

УДК 616-092

Результаты доклинического исследования эффективности экспериментального препарата на основе технологически обработанных антител на моделях гриппа и смешанной вирусно-бактериальной инфекции

Петрова Н.В.¹, Емельянова А.Г.¹, Тарасов С.А.¹, Карташова Н.П.², Глубокова Е.А.²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова».

105064, Москва, Малый Казённый пер., д. 5а

Целью исследования была оценка противовирусной активности экспериментальных образцов сверхвысоких разведений антител к различным мишеням, вовлеченным в реакции иммунного ответа (МНС I, МНС II, CD4 рецептор, ИФН-γ).

Методы. Исследование противовирусной активности сверхвысоких разведений антител к молекуле МНС I проводили на модели летальной гриппозной инфекции (грипп А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09), тогда как протективный эффект комплексного препарата, содержащего сверхвысокие разведения антител к молекулам МНС I, МНС II, ИФН-γ и к CD4 рецептору, оценивали на модели смешанной вирусно-бактериальной пневмонии (последовательное инфицирование вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) и *Staphylococcus aureus*).

Результаты. Показано, что сверхвысокие разведения антител к МНС I увеличивали выживаемость животных в эксперименте на 46,7% и 52,4% по сравнению с группами отрицательного контроля и плацебо ($p < 0,05$), соответственно. Препарат сравнения Осельтамивир повышал этот же показатель на 60% и 85,7% по сравнению с теми же группами животных ($p < 0,05$). На модели смешанной вирусно-бактериальной инфекции комплексный препарат повышал выживаемость мышей на 30% и 40% ($p < 0,05$) относительно контрольных групп. Введение Осельтамивира в комбинации с Цефуроксимом выражалось в увеличении выживаемости животных на 50% и 60%, соответственно. Статистически значимого снижения вирусной или бактериальной нагрузки ни для одной из групп выявлено не было.

Заключение. Впервые продемонстрирована эффективность экспериментальных препаратов, содержащих сверхвысокие разведения антител к молекуле МНС I, а также их комплекс к МНС I, МНС II, ИФН-γ и к CD4 рецептору в моделях гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии у животных. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения протективных эффектов данных образцов при вирусных и бактериальных инфекциях.

Ключевые слова: вирус гриппа А; *Staphylococcus aureus*; сверхвысокие разведения антител; главный комплекс гистосовместимости; МНС I; МНС II.

Для цитирования: Петрова Н.В., Емельянова А.Г., Тарасов С.А., Карташова Н.П., Глубокова Е.А. Результаты доклинического исследования эффективности экспериментального препарата на основе технологически обработанных антител на моделях гриппа и смешанной вирусно-бактериальной инфекции. *Патогенез*. 2020; 18(4): 55–63.

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.04.55-63

Для корреспонденции: Петрова Наталия Владимировна, e-mail: physactive@yandex.ru

Финансирование. Спонсором исследований является ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ».

Конфликт интересов. Авторы сообщили о следующих потенциальных конфликтах интересов в отношении исследования, авторства и публикации статьи: Петрова Н.В., Емельянова А.Г., Тарасов С.А. являются сотрудниками ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» полностью или частично. ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» выступало в роли спонсора описанных исследований, проводило статистический анализ результатов исследования, приняло решение опубликовать статью, покрыло расходы, связанные с публикацией данной рукописи, принимало участие в дизайне экспериментов, написании рукописи. Различные технологические версии сверхвысоких разведений антител к МНС I, МНС II, ИФН-γ и CD4-рецептору входят в состав (отдельно или в комплексе с другими компонентами) коммерческих препаратов, которые производит или производит и продает ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ». Патенты и заявки на патенты на данные субстанции принадлежат ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ».

Поступила: 08.06.2020

Efficacy of an experimental drug based on technologically processed antibodies in models of influenza infection and secondary bacterial pneumonia: Results of a preclinical study

Petrova N.V.¹, Emelianova A.G.¹, Tarasov S.A.¹, Kartashova N.P.², Glubokova E.A.²

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Malyy Kazyonnyy Pereulok 5a, Moscow 105064, Russian Federation

The aim of this study was to evaluate the antiviral activity of ultra-highly diluted antibodies to various targets (MHC I, MHC II, INF γ , and CD4 receptor) involved in the immune response.

Methods. The antiviral activity of ultra-highly diluted antibodies to the MHC I molecule was evaluated in a standard model of the lethal A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 influenza infection, and the protective effect of a complex drug containing highly diluted antibodies to MHC I and MHC II molecules, INF γ , and CD4 receptor was accessed in a model of secondary bacterial pneumonia (A/California/04/2009 (H1N1) influenza virus challenge followed by *Staphylococcus aureus* inoculation).

Results. The treatment with ultra-highly diluted antibodies to MHC I increased the survival rate of mice by 46.7% and 52.4% vs. the negative control and placebo groups ($p < 0.05$), respectively. The survival rate was increased in the Oseltamivir group by 60% and 85.7% vs. the same control groups ($p < 0.05$). In the model of secondary bacterial pneumonia following influenza, the complex drug increased the survival rate of mice by 30% and 40% ($p < 0.05$) vs. the control groups. The combined application of Oseltamivir and Cefuroxime increased the survival rate by 50% and 60%, respectively. There was no statistically significant decrease in the viral or bacterial load in any of the groups.

Conclusion. The study showed for the first time that highly diluted antibodies to the MHC I molecule as well as the complex drug containing highly diluted antibodies to MHC I, MHC II, INF γ , and CD4 receptor were effective in animal models of influenza infection and secondary bacterial pneumonia. Further investigation of protective effects of these samples in viral and bacterial infections is promising.

Key words: influenza A virus; *Staphylococcus aureus*; ultra-highly diluted antibodies; major histocompatibility complex; MHC I; MHC II.

For citation: Petrova N.V., Emelianova A.G., Tarasov S.A., Kartashova N.P., Glubokova E.A. [Efficacy of an experimental drug based on technologically processed antibodies in models of influenza infection and secondary bacterial pneumonia: Results of a preclinical study]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2020; 18(4): 55-63. (in Russian).

