

УДК 616:619

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

*Загуменнов А., студент 3 курса факультета ветеринарной
медицины*

*Научный руководитель – Васильева Ю.Б., кандидат
ветеринарных наук, доцент*

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *вирусы, инфекции, иммуномодуляторы*

В работе рассматривается современное состояние рынка ветеринарных иммуномодулирующих препаратов.

Проблема применения иммуномодулирующих препаратов при лечении и профилактике вирусных инфекций животных остаётся крайне актуальной. Иммуномодуляторы применяются и в комплексной терапии бактериальных инфекций животных [1-30]. Несмотря на то, что в ветеринарной практике используется достаточно много различных иммуномодуляторов природного и синтетического происхождения, на сегодняшний день известен сравнительно узкий круг препаратов, обладающих широким спектром противовирусной активности. Это связано с целым рядом обстоятельств, наиболее существенные из которых: недостаток сведений об особенностях иммунного ответа при многих вирусных инфекциях, сравнительно небольшое количество известных природных и синтетических соединений, обладающих противовирусным действием и не обладающих при этом токсичностью, аллергенностью или другими побочными эффектами. В связи с этим актуальным представляется научно обоснованный подход к применению тех или иных иммуномодуляторов для профилактики и лечения вирусных инфекций. К числу наиболее популярных в ветеринарной практике иммуномодуляторов можно отнести Анандин (стимулятор интерферона-альфа), Иммунофан (синтетический пептид тимуса), Риботан (комплексный иммунокорректор, состоящий из смеси низкомолекулярных пептидов и фрагментов РНК), Ронколейкин (рекомбинантный интерлейкин-2), Фоспренил (0,4% раствор полипренолов хвой сосны), Максидин (германийорганический иммуномодулятор – стимулятор интерферонов-альфа,

бета, гамма). Необходимо отметить, что вирусы сами по себе являются иммуномодуляторами, способными, попадая в организм хозяина, подавлять клеточный и (или) гуморальный иммунный ответ, что препятствует развитию сбалансированной иммунной реакции и тем самым утяжеляет инфекционный процесс. При этом необходимо учитывать, что благоприятный исход при любой вирусной инфекции напрямую зависит от ранней (от нескольких часов до 1-2 суток) стимуляции синтеза цитокинов (ЦТ), обеспечивающих формирование, как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. На поздних стадиях вирусного инфекционного процесса избыточная стимуляция ЦТ может, напротив, привести к развитию целого ряда иммунопатологических реакций и значительно ухудшить состояние организма, и даже вызвать шок и смерть. В связи с этим, на ранних стадиях развития вирусной инфекции (в инкубационном периоде, в течение первых 1-2 суток клинически выраженного заболевания) предпочтительно применение иммуномодуляторов, стимулирующих продукцию интерферонов (ИФН), а также других факторов естественной резистентности организма (ФНО и некоторых других ЦТ: ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-2). На более поздних этапах эффективно применять препараты, непосредственно воздействующие на размножение вирусов в клетках, или комплексные иммунокорректоры. Одним из таких препаратов является Фоспренил (ФП). В исследованиях было показано, что одним из механизмов иммуномодулирующего действия ФП является стимуляция продукции ряда ключевых ЦТ, обеспечивающих сбалансированное формирование Th 1 и Th 2 иммунного ответа при вирусном инфекционном процессе (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12), а также ФНО-а [1,2]. При этом установлено, что ФП, введённый в организм неинфицированных вирусом животных стимулирует продукцию ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-12 через 24, 48 и 72 часа после инъекции. Стимуляция ФП продукции ИЛ-12 и ИЛ-4 (наряду со стимуляцией ФНО, ИФН), по-видимому, является одним из ключевых механизмов противовирусного действия препарата, по крайней мере, при его использовании в качестве эффективного профилактического средства и на самых ранних стадиях инфекционного процесса. ИЛ-12 (продуцируемый макрофагами) стимулирует пролиферацию ЕК- и Т-клеток, увеличивая их киллерные способности и запуская образование ИФН-g. Он стимулирует пролиферативную активность Т-хелперов 1-го типа (Th 1) и является связующим звеном между ранним неспецифическим иммунным ответом и поздним специфическим. ИЛ-4 стимулирует пролиферацию Th 2 хелперов. Между тем, вирусы обладают способностью нарушать сбалансированное

развитие Th 1/ Th 2 иммунного ответа, необходимое для формирования эффективного противовирусного иммунитета. ФП, по-видимому, обеспечивает этот необходимый баланс.

Целями настоящего исследования являлись: изучение особенностей противовирусной активности ФП при экспериментальном клещевом энцефалите у мышей и при инфицировании вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) культуры клеток СПЭВ; исследование возможностей совместного применения ФП и Максидина (МД) при вирусных инфекциях в условиях эксперимента и в клинической практике.

