

**Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

**ГАЛОЧКИНА
Анастасия Валерьевна**

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

03.02.02 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук,
заведущий лабораторией
химиотерапии вирусных инфекций

ФГБУ «НИИ Гриппа» МЗ РФ

Зарубаев В.В.

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
2.1 Актуальность проблемы	10
2.2 Общая характеристика семейства Пикорнавирусов.	11
2.2.1 Эпидемиология энтеровирусной инфекции.	13
2.2.2 Характеристика клинических симптомов при ЭВИ	15
2.2.3 Патогенез энтеровирусной инфекции	18
2.2.5 Строение и жизненный цикл вируса Коксаки В4	19
2.2.6 Строение поджелудочной железы	21
2.2.7 Патогенез Коксаки В4 инфекции в поджелудочной железе.	22
2.3 Этиология инсулин-зависимого диабета 1 типа.....	22
2.3.1 Патогенез ИЗД 1 типа	27
2.3.2 Окислительный стресс при ИЗД 1 типа	29
2.3.3 Современные методы терапии ИЗД 1 типа.....	33
2.4 Взаимосвязь Коксаки В4 вирусной инфекции и ИЗД 1 типа.....	36
2.5 Химиотерапия энтеровирусных инфекций.....	37
2.5.1 Ингибиторы прикрепления, входа и раздевания.....	38
2.5.2 Препараты, направленные на подавление вирусной репликации.	41
2.5.3 3С протеазные ингибиторы.....	44
2.5.4 2А протеазные ингибиторы.....	47
2.5.5 Ингибиторы сборки и выхода вириона.	47
2.5.7 Дополнительная химиотерапия	47
2.6 Биологическая активность флавоноидов	49
2.6.3 Биологическая активность дигидрокверцетина	50
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
3.1 Исследуемые препараты.....	52

3.2. Вирусы и клетки	53
3.3. Подготовка вируса	53
3.4. Питательные среды	53
3.5. Исследование токсичности препаратов	53
3.6. Определение антиоксидантной активности препаратов	54
3.7. Титрование вируса	55
3.8. Определение противовирусной активности препаратов	55
3.9. Животные	56
3.10 Исследование противовирусной активности препаратов <i>in vivo</i>	56
3.11 Определение антиоксидантной активности препарата <i>in vivo</i>	56
3.12 Определение уровня интерферона <i>in vivo</i>	56
3.13 Приготовление гистологических срезов и проведение гистологической окраски.	57
3.14 Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия дигидрохлорокверцетина	58
3.15 Изучение вирулицидного действия препаратов	59
3.16 Получение устойчивых к дигидрохлорокверцетину штаммов вируса Коксаки В4.	59
3.17 Электронная микроскопия	59
3.18 Статистическая обработка данных	60
4 РЕЗУЛЬТАТЫ	61
4.1 Оценка антиоксидантной активности препаратов	61
4.2 Моделирование коксакивирусной инфекции в культуре клеток	64
4.2.1 Оценка противовирусной активности соединений в опытах <i>in vitro</i>	65
4.2.1.1 Цитотоксичность веществ-антиоксидантов	65
4.2.1.2 Противовирусная активность соединений.....	67
4.3. Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия ДКВ	72
4.4 Вирулицидное действие ДКВ	74
4.5 Селекция и изучение вирусов, устойчивых к ДКВ	74
4.6 Разработка и характеристика модели коксакивирусного поражения ПЖу белых мышей	78

4.6.1 Сравнительная оценка эффективности внутрибрюшинного и внутримышечного способов заражения	78
4.6.2 Динамика репродукции вируса в ткани поджелудочной железы.....	79
4.7 Исследование активности природных антиоксидантов на модели коксакивирусной инфекции у белых мышей	80
4.7.1 Оценка противовирусной активности препаратов в опытах <i>in vivo</i>	81
4.7.2 Влияние природных антиоксидантов на морфогенез экспериментальной коксакивирусной инфекции у мышей.....	82
4.7.3 Антиоксидантная активность ткани поджелудочной железы при энтеровирусном панкреатите.....	85
4.7.4 Оценка уровня выработки интерферона в крови мышей, зараженных вирусом Коксаки В4 при терапии ДКВ.....	86
4.8 Влияние ДКВ на ультраструктурные особенности морфогенеза коксакивирусной инфекции в культуре клеток	87
ОБСУЖДЕНИЕ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