DOI: 10.25557/2310-0435.2020.04.55-63

For correspondence: Petrova Nataliya Vladimirovna, e-mail: physactive@yandex.ru

Funding. The study was sponsored by MATERIA MEDICA HOLDING LLC.

Conflict of interest. The authors reported the following potential conflicts of interest regarding the research, authorship, and publication of the article: N.V.Petrova, A.G.Emelianova, and S.A.Tarasov are full- or part-time employees of MATERIA MEDICA HOLDING LLC. MATERIA MEDICA HOLDING LLC sponsored the study, performed a statistical analysis of the study results, decided to publish the article, covered the costs associated with the publication of this manuscript, and participated in designing the experiments and writing the manuscript. Various technological versions of ultra-high dilutions of antibodies to MHC I, MHC II, INF γ , and CD4-receptor are components (alone or in combination with other components) of commercial drugs that are produced or manufactured and sold by MATERIA MEDICA HOLDING LLC. Patents and patent applications for these substances belong to MATERIA MEDICA HOLDING LLC.

Received: 08.06.2020

Введение

Терапевтическая эффективность ингибиторов нейраминидазы была показана в отношении ряда низко- и высокопатогенных штаммов вируса гриппа [1]. Тем не менее, результативность использования этих препаратов в случае осложненного течения гриппа требует дополнительного изучения. Основным методом в лечении осложнённого гриппа остаётся применение комбинации противовирусных и антибактериальных препаратов. Однако резистентность как вирусных, так и бактериальных патогенов неуклонно растёт [2]. Кроме того, наличие побочных эффектов [2] делает применение указанных выше препаратов затруднительным, особенно у детей. Таким образом, актуальность поиска новых мишеней воздействия и альтернативных путей повышения результативности существующих схем лечения не вызывает сомнений. В роли новых мишеней могут выступать молекулы, вовлеченные в ключевые звенья иммунного ответа хозяина на патоген. Поскольку дан-

ные молекулы не являются продуктами бактериального или вирусного происхождения, риски развития резистентности к подобного рода препаратам минимальны.

Одним из подходов воздействия на мишени в организме хозяина может быть использование препаратов на основе сверхвысоких разведений антител (СВР АТ), приготовленных с использованием технологии сверхвысоких разведений, позволяющей получать препараты, воздействующие на конформацию своей мишени [3], и как следствие, влияющие на все остальные процессы, в которые вовлечена данная молекула в организме.

Известно, что течение и тяжесть инфекционных заболеваний, в том числе при гриппе, зависит от активности CD4⁺ Т-лимфоцитов, а нормализация интерферон- γ (ИФН- γ) зависимого цитокинового баланса ассоциируется с благоприятным прогнозом [4]. Кроме того, возможность влиять на процессы представления антигена Т-клеткам белками главного комплекса гистосовмести-

мости (МНС) I и II также является многообещающей с точки зрения разработки препаратов, направленных, в том числе, и на лечение инфекционных заболеваний [5]. Для лечения вирусно-бактериальных инфекций нами был предложен препарат-кандидат, в состав которого входят СВР АТ к ИФН- γ , СВР АТ к CD4-рецептору, а также СВР АТ к белкам МНС. Для СВР АТ к ИФН- γ ранее были показаны иммунорегуляторные эффекты в отношении неспецифических реакций иммунного ответа, в которых участвует молекула ИФН- γ [6] и, как следствие, противовирусные эффекты в отношении широкого спектра возбудителей вирусных инфекций [7]. Для СВР АТ к ИФН- γ и СВР АТ к CD4-рецептору в составе комбинированного препарата также были показаны противовирусные и противовоспалительные эффекты [8, 9], а для СВР АТ к CD4-рецептору – усиление специфического Т-клеточного ответа [10].

Таким образом, для отдельных СВР АТ показан их иммунорегулирующий и противовирусный потенциал, однако, вирусные инфекции часто сопровождаются бактериальными осложнениями, что подчеркивает необходимость создания препарата, обладающего как противовирусными, так и антибактериальными эффектами. В этой связи, было решено дополнить состав препарата СВР АТ к МНС I и МНС II, ввиду важности роли этих молекул в презентации антигенов как вирусного, так и бактериального происхождения.

В настоящей работе эффективность комплексного препарата, содержащего СВР АТ к ИФН- γ , CD4-рецептору, МНС I и МНС II, была протестирована на модели бактериальных осложнений гриппозной инфекции, так как в патогенезе этого заболевания участвуют обе системы презентации антигена, как МНС I, так и МНС II, а также неспецифическое (ИФН- γ) и специфическое Т-клеточное звено иммунного ответа. Поскольку инфекции, вызванные гриппом, часто характеризуются снижением презентации антигена молекулами МНС I [11], дополнительно в данной работе был оценен потенциал СВР АТ к МНС I в качестве противовирусного препарата на стандартной экспериментальной модели заражения животных гриппозной инфекцией.

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты. Аффинно очищенные кроличьи поликлональные антитела к МНС I (модель гриппозной инфекции), а также аффинно очищенные кроличьи поликлональные антитела к МНС I, МНС II, ИФН- γ и CD4 рецептору (далее «комплексный препарат», модель вирусно-бактериальной пневмонии) в исходной концентрации 2,5 мг/мл каждое были изготовлены в соответствии с требованиями GMP для исходных субстанций. СВР АТ к МНС I, а также комплексный препарат были произведены в соответствии с технологией, описанной в патенте US 8871203B2 (EPSHTEIN; SHTARK; KOLYADKO; EPSHTEIN, 2014). Кратко, антитела (2,5 мг/мл) смешивали с растворите-

лем (водно-спиртовой раствор) в соотношении 1:100 и интенсивно перемешивали для получения первого сотенного разведения (разведение в 100 раз). Все последующие разведения состояли из 1 части предыдущего разведения и 99 частей растворителя (водно-спиртовой раствор для промежуточных разведений, и вода очищенная для финальных разведений), которые физически обрабатывали на каждом этапе разведения. Конечные разведения СВР АТ к МНС I или комплексный препарат содержат смесь 12, 30 и 50 сотенного разведения. Теоретический уровень снижения концентрации исходных антител – как минимум, 10^{24} раз.

Очищенная вода, подвергшаяся аналогичной технологической обработке, выступала в роли плацебо. Все образцы поставлялись и тестировались в зашифрованном виде, чтобы исследование было слепым плацебо-контролируемым.

