

Сезонная обращаемость в связи с укусом клеща за период 2014–2016 гг. распределилась следующим образом – начало эпидемиологического сезона приходится на конец марта $0,2\% \pm 0,1$ (8 случаев), конец сезона приходится на ноябрь $0,03\% \pm 0,03$ (1 случай). Наибольшее количество обращений отмечено в мае – $33,8 \pm 0,8$ (1122 случая) и в июне – $33,4 \pm 0,8$ (1109 случаев). Пик выявления антигена ВКЭ приходится на июль – $5,9 \pm 1,07$ (29 случаев) (рис. 3).

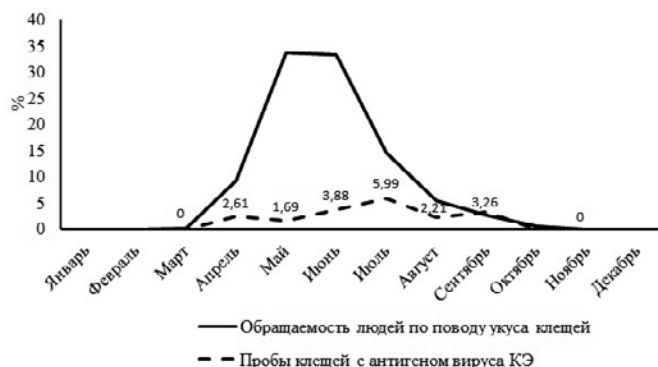


Рис. 3. Сезонное распределение случаев обращения лиц с присосавшимися клещами и выявления антигена вируса клещевого энцефалита в клещах в период 2014–2016 гг.

Таким образом, заболеваемость КЭ на территории Приморского края в 2014, 2015, 2016 гг. была крайне низкой от 0,86% до 1,37% на 100 тыс. населения. Летальные случаи были зафиксированы в 2014 г. и в 2016 г. по 1 случаю. Антиген ВКЭ выявлен в 3,2% из 3323 обследованных экземпляров присосавшихся клещей, что указывало на низкий уровень вирусофорности иксодовых клещей на территории При-

морского края в изучаемый период. Несмотря на низкие показатели заболеваемости КЭ и зараженности клещей ВКЭ в последние годы, проблема КЭ все же остается актуальной и требует постоянных эпидемиологических наблюдений с использованием не только метода ИФА, но и современного диагностического метода ПЦР, что позволит получать более точные прогнозные данные по динамике активности вирусной популяции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа поддержана научным проектом (0545-2014-0011) ФАНО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злобин В.И., Горин О.З. Клещевой энцефалит. – Новосибирск: Наука; 1996; – 177 с.
2. Коренберг Э. И., Помелова В. Г., Осин Н. С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Под ред.: Гинцбурга А.Л., Злобина В.Н. – М.: Наука; 2013; – 463 с.
3. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае: вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты. – Владивосток: Дальнаука; 1997; – 190 с.
4. Лубова В.А., Леонова Г.Н., Бондаренко Е.И. Комплексная характеристика природных очагов клещевых инфекций на юго-восточных территориях Сихотэ-Алиня // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; 68(1): 30–35.
5. Руководство по инфекционным болезням. Под ред. Лобзина Ю.В. – СПб.: 2000; 2: – 174 с.

Сведения об авторах

Лубова В.А. – младший научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова); Владивосток, ул. Сельская 1, 690087; раб. тел. 8(423)244-26-04; моб. тел. 8(999)040-71-08 e-mail: valeri_priority@mail.ru (автор-корреспондент);

Леонова Г.Н. – главный научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций, доктор медицинских наук, профессор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова); Владивосток, ул. Сельская 1, 690087; раб. тел. 8(423)244-07-12; e-mail: galinaleon41@gmail.com.

© Коллектив авторов, 2017 г.