Список сокращений

- АО — антиоксидант
- АОА — антиоксидантная активность
- АТФ — аденозинтрифосфат
- ДКВ — дигидрокверцетин
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЗД 1 типа — инсулин зависимый диабет 1 типа
- ИНЗД 2 типа — инсулин независимый диабет 2 типа
- КВИ — коксакивирусная инфекция
- ЛПНП — липопротеиды низкой плотности
- МНС 1 класса — главный комплекс гистосовместимости
- мРНК — матричная РНК
- МТТ — метитетразолиевый тест
- ОС — окислительный стресс
- ПЖ — поджелудочная железа
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- цАМФ — циклический аденозинмонофосфат
- ЦНС — центральная нервная система
- ЦПД — цитопатогенное действие
- ЦТД₅₀ — 50% цитотоксическая доза
- ХТИ — химиотерапевтический индекс
- ЭВ — энтеровирус
- ЭВИ — энтеровирусная инфекция
- ЭД₅₀ — 50% эффективная доза
- ЭР-АГ — эндоплазматический ретикулум – аппарат Гольджи
- Arg1-GTP — АДФ-полимеразно-рибозилирующие факторы низкомолекулярных связывающих белков
- CD4⁺T — рецептор молекул МНС 2 класса
- CD8⁺T — рецептор молекул МНС 1 класса
- CRE — катаболически-зависимый элемент
- CTL — цитотоксические лимфоциты
- DC — дендритные клетки
- DFF40/CAD — магний-зависимая эндонуклеаза специфичная для дцДНК
- eIF4G — эукариотический трансляционный иницирующий фактор 4 гамма
- ET-1 — эндотелин 1

FADD— TNFR1-ассоциированный DD-протеин
FAS— лиганд белка CD95
GAD65— глутаматдекарбоксилаза
GALT — лимфоидная ткань кишечника
GLP-1— глюкагонподобный пептид 1
HAV— вирус гепатита А
HIV— вирус иммунодефицита
HRV— риновирус
IA-2— антитела к тирозинфосфатазе
IFIH1— интерферон-индуцированный с хеликазой С домен 1
IgG1— 1 подкласс иммуноглобулина G
IgG-Fc— фрагмент молекулы иммуноглобулина G
IL -1 β , -2, -6, -10— интерлейкины 1 β , -2, -6, -10
INF $\alpha/\beta/\gamma$ — интерферон $\alpha/\beta/\gamma$
IP-10— интерферон-гамма индуцибельный белок
IRES— участок внутренней посадки рибосомы
microRNAs— микро РНК
MDA— малоновый диальдегид
MSC— мезенхимальные стволовые клетки
NF- κ B— транскрипционный фактор
p53— белок, регулирующий клеточный цикл
PAI-1— ингибитор- 1 активатора плазминогена
RAIDD— RIP-ассоциированный Ich-1/CED-3 гомологичный протеин с доменом смерти
RAS— белки, кодирующие малые G-белки
RISC — РНК, индуцированный комплекс сайленсинга
shRNAs— малые РНК, образующие шпильки
siRNAs— малые интерферирующие РНК
T12 (CD6)— рецептор, включенный в клиренс
TGF- β 1— трансформирующий фактор роста 1
TNF- α — фактор некроза опухоли
TNF-R— рецептор TNFSF2/TNF- α и гомотримерного TNFSF1/лимфотоксина- α
VSV—вирус везикулярного стоматита

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Наиболее распространенными энтеровирусными инфекциями считаются инфекции, вызываемые вирусами группы Коксаки. Актуальность проблемы Коксаки вирусных инфекций обусловлена частотой возникновения эпидемических вспышек и спорадических случаев болезни. Одной из основных особенностей инфекции является вирусоносительство, которое таит постоянную угрозу возникновения заболевания, особенно у детей. Заболевания, вызываемые вирусами Коксаки, характеризуются многообразием клинических проявлений с большим диапазоном тяжести от инанарантных форм до энцефалита и миокардита. Особенно тяжелое течение наблюдается у детей раннего возраста. Лечение энтеровирусной инфекции направлено на облегчение симптомов болезни и на уничтожение вируса. Поскольку этиотропное лечение энтеровирусных инфекций не разработано, производится симптоматическая и дезинтоксикационная терапия, в зависимости от тяжести и локализации воспалительного процесса.