В качестве противовирусного средства в обоих экспериментах применяли Осельтамивир (препарат Тамифлю, Хоффман-ля-Рош Лтд., Швейцария) [12]. Для лечения бактериальной инфекции использовали антибиотик Цефуросим (препарат Зинацеф, ГлаксоСмитКляйн Трейдинг, Россия) [13]. Дозы Осельтамивира и Цефуросима рассчитывали в мг/кг массы тела животного из расчёта содержания чистой субстанции в лекарственной форме. Группы отрицательного контроля получали дистиллированную воду.

Вирусы, клетки, штаммы. Для воспроизведения модели гриппозной инфекции был использован штамм вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1pdm2009), исходно полученный из коллекции вирусных штаммов центра по контролю за заболеваемостью (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Атланта, США).

Моделирование вирусно-бактериальной пневмонии проводили с использованием вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (изначально полученного из CDC) и культуры *Staphylococcus aureus* 1986 (далее *S. aureus*, коллекция лаборатории протективных антигенов ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Получение живой культуры *S. aureus* осуществляли стандартно [14] и в этот же день использовали для заражения животных. Вирус гриппа для обоих экспериментов был адаптирован путем последовательных пассажей через лёгкие [15]. Конечный гомогенат использовали для заражения куриных эмбрионов. Аллантоисный вирус после титрования на мышах использовали для дальнейшего инфицирования животных и определения летальных доз (ЛД) по методу Рида и Менча.

Животные. Воспроизведение гриппозной инфекции проводили на половозрелых мышах-самках линии Balb/c ($n = 100$) массой тела 16-18 г (питомник «Рапполово», Ленинградская обл.).

Для вирусно-бактериальной пневмонии были также использованы мыши-самки Balb/c ($n = 52$), массой тела 12-14 г (питомник «Андреевка», Московская обл.). Во всех экспериментах животные содержались в соответствии с правилами, принятыми Европей-

ской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). В комнате содержания поддерживали следующие условия: температура воздуха 18-26°C; автоматическая смена 12-часового светового периода при относительной влажности 30-70%. Все мыши имели неограниченный доступ к питьевой воде и корму.

Процедуры с животными были утверждены комиссией по биоэтике института Эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, а также комиссией ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова на предмет соответствия регулирующим актам.

Определение эффективности образцов в отношении гриппозной инфекции. В ходе эксперимента 80 животных были заражены вирусом гриппа А, путём интраназального введения патогена в дозе 10LD₅₀, под легким эфирным наркозом, 20 животных были использованы в качестве интактных.

Таким образом, животные были рандомизированы на следующие 5 групп ($n = 20$ на группу): интактные животные, не подвергшиеся заражению вирусом гриппа А; мыши, получавшие Осельтамивир за 1 час до инфицирования (20 мг/кг/день) и далее в течение 5 дней; животные, получавшие образец СВР АТ к МНС I (20 мл/кг/день) в лечебно-профилактическом режиме, за 5 суток до заражения и в течение 14 дней после инфицирования. И группы дистиллированной воды (отрицательный контроль) и плацебо, схема и объём введения для которых идентичны группе СВР АТ к МНС I.

На третий день после заражения 5 особей из каждой группы отбирали для определения титра вируса: мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации, вскрывали и изолировали легкие, которые использовали для постановки эксперимента [15]. Наблюдение за оставшимися животными ($n = 15$ на группу) проводили в течение последующих 11 дней с визуальной оценкой их состояния (потребление воды, пищи и т.д.).

В качестве первичных критериев эффективности были выбраны выживаемость, а также средняя продолжительность жизни животных, так как именно эти показатели отражают тяжесть течения заболевания и коррелируют с клинической картиной инфекции. В качестве дополнительного критерия оценивали вирусную нагрузку в лёгких животных.

Определение эффективности образцов в отношении вирусно-бактериальной пневмонии. Воспроизведение модели осуществляли путем интраназального заражения 52 животных (под лёгким эфирным наркозом) вирусом гриппа А в дозе 1 LD₅₀, с их последующим инфицированием *S. aureus* ($2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) через 4 дня [16].

Были сформированы следующие группы: группа комбинированного лечения препаратами Осельтамивир (10 мг/кг/день, 4 дня) и Цефуросим (20 мг/кг/день, на протяжении 3 дней после заражения *S. aureus*); группы комплексного препарата и плацебо, получающие экспериментальные образцы в лечебно-профи-

лактическом режиме (2 дня до, в день инфицирования и в течение 5 дней после заражения животных вирусом гриппа, 20 мл/кг/день). И мыши с введением дистиллированной воды (отрицательный контроль), в идентичном объёме и согласно схеме введения комплексного препарата ($n = 13$ на группу).

Спустя шесть дней после заражения мышей вирусом гриппа (соответствует второму дню после инфицирования *S. aureus*) в каждой группе умерщвляли (путем цервикальной дислокации) по 3 особи для определения вирусной и бактериальной нагрузки в лёгких. Кроме того, оценивали выживаемость (ежедневно) и динамику массы тела. Первые 5 дней после инфицирования вирусом гриппа животных взвешивали каждый день, далее процедуру проводили через день.

Эффективность препаратов определяли по первичным критериям – показателям выживаемости, средней продолжительности жизни (СПЖ), и вторичным – вирусной и бактериальной нагрузке в лёгких животных.

Определение патогенной нагрузки в лёгких мышей. Оценку вирусной нагрузки в лёгочной ткани в обеих моделях проводили после извлечения органов, с их последующей гомогенизацией в буфере (ФСБ) и получением серии десятикратных разведений. Инфекционный титр вируса определяли по методу Рида и Менча и выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса (lg TCID₅₀/0,2 мл).

В модели вирусно-бактериальной пневмонии 0,1 мл готового супернатанта отбирали для оценки бактериальной обсемененности лёгких, определение которой проводили визуально, путем подсчёта колониеобразующих единиц (КОЕ), образовавшихся на питательной среде после высева гомогената.