УДК 615.281.8:616.988.25-022.935.4

doi: 10.5281/zenodo.817811

Н.В. Крылова¹, Г.Н. Леонова¹, А.М. Попов², А.А. Артюков², О.С. Майстровская¹, М.В. Зыкова¹

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ ПОЛИФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ МОРСКИХ ТРАВ СЕМЕЙСТВА ZOSTERACEAE ПО ОТНОШЕНИЮ К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», Владивосток

² ФГБНУ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

Одним из возможных подходов к эффективному патогенетически обоснованному лечению клещевого энцефалита (КЭ) является включение природных антиоксидантов в комплексную терапию заболевания. *Цель исследования.* Изучить *in vitro* механизмы противовирусного действия полифенольного комплекса (ПФК)

и его компонентов (розмариновая кислота, дисульфат лютеолина и лютеолин) из морских трав семейства *Zosteraceae* по отношению к высокопатогенному для человека штамму вируса КЭ. *Материалы и методы.* Противовирусную активность соединений оценивали по ингибированию цитопатогенного действия вируса КЭ на культуре клеток СПЭВ с использованием МТТ-анализа. Исследовали различные схемы применения тестируемых соединений: предварительная обработка клеток, вируса и воздействие на раннюю стадию репликации вируса. *Результаты.* Установлено, что основным механизмом противовирусного действия ПФК и его компонентов является прямая инактивация вирусных частиц и ингибирование вируса КЭ на ранней стадии репликации. *Заключение.* Показано, что ПФК и его компоненты могут рассматриваться как потенциальные противовирусные соединения в комплексной терапии КЭ.

Ключевые слова: полифенольный комплекс, противовирусная активность, вирус клещевого энцефалита.

N.V. Krylova¹, G.N. Leonova¹, A.M. Popov², A.A. Artjukov², O.S. Majstrovskaja¹, M.V. Zyкова¹

ANTIVIRAL ACTIVITY OF POLYPHENOL COMPLEX COMPONENTS FROM SEAGRASSES OF ZOSTERACEAE FAMILY AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

² Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

One of the possible approaches to effective pathogenetically based treatment of tick-borne encephalitis (TBE) is the inclusion of natural antioxidants in the complex therapy of the disease. *The purpose of the research* is to study antiviral action mechanisms of the polyphenol complex (PFC) and its components (rosmarinic acid, luteolin disulfate and luteolin) from seagrass of *Zosteraceae* family against the highly pathogenic strain of the TBE virus in vitro. *Materials and methods.* Antiviral activity of the compounds was evaluated by inhibition of cytopathic effect of TBE virus in PK cells using MTT analysis. Different modes of tested compounds application were investigated: pre-treatment of cells, pre-treatment of virus, and effect on the early stage of viral replication. *Results.* It has been established that the main mechanisms of action PFC and its components are direct inactivation of virus particles and inhibition of the TBE virus at an early stage of replication. *Conclusion.* It is shown that PFC and its components can be considered as potential antiviral agents in complex therapy of TBE infection.

Keywords: polyphenolic complex, antiviral activity, tick-borne encephalitis virus.

Введение

До настоящего времени терапия клещевого энцефалита (КЭ), как и многих других вирусных инфекций, представляет собой сложную и нерешенную проблему. Лечение КЭ, как правило, является симптоматическим, лицензированных препаратов против вируса КЭ до сих пор не существует [1]. Поскольку окислительный стресс, индуцированный вирусами, играет важную роль в патогенезе нейротропных флавивирусных инфекций [2, 3, 4], включение в комплексную терапию антиоксидантов является одним из возможных подходов к эффективному патогенетически обоснованному лечению КЭ.

Среди природных антиоксидантов важное место занимают полифенольные соединения, основным источником которых являются наземные и морские растения [5, 6]. В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН из морских трав семейства *Zosteraceae* был выделен полифенольный комплекс (ПФК), состоящий из розмариновой кислоты (около 45%), дисульфата лютеолина (около 45%) и биофлавоноидов – лютеолина и апигенина (около 10%). Биомедицинский анализ свойств этого комплекса показал, что ПФК и составляющие его компоненты характеризуются разносторонней фармакологической активностью: антиоксидантной, противовоспалительной, иммуномодулирующей и др. [7, 8, 9].

Нами была установлена противовирусная активность ПФК в отношении вируса КЭ [10, 11].

Цель настоящего исследования – изучить *in vitro* механизмы противовирусного действия компонентов ПФК и выявить наиболее эффективные компоненты комплекса по отношению к вирусу КЭ.

Материалы и методы

Штаммы вируса КЭ. В работе был использован высокопатогенный для человека штамм вируса КЭ дальневосточного субтипа – *Dal'negorsk* (Dal), выделенный в 1973 году из мозга умершего больного с очаговой формой КЭ (номер полногеномной последовательности в GenBank – FJ402886). Использована 10% вирус-содержащая суспензия мозга мышей 2-х сут. возраста, инфицированных этим штаммом (10 пассаж).