Таким образом, полное отсутствие этиотропных препаратов на фармакологическом рынке и то существенное значение, которое они приобретает для терапии коксакивирусных инфекций в целом, определяют актуальность темы, цель и задачи диссертационного исследования.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей диссертационной работы является оценка терапевтического потенциала антиоксидантов растительного происхождения при лечении экспериментальной коксакивирусной инфекции. Достижение данной цели потребовало решения следующих задач:

- определить АОА 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.

Объект и предмет исследования.

Объектом исследования является вирус Коксаки В4 как фактор, инициирующий развитие инсулин-зависимого диабета 1 типа. Предметом исследования является

противовирусная активность антиоксидантных препаратов *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса Коксаки В4.

Методологической основой работы явились системный и диалектический подходы, методы анализа и синтеза, научной абстракции, а также метод сопоставления теоретических данных с практическими результатами опыта их претворения в жизнь на основе критерия объективности.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- ❖ Разработана и охарактеризована экспериментальная модель на белых мышах для изучения патогенеза вирусного панкреатита, вызванного вирусом Коксаки В4.
- ❖ Оценены противовирусные свойства антиоксидантных соединений в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro* и *in vivo*.
- ❖ Доказана противовирусная эффективность препарата ДКВ в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro* и *in vivo*.
- ❖ Объяснены возможные механизмы действия АО как противовирусных веществ в отношении вируса Коксаки В4.
- ❖ Создана платформа для дальнейших исследований синтетических и природных препаратов-антиоксидантов как эффективных противовирусных средств.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Теоретическое значение исследования заключается в том, что оно: позволяет дополнить существующие исследования по изучению противовирусной активности АО, дает возможность оценить перспективы для создания комплексных противовирусных средств для лечения КВИ, в том числе на основе АО. Практическая значимость диссертационной работы заключается в идентификации и характеристике новых активных АО противовирусных соединений в отношении вируса Коксаки В4, запускающим механизм развития диабета 1 типа; создания экспериментальной животной модели для изучения вируса Коксаки В4; выявлении эффективного противовирусного препарата – дигидрокверцетина, активного в отношении вируса Коксаки В4.

Положения, выносимые на защиту.

1. Наибольшую антиоксидантную активность в бесклеточной системе показали следующие соединения: ДКВ, ДКВ-Zn, фракция 6 единого экстракта антиоксидантов ели сибирской (ЭА-ЕС) и сам ЭА-ЕС.
2. Антиоксидантные соединения обладают умеренной противовирусной активностью в отношении вируса Коксаки В4. Наибольшую противовирусную активность *in vitro* проявил дигидрокверцетин – флавоноид, экстрагируемый из коры лиственницы сибирской.

3. ДКВ проявляет наивысшую активность на ранних стадиях жизненного цикла вируса Коксаки В4.
4. ДКВ обладает противовирусной активностью на модели коксакивирусной инфекции у белых мышей, снижая титры вируса в ПЖ и уменьшая воспалительные процессы в ткани.
5. Пассирование 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 АОА соединений, первичный скрининг препаратов на определение противовирусной активности *in vitro*, были выявлены механизмы противовирусного действия ДКВ в отношении вируса Коксаки В4. Также была разработана и охарактеризована модель *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.

Апробация результатов исследования. 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 журналах из списка ВАК, а также в тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 114 печатных листах, состоит из: введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы» и главы «Результаты», а также из обсуждения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 51 рисунком. Список литературы содержит 120 источников, в том числе 9 на русском языке и 111 на иностранных языках.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Актуальность проблемы

