

*На правах рукописи*

**ГАЛОЧКИНА**  
**Анастасия Валерьевна**

**ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ  
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОКСАКИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У  
МЫШЕЙ**

03.02.02 – вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Санкт-Петербург**  
**2016**

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории химиотерапии вирусных инфекций

Научный руководитель:

**Зарубаев Владимир Викторович**, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией химиотерапии вирусных инфекций

**Официальные оппоненты:**

**Ведущая организация:**

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.15/17), тел. (812) 499 15 04; e-mail:sover@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.15/17); <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета Д 001.043.01,  
Кандидат биологических наук

**Амосова Ирина Викторовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Коксакивирусная инфекция (КВИ) - это одна из наиболее часто встречающихся инфекций у детей и подростков. Заболевания, вызываемые вирусами Коксаки, характеризуются многообразием клинических проявлений с широким диапазоном тяжести от инанарантных форм до энцефалита и миокардита. На сегодняшний день существует две основные проблемы при терапии КВИ: это трудность при их диагностике, связанная с разнообразием клинических симптомов, и отсутствие на фармакологическом рынке этиотропных препаратов, направленных против данного вида инфекций.

Известно, что вирус Коксаки В4, представитель семейства семейства *Picornaviridae* рода *Enterovirus*, является одним из возможных причин дисфункции  $\beta$ -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. В результате сокращения числа нормально функционирующих  $\beta$ -клеток, нарушаются процессы выработки инсулина, что в конечном итоге может привести к развитию инсулин-зависимого диабета 1 типа (ИЗД 1 типа). Одним из главных механизмов повреждения поджелудочной железы, вызванных вирусной инфекцией, считается окислительный стресс. В связи с тем, что  $\beta$ -клетки обладают слабой антиоксидантной защитой, введение антиоксидантных препаратов в терапию позволило бы приостановить или ослабить процесс поражения тканей поджелудочной железы.

При подтверждении противовирусной активности антиоксидантов в отношении вируса Коксаки В4 в условиях *in vitro* и *in vivo* открывается перспектива расширения арсенала лекарственных средств для лечения КВИ.

**Степень разработанности темы.** Стандартное лечение КВИ заключается в применении симптоматических и иммуномодулирующих препаратов. Специфическая терапия против КВИ на сегодняшний день полностью отсутствует. Потенциал антиоксидантов в качестве активных противовирусных средств может быть доказан в связи с широким спектром их действия. В настоящий момент хорошо изучены следующие свойства антиоксидантов: антигистаминные, противовоспалительные и другие. В настоящей работе охарактеризованы противовирусные свойства дигидрохверцетина (ДКВ) – препарата, широко используемого в качестве противовотечного, дезинтоксикационного, капилляропротективного и антиоксидантного средства. Гипотеза о перспективе применения ДКВ и его комплексных соединений с ионами металлов в качестве противовирусных средств в отношении вируса Коксаки В4 на сегодняшний день не высказывалась в научных публикациях.

**Цель исследования** - оценка терапевтического потенциала антиоксидантов растительного происхождения при лечении экспериментальной коксакивирусной инфекции.

**Задачи исследования:**

- определить АОО препаратов в бесклеточной системе;
- смоделировать КВИ на культуре клеток;
- провести первичный противовирусный скрининг различных антиоксидантов *in vitro* в отношении вируса Коксаки В4 и выявить наиболее активные соединения;
- выявить механизмы и принципы их действия на вирусную инфекцию в условиях *in vitro*;
- разработать экспериментальную модель на животных для изучения противовирусной активности химических соединений *in vivo*;
- оценить противовирусную активность веществ-антиоксидантов, прошедших первичный скрининг на экспериментальной модели с использованием белых мышей.

**Научная новизна работы.**

Разработана и охарактеризована животная модель для изучения патогенеза вирусного панкреатита, вызванного вирусом Коксаки В4 с использованием беспородных мышей.

Впервые оценены противовирусные свойства антиоксидантных соединений в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro* и *in vivo*.

Впервые доказана противовирусная эффективность препарата дигидрохверцетина в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro* и *in vivo*.

Впервые объяснены возможные механизмы действия антиоксидантов как противовирусных веществ в отношении вируса Коксаки В4.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическое значение исследования заключается в том, что оно: позволяет дополнить существующие исследования по изучению противовирусной активности антиоксидантов, дает возможность оценить перспективы создания комплексных противовирусных комплексных средств для лечения КВИ, в том числе на основе антиоксидантов. Практическая значимость диссертационной работы заключается в идентификации и характеристике новых активных АО противовирусных соединений в отношении вируса Коксаки В4; создании экспериментальной животной модели для изучения вируса Коксаки В4; выявлении эффективного противовирусного препарата - дигидрохверцетина в отношении

вируса Коксаки В4; подтверждении наличия противовирусной активности у ДКВ независимо от его антиоксидантных свойств.

**Методология и методы исследования.** В данной работе широко применялись стандартные вирусологические, биохимические, гистологические и электронно-микроскопические методы, методы анализа и синтеза, научной абстракции, а также метод сопоставления теоретических данных с практическими результатами опыта их претворения в жизнь на основе критерия объективности.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Наивысшую АОА в бесклеточной системе имеют следующие соединения: ДКВ, ДКВ-Zn, фракция 6 экстракта антиоксидантов ели сибирской (ЭА-ЕС) и сам ЭА-ЕС.

2. Антиоксидантные соединения обладают противовирусной активностью в отношении вируса Коксаки В4. Наибольшую противовирусную активность *in vitro* проявил ДКВ (дигидрокверцетин) – флавоноид, экстрагируемый из коры лиственницы сибирской.

3. ДКВ проявляет наибольшую активность на ранних стадиях жизненного цикла вируса Коксаки В4.

4. Дигидрокверцетин обладает противовирусной активностью на модели коксакировирусной инфекции у белых мышей, снижая титры вируса в ПЖ и сэмжая уровень воспалительных процессов в ткани.

5. ДКВ препятствует формированию вирусспецифических структур в клетках, выявленных при помощи ЭМ анализа.

6. Пассирование вируса Коксаки В4 в присутствии ДКВ не приводит к повышению резистентности вируса к этому соединению.

**Личный вклад автора** состоит в самостоятельном выполнении всех основных разделов работы. Автором был проведен анализ и систематизация литературных данных, проведен первичный скрининг соединений на АО и противовирусную активность *in vitro*, были выявлены механизмы противовирусного действия ДКВ в отношении вируса Коксаки В4. Также была разработана и охарактеризована модель КВИ *in vivo*, изучено влияние ДКВ на репродукцию вируса в ПЖ и уровень АОА в ходе вирусной инфекции.

**Вклад соавторов** заключается в предоставлении клеточных линий *Vero*, *L-929*, приготовлении материалов для гистологического и электронно-микроскопического анализа и помощи при поиске литературных источников для написания научных статей и тезисов.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Материалы результатов исследования были представлены на международной конференции EuroPic 2014, Blankenberge, Belgium, 2014, 9-14 марта.

**Публикации.** Результаты диссертации отражены в 6 печатных работах, в том числе в 3 статьях в 3 реферируемых российских и международных журналах из списка ВАК, а также в тезисах докладов на российских и международных конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация представлена на 107 печатных листах, состоит из: введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы» и главы «Результаты», а также из обсуждения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 48 рисунками. Список литературы содержит 115 источников, в том числе 9 на русском и 106 на английском языке.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Исследуемые препараты.** Препарат дигидрокверцетин (ДКВ) и комплексные соединения ДКВ с ионами металла - цинком (ДКВ+Zn<sup>2+</sup>), медью (ДКВ+Cu<sup>2+</sup>), и кальцием (ДКВ+Ca<sup>2+</sup>), а также экстракт антиоксидантов ели сибирской (ЭА-ЕС) и его фракции были получены из Иркутского института химии им. А.Е.Фаворского СО РАН, г. Иркутск. Фракции антиоксидантного комплекса были представлены следующими соединениями: фракция 1 – фенокислоты, флавоноиды; фракция 2 – фенолокислоты, флавоноиды, стильбен (следы), проантоцианидины (следы), спирофлавоноиды (следы); фракция 3 – спирофлавоноиды (димеры), фракция 4 – спирофлавоноиды, проантоцианидины; фракция 5 – спирофлавоноиды, в небольшом количестве олигомеры, состоящие из спирофлавоноидов и флаван-3-олов; фракция 6 – олигомеры, состоящие из спирофлавоноидов и флаван-3-олов фракция 7 – полимеры, состоящие из спирофлавоноидов и флаван-3-олов.