Статистическая обработка данных. Анализ результатов проведен в программе RStudio (Version 1.1.463 – © 2009-2018 RStudio, Inc.) с использованием пакета R версии 3.5.3 и 3.6.1. Нормальность распределения оценивали по тесту Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсии – по тесту Бартлетта. Показатели титров вируса и бактериальной нагрузки анализировали с помощью перестановочного теста, Т-критерием Стьюдента, с использованием поправки Холма. Значения титров вируса и бактерий представлены в виде медиан (*Me*), нижнего и верхнего квартиля (*Q1*; *Q3*). Тест Данна с поправкой Холма применяли для оценки динамических изменений массы тела животных, данные визуализированы на графиках в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm SEM$). Анализ выживаемости для обеих моделей произведен путем построения кривых Каплана-Майера, с использованием log-rank теста.

СПЖ и ее доверительные интервалы (*LCI*; *UCI*) рассчитывали по усеченной оценке Каплана-Майера (*truncated Kaplan-Meier estimator*) по методу ограниченного среднего (*restricted mean, rmean*). Из-за точечной оценки параметра, различия считали статистически значимыми при неперекрывании доверительных интервалов значений СПЖ.

В ходе заражения животных вирусом гриппа (модель гриппозной инфекции) одна мышь не отошла от наркоза и была исключена из дальнейшего эксперимента и анализа данных.

Результаты исследования

Результаты изучения эффективности препаратов на модели гриппозной инфекции.

Клинические признаки заболевания у инфицированных животных всех групп были типичными для гриппозной инфекции: затруднённое дыхание, атаксия, тремор, снижение потребления корма и воды. Заражение мышей приводило практически к полной гибели в группе отрицательного контроля: начало падежа фиксировали уже на 4-й день, и к окончанию исследования выживаемость составила 20%, что было сопоставимо с выживаемостью в группе плацебо. В противоположность

этому, для группы лечебно-профилактического введения образца СВР АТ к МНС I смертность (первичный критерий эффективности) была зафиксирована начиная только с 6-х суток после инфицирования, СПЖ животных в группе образца СВР АТ была схожей с группой препарата Осельтамивир и превышала таковую в группах отрицательного контроля и плацебо (табл. 1). Выживаемость составила 67% ($p < 0,05$ vs отрицательный контроль и плацебо) и была близка к таковой для группы Осельтамивир (80%, $p < 0,05$ vs отрицательный контроль и плацебо) (рис. 1).

Лечение Осельтамивиром подавляло размножение вируса в тканях инфицированных животных (вторичный критерий эффективности), однако ограниченность выборки не позволила выявить статистически значимых отличий ни по отношению к группе отрицательного контроля, ни к группе плацебо. Для образца СВР АТ к МНС I было показано незначительное снижение

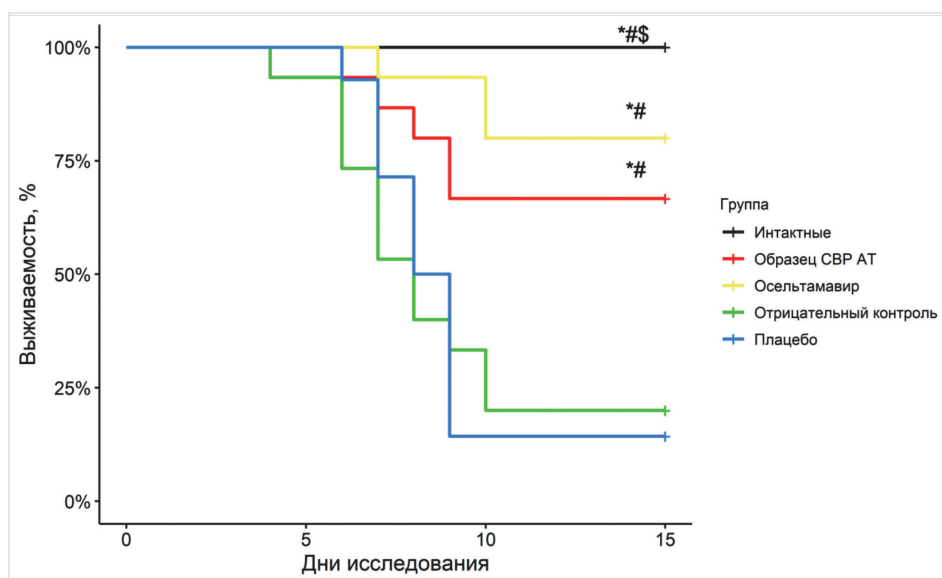


Рис. 1. Кривые выживаемости Каплана-Майера. Мыши ($n = 20$), подвергшихся заражению вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (pdmH1N1 2009). * – $p < 0,05$ vs группа отрицательного контроля; # – $p < 0,05$ vs группа с плацебо; \$ – $p < 0,05$ vs группа образца СВР АТ к МНС I.

Таблица 1.

Средняя продолжительность жизни (СПЖ) и вирусная нагрузка в лёгких животных при интраназальном заражении вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (pdmH1N1 2009)

Группа	Выживаемость, %	СПЖ (дни), Mean (LCL, UCL)	Титр вируса lg TCID ₅₀ /0,2 мл, Me (Q1, Q3)
Интактные	100 *# \$	14,0 (0,0; 0,0) +	0,0 (0; 0) *#
Отрицательный контроль	20	7,90 (–0,49; +0,49)	7,5 (7,5; 7,5)
Осельтамивир	80 *#	12,80 (–0,35; +0,35) •	5,0 (3,5; 6,0)
Образец СВР АТ к МНС I	66,7 *#	11,60 (–0,49; +0,49) •	7,0 (5,5; 7,0)
Плацебо	14,3	8,00 (–0,40; +0,40)	7,5 (7,5; 7,5)

Примечания: * – $p < 0,05$ vs группа отрицательного контроля; # – $p < 0,05$ vs группа плацебо; \$ – $p < 0,05$ vs группа образца СВР АТ к МНС I. + – интактные животные по показателю СПЖ отличались от всех групп исследования. • – значимые отличия по показателю СПЖ от группы отрицательного контроля и плацебо.

вирусной нагрузки, которое также не достигло статистической значимости по сравнению с контрольными группами (табл. 1).

Результаты изучения эффективности препаратов на модели вирусно-бактериальной пневмонии.