Культура клеток. Исследования были проведены на высокочувствительной к вирусу КЭ персептируемой культуре клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ). Для изучения противовирусной активности препаратов использовали однослойный монослой клеток, выращенный в ростовой среде 199, с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров и 100 ЕД/мл гентамицина в СО₂-инкубаторе при 37°C. Для проведения опытов использовали поддерживающую

среду 199 с добавлением 1% эмбриональной сыворотки и антибиотиков.

Исследуемые соединения. Полифенольный комплекс (ПФК), розмариновая кислота (РК), дисульфат лютеолина (ДСЛ), выделенные из морских трав семейства *Zosteraceae*, и лютеолин (ЛТ) (Sigma, USA).

Определение цитотоксичности соединений. Цитотоксичность исследуемого соединения оценивали по жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста [12]. На односуточный монослой культуры клеток в 96-луночных планшетах наносили в триплетах различные концентрации исследуемых соединений (от 1 до 3000 мкг/мл). Контролем являлись необработанные клетки. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 6 сут при 37°C до появления цитодеструктивных изменений монослоя клеток. Затем к монослою клеток добавляли 5 мг/мл МТТ (метилтиазолилтетразолий бромид, Sigma, USA) по 20 мкл/лунку на 2 ч при 37°C. Для растворения гранул добавляли изопропиловый спирт, подкисленный 0,4М HCl (150 мкл/лунку). Оптическую плотность (ОП) измеряли на 96-луночном ридере (Labsystems Multiskan RC, Finland) при длине волны 540 нм. Жизнеспособность клеток оценивалась как ОП опыта/ОП клеточного контроля × 100 %. Концентрацию соединений, которая снижает жизнеспособность клеток на 50% по сравнению с контролем, определяли как 50% цитотоксическую концентрацию (CC₅₀).

Определение противовирусной активности соединений. Изучено несколько схем применения соединений, при этом, каждая схема была исследована в трех независимых повторях с использованием различных концентраций соединений:

- **вирулицидное действие.** Делали 10-кратные разведения вируса и каждое разведение соединяли с различными концентрациями исследуемых соединений в соотношении 1:1, инкубировали 2 ч при 4°C. Затем на монослой клеток наносили вирусосодержащую суспензию, обработанную соединением (опыт) и необработанную (контроль), на 1 ч при 37°C. После чего клетки промывали от неадсорбированного вируса, добавляли поддерживающую среду и инкубировали в течение 6 сут при 37°C в CO₂-инкубаторе.

- **профилактическое действие.** Монослой клеток обрабатывали различными концентрациями соединений в течение 2 ч при 37°C, контролем являлись необработанные клетки. Затем клетки промывали, инфицировали 10-кратными разведениями вируса в течение 1 ч при 37°C. После чего монослой клеток промывали, добавляли поддерживающую среду и инкубировали в течение 6 сут при 37°C в CO₂-инкубаторе.

- **ингибирующее действие.** Монослой культуры клеток инфицировали 10-кратными разведениями вируса в течение 1 ч при 37°C. Затем отмывали клетки от неадсорбированного вируса, обрабатывали

различными концентрациями соединений (необработанные клетки – контроль) и в течение 6 сут инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе.

Индуктированное вирусом КЭ цитопатогенное действие (ЦПД) учитывали на 6 сут культивирования клеток с помощью инвертированного микроскопа (Биолам П-1, ЛОМО, Россия), затем проводили количественное измерение с помощью МТТ-теста, как описано выше. Противовирусную активность соединений рассчитывали по коэффициенту ингибирования КИ = (ОП_{tv} – ОП_{cv}) / (ОП_{cd} – ОП_{cv}) × 100%, где ОП_{tv} – ОП обработанных соединением и инфицированных клеток; ОП_{cv} – ОП контрольных необработанных инфицированных клеток; ОП_{cd} – ОП контрольных неинфицированных необработанных клеток [13]. Значение 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) определяли как концентрацию соединения, которая уменьшала вирус-индуцированное ЦПД на 50%. Индекс селективности (SI) рассчитывали как отношение CC₅₀ к IC₅₀.