**Вирусы и клетки.** В работе использовали штамм вируса Коксаки В4 - *Powers*, полученный из Государственной Коллекции Вирусов ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д.И.Ивановского» Минздрава РФ. Для методики по определению уровня ИФН в крови использовали штамм вируса VSV (вирус везикулярного стоматита) - *Indiana*, полученный также из Государственной Коллекции Вирусов ФГБУ «НИИ Вирусологии им. Д.И.Ивановского» Минздрава РФ. Клетки *Vero* (клетки почки зеленой мартышки) и L-929 (клетки фибросаркомы мыши) были получены из Музея клеточных культур ФГБУ «НИИ Гриппа» Минздрава РФ. Клеточные культуры ( $3 \times 10^5$  клеток /мл и  $4 \times 10^5$  клеток/мл, соответственно) рассеивали на 96-луночные микропланшеты (Orange Scientific, Бельгия) по 0,1 мл в лунку и инкубировали при 37°C при концентрации CO<sub>2</sub> 5% до образования клеточного монослоя на дне микропланшетов. Вирус Коксаки В4 культивировали в

культуральных флаконах площадью 12,5 см<sup>2</sup> с суточным клеточным монослоем Vero, заражая его 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> /10 мл, и инкубировали в термостате 24 часа при +37<sup>0</sup>С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Питательные среды.** В работе использовали питательную среду αMEM (Биолот, Россия). Из нее изготавливали поддерживающую среду с добавлением 2% сыворотки крупного рогатого скота (Биолот, Россия) и антибиотиков амфотерицина 2,5 мг/л (Синтез, Россия) и цефтриаксона 2,5 мг/л (Синтез, Россия).

**Исследование токсичности препаратов.** Все препараты исследовали на токсичность в отношении клеток культуры Vero. Для этого из каждого соединения готовили серию трехкратных разведений от 500 до 5 мкг/мл на среде α-MEM. Клетки инкубировали в течение 48 часов при 37<sup>0</sup>С при концентрации CO<sub>2</sub> 5% в присутствии растворенных препаратов, после чего степень деструкции клеточного монослоя оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ). МТТ-метод основан на восстановлении бесцветной соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, количество которого измеряется спектрофотометрически. МТТ тест ставили на 96-луночных плоскодонных микропланшетах, содержащих клетки Vero. Готовили раствор МТТ (Sigma, США) в физиологическом растворе в концентрации 0,5 мкг/мл. Раствор МТТ вносили в лунки с предварительно отмытыми клетками в объеме 0,1 мл. После 2-2,5 часа контакта МТТ с клетками лунки промывали и заливали 0,1 мл ДМСО, после чего измеряли оптическую плотность при длине волны 535 нм на многофункциональном планшетном ридере Victor 1420 (PerkinElmer, США). На основании полученных результатов рассчитывали 50% цитотоксическую дозу (ЦТД<sub>50</sub>). Исходя из значения ЦТД<sub>50</sub>, рассчитывали рабочие концентрации веществ для дальнейших экспериментов.

**Определение антиоксидантной активности препаратов.** Антиоксидантную активность (АОА) вещества определяли в реакции с DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (Sigma, США), растворенного в этаноле. В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается фиолетовая окраска DPPH в этаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 535 нм методом спектрофотометрии. Опыт проводили на 96-луночных микропланшетах, содержащих лунки с препаратом в концентрациях 0,001 -1 мг/мл и контрольные лунки с физиологическим раствором. Раствор DPPH готовили в этаноле в концентрации 0,02 мкг/мл. Раствор DPPH вносили по 0,1 мл в лунки с растворенными образцами и контрольные лунки. В оставшиеся лунки заливали по 0,1 мл этилового спирта для измерения фоновой оптической плотности. После этого планшеты оставляли на 30 минут в темноте при комнатной температуре. Затем оптическую

плотность измеряли на ридере Victor 1420 (PerkinElmer, США) при длине волны 535 нм. На основании полученных результатов определяли показатели антиоксидантной защиты каждого препарата при различных концентрациях и рассчитывали 50% эффективную концентрацию, то есть концентрацию антиоксиданта, снижающую OD<sub>535</sub> вдвое по сравнению с контрольными значениями в лунках без антиоксидантов. Кратность снижения OD<sub>535</sub> рассчитывали по формуле:  $\frac{K - \Phi}{O - \Phi}$ , где K – OD без препарата, O – OD с препаратом, Φ – OD с препаратом без DPPH.

**Титрование вируса.** Из вирусосодержащего материала готовили серию десятикратных разведений ( $10^{-1}$  -  $10^{-7}$ ). Клеточную культуру заражали 10-кратными разведениями вируса. Микропланшеты с вирусом инкубировали в CO<sub>2</sub> - инкубаторе 48 часов при 37<sup>0</sup> С (5% CO<sub>2</sub>). Инфекционную активность оценивали визуально с помощью светового микроскопа и количественно при помощи МТТ, как описано выше. Вирус считали присутствующим в лунке, если оптическая плотность в ней была ниже OD<sub>535</sub> интактных клеток в два и более раза. За инфекционный титр вируса принимали величину, обратную максимальному разведению материала, приводящему к появлению вируса в лунке. На основании результатов, полученных на нескольких параллелях, рассчитывали итоговый титр вируса по методу Рида и Менча.

**Определение противовирусной активности препаратов.** В монослойную культуру клеток *Vero* на 24-луночной планшете добавляли трехкратные разведения препаратов в поддерживающей среде, после чего выдерживали планшеты 1 час при 37<sup>0</sup> С. Через 1 час клетки заражали вирусом (МОИ 0,01), инкубировали 24 часа и определяли его инфекционную активность при каждой концентрации препаратов, как описано выше. На основании полученных результатов рассчитывали ЭД<sub>50</sub>, то есть дозу препарата, при которой титр вируса снижается вдвое. Основным критерием при изучении специфического противовирусного действия исследуемых препаратов считали показатель химиотерапевтического индекса (ХТИ), определявшийся отношением ЦТД<sub>50</sub> к ЭД<sub>50</sub>. Активными считались препараты, ХТИ которых был 10 и выше.

**Животные.** Эксперименты проводили на белых беспородных мышах, полученных из питомника Рапполово (Лен. Область, Россия).

**Исследование противовирусной активности препаратов *in vivo*.** Вирус в дозе 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> / 0,2 мл вводили внутрибрюшинно в объеме 0, 2 мл/мышь. Препараты вводили по лечебно-профилактической схеме: за час до заражения и через 1, 2, 3 и 4 сутки после заражения. Часть животных использовали для титрования вирусной активности, часть – для морфологического анализа. Для определения уровня репродукции вируса в ткани



поджелудочные железы извлекали на 5 сутки после инфицирования и гомогенизировали с помощью прибора TissueLyser II (QIAGEN, Германия). Далее из полученных гомогенатов готовили серию десятикратных разведений и вносили их в культуру клеток Vero, где инкубировали в течение 6 суток при температуре 37<sup>0</sup> С (5% CO<sub>2</sub>). В качестве контроля использовали гомогенаты поджелудочных желез интактных мышей. Инфекционную активность вируса оценивали, как описано выше. Противовирусную активность препаратов оценивали по снижению вирусных титров в ткани поджелудочных желез животных, получавших препараты по сравнению с контрольными животными, получавшими плацебо.

**Определение антиоксидантной активности препарата *in vivo*.** Для определения уровня АОА в ПЖ 10 мышей заражали внутрибрюшинно вирусом Коксаки В4 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/0,2 мл. 5 животным ежедневно вводили ДКВ в дозе 100 мг/кг. На 4 сутки после инфицирования ПЖ у всех групп мышей извлекали и гомогенизировали на приборе TissueLyser II (QIAGEN, Германия). После этого гомогенаты осветляли на центрифуге Eppendorf 5424 (Eppendorf, Германия) 10 минут при 5 000 об/мин, отбирали надосадок и из него готовили 10% гомогенат на физиологическом растворе. Далее в 10% гомогенате от зараженных, пролеченных ДКВ и интактных мышей измеряли уровень АОА, как описано выше.