Коксакивирусная инфекция является одной из разновидностей энтеровирусных инфекций. Энтеровирусная инфекция - это наиболее часто встречающихся инфекций у детей и подростков, возбудителем которой являются вирусы семейства *Picornaviridae* (Пикорнавирусы). Вспышки энтеровирусных заболеваний происходят довольно часто и во всем мире. Например, энтеровирусным (асептическим) менингитом во Франции в 2002 г. заболело 559 человек, источником явились вирусы ЕСНО 13, 20, 6, в Японии в 2000 г. было инфицировано несколько сотен человек со смертельными исходами, причиной которых был энтеровирус 71-го типа. В США в 2001 г., более 100 человек было инфицировано вирусом ЕСНО 13, в Испании в 2000 г. этот же вирус поразил 135 человек, в Германии в 2001 г., заболело 70 человек, причиной явился вирус Коксаки В5. Наиболее крупные зафиксированные вспышки отмечались на Тайване в 1998, 2000 гг., где заболело около 3 тысяч человек с доминирующими вирусами ЕСНО 13, 30 и энтеровирус 71-го типа. В Сингапуре в 2000 г. регистрировалась вспышка вызванная энтеровирусом 71-го типа было инфицировано около 1 тысячи случаев с 4 смертельными исходами. На постсоветском пространстве наиболее крупные вспышки в последние годы наблюдались в России. В Приморском крае (Хабаровск) в 1997 г., преобладали вирусы Коксаки В3, 4, 5, ЕСНО 6, 17 и энтеровирус 70-го типа. В Калмыкии в 2002 г. было зафиксировано 507 случаев заражения энтеровирусной инфекции, вызванной вирусом ЕСНО 30, а в Украине в 1998 г. заболело 294 человека, а причиной явился вирус Коксаки В4.

Энтеровирусы обладают широким спектром клинических синдромов, включающих в себя такие заболевания как асептический менингит, герпангина, конъюнктивит, миокардит, различные экзантемы и т.д. У новорожденных энтеровирусная инфекция может вызывать менингоэнцефалит или состояние, клиническая картина которого, напоминает сепсис (<http://www.pitermed.com/simptom-y-bolezni/?cat=6&word=55036>).

Открытие энтеровирусов произошло в начале 20 века. Стимулом к изучению данных вирусов послужило неизлечимое заболевание, которым страдал президент США Франклин Рузвельт (рисунок 1).



Рисунок 1 - Портрет 32-го президента США Франклина Делано Рузвельта (1882-1945)(https://ru.wikipedia.org/wiki/Рузвельт,_Франклин)

В результате инфицирования энтеровирусом у него развилась лихорадка, после которой наступил паралич. Это был один из первых случаев заболевания энтеровирусной инфекцией с серьезными последствиями у публичного человека. Вскоре после этого в США началась активная работа по выделению вируса, вызвавшего данную болезнь. Несмотря на то, что случаи заболевания с похожими симптомами встречались еще в Древнем Египте, впервые выделить данный вирус (полиовирус) удалось только в 1949 году Джону Эндеру. Примерно в этот же период были выделены и объяснены свойства других представителей рода энтеровирусов. Вирус Коксаки был открыт в 1948 году Гилбертом Далдорфом и Грейс Сиклсом. Он был выделен в местечке Коксаки (штат Нью-Йорк), поэтому Г. Долдорф предложил временно назвать этот и сходные с ним вирусы вирусами группы Коксаки. Это название сохранилось и до наших дней (Melnick J.L., 1993).

2.2 Общая характеристика семейства Пикорнавирусов.

Энтеровирусы относятся к семейству *Picornaviridae* (от *pico* – «малый» и *rna* – «содержащий РНК»), роду *Enterovirus*. Помимо рода Энтеровирусов к данному семейству относят следующие роды: *Rhinovirus*, *Hepatovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*. Согласно последней классификации вирусов (Международного комитета по таксономии вирусов, 2003), основанной на геномных характеристиках вирусов, неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ) человека объединены в четыре группы (вида): А, В, С, D. Различные серотипы неполиомиелитных энтеровирусов отнесены к этим группам. В филогенетическом плане энтеровирусы группы С и полиовирусы представляют один вид энтеровирусов. В настоящее время определена полностью или частично

нуклеотидная последовательность геномов многих энтеровирусов. Все энтеровирусы оказались сходными по общей схеме организации генома, хотя у вирусов разных видов и серотипов имеются различия (Нуурпää Т. et al., 1997; King A. M.Q. et al., 1999)(таблица 1).