Последовательное комбинированное заражение в группе отрицательного контроля приводило к значительной потере веса и полной гибели животных к моменту окончания эксперимента, что было также характерно и для группы плацебо. Плотность бактерий и титр вируса в лёгких мышей для обеих групп были на сопоставимом уровне (табл. 2).

Применение комплексного препарата увеличивало выживаемость животных, которая на конец экспе-

римента составила 40% и статистически значимо отличалась как от группы плацебо, так и от отрицательного контроля ($p < 0,05$). При этом отличий по данному показателю от группы сочетанного применения противовирусного и антибактериального препаратов выявлено не было ($p > 0,05$). СПЖ для обеих групп была одинаковой и составила почти 13 дней, что статистически значимо отличалось от СПЖ в группах плацебо и отрицательного контроля (рис. 2, табл. 2).

Тем не менее, введение комплексного препарата не оказывало выраженного влияния на набор массы тела животными: суммарные показатели веса в острейший период инфекции (6-е сутки после заражения) не отличались ($p > 0,05$) от таковых для групп плацебо и отри-

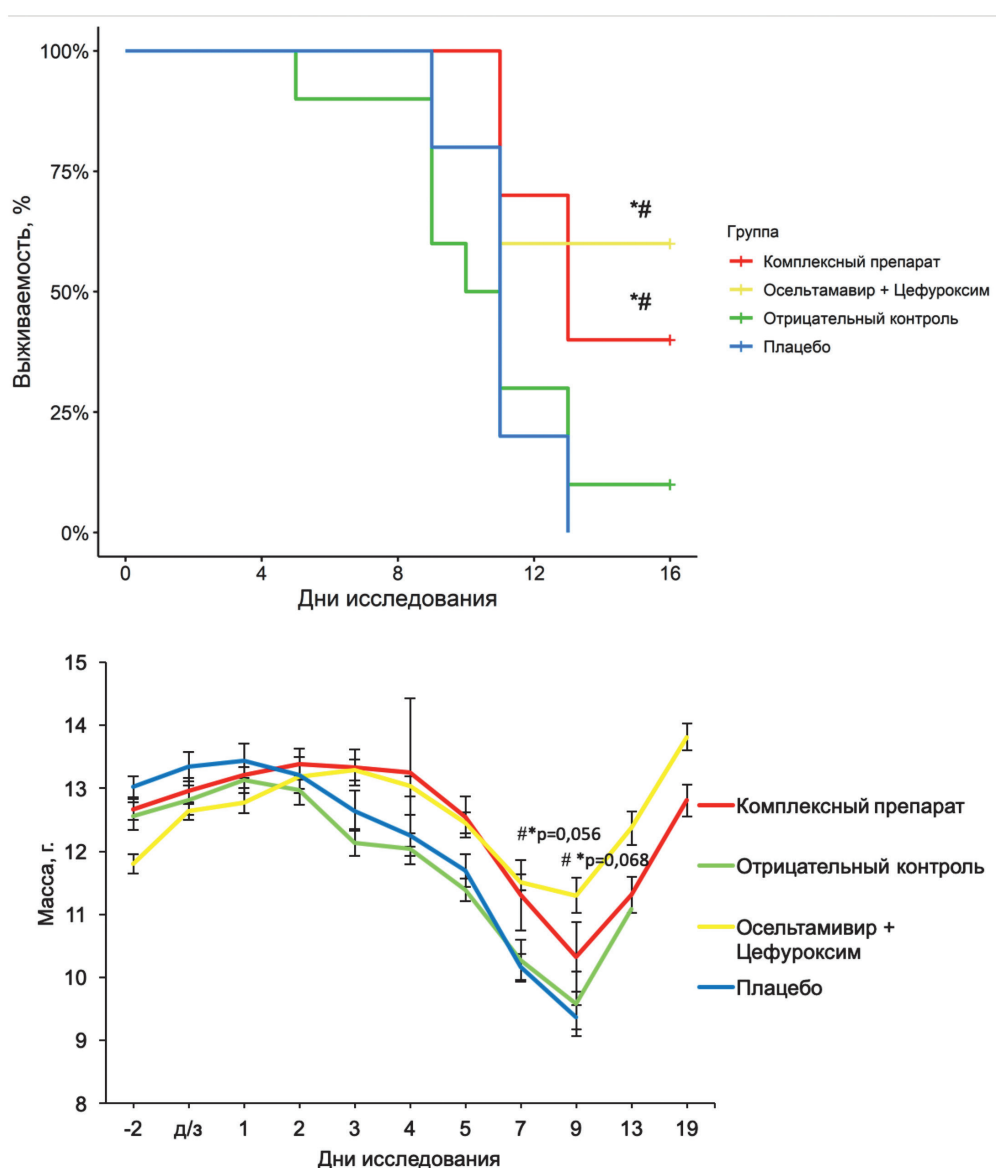


Рис. 2. Кривые выживаемости Каплана-Майера (вверху) и динамика массы тела мышей по дням (внизу) (mean \pm SEM). Мыши ($n = 13$), подвергшиеся заражению вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (pdmH1N1 2009) с последующим инфицированием *S. aureus*. Отличия между экспериментальными группами рассчитывали для клинически значимых точек эксперимента: за 2 дня до заражения, в день инфицирования, на 7-е и 9-е сутки после заражения. * – $p < 0,05$ vs группа отрицательного контроля; # – $p < 0,05$ vs группа плацебо.

цательного контроля. Несмотря на это, к окончанию эксперимента выжившие особи в группе, получавшей комплексный препарат, набирали, а не теряли вес. Значимый прирост массы тела был отмечен лишь для комбинации Осельтамивира с Цефуруксимом ($p < 0,05$ vs плацебо).

Как и в предыдущем опыте, ограниченность выборки не позволила выявить статистически значимых отличий во вторичном критерии – титрах вируса и плотности бактерий лёгких заражённых животных для групп, получавших комплексный препарат или контроли (табл. 2). Применение комбинации Осельтамивира с Цефуруксимом приводило к выраженному биологическому эффекту и подавлению репликации как вирусного, так и бактериального агентов (рис. 2, табл. 2) однако этот эффект не достиг статистической значимости.