**Определение уровня интерферона *in vivo*.** Для определения уровня ИФН в крови мышей их инфицировали вирусом и на 5 сутки отбирали кровь из сонной артерии. Контролем служили интактные животные и животные, которым вместо ДКВ вводили плацебо. После этого образцы крови откручивали на центрифуге 30 минут при 900 об/мин и отбирали сыворотку. Для определения уровня ИФН наращивали клетки L-929 в 96-луночных микропланшетах до состояния монослоя. Для изучения протективных свойств образцов сыворотки из них готовили серию двухкратных разведений от 1:10 до 1:160. Клетки инкубировали с разведениями исследуемой мышинной сыворотки в течение 24 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По истечении этого срока клетки отмывали средой αMEM и добавляли среду αMEM, содержащую 100 ЦТД<sub>50</sub> /лунку VSV. Микропланшеты вновь помещали в термостат на 24 часа. После этого из микропланшетов удаляли среду и окрашивали клетки 0,1% кристалл-виолетом при комнатной температуре 10 минут. Краситель экстрагировали из клеток 30% этанолом в течение 30 минут при 37<sup>0</sup>С, после чего оптическую плотность в лунках планшета измеряли на ридере Victor 2 1420 (PerkinElmer, США) при длине волны 590 нм. За титр ИФН принимали величину, обратную наибольшему разведению исходной сыворотки, при котором сохранялось 50% клеточного монослоя.

**Приготовление гистологических срезов и проведение гистологической окраски.** Для получения гистологических срезов поджелудочные железы мышей (по 5 на группу) помещали в раствор 10 % формалина на фосфатном буфере на 24 часа. Далее образцы промывали в течение ночи в проточной воде, а затем вносили в 50% спирт на сутки. Затем образцы помещали в 70% спирт на сутки, после чего дважды – в 96% спирт на сутки. Далее образцы дважды помещали на 1 час в хлороформ, после чего на 16 часов – в смесь хлороформа с парафином при температуре 37<sup>0</sup> С, после чего образцы дважды переносили в парафин на 1 час при 56<sup>0</sup> С. После проводки образцы ткани помещали в жидкий парафин и оставляли на три часа при комнатной температуре. Из полученной массы вырезали блоки, содержащие образцы ткани и готовили из них срезы толщиной 4 мкм на микротоме. Для гистологической окраски стекла с нанесенными срезами последовательно выдерживали в следующих реактивах: ксилол – 5 мин (2 раза), смесь спирт/ксилол (1:1) – 5 мин, 96% спирт – 2 мин (2 раза), 50% спирт – 1 мин, дистиллированная вода – 1 мин, гематоксилин – 3 мин, вода- 3 мин, дистиллированная вода – 15 с, эозин -15 с, 50% спирт – 1 мин, 96% спирт – 2 мин (2 раза), ксилол – 2 мин (2 раза). На окрашенный срез наносили каплю канадского бальзама, растворенного в ксилоле. Сверху накладывали покровное стекло, контролируя равномерность распределения бальзама при помощи препаровальной иглы. Заключенные срезы выдерживали в течение 24 часов при 20<sup>0</sup> С и исследовали под световым микроскопом. При исследовании оценивали степень и локализацию очагов цитодеструкции, а также выраженность, локализацию и клеточный состав воспалительного инфильтрата.

**Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия дигидрохверцетина.** Вирусный цикл пикорнавирусов очень короткий, процесс репликации происходит в течение 6-7 часов. Через 30 минут после инфицирования происходит ингибирование синтеза клеточных протеинов. В последующие 1-2 часа после инфицирования начинается распад хроматина и его конденсация внутри ядра. На 3 час инфицирования иницируется синтез вирусных белков, сопровождающийся появлением вакуолей в цитоплазме вблизи ядра. По истечении 3 часов клеточная плазматическая мембрана становится проницаемой, и через 4-6 часов после инфицирования завершается сборка вирусных частиц. Через 7 часов клетка умирает, и происходит высвобождение вирусных частицы, готовые к заражению других клеток.

Опыт проводили на клеточной культуре *Vero*, посеянной на 24-луночном планшете (Jet Biofil, Китай). ДКВ добавляли в различное время до, после или одновременно с внесением вируса. В период (-1)- 0 клетки вместе с вирусом находились при температуре +4<sup>0</sup> С. Все остальное время эксперимент проходил при температуре 37<sup>0</sup> С. Вирус в дозе 5×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>

/1 мл добавляли к клеткам во время, условно обозначаемое как точка -1, после чего в течение часа клетки выдерживали при температуре +4<sup>0</sup>С. Далее, в точке 0, несвязавшийся вирус отмывали, добавляли свежую среду с препаратом в той же концентрации и переносили клетки в термостат на 37<sup>0</sup>С, где инкубировали в течение 6 часов. По истечении этого срока клетки соскабливали, из полученной суспензии делали серию десятикратных разведений, которые наносили на свежую культуру клеток и инкубировали 3 суток. Титр вируса оценивали по ЦПД и рассчитывали по методу Рида и Менча. Препарат добавляли в следующие сроки относительно добавления вируса: точка -2 – препарат внесен за час до инфицирования клеток, точка -1 – одновременно во все лунки за исключением клеточного контроля, точка 0 - в момент смены температур, точка 1, 2, 3, 5 – через 1, 2, 3 и 5 часов после смены температур, соответственно.

**Изучение вирулицидного действия препаратов.** Данный опыт проводили в бесклеточной системе, для чего препараты инкубировали в течение часа с вирусом в дозе 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/1 мл, после чего оценивали титр вируса как описано выше. В качестве положительного контроля использовали этанол, в качестве отрицательного – физиологический раствор.

**Получение устойчивых к дигидрокверцетину штаммов вируса Коксаки В4.** Для получения устойчивых штаммов вирус Коксаки В4 выращивали в клеточной культуре Vero на 6-луночных планшетах (Jet Biofil, Китай) в присутствии ДКВ в дозе 100 мкг/мл. Всего провели 5 последовательных пассажей, после чего чувствительность исходного и конечного вирусов к ДКВ оценивали в отдельной серии экспериментов. По снижению противовирусного эффекта ДКВ (увеличение значения ЕС<sub>50</sub>) в отношении пассированных вирусов по сравнению с исходными судили о приобретении ими резистентности.

**Электронная микроскопия.** Клетки Vero, посеянные на 24-луночном планшете, инфицировали вирусом в дозе 5×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> /1 мл и инкубировали 1 час при +4<sup>0</sup> С. Несвязавшийся вирус отмывали 1 раз 5 минут средой для культивирования клеток, затем добавляли 1 мл среды, содержащей ДКВ в концентрации 100 мкг/мл и переносили планшеты в термостат на +37<sup>0</sup> С и 5% CO<sub>2</sub>. В контрольные лунки добавляли среду, не содержащую ДКВ. Через 3 и 6 часов после переноса среду отбирали и заливали клетки 1% раствором глутаральдегида на какодилатном буфере. После инкубации в течение 30 минут при +4<sup>0</sup> С клетки соскабливали, центрифугировали 15 минут при 2000 об/мин, удаляли надосадок и заливали 1 мл 2,5 % глутаральдегидом на какодилатном буфере. Для приготовления какодилатного буфера смешивали 100 мл 0,1М раствора какодилата натрия (Sigma, USA, C0250-25G), 8,3 мл 0,1н HCl и 91,7 мл дистиллированной воды. На полученном буфере готовили 1% раствор тетроксид осмия (Sigma, USA, O5500-250MG) и

фиксируют им клеточные осадки в течение 30 минут. Клетки обезживали последовательно по 10 мин 30%, 50% и 70% этанолом и фиксируют в течение 30 мин 0,5% раствором уранилацетата (Fluka, кат. № А58190) на 70% этаноле. Дальнейшее обезживание осуществляли, выдерживая клетки по 10 мин два раза в 96 спирте и 2 раза по 5 мин в ацетоне. Смесь эпон/аралдит готовили следующим образом. Маточную смесь получали, смешивая в стеклянной емкости следующие реактивы: Эпон 812 (Fluka 45345) - 23,63 г, Durcupan ACM (Fluka 44611) - 30,78 г, дибутилфталат (Fluka 80102) – 2,89 г. Смолу для заливки получали, тщательно смешивая 3,9 г маточной смеси, 3,33 г отвердителя DDSA (Fluka 45346) и 2,6 мг отвердителя DMP30 (Fluka 45348). Клеточный осадок выдерживали последовательно в течение ночи при комнатной температуре в смеси равных объемов ацетона и смолы, в течение 4 часов – в смоле, в течение ночи – в смоле при 37°C, после чего формы переносили в термостат на 56°C для полимеризации. Ультратонкие срезы, приготовленные из полученных блоков на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Austria), контрастировали цитратом свинца (Sigma, USA, C6522, 4 мг/мл. pH=12) и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Japan) при инструментальном увеличении кратности 5000-50000.