Таблица1 - Таксономические виды и серотипы энтеровирусов

Виды энтеровирусов	Серотипы
Энтеровирус человека А	16 (КоксакиА 2-8, 10, 12, 14, 16; EV 71, EV 76, EV 89-91)
Энтеровирус человека В	53 (Коксаки А 9; Коксаки В 1-6; ЕСНО 1-7,9, 11-21, 24-27, 29-33; EV 69, EV 73-75, EV 77, EV 78, EV 79-88, EV 100-101)
Энтеровирус человека С	12 (Коксаки А 1, 11, 13, 17, 19-22, 24, PV 1-3)
Энтеровирус человека D	2 (EV 68, 70)
Обезьяний	1 (SEV-AI)
Бычий энтеровирус	2 (BEV-1, BEV-2)
Энтеровирус свиней А	3
Энтеровирус свиней В	2 (PEV-9 и PEV-10)

Энтеровирусы быстро погибают при температуре выше 50°C (при 60°C в течение 6-8 мин, при 65°C – 2, 5 мин, при 80°C - 0,5 мин, при 100°C - мгновенно). Добавление к вирусной взвеси хлористого магния сохраняет титр вируса при 50°C практически неизменным в течение часа. В замороженном состоянии активность энтеровирусов сохраняется в течение многих лет, при хранении в обычном холодильнике (4- 6°C) - в течение нескольких недель, а при комнатной температуре – на протяжении нескольких дней. Они выдерживают многократное замораживание и оттаивание без потери активности.

Энтеровирусы быстро разрушаются под воздействием ультрафиолетового облучения, при высушивании, кипячении. Быстро инактивирует вирусы раствор йода. Обработка 0,3 % формальдегидом, 0,1 NHCl или свободным остаточным хлором в концентрации 0,3-0,5 мг/л ведет к инаktivации энтеровирусов, однако присутствие органических веществ может оказывать защитное действие. Перекись водорода в дозе 6,8 мг/л инаktivирует энтеровирусы в воде за 30 мин. Этиловый спирт (70% и более высокой концентрации) и формальдегид (0,3%) применяют для дезинфекции в отношении энтеровирусов при экспозиции не менее 3 ч. Энтеровирусы устойчивы в кислой среде (рН=3,0-5,0). Эфир, дезоксихолат и другие детергенты, разрушающие ряд вирусов, не оказывают влияния на энтеровирусы (<https://www.lawmix.ru/expertlaw/60032>).

2.2.1 Эпидемиология энтеровирусной инфекции.

Энтеровирусы обнаруживают у людей по всему земному шару. В тропических и субтропических странах они циркулируют постоянно. В странах с умеренным климатом энтеровирусы наиболее часто встречаются в конце лета и начале осени и могут быстро распространяться среди населения в виде скрытых или явных эпидемий (Muehlenbachs A. et al., 2015). Из-за низкого иммунитета дети наиболее восприимчивы к инфекции энтеровирусами и служат основными их распространителями. Зараженность детей при низком социально-гигиеническом уровне может достигать до 50%. Уровень естественного иммунитета с возрастом увеличивается. Чем хуже санитарные условия, тем в более раннем возрасте происходит инфекция, и вырабатывается невосприимчивость. С возрастанием уровня личной и коммунальной гигиены циркуляция энтеровирусов сокращается, и увеличивается число лиц, доживающих до взрослого возраста без инфицирования и без иммунитета. Источником инфекции является больной человек или бессимптомный носитель вируса. Вирус выделяется из носоглотки и кишечного тракта и может передаваться как фекально-оральным, так и респираторным путями (Melnick J.L. et al., 1970). Относительная роль каждого из путей передачи остаётся неясной, по-видимому, она может варьировать в зависимости от сроков после начала болезни (или инфицирования), характеристик вируса и условий окружения. Важным путём является, по-видимому, контакт с загрязнёнными предметами и руками другого человека с последующей аутоинокуляцией вируса через рот, нос или глаза. Энтеровирусы регулярно выделяют из сточных вод. По видовому составу и количественному содержанию можно судить об их циркуляции на соответствующих территориях. Поверхностные воды (озёра, бассейны) часто контаминированы энтеровирусами, их изредка обнаруживали даже в хлорированной водопроводной воде (Yin-Murphy M. et al., 1970). Доказано, что некоторые вспышки серозного менингита в сибирских городах были связаны с потреблением контаминированной воды. Использование сточных вод для полива сельскохозяйственных угодий и сохранение вируса на овощах не является важным путём передачи вируса. Инкубационный период энтеровирусов широко варьирует, составляя от 2 до 35 дней, в среднем - до 1 недели. Высокая их патогенность убедительно доказана. Заболеваемость детей составляет обычно 10-20%, достигая среди самых младших возрастов до 50%. Часто наблюдается внутрисемейное распространение инфекции. Эпидемиологические данные указывают на то, что инфекционная активность вируса выше в ранние периоды заболевания, когда возбудитель присутствует в экскретах организма в наибольших концентрациях. Вирус обнаруживают в крови, моче, носоглотке и фекалиях за несколько дней до появления клинических симптомов. Через 2 недели большинство энтеровирусов ещё выделяется с фекалиями, но уже не обнаруживается в крови или носоглоточных выделениях (Pallansch M.A., 1997)