Статистический анализ результатов. Значения CC₅₀ и IC₅₀ были определены с помощью регрессионного анализа, используя пакет программ Statistica 6,0. Сравнение различий между показателями контрольной и опытной групп проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для связанных выборок. Различия считались достоверными при p ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение

Для определения диапазона концентраций ПФК и его компонентов (РК, ДСЛ, ЛТ) был проведен анализ цитотоксичности этих соединений в отношении клеток СПЭВ. На основании результатов МТТ-анализа для каждого исследуемого соединения были построены графики зависимости жизнеспособности клеток от концентраций соединений, вычислены цитотоксические – CC₅₀ (50% клеток остаются жизнеспособными) и максимально нетоксические концентрации – MNTC (75% клеток остаются жизнеспособными). Установлено, что CC₅₀ для ПФК, РК и ДСЛ были > 1100 мкг/мл, т.е. данные соединения практически нетоксичны для клеток СПЭВ, в отличие от ЛТ, для которого CC₅₀ составила лишь 132,8 мкг/мл. Дальнейший анализ противовирусной активности проводили с использованием максимально нетоксических концентраций – для ПФК, РК и ДСЛ < 400 мкг/мл, ЛТ – < 50 мкг/мл (рис.).

Изучена степень защиты культуры клеток СПЭВ в зависимости от схем применения изучаемых соединений по ингибированию цитопатического действия вируса КЭ. При использовании ПФК и его компонентов в максимально нетоксичных концентрациях установлено, что предварительная обработка клеток за 1 ч до инфицирования не оказывала значимого эффекта на репродукцию вируса. Исследование прямого вирулицидного действия (предварительная инку-



Рис. Ингибирование цитопатического действия вируса КЭ при различных схемах применения ПФК и его компонентов. Соединения использовались в максимально нетоксических концентрациях

бация исследуемых соединений с вирусом в течение 1 ч перед инфицированием клеток) показало другую картину: ЛТ и ДСЛ проявляли значимую ингибирующую активность ($> 75\%$), ПФК – умеренную ($> 50\%$), а РК – низкую ($\sim 35\%$). Внесение ПФК, ЛТ и ДСЛ на ранней стадии репликации вируса (через 1 ч после инфицирования клеток) приводило к умеренному ингибированию репродукции вируса (\sim на 40–50%), а РК проявил незначительную активность ингибирования ($\sim 15\%$). Полученные нами результаты указывают на то, что основным механизмом действия *in vitro* ПФК и его компонентов в отношении вируса КЭ является прямая инаktivация вирусных частиц и ингибирование ВКЭ на ранней стадии репликации. Можно предположить, что вирулицидное действие исследуемых соединений обусловлено их способностью блокировать рецепторные вирусные структуры и, таким образом, ингибировать адсорбцию и вход вируса в клетки. Кроме того, антивирусная активность этих соединений, вероятно, зависит от их способности оказывать влияние на ранние стадии событий после входа вируса в клетки.

Для более детального сравнительного анализа противовирусной активности ПФК и его компонентов были вычислены 50% ингибирующие концентрации – IC_{50} и селективный индекс – SI при наиболее эффективном прямом воздействии этих соединений на вирус КЭ. На основании результатов МТТ-анализа было установлено, что для полифенольного комплекса $IC_{50}=80,8$ мкг/мл и $SI=15,4$; для розмариновой кислоты – $IC_{50}=129,5$ мкг/мл и $SI=8,6$; для дисульфата лUTEОЛИНА – $IC_{50}=71,4$ мкг/мл и $SI=20,8$; для лUTEОЛИНА – $6,25$ мМ/мл и $SI=21,2$. Так как величина SI более достоверно характеризует специфическую противовирусную активность исследуемого вещества, то соединения с $SI > 10$ могут рассматриваться как потенциальные противовирусные соединения [14].

Проведение *in vitro* сравнительного анализа противовирусной активности ПФК и его компонентов

показало, что, хотя лUTEОЛИН проявляет высокую ингибирующую активность в отношении вируса КЭ, это соединение оказалось достаточно токсичным для клеток СПЭВ. В то же время, применение розмариновой кислоты продемонстрировало его невысокую вирус-ингибирующую эффективность. Для дальнейшего изучения *in vivo* противовирусного действия соединений при КЭ наиболее перспективными являются ПФК и дисульфат лUTEОЛИНА. Однако необходимо подчеркнуть, что протективное действие этих природных соединений будет обусловлено не только целенаправленным воздействием на различные фазы развития вирусной инфекции, но и системным эффектом на организм, обусловленным их высоким антиоксидантным, противовоспалительным и нейрпротективным потенциалом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках программы «Новые лекарственные формы, биопрепараты и медицинские технологии, преимущественно на основе биомолекул и надмолекулярных комплексов из биологических объектов Дальнего Востока и Мирового океана».