**Статистическая обработка данных.** Нормальность распределения величины определяли при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента для выборок с нормальным распределением, или непараметрического критерия Манна-Уитни с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2007 и Statistica 8.0.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Оценка антиоксидантной активности препаратов**

Для оценки антиоксидантной активности препаратов был использован метод, основанный на снижении OD при восстановлении DPPH. DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) является стабильным свободным радикалом за счет делокализации спаренного электрона. Делокализация придает фиолетовую окраску DPPH при растворении его в этаноле. При взаимодействии DPPH с антиоксидантом в атоме азота молекулы DPPH нечетный электрон восстанавливается за счет атома водорода антиоксиданта. При смешивании раствора DPPH с антиоксидантом происходит отдача атома водорода от антиоксиданта к окислителю. Метод DPPH позволяет получить наиболее релевантные результаты по измерению АОА, поскольку дает полную оценку функциональной активности антиоксидантной системы в биологических образцах.

В эксперименте измеряли снижение оптической плотности при разных концентрациях изучаемых веществ. На основании этих данных рассчитывали 50% эффективную антиоксидантную концентрацию (EC<sub>50</sub>) каждого препарата в бесклеточной системе. Чем ниже значения EC<sub>50</sub>, тем активнее вещество. Препараты были разделены на две группы: в первую входили ДКВ и его комплексные соединения с ионами металлов, а во вторую ЭА-ЕС и его фракции. В таблице 1 представлены расчеты 50% эффективной антиоксидантной концентрации, где равноценные значения имеют два соединения ДКВ и ДКВ-Zn. Они являются наиболее активными. Из представленных данных видно, что наименее активным является соединение ДКВ-Cu.

Таблица 1- Антиоксидантные свойства ДКВ и его производных в бесклеточной системе

Препараты	EC <sub>50</sub> , mM	Препараты	EC <sub>50</sub> , mM
ДКВ	155±10,1	ДКВ-Ca	180±12,1
ДКВ-Zn	155±9,3	ДКВ-Cu	395±20,4

Они являются наиболее активными. Из представленных данных видно, что наименее активным является соединение ДКВ-Cu.

На следующем этапе исследования была изучена АОА фракций, содержащих флавоноиды, спирофлавоноиды, протоантоцианидины и другие природные антиоксиданты в виде смесей. В таблице 2 представлены расчеты 50% эффективной антиоксидантной концентрации суммарного препарата ЭА-ЕС и его фракций.

Таблица 2- Антиоксидантные свойства ЭА-ЕС и его фракций в бесклеточной системе.

Препараты	EC <sub>50</sub> , мкг/мл
Фракция 1	224±23,2
Фракция 2	115±11,5
Фракция 3	100±0,7
Фракция 4	63±6,2
Фракция 5	74±6,4
Фракция 6	52±4,5
Фракция 7	61±4,2
ЭА-ЕС	40±3,2

Из полученных данных видно, что наиболее активной фракцией является 6, а также сам исходный экстракт ЭА-ЕС. Между собой фракции препарата ЭА-ЕС существенно отличались по антиоксидантной активности. Фракции 6, 7 оказались более активными по сравнению с фракциями 1, 2. Это обстоятельство позволяет высказать предположение о

зависимости АОА фракций от химической структуры. Также полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе фракционирования экстракта самые поздние по времени выделения фракции оказались более активными по сравнению с первыми. Возможно, это связано с особенностями технологического процесса фракционирования, при котором наиболее активные вещества экстрагируются последними. Высокую активность суммарного экстракта ЭА-ЕС можно объяснить тем, что АОА разных фракций обусловлена различными механизмами.

### Моделирование энтеровирусной инфекции в культуре клеток

Клеточная культура *Vero* была заражена вирусом Коксаки В4 в дозе  $10^2$ TCID<sub>50</sub>/0, 2 мл (m.o.i. 0,01). Для выявления динамики роста вируса *in vitro*, ЦПД в клеточной культуре ежедневно оценивалось под микроскопом. Результаты визуальной оценки представлены на рисунке 1.

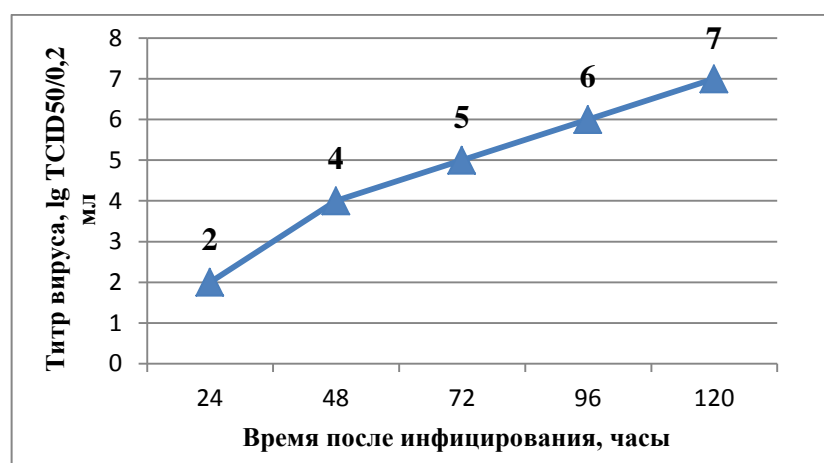


Рисунок 1 – Динамика роста вируса Коксаки В4 *in vitro*

Видно, что инфекционная активность Коксаки В4 повышается с течением времени, достигая к 5 суткам после заражения  $10^7$ TCID<sub>50</sub>/0, 2 мл.

### Оценка противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro*

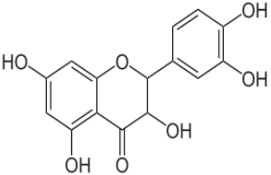
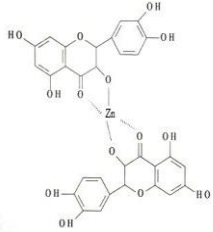
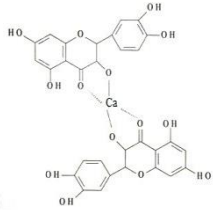
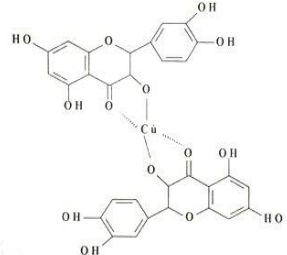
В качестве экспериментального вируса для определения противовирусной активности препаратов был выбран вирус Коксаки В4, который способен эффективно реплицироваться в клетках *Vero*. Визуально в зараженной клеточной культуре уже через 24 часа культивирования обнаруживались признаки вирусспецифического ЦПД – округление клеток, появление гранул, выпячивание цитоплазмы и открепление отдельных клеток от клеточного монослоя. Присутствие ДКВ полностью тормозило развитие цитодеструкции в первые 24 часа. Признаки ЦПД появились лишь на 2 сутки и отмечались только при высоких инфекционных дозах (МОИ 1-100).

На первой стадии экспериментов определяли 50% цитотоксическую дозу (ЦТД<sub>50</sub>) каждого образца в культуре клеток *Vero*. Далее оценивали противовирусную активность

каждого вещества и определяли 50% эффективную дозу ( $ЭД_{50}$ ), а также вычисляли отношение  $ЦТД_{50}$  к  $ЭД_{50}$  - химиотерапевтический индекс (ХТИ). Образец считался активным, если значение ХТИ превышало 10.

В таблице 3 представлены результаты скрининга ДКВ, а также его производных, на противовирусную активность и цитотоксичность.

Таблица 3 - Активность ДКВ и его производных в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro*

Вещество	Формула	$ЦТД_{50}$ , мкг/мл	$ЭД_{50}$ , мкг/мл	ХТИ	Снижение титра вируса при конц $\frac{1}{2}$ $ЦТД_{50}$
ДКВ		$140 \pm 12$	$12 \pm 0,8$	12	3
ДКВ-Zn		$100 \pm 9,2$	$18 \pm 1,2$	5	1,5
ДКВ-Ca		$100 \pm 8,4$	$13 \pm 0,9$	7	1,5
ДКВ-Cu		$90 \pm 7,1$	$17 \pm 0,5$	5	1,5

Из представленных данных видно, что наименее токсичными является ДКВ и его производные ДКВ - Ca и ДКВ - Zn. Согласно используемым критериям, только ДКВ может быть признан активным в отношении вируса Коксаки В4, так как имеет значение ХТИ больше 10, а также в наибольшей степени снижает инфекционную активность вируса.

Вторая группа образцов представлена ЭА-ЕС и его фракциями (таблица 4).

Таблица 4 - Активность ЭА-ЕС и его фракций в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro*

Вещество	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ	Снижение титра вируса при конц ½ ЦТД <sub>50</sub>
ЭА-ЕС	80±7	>120	1	0
Фракция 1	>120	60±3	2	0,5
Фракция 2	>120	45±4	3	0,5
Фракция 3	>120	>120	1	0
Фракция 4	>120	>120	1	0,5
Фракция 5	>120	>120	1	0
Фракция 6	>120	>120	1	0
Фракция 7	>120	90±8	1	0

Как следует из представленных результатов, вторая группа химических веществ не является активной в отношении вируса Коксаки В4, поскольку у большинства соединений полностью отсутствует вирусингибирующая активность, или значения ХТИ не превышают 10. Данные соединения были исключены из дальнейших исследований.

Для анализа специфичности противовирусной активности ДКВ его ингибирующие свойства были изучены в отношении филогенетически близкого вируса CVB3 и неродственного вируса – вируса гриппа. Результаты суммированы в таблице 5.

Таблица 5 - Противовирусная активность ДКВ в отношении различных вирусов

	CVB4(Powers)	CVB3(Nancy)	Грипп (A/PR/8/34)
СТД <sub>50</sub> , мкг/мл	140±12	140±10	140±8
ЕС <sub>50</sub> , мкг/мл	12±0,8	18±1,5	8±0,4
SI	12	7	17
Снижение титра вируса при конц ½ СТД <sub>50</sub>	3	2	4

Как следует из представленных данных, препарат ДКВ эффективно ингибировал представителей семейства *Picornaviridae* – вирус CVB4 (ЕС<sub>50</sub> =12, SI=12) и CVB3 (ЕС<sub>50</sub> =18, SI=7). Менее активным препарат является в отношении вируса CVB3, плеконарил-резистентного штамма *Nancy*. Кроме того, препарат показал эффективную противовирусную защиту в отношении вируса гриппа штамма *A/PR/8/34* (ЕС<sub>50</sub>=8, SI=17).

На основании полученных данных можно говорить о широком спектре вирусингибирующего действия ДКВ в отношении вирусов разных семейств вирусов.



### Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия ДКВ

В этой серии экспериментов была изучена противовирусная активность ДКВ в зависимости от срока его добавления в культуральную среду. Для этого ДКВ добавляли в культуру клеток *Vero* в различные сроки по отношению к заражению вирусом Коксаки В4, после чего оценивали разницу в титрах вируса по сравнению с контролем (рисунок 2).

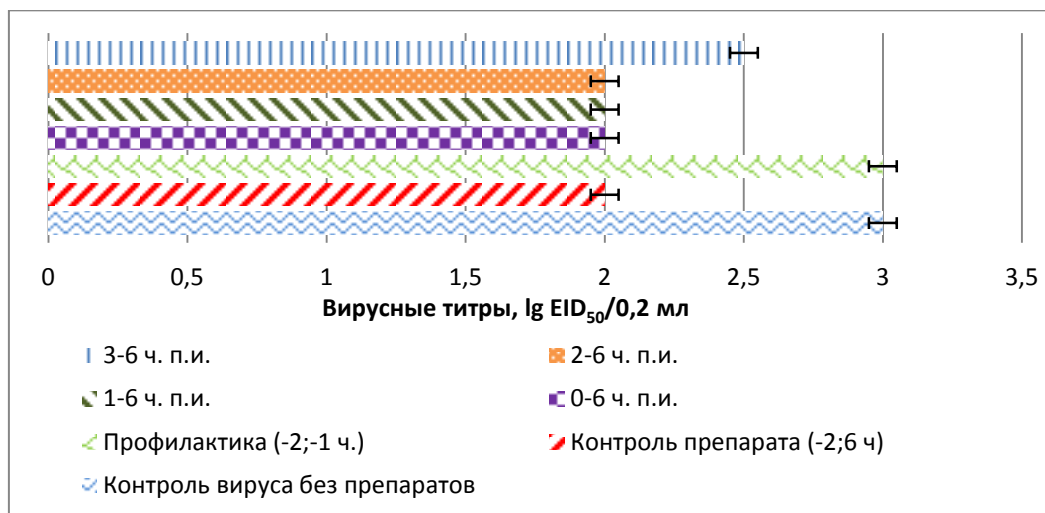


Рисунок 2 - Зависимость интенсивности репродукции CVB4 в присутствии ДКВ от времени внесения препарата.

Как следует из представленных результатов, титр вируса в контроле составил  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/0,2 мл. Статистически значимое снижение титров вируса (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ), наблюдали в следующих временных отрезках 0-6, 1-6, 2-6 ч.п.и. (часов после инфицирования) а также в контрольных образцах, где препарат находился в среде все время эксперимента (-2)-6 ч.п.и. В этих образцах инфекционная активность вируса была снижена на 1 lg EID<sub>50</sub>/ 0,2 мл. Данные результаты позволяют сделать вывод о том, что препарат воздействует на вирус на ранних стадиях его репликации, то есть в первые два часа после заражения. Внесение препарата в точке (-2)-1 является профилактическим, и в этот период препарат может действовать на клеточную мембрану и мешать дальнейшей адсорбции вируса на клетке. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что профилактическое внесение ДКВ в культуру клеток до ее заражения вирусом является неэффективным для ингибирования жизненного цикла Коксаки В4 вируса, то есть противовирусная эффективность ДКВ не обусловлена его предварительным действием на клеточные структуры и механизмы.

### Исследование вирулицидного действия ДКВ

Вирулицидная активность ДКВ была изучена в бесклеточной системе в отношении вируса Коксаки В4, для чего соединение инкубировали совместно с вирусом в течение часа, после чего оценивали инфекционную активность вируса.

Данный препарат статистически достоверно (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ) не снижал инфекционную активность вируса, тогда как обработка 70% этанолом (положительный контроль) приводила к его полной инаktivации (таблица 6).

Таблица 6 - Вирулицидное действие ДКВ в бесклеточной системе.

	Титр вируса, (lg EID <sub>50</sub> /0,2 мл)
Вирусный контроль	5,5±0,0
ДКВ	5,5±0,0
Этанол	0,0±0,0
Физиологический раствор	5,5±0,0

Таким образом, из представленных данных следует, что ДКВ не имеет вирулицидной активности, следовательно, его противовирусные свойства не связаны с непосредственным разрушением внеклеточных вирусных частиц.

#### Селекция и изучение вирусов, устойчивых к ДКВ.

Для оценки способности вируса CVB4 вырабатывать устойчивость к ДКВ, показавшему наибольшую активность в опытах *in vitro*, было проведено 5 последовательных пассажей вируса с концентрацией препарата 100 мкг/мл. После этого вирусингибирующая активность ДКВ была протестирована в отношении исходного и пассированного штамма (CVB4-II) вируса на клетках *Vero* (таблица 7)

Таблица 7 - Сравнение активности ДКВ в отношении вируса Коксаки В4 до и после совместного пассирования с концентрацией этого препарата 100 мкг/мл.

Вирус	Титр вируса (lg TCID <sub>50</sub> /0,2 мл)				
	120 мкг/мл	90 мкг/мл	60 мкг/мл	30 мкг/мл	0 (КВ)
CVB4 исходный	3,5±0,0	4,5±0,5	5±0,5	6±0,5	6,5±0,0
CVB4-II после 5 пассажей с ДКВ	3±0,0	3,5±0,0	4±0,0	4,5±0,5	5±0,0

Как видно из представленных результатов, оба вируса – исходный и пассированный – способны эффективно размножаться на культуре клеток *Vero*, то есть пятикратное пассирование в присутствии ДКВ принципиально не меняло репликативные свойства вируса Коксаки В4. Однако вирусные титры в контроле без препарата существенно отличались друг от друга. Так, титр вируса CVB4-II составил 5 lgTCID<sub>50</sub>/0,2 мл, в то время как титр исходного вируса достигал 6,5 lg TCID<sub>50</sub>/0,2 мл. Таким образом, пассирование в присутствии ДКВ, хотя и не подавляет полностью активность вируса,

однако приводит к снижению ростовых свойств пассированного вируса по сравнению с исходным.

Таким образом, после пяти совместных пассажей с ДКВ вирус не выработал устойчивости к соединению. Эти результаты были подтверждены расчетом  $IC_{50}$ . Для исходного вируса  $IC_{50}$  составлял  $18 \pm 3$  мкг/мл, для вируса, пассированного в присутствии ДКВ -  $20 \pm 2$  мкг/мл. Статистически значимых различий не было выявлено, следовательно, на протяжении пяти пассажей резистентность к ДКВ не вырабатывается.

### **Разработка и характеристика модели энтеровирусного поражения ПЖ у белых мышей**

#### **Сравнительная оценка эффективности внутрибрюшинного и внутримышечного способов эффективности заражения**

Для создания модели энтеровирусного панкреатита у белых мышей сначала был определен наиболее эффективный метод инфицирования ПЖ вирусом Коксаки В4. Для этого 20 мышей заражали вирусом: 10 мышей внутрибрюшинно (i.p.) по 0,2 мл и 10 мышей внутримышечно (i.m.) также по 0,2 мл. На 2 и 3 сутки после инфицирования ПЖ извлекались для оценки вирусных титров. В результате было обнаружено, что более высокие вирусные титры оказывались у мышей, которых заражали внутрибрюшинно (таблица 8).

Таблица 8 - Вирусные титры в ПЖ мышей при разных способах заражения вирусом Коксаки В4

Способ заражения	Титр вируса , lg TCID <sub>50</sub> /0,2 мл	
	48 часов после инфицирования	72 часа после инфицирования
Внутримышечное заражение	$3 \pm 0,0$	$3,5 \pm 0,0$
Внутрибрюшинное заражение	$3,5 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,0$

#### **Динамика репродукции вируса в ткани поджелудочной железы.**

Для оценки динамики репродукции вируса в ткани поджелудочной железы 24 мыши были заражены внутрибрюшинно вирусом Коксаки В4 в дозе  $10^6$  TCID<sub>50</sub> /0,2 мл внутрибрюшинно. На 1, 3, 5, 7, 10 и 14 сутки после инфицирования у 4 мышей извлекали поджелудочные железы для оценки вирусных титров. Вирусные титры на разные сроки после заражения сравнивали между собой для сравнительной оценки уровней вирусной репликации в ткани. В ходе эксперимента был выявлен пик вирусной репродукции, приходящийся на 5 сутки и составляющий  $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub> /0,2 мл. На 7, 10 и 14 сутки

наблюдались более низкие вирусные титры, свидетельствующие о затухании инфекционного процесса (рисунок 3).

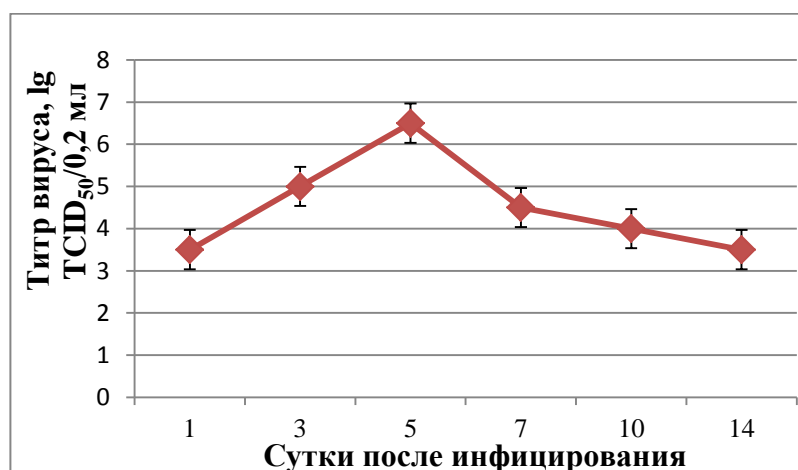


Рисунок 3 - Динамика репродукции вируса CVB4 в ткани поджелудочной железы белых мышей при внутрибрюшинном заражении ( $10^6$  TCID<sub>50</sub> /0,2 мл).

#### **Исследование активности ДКВ на модели коксакивирусной инфекции у белых мышей**

На следующем этапе исследования активность ДКВ была изучена *in vivo* на модели коксакивирусной инфекции у белых мышей, вызванной CVB4. Для опыта был использован препарат ДКВ, показавший наибольшую противовирусную активность *in vitro*, и рибавирин в качестве референс-препарата. Для определения рабочих концентраций в предварительных экспериментах определяли значения ЦТД<sub>50</sub> (50% токсической дозы) препаратов. В качестве рабочей концентрации была выбрана нетоксичная доза 100 мг/кг для рибавирина и ДКВ, не приводящая к гибели животных. Данная дозировка была выбрана на основе анализа литературных данных по тестированию токсичности рибавирина на животных. Препараты ДКВ и рибавирин вводили внутрибрюшинно за 24 часа до инфицирования и раз в день в течение последующих 4 суток после инфицирования.

Критериями активности соединений служили вирусные титры в поджелудочных железах у инфицированных мышей, а также морфологическая структура ткани поджелудочной железы.

#### **Оценка противовирусной активности препаратов в опытах *in vivo*.**

На 5 сутки после заражения поджелудочные железы мышей из каждой группы извлекали асептически. Железы гомогенизировали и титровали инфекционную активность вируса в клеточной культуре *Vero*. Противовирусную активность препаратов определяли по снижению вирусных титров по сравнению с контролем (рисунок 4).

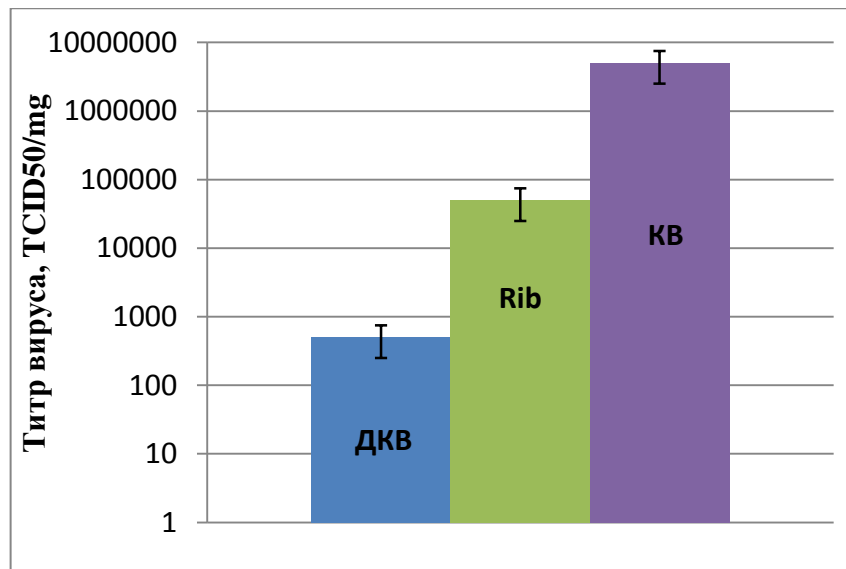


Рисунок 4 - Противовирусная активность препаратов ДКВ и рибавирина в опытах *in vivo*

По результатам титрования *in vitro* образцов группы вирусного контроля можно говорить о высоких вирусных титрах в группе плацебо, достигающих  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mg. В группе референс-препарата рибавирина, обладающим широким противовирусным спектром активности, наблюдалось снижение вирусных титров до  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mg ( $p=0,03$ ). Препарат ДКВ подтвердил свою активность в отношении вируса Коксаки В4 и в эксперименте *in vivo*. Он существенно снизил вирусный титр в ткани ПЖ до  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mg ( $p < 0,0001$ ). Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о наличии противовирусных свойств у обоих препаратов *in vivo* в отношении вируса Коксаки В4, причем активность ДКВ превосходила активность препарата сравнения – рибавирина.

#### **Влияние препаратов на морфогенез экспериментальной энтеровирусной инфекции у мышей.**

Для оценки действия препаратов на тканевые структуры поджелудочных желез был проведен гистологический анализ желез животных, зараженных вирусом Коксаки В4, а также инфицированных животных, получавших препарат ДКВ.

Ткань поджелудочной железы зараженных животных была воспалена, в ней присутствовали некротические очаги и воспалительные инфильтраты со скоплением мононуклеарных клеток и нейтрофилов. Также можно было наблюдать обширный адипонекроз, при этом оставались островки, которые были не повреждены. У животных, пролеченных ДКВ, тканевые повреждения были менее значительные. На гистологических срезах отмечались некротические поражения и воспалительные инфильтраты, но менее обширные по сравнению с контрольной группой (рисунок 5).

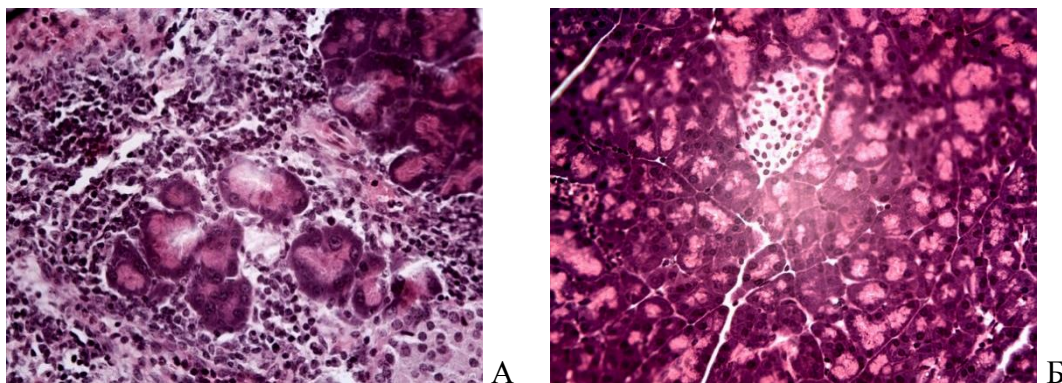


Рис 5 - Поражения, вызванные вирусом Коксаки В4 в ткани поджелудочной железы. А- контроль вируса, Б -ДКВ. Гематоксилин-эозин,  $\times 400$ .

### Антиоксидантная активность ткани поджелудочной железы при энтеровирусном панкреатите

На 4 сутки после инфицирования вирусом ПЖ мышей были асептически извлечены и гомогенизированы. Определение АОА *in vivo* проводилось по той же схеме, что и *in vitro*. В эксперименте измеряли способность гомогенатов ткани восстанавливать DPPH во всех группах мышей: интактных, зараженных и леченных ДКВ (таблица 9).

Таблица 9 - Антиоксидантная активность ткани поджелудочной железы при энтеровирусном панкреатите в условиях применения ДКВ

	ФОН (DPPH+физиологический раствор)	Здоровые мыши	Зараженные мыши	Зараженные мыши, получившие терапию ДКВ
Значения оптической плотности (у.е.) в 10% гомогенате	1,1 $\pm$ 0,015	0,09 $\pm$ 0,0035	0,267 $\pm$ 0,001	0,085 $\pm$ 0,007

Из таблицы видно, что фоновые значения  $OD_{535}$  являются наиболее высокими, поскольку в контрольных лунках находится только окислитель DPPH и полностью отсутствует АО. В результате в фоновых лунках не происходит осветления раствора за счет реакции DPPH с антиоксидантом, и оптическая плотность имеет высокие значения, что характерно для полного отсутствия АОА. Добавление сывороток здоровых мышей снижает значения оптической плотности, что соответствует нормальным показателям антиоксидантных процессов у интактных мышей. В образцах, содержащих гомогенаты ПЖ от зараженных мышей, наблюдаются высокие значения оптической плотности, что

говорит о низком уровне АО защиты при Коксаки вирусной инфекции *in vivo*. При терапии больных мышей ДКВ отмечаются низкие значения оптической плотности, приближенные к показателям здоровых мышей, что свидетельствует о значительной АО защите препарата при окислительном стрессе в ПЖ, вызванном инфицированием вирусом Коксаки В4. Таким образом, применение ДКВ способствует восстановлению АО защиты в ткани ПЖ при КВИ.

### **Оценка уровня выработки интерферона в крови мышей, зараженных вирусом Коксаки В4 при терапии ДКВ**

Для оценки ИФН-индуцирующих свойств ДКВ был измерен уровень ИФН в сыворотке крови мышей. В данном опыте проверялась гипотеза о способности ДКВ индуцировать дополнительную выработку ИФН. В ходе эксперимента образцы крови от интактных, больных и пролеченных ДКВ мышей были взяты на 4 сутки после инфицирования вирусом и разлиты на культуре клеток L-929. В эксперименте измеряли оптическую плотность образцов от разных групп мышей в серии двукратных разведений сывороток крови. Данные по оптической плотности суммированы на рисунке 6.

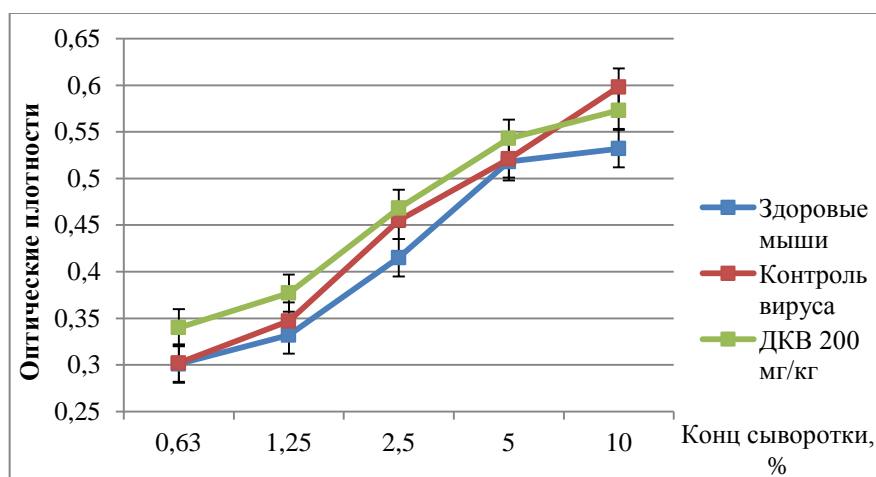


Рис 6 – Индукция ИФН в сыворотке крови мышей

В результате эксперимента во всех группах мышей были получены одинаковые значения ИФН, соответствующие уровню выработки ИФН у интактного животного. Полученные данные указывают на то, что ДКВ не влиял на продукцию ИФН при вирусной инфекции.

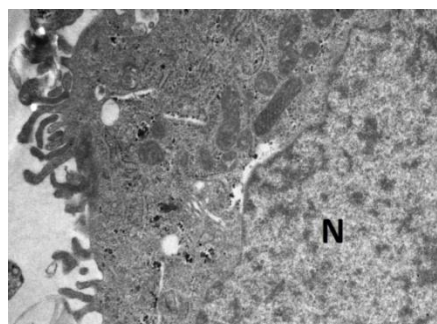
### **Влияние ДКВ на ультраструктурные особенности морфогенеза энтеровирусной инфекции в культуре клеток**

Полный репликационный цикл CVB4 в культуре клеток Vero осуществляется за 6-7 часов. В ходе этого процесса под влиянием вируса происходит формирование в клеточной цитоплазме специфических мембранных структур. Для того, чтобы исследовать вирус-

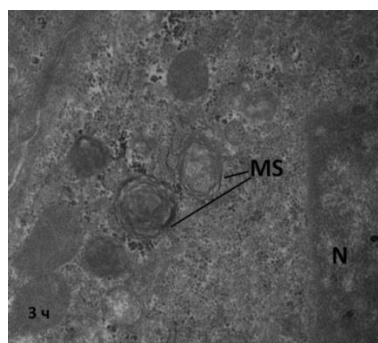
индуцированные изменения в клетках в процессе репликации, клетки зараженные вирусом через 3 и 6 часов после инфицирования были изучены при помощи электронной микроскопии.

Из литературных данных известно, что эти сроки являются наиболее важными в репликации вируса в клетке, поскольку по истечении 3 часов процессы синтеза вирусных белков достигают своего пика, в то время как процесс синтеза клеточных белков снижается до минимума. На 6 час после инфицирования происходит завершение синтеза новой вирусной частицы и осуществляется ее сборка и выход из клетки. Первые мембранные перестройки детектируются в промежуток между 2-3 часами после инфицирования - формируются одномембранные структуры. Они имеют разнообразную форму, в том числе разветвленную трубчатую организацию. С 3 до 6 часов после инфицирования происходит изменения в одномембранных структурах: они начинают скапливаться и изгибаться, образуя сеть. Кроме того происходит формирование двухмембранных перфорированных сферических структур (100-300 нм), которые постепенно замещают одномембранные, и к 6 часам последних остается крайне мало.

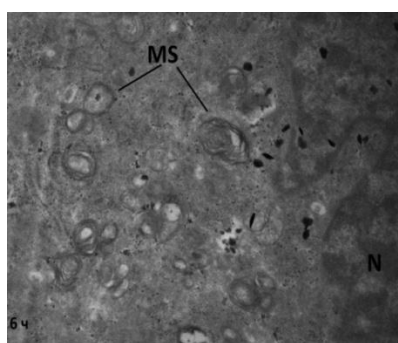
В проведенном опыте при сравнении клеток, зараженных вирусом и клеток, подвергнутых лечению ДКВ, можно обнаружить различия в ультраструктуре при ЭМ. На 3 и 6 часы после инфицирования в клетках с ДКВ наблюдается меньшее число одно- и двумембранных, чем в контроле вируса (рисунок 7). Данные по ЭМ указывают на ингибирование ДКВ структурных преобразований клетки в процессе вирусной инфекции



А



Б



В



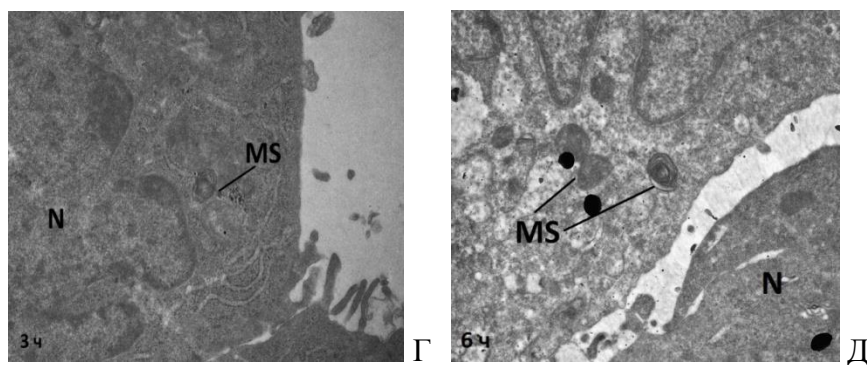


Рис 7 Вирус-индуцированные мембранные перестройки в клеточной культуре Vero. Электронно-микроскопические фотографии мембран клеток Vero на ранней (3 часа) и поздней (6 часов) стадии после инфицирования вирусом Коксаки В4. N - ядро; MS – вирус-индуцированные мембранные структуры. А-интактные клетки; Б-контроль вируса через 3 часа после инфицирования; В-контроль вируса через 6 часов после инфицирования; Г- вирус-инфицированные клетки через 3 часа после заражения при добавлении ДКВ в дозе 100 мкг/мл; Д-вирус-инфицированные клетки через 6 часов после заражения при добавлении ДКВ в дозе 100 мкг/мл.

#### Заключение

В данной работе было проведено исследование антиоксидантной и противовирусной активности ряда флавоноидов в отношении вируса Коксаки В4. Из 12 соединений наибольшей АОА обладали следующие препараты: ДКВ, ДКВ-Zn<sup>2+</sup>, фракция 6 ЭА-ЕС (экстракт антиоксидантов ели сибирской) и сам исходный экстракт ЭА-ЕС. Из изученных образцов только ДКВ показал противовирусную защиту в отношении вируса Коксаки В4 в условиях *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* ДКВ имеет высокий индекс селективности равный 12, что свидетельствует о его противовирусной активности в опытах *in vitro*. В экспериментах *in vivo* ДКВ существенно снизил вирусные титры до  $5 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mg по сравнению с контролем вируса, вирусный титр которого составлял  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mg. ДКВ обладает широким спектром вирусингибирующей активности в отношении вирусов разных семейств. Пассирование в течение 5 пассажей в присутствии препарата ДКВ не приводило к появлению устойчивых штаммов. Показано, что данный препарат действует на вирус на ранних стадиях жизненного цикла - в первые два часа после адсорбции вируса на рецепторах клетки-хозяина. Препарат не обладает вирулицидным действием, что было доказано при его инкубации с вирусом в бесклеточной системе.

### **Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования.**

Для получения новых противовирусных препаратов с антиоксидантной активностью в отношении КВИ следует расширить диапазон растений, из которых можно экстрагировать химические соединения с потенциальной АОА. ДКВ следует рассматривать как перспективное средство комплексной терапии при вирусном поражении ПЖ.

### **Выводы**

1. В результате скрининга по определению АОА препаратов выявлены активные соединения – ДКВ (дигидрокверцетин) и ЭА-ЕС (экстракт антиоксидантов ели сибирской)
2. Создана модель КВИ в культуре клеток *Vero*. В качестве тестового вируса использован вирус Коксаки В4
3. В результате тестирования соединений на противовирусную активность *in vitro* определено наиболее действенное вещество – ДКВ
4. Определены механизмы действия препарата ДКВ: ДКВ действует на ранних стадиях репликации вируса Коксаки В4, не вырабатывает устойчивых штаммов, а также не обладает вирулицидным действием.
5. Разработана модель экспериментальной коксакивирусной инфекции на белых мышах.
6. Доказана противовирусная активность препарата ДКВ *in vivo* по следующим показателям: по снижению вирусных титров в ПЖ, повышению уровня антиоксидантной защиты, и нормализации морфологической структуры ткани ПЖ и угнетению формирования вирусспецифических структур в клетке.

### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### **Статьи:**

1. Галочкина А.В., Зарубаев В.В., Киселев О.И., Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Исследование противовирусной активности дигидрокверцетина в процессе репликации вируса Коксаки В4 *in vitro*. // **Вопросы вирусологии**-2016-В.1- С.27-31
2. Galochkina A.V., Anikin V.B., Babkin V.A., Ostrouhova L.A., Zarubaev V.V. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, flavonoid from *Larix sibirica*, against Coxsackievirus B4 on the model of viral pancreatitis // **Archives of virology**-2016-P.1-10
3. Штро А.А., Слита А.В., Карпинская Л.А., Галочкина А.В., Зарубаев В.В. Активность интерферона в комбинации с антиоксидантами против ДНК- и РНК- содержащих вирусов человека. // **Лечащий врач**- 2014- В.10-С.52

#### **Тезисы на конференциях:**

1. Галочкина А.В., Зарубаев В.В., Киселев О. И., Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Дигидрокверцетин и его производные подавляют репликацию вируса Коксаки В4 //

Сборник тезисов к конференции военных врачей медико-профилактического профиля Вооруженных сил РФ – 2014- В.4

2. Galochkina A.V, Zarubaev V.V, Kiselev O.I. Study of anti-viral activity of dihydroquercetin against Coxsackievirus B4 in vitro and in vivo. //Abstracts of conference Europic – 2014-V.18-P.123

### **Список сокращений.**

АОА — антиоксидантная активность

ДКВ — дигидрокверцетин

ДМСО — диметилсульфоксид

ИЗД 1 типа — инсулин зависимый диабет 1 типа

ИФН — интерферон

КВИ — коксакивирусные инфекции

МТТ — метилтетразолиевый тест

ПЖ — поджелудочная железа

ЦПД – цитопатогенное действие

ЦТД<sub>50</sub> — 50% цитотоксическая доза

ЭА-ЕС — экстракт антиоксидантов ели сибирской

ЭД<sub>50</sub> — 50% эффективная доза

ЭМ — электронная микроскопия

ХТИ — химиотерапевтический индекс

СТД<sub>50</sub> — 50% цитотоксическая доза

CVB4 — вирус Коксаки В4

DRPH — 2, 2-дифенил-1-пикрилгидразил

ЕС<sub>50</sub> — 50% эффективная концентрация

IC<sub>50</sub> — 50% ингибирующая концентрация

МОI — множественность инфицирования

OD<sub>535</sub> — оптическая плотность

SI — индекс селективности

TCID<sub>50</sub> — 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза

VSV — вирус везикулярного стоматита