Такие факторы, как возраст, пол и социально-экономический статус играют существенную роль в эпидемиологии энтеровирусных инфекций. Большое число неполиомиелитных энтеровирусов, лёгкость и широта их распространения, зависящие от предыдущих инфекций и связанного с ними иммунитета, объясняют тот факт, что первичные инфекции имеют место преимущественно в раннем возрасте (Sawyer M. H., 1999). При данных инфекциях количество выделяемого вируса и длительность его выделения являются наибольшими, поэтому детский контингент является наиболее важным источником инфекции, особенно в семьях. Вероятность вторичного инфицирования и тяжесть клинических проявлений существенно варьируют у различных энтеровирусов. Большинство энтеровирусных инфекций протекает тяжелее у взрослых лиц, в то же время, некоторые энтеровирусы (например, ЕСНО 11) вызывают в редких случаях у новорождённых исключительно тяжёлое заболевание и быстро приводят к летальному исходу («вирусный сепсис»). Особую важность имеет распространение энтеровирусных инфекций в организованных детских коллективах (детских садах, школах), когда в группах до 50% детей могут оказаться зараженными (Palacios G. et al., 2005). Хорошо документированные многочисленные случаи внутрибольничных энтеровирусных инфекций объясняются как недостаточно продуманным устройством больниц (их планировкой, системами сантехники), так и в ещё большей мере недостаточной квалификацией и дисциплиной персонала по соблюдению мер профилактики внутрибольничных инфекций. Примерами являются вспышки острого энтеровирусного увеита в больницах Красноярска, Омска и Иркутска в 1980-1989 гг. с десятками и сотнями заболевших детей, потерявших зрение (Королева Г.А. и соавт., 1995). Почти все энтеровирусы могут вызывать как спорадические случаи заболевания, так и быть причиной крупных вспышек или даже пандемий. Энтеровирус 70-го типа в 1969 году вызвал пандемию геморрагического конъюнктивита в Западной и Северной Африке, которая охватила десятки миллионов человек с большим количеством неврологических осложнений (<http://www.krasotaimedicina.ru/diseases/ophthalmology/epidemic-hemorrhagic-conjunctivitis>). Принципиально важной для понимания эпидемиологии энтеровирусных инфекций является их высокая изменчивость: быстро сменяются серотипы энтеровирусов, изменяется географическая локализация вспышек, клиническая картина заболевания. Важно то, что один и тот же серотип вируса может вызывать совершенно различные по клинике заболевания (даже в одной семье в одно и то же время), и что различные серотипы энтеровирусов могут давать заболевания сходной клинической картиной (например, полиомиелит может быть вызван вирусами полиомиелита, Коксаки А7 или энтеровирусом типа 71). Доказано, что в одном регионе одновременно могут циркулировать только несколько серотипов энтеровирусов, характерных для данной местности. Серологическое обследование населения показало, что значительная его часть имеет

нейтрализующие антитела к определённым типам энтеровирусов, что говорит о контакте с инфекцией в прошлом. Наличие IgM антител к энтеровирусам у 4-6% населения указывает на то, что эта часть популяции перенесла свежую (в течение 1-2 месяцев) энтеровирусную инфекцию. Наличие и уровень антител к определенному серотипу варьирует в зависимости от времени, места, возраста. Поэтому интерпретация результатов серологических обследований должна быть весьма осторожной (Grist N.R. et al., 1975).