ЛИТЕРАТУРА

1. Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases*. 2015; 3(5): 430–441.
2. Valyi-Nagy T., Dermody T.S. Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol. Histopathol*. 2005; 20: 957–967.
3. Reshi M.L., Su Y.-C., Hong J.-R. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *Int. J. Cell Biol*. 2014; ID 467452.
4. Dasuri K., Zhang L., Keller J.N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic. Biol. Med*. 2012; 62: 170–185.
5. Firuzi O., Miri R., Tavakkoli M., Saso L. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. *Curr. Med. Chem*. 2011; 18: 3871–3888.
6. Balakrishnan D., Kandasamy D., Nithyanand P. A review on Antioxidant activity of marine organisms. *Int. J. Chem. Tech. Res*. 2014; 6(7): 3431–3436.
7. Кривошапко О.Н., Попов А.М. Лечебно-профилактические свойства полярных липидов и антиоксидантов из морских гидробионтов // *Вопросы питания*. 2011; 2: 4–8.
8. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Механизмы протективной фармакологической активности флавоноидов // *Биофармацевтический журнал*. 2012; 4(4): 27–41.
9. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Климович А.А., Артюков А.А. Биологическая активность и механизмы

лечебного действия розмариновой кислоты, лютеолина и его сульфатированных производных // *Биомедицинская химия*. 2016; 62(1): 22–30.

10. Крылова Н.В., Попов А.М., Леонова Г.Н. Антиоксиданты как потенциальные противовирусные препараты при флавивирусных инфекциях // *Антибиотики и химиотерапия*. 2016; 61(5–6): 25–31.

11. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Макаренко И.Д., Попов А.М., Ермакова С.П. Характеристика противовирусной активности препаратов по отношению к вирусу клещевого энцефалита. База данных №2016620150. Заявка № 2015621556 от 10.12.2015. Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 02.02.2016.

12. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Попов А.М., Артюков А.А. Вирус клещевого энцефалита – как модель для изучения противовирусной активности биологически активных веществ // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 57(3): 35–36.

13. Bastos J.C.S., de Menezes C.B.A., Fantinatti-Garboggini F., et al. Antiviral Activity of Marine Actinobacteria against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. *RRJMB* 2015; 4(4): 55–62.

14. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Сведения об авторах

Крылова Наталья Владимировна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова; 690087, Владивосток, ул. Сельская 1; моб. тел. 8(908)448-64-23 e-mail: krylovanatalya@gmail.com (автор-корреспондент);

Леонова Галина Николаевна – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова; 690087, Владивосток, ул. Сельская 1;

Попов Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор, руководитель группы изучения биологически активных добавок Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159; профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы Естественных наук Дальневосточного Федерального Университета, 690000, Владивосток, Октябрьская, 27;

Артюков Александр Алексеевич – доктор химических наук, заведующий лабораторией биотехнологии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.

Майстровская Ольга Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова; 690087, Владивосток, ул. Сельская 1;

Зыкова Мария Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории флавивирусных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова; 690087, Владивосток, ул. Сельская 1.

© Коллектив авторов, 2017 г.

УДК 579.61:57.085.23:577.27+616.9-092.9:612.017.11

doi: 10.5281/zenodo.817817

И.Н. Ляпун¹, Н.Г. Плехова^{1,2}, Е.И. Дробот¹

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ХАНТАВИРУСОМ

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток

² Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток

В данной работе было установлено, что выраженность функционального состояния дендритных клеток на 9-е сутки инкубирования зависят от вносимого индуктора созревания. Хантавирус не оказывал активирующего эффекта на незрелые дендритные клетки, тогда как в отношении индуцированных проявлялось его выраженное действие, о чем свидетельствовали показатели активности АТФазы, подавление лактатдегидрогеназной активности и повышение сукцинатоксидазной и нитроксидабразующей систем клеток.

Ключевые слова: дендритные клетки, хантавирус, ферменты.

I.N. Lyapun¹, N.G. Plekhova^{1,2}, E.I. Drobot¹

METABOLIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS AS THEY INTERACT WITH HANTAVIRUS

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

² Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia