрализации внеклеточных вирусных частиц и блокировании присоединения вируса к клетке-мишеню [20, 21].

При использовании пептидного комплекса тинростима в концентрации 10 мкг/мл было зарегистрировано снижение титров вируса КЭ на 3,5 lg ТЦИД₅₀/мл (Ки = 58,3%) (см. табл. 1). Необходимо отметить, что минимальная вирусингибирующая концентрация для тинростима составила 0,1 мкг/мл, что обусловило высокий химиотерапевтический индекс этого препарата (табл. 2).

Механизмы противовирусного действия тинростима, как и ряда других пептидных препаратов, находятся в процессе изучения. Можно предположить, что снижение титров вируса КЭ под действием тинростима происходит за счет блокирования проникновения вируса в клетку, поскольку этот пептид может конкурировать за «вирусспецифические» рецепторы на клетках-мишенях, участвующие в прикреплении и проникновении вируса в клетку. Кроме того, возможно прямое взаимодействие препарата с вирусом, приводящее к нарушению целостности оболочки вируса и блокированию его адсорбции на клетки. Есть

основания полагать, что противомикробные пептиды непосредственно участвуют в изменении структуры вируса [22].

Известно, что комбинированное использование противовирусных препаратов, имеющих разную химическую структуру и принципиально разный механизм действия, может приводить к усилению антивирусного эффекта аддитивного или синергидного характера [23]. Нами был изучен противовирусный эффект сочетанного применения химиопрепарата рибавирина и иммуномодулятора тинростима (см. табл. 1). Монопрепараты применяли в МЭК, снижающих накопление вируса КЭ на 2 lg ТЦИД₅₀/мл. Комбинированное использование рибавирина и тинростима (в соотношении 1:1) в указанных минимальных концентрациях снижало титр вируса КЭ на 4,0 (3,6–4,4) lg ТЦИД₅₀/мл, подавляя репродукцию вируса на 66,7% (60,0–73,3%), т. е. эффект комбинации препаратов имеет аддитивный характер и может быть оценен положительно.

Результаты данного этапа исследований на модели *in vitro* продемонстрировали высокую ингибирующую активность препаратов в отношении вируса КЭ, что свидетельствовало о целесообразности дальнейшего изучения *in vivo* как самих препаратов, так и их совместного применения.

Изучение активности препаратов при экспериментальном КЭ. В настоящем исследовании моделировали летальную вирусную инфекцию у мышей, инфицированных штаммом Dal вируса КЭ в дозе 100 LD₅₀, с использованием лечебной схемы введения препаратов. В контрольной группе все животные погибали начиная с 9-х суток (СПЖ составила 9,8 ± 1,9 дня) (табл. 3).

Пероральное введение животным рибавирина в дозах 50–100 мг/кг защищало от гибели лишь 5,0–13,3% животных (см. табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что хотя рибавирин на модели *in vitro* проявляет высокую ингибирующую активность в отношении вируса КЭ, в то же время он недостаточно эффективно защищает инфицированных животных. Подобные результаты получены другими авторами при флавивирусных инфекциях [24, 25].

Внутримышечное введение реаферона-ЕС в дозе 10⁴ МЕ/кг удлиняло СПЖ животных на 1 день по сравнению с таковой в контрольной группе, защищая от гибели 5,0 ± 1,0% мышей, инфицированных вирусом КЭ (см. табл. 3). Слабое протективное действие реаферона-ЕС, выявленное в наших экспериментах, может объясняться не только видоспецифичностью данного препарата, но и невысокой эффективностью монотерапии препаратами ИФН-α, продемонстрированной другими авторами на моделях животных, инфицированных разными флавивирусами [17, 24].