Эксперименты *in vivo* проводили на самцах мышей линии BALB/c массой 12 – 14 г и на 2-3-х дневных сосунках беспородных мышей. Опыты *in vitro* проводили на перевиваемой культуре клеток СПЭВ. Использовали стандартные коммерческие препараты ФП и МД производства ЗАО «Микро-плюс» при НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. ВКЭ: в опытах *in vivo* и *in vitro* использовали высокопатогенный для человека и животных штамм Абсеттаров в виде культуральной жидкости, содержащей 1010 БОЕ50/мл. ВКЭ титровали на сосунках беспородных мышей путём приготовления серийных разведений вируса и введения их в головной мозг в объёме 0,03 мл. Экспериментальных мышей инокулировали вируссодержащей суспензией, содержащей 60 мкг ФП в 0,03 мл. Титр ВКЭ рассчитывали по формуле Рида-Менча и выражали в lg ЛД50. Противовирусную активность ФП *in vitro* оценивали по количеству выживших мышей при одновременном введении им ВКЭ (100 ЛД50 внутривентриально по 0,2 мл) и ФП внутримышечно 100 мкг/0,2 мл. После заражения (и введения ФП) у контрольных и экспериментальных животных производили ежедневно в течение 7-и суток забор крови с последующим получением сывороток и титровали на культуре клеток СПЭВ с целью выявления инфекционного ВКЭ. В опытах *in vitro* проводили титрование ВКЭ в присутствии 200 и 400 мкг/мл ФП. Титры ВКЭ выражали в lg БОЕ50.

ФП в дозе 60 мкг подавлял размножение в ЦНС 2-3-дневных сосунков беспородных мышей в 1000 раз: титры вируса в головном мозге контрольных животных достигали 6 lg ЛД50, тогда как у мышат, которым вводили ВКЭ и ФП, не превышал 3 lg ЛД50. ФП в дозе 100 мкг/мышь защищал от экспериментального клещевого энцефалита до 80% инфицированных вирусом животных, контрольные инфицированные вирусом мыши заболели и гибли в 100% случаев. При этом инфекционный вирус в сыворотках мышей, получивших ФП, выявляли лишь на 6-е и 7-е сутки после заражения и введения ФП, и его титр составлял

1 и 2 lg БОЕ50 соответственно, тогда как в сыворотках контрольных мышей, инфицированных ВКЭ без введения ФП инфекционный ВКЭ обнаруживался уже на 2, 3 сутки (2,5 и 3,0 lg БОЕ50 соответственно), на 5-е сутки 2,25 (lg БОЕ50), на 6 и 7 сутки (4,5 lg БОЕ50). ФП в дозах 200-400 мкг/мл обладал способностью в 30-100 раз (соответственно) подавлять размножение ВКЭ в культуре клеток СПЭВ.

Таким образом, ФП обладает выраженной противовирусной активностью при экспериментальном клещевом энцефалите у мышей и при инфицировании ВКЭ клеток СПЭВ. В первом случае наиболее вероятным механизмом протективного действия ФП является обнаруженная в предыдущих исследованиях способность ФП стимулировать продукцию факторов естественной резистентности организма (ФНО-а , ИФН-г), а также ряд ключевых ЦТ, регулирующих формирование противовирусного иммунитета (ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-12) [1]. Механизмы противовирусного действия ФП на этапах взаимодействия вирус-клетка находятся в процессе изучения. Одним из механизмов антивирусной активности ФП *in vitro* является стимуляция ФП клеточного ИФН, обнаруженная в предыдущих исследованиях (1,3). В предварительной серии экспериментальных исследований на модели острой клинически выраженной инфекции, вызываемой ВКЭ у мышей линии BALB/c, был выявлен эффект взаимного усиления активности ФП и МД. При этом было изучено сочетанное действие препаратов в следующих дозах: ФП – 100 мкг/мышь (данная доза препарата при однократном внутривентральном введении защищала до 70% зараженных вирусом животных); МД – 20 мкг (данная доза защищала до 30% мышей). В результате совместного одновременного введения мышам обоих препаратов в указанных дозах протективный эффект возрастал в 2-2,5 раза, по сравнению с эффектом от введения какого-либо одного препарата.

Экспериментальные данные о повышении противовирусной активности при сочетанном применении ФП и МД легли в основу клинических испытаний при лечении собак с диагнозом чума плотоядных и кошек с диагнозом панлейкопении. Согласно полученным нами данным, при тяжелом течении чумы плотоядных у собак породы гладкошерстная такса (возраст 2-5 лет) положительный эффект наблюдается при совместном одновременном применении препаратов ФП и МД. Оба препарата, обладая различными механизмами противовирусного действия, прекрасно дополняют друг друга.

Полученные экспериментальные данные научно обосновывают применение иммуномодулирующих препаратов на ранних стадиях инфекционного вирусного процесса. При этом показано, что ФП - имму-

номодулятор комплексного действия, может также использоваться на более поздних клинически выраженных этапах вирусной инфекции, так как обладает способностью нарушать жизненный цикл вирусов в клетках. Существенным, на наш взгляд, является тот факт, что ФП проявляет антивирусную активность при непосредственном введении в ЦНС лабораторных животных.

Сочетанная терапия максидином и фоспренилом может быть рекомендована для профилактики и лечения целого ряда вирусных заболеваний собак (чума различной степени тяжести, парвовирусный энтерит) и кошек (панлейкопения, инфекционный ринотрахеит, калицивироз).

Библиографический список:

1. Sanin A.V., Narovlyansky A.N., Danilov L.L., Deyeva A.V., Maltsev S.D., Ozherelkov S.V., and Pronin A.V. "Phosprenyl: A novel stimulator of natural resistance". 2-nd joint meeting, Intern.Cytokine Soc. and Int.Soc. for Interferon and Cytokine Research. Jerusalem, Israel, 25-30 October 1998. Eur. Cytokine Netw.-1998.-Vol.9.-N3.-P.537.

2. Ожерелков С.В., Сосновская О.Ю., Кожевникова Т. Н., Красота А.Ю., Деева А.В., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В., Белосова Р.В. Возможные механизмы противовирусного действия фоспренила. Тез. докл. вет. конф. Екатеринбург. Март 2003., с.84-87.

3. Бордетеллэз животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Семанина, О.Ю. Борисова, С.Н. Золотухин, И.Г. Швиденко // Монография. - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2014. – 206 с.

4. Васильев, Д.А. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных / Д.А. Васильев, А.В. Мастыленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 233-235.

5. Васильев, Д.А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - №1 (13). - С. 59–62.

6. Васильев, Д.А. Индикация *Bordetella bronchiseptica* из объектов внешней среды и клинических образцов / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // Материалы V-й Международной

научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения». – Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т.П. – С. 18-22.

7. Васильев, Д.А. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 230-232.

8. Васильев, Д.А. Разработка методов выделения и селекции бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. - Т.І. – С. 28-32.

9. Васильев, Д.А. Технология конструирования диагностического биопрепарата на основе бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и перспективы его применения / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т.П. – С. 99-104.

10. Васильева, Ю.Б. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев, Р.Р. Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, А.С. Скорик // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>

11. Васильева, Ю.Б. Биотехнологический подход в разработке метода идентификации *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // Материалы V-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения». – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т.П. – С. 15-18.

12. Васильева, Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллезной инфекции / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.

13. Васильева, Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч.2. – С. 334-338.

14. Васильева, Ю.Б. Основы подбора компонентов питательных сред для первичного выделения *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, А.Г. Семанин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2014. № 1 (25). С. 85-92.

15. Васильева, Ю.Б. Особенности биологии бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 285. - URL: <http://www.science-education.ru/110-9927>.

16. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23). С. 46-51.

17. Васильева, Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллёза / Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С.51-56.

18. Васильева, Ю.Б. Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики бордетеллёза / Ю.Б. Васильева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 275. - URL: <http://www.science-education.ru/110-9751>.

19. Васильева, Ю.Б. Фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*: свойства и возможности применения / Васильева Ю.Б. / Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 4 (24). С. 44-49.

20. Васильева, Ю.Б. Эффективность иммунохимических методов для анализа антигенного состава *Bordetella bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч.1. – С. 100-104.

21. Мاستиленко, А.В. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» / А.В. Мастыленко, Д.А. Васильев, О.Ю. Борисова, Ю.Б. Васильева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 50-54.

22. Нафеев, А.А. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями / А.А. Нафеев, Н.И. Пелевина, Ю.Б. Васильева // Дезинфекционное дело. - 2014. - № 1. - С. 39-43.

23. Никульшина, Ю.Б. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Д.А. Васильев, А.В. Мастыленко, Д.Н. Хлынов // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы

аграрной науки и образования». – Ульяновск: УГСХА. - Т. IV. - 2008. – С. 57-59.

24. Никульшина, Ю.Б. Разработка методов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, выделенных от домашних животных / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Никулина // Ветеринарная патология. - 2007. - №4. (23). — С. 103-106.

25. Райчинец, Ю.А. Методика выделения *Paenibacillus larvae* / Ю.А. Райчинец, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, Р.Р. Бадаев, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14787>

26. Сверкалова, Д.Г. Создание транспортной и накопительной среды для *Bordetella bronchiseptica* // Д.Г. Сверкалова, А.В. Мاستиленко, Д.Н. Хлынов, Ю.Б. Никульшина, Д.А. Васильев / Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования». – Ульяновск: УГСХА. - Т. IV. - 2008. – С. 134-136.

27. Vasylyeva, Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 45. - № 6. - С. 81-85.

28. Vasylyeva, Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing / Yu.B. Vasylyeva / Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2013. - Т. 43. - № 4. - С. 44-46.

STUDY OF THE CHARACTERISTICS AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF IMMUNOMODULATORS

Zagumennov A.

Keywords: *viruses, infections, immune modulators*

The paper describes the current status of the market of veterinary immunomodulatory drugs