Обсуждение

На сегодняшний день обоснованным является поиск новых противовирусных препаратов, способных подавлять размножение патогена, устранять основные симптомы заболевания и как следствие, приводить к снижению количества осложнений, в частности пневмоний. Именно фактор снижения количества пневмоний рассматривается как один из ключевых при оценке эффективности противовирусного препарата. В связи с этим, терапевтический потенциал противовирусных препаратов должен быть изучен не только в рамках стандартных моделей вирусного заражения, но и при более тяжелых состояниях, например, вирусно-бактериальных пневмониях. Поскольку иммунопатогенез таких состояний сложнее, чем при только вирусной инфекции, подход к их лечению должен быть комплексным. Именно поэтому в модели вирусно-бактериальной пневмонии нами был использован комплексный препарат, содержащий в своем составе СВР АТ к МНС I, МНС II, ИФН- γ и CD4 рецептору.

Кроме того, при моделировании подобных патологий важным является подбор инфицирующих доз и схем лечения, с возможностью адекватной оценки эффективности изучаемых препаратов. В связи с этим, терапевтический потенциал СВР АТ изучали с использованием различных инфицирующих доз вируса гриппа А, кото-

рые соотносятся с данными литературы [12, 16]. Действительно, в работе [17] было показано, что одиночное заражение животных низкой дозой вируса гриппа А, используемой для постановки вирусно-бактериальной пневмонии, не вызывает развития стойкой инфекции и не приводит к гибели животных, что для оценки противовирусного потенциала недостаточно. В этой связи нами также был проведен отдельный эксперимент на модели летальной инфекции животных.

Вирусная нагрузка животных определяла и дозировку для противовирусного препарата. В случае летальной гриппозной инфекции доза Осельтамивира была в 2 раза выше, нежели чем для животных, подвергшихся сочетанному вирусному и бактериальному заражению [12, 16].

В рамках обеих моделей было показано, что применение образцов СВР АТ способствует улучшению общего состояния, уменьшению выраженности симптомов инфекции, повышению выживаемости и СПЖ животных. Именно показатель выживаемости животных, отражающий тяжесть развившейся инфекции, рассматривается как первичный критерий эффективности противовирусных препаратов, тогда как патогенная нагрузка в органах-мишенях является вторичным критерием для оценки их эффективности [18].

Полученный результат, по-видимому, обусловлен регуляторным влиянием образцов СВР АТ на неспецифическое и специфическое звено иммунного ответа [3]. Так, было показано, что СВР АТ сохраняют специфичность действия, характерную для антител в их исходной форме, при этом не блокируя, а модифицируя мишень [3]. Такого рода активность далее реализуется в конформационных изменениях мишени и таким образом влияет на все реакции, протекающие с участием этой мишени, а также запускаемые ей каскады [7].

В частности, известно, что СВР АТ к ИФН- γ обеспечивают более эффективное развитие неспецифических иммунных реакций, увеличивая количество ИФН- γ , связавшегося с рецептором, и способствуя большей активации ИФН- γ -зависимых генов, в том числе, кодирующих неспецифические противовирусные белки [6].

Известно, что активация CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток посредством взаимодействия с белками МНС I и II клас-

Таблица 2.

Выживаемость и уровень патогена в лёгких при инфицировании животных вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (pdmH1N1 2009) с последующим заражением *S. aureus*.

Группа	Выживаемость, %	СПЖ (дни), Mean (LCL, UCL)	Титр вируса lg TCID ₅₀ , Me (Q1, Q3)	Плотность бактерий КОЕ/мл, Me (Q1, Q3)
Отрицательный контроль	10	9,60 (-0,64; +0,64)	6,0 (6,0; 6,0)	$4,5 \times 10^5$ ($4,5 \times 10^5$; $4,8 \times 10^5$)
Осельтамивир + Цефуруксим	60*#	12,60 (-0,68; +0,68) •	1,0 (0,5; 1,5)	0,0 (0,0; 0,0) +
Комплексный препарат	40*#	12,60 (-0,48; +0,48) •	5,0 (4,8; 5,0)	$3,8 \times 10^5$ ($2,4 \times 10^5$; $4,5 \times 10^5$)
Плацебо	0	10,00 (-0,29; +0,29)	4,0 (2,0; 4,5)	$8,3 \times 10^5$ ($5,1 \times 10^5$; $9,7 \times 10^5$)

Примечания: * – $p < 0,05$ vs группа отрицательного контроля; # – $p < 0,05$ vs группа плацебо. + – $p = 0,061$ vs группа отрицательного контроля. • – значимые отличия по показателю СПЖ от группы отрицательного контроля и плацебо.

сов является ключевым аспектом в элиминации большинства патогенов. При этом, многие из них способны оказывать «таргетное» воздействие на компоненты презентации и процессирования антигена, а также участвовать в модуляции сигнальных путей клеток, тем самым нарушая или подавляя адаптивный иммунный ответ хозяина [5]. Описанные в литературе данные для вируса гриппа указывают не только на нарушения со стороны презентации антигенов белкам МНС I класса [11], но и демонстрируют частичную вовлеченность вируса в деструкцию процессинга МНС II класса [19]. Например, вирус гриппа способен нарушать транскрипцию МНС I или приводить к общему понижению внутриклеточного пула этих белков, а также подавлять одно из звеньев ИФН-зависимого пути и экспрессию трансактивирующего фактора МНС II класса - СИТА. Что касается *S. aureus*, то некоторые из экспрессируемых бактериями токсинов (энтеротоксины А-Е, эпидермолитический токсин А и т.д.) действуют как суперантигены, связываясь с белками МНС II, стимулируя тем самым Т-клетки к неспецифической пролиферации [20]. Было также показано, что внеклеточные белки *S. aureus* способны связывать два главных рецептора для хемотаксиса нейтрофилов, что ведет к ослаблению воспалительного ответа организма хозяина [20]. Еще один механизм – усиленное высвобождение интерлейкина-10 за счёт бактериальных пептидогликанов, что может приводить к ослаблению Th1/Th17 ответа [20].

Мы полагаем, что выявленный протективный эффект со стороны образцов СВР АТ был связан также и с их влиянием на процесс презентации антигенов белками МНС I и II Т-клеткам и нивелированием подавляющих иммунный ответ хозяина эффектов патогенов; обеспечением более эффективного Т-клеточного иммунного ответа [9]. Немаловажную роль мог играть и баланс провоспалительных/противовоспалительных цитокинов, обеспечивающих мобилизацию и надлежащий воспалительный ответ со стороны хозяина.

Тем не менее, для подтверждения выдвинутого предположения необходимо проведение дополнительных исследований. В частности, изучить возможность препаратов на основе СВР АТ влиять на процесс презентации дендритными клетками специфических антигенов Т-клеткам.

Заключение

Показано, что профилактическое и лечебное применение СВР АТ к компонентам неспецифического и специфического иммунного ответа может быть эффективно при инфекциях вирусной и бактериальной этиологии, снижая летальность и увеличивая продолжительность жизни инфицированных особей; увеличивать сопротивляемость организма инфекциям дыхательных путей, способствуя снижению тяжести бактериальных осложнений при смешанной вирусно-бактериальной пневмонии.

Список литературы

1. Monto A.S. Effectiveness of the Neuraminidase Inhibitors: The supporting Evidence Increases *J. Infect. Dis.* 2020; 221: 340-342. DOI: 10.1093/infdis/jiz157
2. Torres A., Chalmers J.D., Dela Cruz C.S., Dominedò C., Kollef M., Martin-Loeches I., Niederman M., Wunderink R.G. Challenges in severe community-acquired pneumonia: a point-of-view review. *Intensive Care Med.* 2019; 45(2): 159-171. DOI: 10.1007/s00134-019-05519-y
3. Epstein O.I. The Spatial Homeostasis Hypothesis. *Symmetry.* 2018; 10(4): 103. DOI: 10.3390/sym10040103
4. La Gruta N.L., Turner S.J. T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. *Trends Immunol.* 2014; 35(8): 396-402. DOI:https://doi.org/10.1016/j.it.2014.06.004
5. Iannello A., Debbeche O., Martin E., Attalah L.B., Samarani S., Ahmad A. Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79(1): 16-35. DOI: 0.1189/jlb.0705397.
6. Tarasov S.A., Kachanova M.V., Gorbunov E.A., Zabolotneva J.A., Ertuzun I.A., Belopolskaya M.V., Borodavkina M.V., Dugina J.L., Epstein O.I. Anaféron, released-active form of antibodies to IFN γ , as an effective medicine for treatment and prophylaxis of a wide spectrum of infections. *Clin. Res. Trials.* 2016; 2(5): 229-232. DOI: 10.15761/CRT.1000152
7. Емельянова А.Г., Никифорова М.В., Дон Е.С., Махмудова Н.Р., Фальинская И.Н., Глубокова Е.А., Петрова Н.В., Горбунов Е.А., Тарасов С.А. Результаты исследования влияния анаферона детского на жизненный цикл вируса гриппа А/Н1N1 *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(3): 87-94. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.87-94
8. Емельянова А.Г., Тарасов С.А., Морозов С.Г. Противовоспалительное действие релиз-активных антител к интерферону-гамма, CD4-рецептору и гистамину при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции. *Патогенез.* 2019; 17(1): 85-89. DOI: 10.25557/2310-0435.2019.01.85-89
9. Канарейкина М.А., Алинкина Е.С., Петрова А.О., Емельянова А.Г., Горбунов Е.А., Тарасов С.А. Эргоферон повышает продукцию ИЛ-2 активированными лимфоцитами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018; 166(12): 706-709.
10. Emel'yanova A.G., Grechenko V.V., Petrova N.V., Shilovskii I.P., Gorbunov E.A., Tarasov S.A., Khaitov M.R., Morozov S.G., Epshtein O.I. Effects of Release-Active Antibodies to CD4 Receptor on the Level of Ick-Kinase in Cultured Mononuclear Cells from Human Peripheral Blood. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 162(3): 323-326. DOI: 10.1007/s10517-017-3606-4
11. Koutsakos M., McWilliam H.E.G., Aktepe T.E., Fritzlir S., Illing P.T., Mifsud N.A., Purcell A.W., Rockman S., Reading P.C., Vivian J.P., Rossjohn J., Brooks A.G., Mackenzie J.M., Mintern J.D., Villadangos J.A., Nguyen T.H.O., Kedzierska K. Downregulation of MHC Class I Expression by Influenza A and B Viruses. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1158. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01158
12. Зарубаев В.В., Гаршинина А.В., Калинина Н.А., Штро А.А., Беляевская С.В., Небольсин В.Е., Киселев О.И. Протективная активность препарата Ингавирин при экспериментальной летальной гриппозной инфекции, вызванной пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1) у белых мышей. *Антибиотики и химиотерапия.* 2010; 55(5-6): 24-31.
13. Cenjor C., Ponte C., Parra A., Nieto E., García-Calvo G., Giménez M.J., Aguilar L., Soriano F. In vivo efficacies of amoxicillin and cefuroxime against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a gerbil model of acute otitis media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(6): 1361-1364. DOI: 10.1128/AAC.42.6.1361
14. *Методы общей бактериологии* / Ред. Герхардт Ф. М.: Мир, 1983; 536 с.
15. Баррет Т., Берд П., Клефт Д. [и др.] *Вирусология. Методы.* М.: Медицина, 1988; 344 с.
16. Ленёва И.А., Фальинская И.Н., Леонова Е.И., Федякина И.Т., Махмудова Н.Р., Осипова Е.А., Лепеха Л.Н., Михайлова Н.А., Зверев В.В. Эффективность умифеновира (Арбидола) на модели экспериментальной сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии мышей. *Антибиотики и химиотерапия.* 2014; 59(9-10): 17-24.
17. Ленёва И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н.Р., Фальинская И.Н., Федякина И.Т., Зверев В.В., Михайлова Н.А. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии. *Вопросы вирусологии.* 2015; 60(5): 27-31.

18. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ* / Ред. Хабриев Р.У. М.: Медицина, 2005. 832 с.
19. Uetani K., Hiroi M., Meguro T., Ogawa H., Kamisaco T., Ohmori Y., Erzurum S.C. Influenza A virus abrogates IFN γ response in respiratory epithelial cells by disruption of the Jak/Stat pathway. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38(6): 278–285. DOI: 10.1002/eji.200737045
20. Thammavongsa V., Kim H.K., Missiakas D., Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(9): 529–543. DOI: 10.1038/nrmicro3521

References

1. Monto A.S. Effectiveness of the Neuraminidase Inhibitors: The supporting Evidence Increases *J. Infect. Dis.* 2020; 221: 340–342. DOI: 10.1093/infdis/jiz157
2. Torres A., Chalmers J.D., Dela Cruz C.S., Dominedò C., Kollef M., Martin-Loeches I., Niederman M., Wunderink R.G. Challenges in severe community-acquired pneumonia: a point-of-view review. *Intensive Care Med.* 2019; 45(2): 159–171. DOI: 10.1007/s00134-019-05519-y
3. Epstein O.I. The Spatial Homeostasis Hypothesis. *Symmetry.* 2018; 10(4): 103. DOI: 10.3390/sym10040103
4. La Gruta N.L., Turner S.J. T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control. *Trends Immunol.* 2014; 35(8): 396–402. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.06.004>
5. Iannello A., Debbeche O., Martin E., Attalah L.B., Samarani S., Ahmad A. Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79(1): 16–35. DOI: 0.1189/jlb.0705397
6. Tarasov S.A., Kachanova M.V., Gorbunov E.A., Zabolotneva J.A., Ertuzun I.A., Belopolskaya M.V., Borodavkina M.V., Dugina J.L., Epstein O.I. Anaféron, released-active form of antibodies to IFN γ , as an effective medicine for treatment and prophylaxis of a wide spectrum of infections. *Clin. Res. Trials.* 2016; 2(5): 229–232. DOI: 10.15761/CRT.1000152
7. Emelyanova A.G., Nikiforova M.V., Don E.S., Makhmudova N.R., Falynskova I.N., Glubokova E.A., Petrova N.V., Gorbunov E.A., Tarasov S.A. [Effect of anaféron for children on the *in vitro* life cycle of influenza virus A/H1N1]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2018; 62(3): 87–94. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.87-94 (in Russian)
8. Emelianova A.G., Tarasov S.A., Morozov S.G. Anti-inflammatory activity of released-active antibodies to Interferon-gamma, CD4-receptor and histamine against respiratory-syncytial viral infection. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2019; 17(1): 85–89. DOI: 10.25557/2310-0435.2019.01.85-89 (in Russian)
9. Kanareikina M.A., Alinkina E.S., Petrova A.O., Emel'yanova A.G., Gorbunov E.A., Tarasov S.A. Ergoferon increases IL-2 production by activated lymphocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019; 166(6): 744–746. DOI: 10.1007/s10517-019-04431-1
10. Emel'yanova A.G., Grechenko V.V., Petrova N.V., Shilovskii I.P., Gorbunov E.A., Tarasov S.A., Khaitov M.R., Morozov S.G., Epshtein O.I. Effects of Release-Active Antibodies to CD4 Receptor on the Level of Ick-Kinase in Cultured Mononuclear Cells from Human Peripheral Blood. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 162(3): 323–326. DOI: 10.1007/s10517-017-3606-4
11. Koutsakos M., McWilliam H.E.G., Aktepe T.E., Fritzlar S., Illing P.T., Mifsud N.A., Purcell A.W., Rockman S., Reading P.C., Vivian J.P., Rossjohn J., Brooks A.G., Mackenzie J.M., Minter J.D., Villadangos J.A., Nguyen T.H.O., Kedzierska K. Downregulation of MHC Class I Expression by Influenza A and B Viruses. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1158. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01158
12. Zarubaev V.V., Garshinina A.V., Kalina N.A., Shtro A.A., Belyaevskaya S.V., Nebolsin V.E., Kiselev O.I. [Protective Activity of Ingavirin® in Experimental Lethal Influenza Due to Pandemic Influenza Virus A (H1N1)v (Albino Mice)]. *Antibiotiki i khimioterapiya [Antibiotics and Chemotherapy]*. 2010; 55 (5–6): 24–31. (in Russian)
13. Cenfor C., Ponte C., Parra A., Nieto E., García-Calvo G., Giménez M.J., Aguilar L., Soriano F. In vivo efficacies of amoxicillin and cefuroxime against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a gerbil model of acute otitis media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(6): 1361–1364. DOI: 10.1128/AAC.42.6.1361
14. *[General bacteriology methods]* / Eds. Gerhardt. F. Moscow: Mir, 1983. 536 p. (in Russian)
15. *[Virology: Methods]* / Eds. Barrett T., Berd P., Clegg D. [et al.] Moscow: Meditsina, 1988. 344 p. (in Russian)
16. Leneva I.A., Makhmudova N.R., Leonova E.I., Fedyakina I.T., Makhmudova N.R., Osipova E.A., Lepekha L.N., Mikhailova N.A., Zverev V.V. [Umifenovir (Arbidol) efficacy in experimental mixed viral and bacterial pneumonia of mice]. *Antibiotiki i khimioterapiya [Antibiotics and Chemotherapy]*. 2014; 59(9–10): 17–24. (in Russian)
17. Leneva I.A., Leonova E.I., Makhmudova N.R., Makhmudova N.R., Fedyakina I.T., Zverev V.V., Mikhailova N.A. [Experimental model of secondary bacterial pneumonia after influenza]. *Voprosy virusologii [Problems of Virology]*. 2015; 60(5): 27–31. (in Russian)
18. *[Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]* / Eds. Khabriev R.U. Moscow: Meditsina; 2005. 832 p. (in Russian)
19. Uetani K., Hiroi M., Meguro T., Ogawa H., Kamisaco T., Ohmori Y., Erzurum S.C. Influenza A virus abrogates IFN γ response in respiratory epithelial cells by disruption of the Jak/Stat pathway. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38(6): 278–285. DOI: 10.1002/eji.200737045
20. Thammavongsa V., Kim H.K., Missiakas D., Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(9): 529–543. DOI: 10.1038/nrmicro3521

Сведения об авторах:

Петрова Наталия Владимировна — научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-2192-7302>

Емельянова Александра Геннадиевна — научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-0832-9551>

Тарасов Сергей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-6650-6959>

Карташова Надежда Павловна — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Глубокова Екатерина Андреевна — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; <https://orcid.org/0000-0002-5925-9733>