Т а б л и ц а 2

Определение ХТИ исследуемых препаратов в культуре клеток СПЭВ

Препарат	Диапазон концентраций препаратов	МПК, мкг/мл	МЭК, мкг/мл	ХТИ
Рибавирин	10 – 8000 мкг/мл	2000	30	67
Реаферон-ЕС	10 ¹ – 10 ⁶ МЕ/мл	5000	100	50
Циклоферон	1,25 – 2000 мкг/мл	1000	12,5	80
Йодантипирин	1 – 2000 мкг/мл	1000	100	10
Тинростим	0,001 – 6400 мкг/мл	3200	0,1	32000

Таблица 3

Влияние препаратов на выживаемость животных, инфицированных вирусом КЭ

Препараты	Способ и кратность введения препаратов	Дозы препаратов	% выживших животных	СПЖ, дни	Логранговый критерий z
Контроль (без препаратов)			0	9,8 ± 1,9	
Рибавирин	Перорально 10 дней	50 мг/кг	5,0 ± 1,0	10,8 ± 2,0	$z = 0,891, a = 0,346$
		100 мг/кг	13,3 ± 3,2	11,8 ± 2,4	$z = 1,516, a = 0,130$
		200 мг/кг	0	9,1 ± 1,8	$z = 0,379, a = 0,744$
Реаферон-ЕС	Внутримышечно 5 дней	10 ³ МЕ/кг	0	10,0 ± 2,0	$z = 0,936, a = 0,875$
		10 ⁴ МЕ/кг	5,0 ± 1,0	10,6 ± 2,1	$z = 0,771, a = 0,441$
Циклоферон	Внутримышечно 5 дней	0,6 мг/кг	0	10,2 ± 2,0	$z = 0,399, a = 0,711$
		6 мг/кг	21,7 ± 4,3	12,3 ± 2,5	$z = 2,065, a = 0,039$
		60 мг/кг	35,0 ± 5,0	14,5 ± 2,8	$z = 2,490, a = 0,013$
Йодантипирин	Перорально 5 дней	1,25 мг/кг	0	10,0 ± 2,0	$z = 0,936, a = 0,875$
		12,5 мг/кг	15,5 ± 3,1	11,5 ± 2,3	$z = 1,020, a = 0,308$
Имуноглобулин против КЭ	Внутримышечно однократно	0,15 мл/кг	30,0 ± 5,0	13,9 ± 2,8	$z = 2,240, a = 0,029$
		0,25 мл/кг	45,0 ± 8,0	16,2 ± 3,2	$z = 3,646, a = 0,000$
Тинростим	Подкожно 5 дней	5 мг/кг	25,3 ± 5,8	12,5 ± 2,5	$z = 2,080, a = 0,041$
		50 мг/кг	10,0 ± 2,0	11,0 ± 2,8	$z = 1,056, a = 0,411$
Тинростим + Рибавирин	Подкожно	5 мг/кг	33,3 ± 6,7	13,8 ± 2,5	$z = 2,153, a = 0,028$
					$z_1 = 0,316, a = 0,752$
Тинростим + Циклоферон	Подкожно	5 мг/кг	50,0 ± 5,0	15,9 ± 3,0	$z_2 = 2,060, a = 0,043$
					$z = 3,121, a = 0,000$
	Внутримышечно	60 мг/кг			$z_1 = 2,368, a = 0,021$
					$z_2 = 2,077, a = 0,039$

Примечание. z – логранговый критерий выживаемости с поправкой Йетса характеризует различия в выживаемости между животными опытной и контрольной групп (1,960 – критическое значение для уровня значимости 0,05), z_1 – между животными, получавшими комбинированную терапию, и животными, получавшими монотерапию тинростимом, z_2 – между животными, получавшими комбинированную терапию, и животными, получавшими монотерапию официальными препаратами; a – уровень значимости различий в выживаемости между животными двух групп.

Выживаемость мышей, получавших циклоферон, значительно отличалась от таковой у нелеченых животных ($z > 1,960; a \leq 0,05$). Этот препарат в дозе 60 мг/кг защищал от гибели 35,0 ± 5,0% инфицированных животных, увеличивая СПЖ на 4,7 дня (см. табл. 3). Выраженный защитный и лечебно-профилактический эффект циклоферона был показан как при экспериментальном КЭ, так и у пациентов с лихорадочной и менингеальной формами КЭ [26, 27]. Использование циклоферона в комплексной терапии у этих пациентов приводило к более быстрому купированию клинических симптомов заболевания, сокращению сроков лечения в стационаре, коррекции иммунологических показателей и предупреждению развития двухволнового течения КЭ.

При летальной вирусной инфекции монотерапия йодантипирином (12,5 мг/кг) защищала от гибели 15,5 ± 3,1% животных, зараженных вирусом КЭ, увеличивая СПЖ на 1,7 дня (см. табл. 3). Рядом авторов установлено, что в комплексной терапии КЭ применение йодантипирина сокращало продолжительность лихорадочного периода, субфебрилитета и общеинфекционных проявлений, а также сроки пребывания в стационаре, реже наблюдался постинфекционный астенический синдром [28].

Наибольший защитный эффект в отношении вируса КЭ зарегистрирован при применении 0,25 мл/кг иммуноглобулина против КЭ (см. табл. 3). Однократное введение этого препарата после заражения животных защищало от гибели 45,0 ± 8,0% мышей, СПЖ увеличивалась на 6,4 дня по сравнению с контрольной группой ($z = 3,646, a = 0,000$). Другими авторами было продемонстрировано выраженное протективное действие данного иммуноглобулина как при экспериментальном КЭ, так и при экстренной профилактике КЭ у людей [21, 29].

Подкожное введение тинростима защищало от гибели 25,3 ±

5,8% животных и увеличивало СПЖ инфицированных вирусом КЭ мышей на 2,7 дня по сравнению с таковой в контрольной группе. Вероятно, механизм протективного действия этого препарата реализуется за счет его иммуномодулирующей активности: усиления цитотоксической активности НК-клеток, стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов [8, 9]. Было изучено сочетанное применение рибавирина и циклоферона с тинростимом при остром летальном КЭ у мышей (см. табл. 3). Комбинация официальных препаратов с иммуноактивным пептидом значимо повышает выживаемость животных и срок их жизни по сравнению с контрольной группой ($z > 1,960, a \leq 0,05$). Следует отметить, что совместное применение рибавирина с тинростимом ($z_2 = 2,060, a = 0,043$) более эффективно, чем монотерапия рибавирином ($z = 1,516, a = 0,130$). В то же время эффективность комбинации тинростима с рибавирином значимо не отличалась от результатов монотерапии тинростимом ($z_1 = 0,316, a = 0,752$). На более эффективной оказалась комбинация тинростима с циклофероном, которая превышала значения для отдельных препаратов ($z > 1,960, a \leq 0,05$). Комбинированное введение циклоферона и тинростима защищало от гибели 50,0 ± 5,0% инфицированных животных, удлинняя срок их жизни на 6,1 дня по сравнению с контрольной группой мышей ($z = 3,121, a = 0,000$). Таким образом, сочетание препаратов с различным механизмом действия (тинростима с рибавирином и циклофероном) дает выраженный защитный эффект аддитивного характера, что может свидетельствовать о перспективности использования тинростима в комбинированной терапии КЭ.

Выводы

1. На моделях экспериментального КЭ установлена вирусингибирующая и протективная активность пептида из оптических ганглиев кальмара *Beryteuthis magister* – тинростима, оказывающего широкий спектр биологического действия, при сравнительном исследовании с некоторыми официальными препаратами (рибавирином, реафероном-ЕС, циклофероном, 4-йодантипирином, иммуноглобулином против КЭ).
2. Все тестируемые препараты достоверно подавляли размножение высоковирулентного штамма вируса КЭ в чувствительной культуре клеток СПЭВ: рибавирин и иммуноглобулин против КЭ ингибировали репродукцию вируса полностью – на 100%, циклоферон – на 75%, тинростим, реаферон-ЕС и йодантипирин – на 50–60%.
3. На модели острого летального КЭ у мышей применение циклоферона и иммуноглобулина против КЭ предотвращало смертность 35–45% инфицированных животных, применение тинростима – 25%, рибавирина, реаферона-ЕС и йодантипирина – 5–10% животных.
4. Сочетанное применение иммуноактивного пептида тинростима с официальными препаратами (рибавирином, циклофероном) было более эффективным, чем терапия отдельными препаратами. Наиболее эффективным оказалось комбинированное

введение циклоферона и тинростима, которое защищало от гибели 50,0 ± 5,0% инфицированных животных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5, 10, 12–17, 22, 24, 25
с.м. REFERENCES)**

1. Иерусалимский А.П. Клещевые инфекции в начале XXI века. *Неврологический журнал*. 2009; 3: 17–21.
2. Конькова-Рейдман А.Б. Современные стратегии патогенетической терапии клещевых нейроинфекций. *Инфекционные болезни*. 2009; 3: 35–9.
3. Ершов Ф.И. *Антивирусные препараты*. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006.
4. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (обзор полувекowego опыта). *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2010; 1: 53–9.
6. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. *Иммуноактивные пептиды из гидробионтов и наземных животных*. Владивосток: ТИПРО-центр; 2004.
7. Эпштейн Л.М., Боровская Г.А., Ковалев Н.Н. Способ получения иммуностимулятора. Патент РФ № 2222337; 2004.
8. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. *Иммуноактивные биополимеры из гидробионтов*. Владивосток: ТИПРО-центр; 2007.
9. Кузнецова Т.А., Киняйкин М.Ф., Суханова Г.И., Беседнова Н.Н. Применение тинростима для коррекции нарушений иммунитета и гемостаза в комплексном лечении пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Пульмонология*. 2010; 1: 106–9.
11. Хабриев Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. 2-е изд. М.: Медицина; 2005.
18. Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б. От чего зависят эффекты индукторов интерферона? В кн.: Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. *Интерферон – 2011*. М.; 2012: 80–106.
19. Худoley В.Н., Саратиков А.С., Лепехин А.В., Яровская В.Е., Евстропов А.Н., Помогаева А.Д. и др. Неспецифическая профилактика клещевых нейроинфекций. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008; 7 (Прил.1): 92–7.
20. Мейл Д., Броstoff Дж., Рот Д.Б., Ройт А. *Иммунология*. М.: Логосфера; 2007.
21. Воробьева М.С., Расщепкина М.Н., Ладженская И.П. Вакцины, иммуноглобулины и тест-системы для профилактики и диагностирования клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2007; 6: 30–6.
23. Яковлев В.П., Яковлев С.В. *Рациональная антимикробная фармакотерапия*. М.: Литтерра; 2003.
26. Ратникова Л.И., Ермакова И.В., Миронов И.Л. Циклоферон в комплексном лечении больных с лихорадочной и менингеальной формами клещевого энцефалита. *Российский медицинский журнал*. 2004; 6: 16–8.
27. Ершов Ф.И., Коваленко А.Л., Романцов М.Г., Голубев С.Ю. *Циклоферон. Клиническая фармакология и терапия: Руководство для врачей*. М.-СПб.: Полисан; 1998.
28. Лепехин А.В., Ильинских Е.Н., Лукашова Л.В., Дорошенко А.С., Замятин Е.В. Изучение клинической эффективности профилактического применения йодантипирина при клещевом энцефалите. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 4: 55–8.
29. Воронкова Г.М. *Специфические иммуноглобулины из донорской крови человека для лечения КЭ и ГЛПС (лабораторные и клинические испытания)*: Дисс. ... докт. мед. наук. Хабаровск; 2002.

REFERENCES

1. Ierusalimskiy A.P. Tick-borne infections in the beginning of the XXI century. *Neurologicheskiy zhurnal*. 2009; 3: 17–21. (in Russian)
2. Kon'kova-Reydmann A.B. Current strategies pathogenic therapy of mite neuroinfections. *Infektsionnye bolezni*. 2009; 3: 35–9. (in Russian)
3. Ershov F.I. *Antiviral Drugs [Antivirusnye preparaty]*. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)
4. Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V. The efficacy of immunoglobulin preparations for the post-exposure prophylaxis tick-borne encephalitis in Russia (review of half a century of experience). *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2010; 1: 53–9. (in Russian)
5. Proksch P., Edrada-Ebel R., Ebel R. Drugs from the Sea – opportunities and obstacles. *Marine Drugs*. 2003; 1: 5–17.

6. Besednova N.N., Epshteyn L.M. *Immunoactive Peptides of Hydrobiotics and Terrestrial Animals [Immunoaktivnye peptidy iz gidrobiontov i nazemnykh zhivotnykh]*. Vladivostok: TINRO-tsentr; 2004. (in Russian)
7. Epshteyn L.M., Borovskaya G.A., Kovalev N.N. A Method of Producing an Immunopotentiator. Patent RF № 2222337; 2004. (in Russian)
8. Zaporozhets T.S., Besednova N.N. *Immunoactive Biopolymers from Hydrobiotics [Immunoaktivnye biopolimery iz gidrobiontov]*. Vladivostok: TINRO-tsentr; 2007. (in Russian)
9. Kuznetsova T.A., Kinyaykin M.F., Sukhanova G.I., Besednova N.N. Tinrostim application for correction of immunity disorders and hemostasis in the complex treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2010; 1: 106–9. (in Russian)
10. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*. 2013; 443: 89–98.
11. Khabriev R.U. *A Manual on Experimental (preclinical) Studies of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
12. Huggins J.W. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 11(Suppl.4): 750–61.
13. Jordan J., Briese T., Fischer N., Lau J.Y., Lipkin W.I. Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(4): 1214–7.
14. Dixit N.M., Perelson A.S. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63(7-8): 832–42.
15. Parker W.B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* 2005; 107: 165–71.
16. Anderson J.F., Rahal J.J. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8 (1): 107–8.
17. Crance J.M., Scaramozzino N., Jouan A., Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res.* 2003; 58: 73–9.
18. Ershov F.I., Tazulakhova E.B. What determines the effects of interferon inducers? In: Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., eds. *Интерферон – 2011 [Интерферон – 2011]*. Moscow; 2012: 80–106. (in Russian)
19. Khudoley V.N., Saratikov A.S., Lepekhin A.V., Yarovskaya V.E., Evstropov A.N., Pomogaeva A.D. et al. Non-specific prophylactic measures of mite neuroinfections. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2008; 7 (Suppl.1): 92–7. (in Russian)
20. Meyl D., Brostoff Dzh., Rot D.B., Royt A. *Immunology [Immunologiya]*. Moscow: Logosfera; 2007. (in Russian)
21. Vorob'eva M.S., Rasshepkina M.N., Ladyzhenskaya I.P. Vaccines, immunoglobulins and test systems for the prevention and diagnosis of tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii*. 2007; 6: 30–6. (in Russian)
22. Howell M.D., Jones J.F., Kisich K.O., Streib J.E., Gallo R.L., Leung D.Y. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J. Immunol.* 2004; 172(3): 1763–7.
23. Yakovlev V.P., Yakovlev S.V. *Rational Antimicrobial Pharmacotherapy [Ratsional'naya antimikrobnaya farmakoterapiya]*. Moscow: Litterra; 2003. (in Russian)
24. Leyssen P., Drosten C., Paning M., Charlier N., Paeshuyse J., De Clercq E. et al. Interferons, interferon inducers, and interferon-ribavirin in treatment of flavivirus-induced encephalitis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(2): 777–82.
25. Huggins J.W. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 11 (Suppl.4): 750–61.
26. Ratnikova L.I., Ermakova I.V., Mironov I.L. Cycloferon in complex treatment of patients with febrile and meningeal forms of tick-borne encephalitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2004; 6: 16–8. (in Russian)
27. Ershov F.I., Kovalenko A.L., Romantsov M.G., Golubev S.Yu. *Cycloferon. Clinical Pharmacology and Therapeutics: A Guide for Physicians [Tsikloferon. Klinicheskaya farmakologiya i terapiya: Rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow - St. Petersburg: Polisan; 1998. (in Russian)
28. Lepekhin A.V., Il'inskikh E.N., Lukashova L.V., Doroshenko A.S., Zamyatina E.V. Assessment of effectiveness of iodantipyrine preventive use in treatment of Russian tick-borne encephalitis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 4: 55–8. (in Russian)
29. Voronkova G.M. *Specific Immunoglobulins from Donated Human Blood for the Treatment of TBE and HFRS (laboratory and clinical trials)*: Diss. Khabarovsk; 2002. (in Russian)

Поступила 22.10.15

Принята в печать 19.11.15