2.2.2 Характеристика клинических симптомов при ЭВИ

Энтеровирусные инфекции характеризуются весьма большим разнообразием вариантов клинического течения, из которых многие не имеют между собой даже отдаленного сходства. Лишь благодаря достижениям вирусологии, открытию возбудителей этих инфекций, установлена единая этиология различных, казалось бы, не имеющих ничего общего между собой клинических форм (таблица 2).

Таблица 2 - Клинические синдромы при энтеровирусных инфекциях

Синдром	Доминантный вирус	Клинические проявления
Неспецифическая фебрильная лихорадка	Все типы	Фебрильная лихорадка, головные боли, миалгия
Асептический менингит	Эховирус и вирусы группы В	Жар, менингеальные симптомы
Герпангина	Вирусы Коксаки группы А	Жар, болезненные везикулы на миндалинах и глотке
Болезнь кистей-стоп-полости рта	Вирус Коксаки А16	Жар, формирование везикул на слизистой оболочке щек и языка и на межпальцевой поверхности стоп и ладоней
Неспецифичная экзантема	Эховирусы	Разнообразная сыпь, +/- жар
Плейродения	Коксаки В3, В5	Жар, мышечная боль в грудной клетке и брюшной полости

Кардиты (мио/перикардиты)	Вирусы группы В	Лихорадка, боли в грудной клетке, повышенная потливость, рвота, цианоз кожных покровов
------------------------------	-----------------	--

Характеристика основных форм энтеровирусной инфекции.

Серозный (асептический, абактериальный) менингит –одна из частых и типичных форм Коксаки и ЕСНО инфекций. Как и другие формы энтеровирусной инфекции, серозный менингит наблюдается главным образом у детей и реже у людей молодого возраста. Обычной для этой инфекции является летне-осенняя сезонность заболеваемости. Энтеровирусный серозный менингит наблюдается как в виде спорадических заболеваний, так и в виде вспышек, нередко значительных (вспышка в США и странах Западной Европы в 50-х годах; вспышки в СССР: в Приморском крае (1958), Николаеве (1958), Киеве (1958-1959), Марийской АССР, Хабаровское крае (1959), Донецке (1959), в Московской, Ленинградской, Ярославской и других областях).

Клиника серозного менингита, вызванного различными серологическими типами энтеровирусов, не имеет существенных различий, поэтому описание ее дается здесь вне зависимости от типа возбудителя.

Начало болезни острое. Оно проявляется повышением температуры (до 38-40°), расстройством общесостояния и симптомами внутричерепной гипертензии - сильными головными болями, рвотой, обычно неоднократной. Нередко (в 15-25% случаев) отмечаются боли в животе, иногда возбуждение, беспокойство, изредка бред, судороги. Лицо больного гиперемировано, сосуды склер инъецированы. Отмечается также гиперемия и нередко зернистость слизистой оболочки зева, а также припухание лимфатических узлов (преимущественно подчелюстных и шейных). На 1-3-й день болезни появляются менингеальные признаки - ригидность затылочных мышц и симптомы Кернига и Брудзинского. Нередко менингеальный синдром бывает неполным - отдельные признаки выпадают; наиболее постоянным из них является ригидность затылочных мышц. Через 3-7 дней температура в большинстве случаев падает. К 5-7-му дню исчезают менингеальные симптомы. Нормализация клеточного состава ликвора происходит значительно позже (обычно к концу 3-й недели, редко позднее) (Ajith C. et al., 2012).

Эпидемическая миалгия (плевродиния, болезнь Борнхольма) - частая типичная форма Коксаки В инфекции. Начиная с 1950 г., вспышки эпидемической миалгии наблюдались во многих странах на всех континентах. Чаще они носили локальный характер, иногда принимали размеры значительной эпидемии. Число заболевших во время этих вспышек исчислялось

сотнями, тысячами и изредка даже десятками тысяч. Начало болезни острое. Отмечается быстрое повышение температуры (до 38-40°C), которое нередко сопровождается ознобом. Появляются общее недомогание, головные боли и нередко рвота. Лицо гиперемировано, склеры глаз инъектированы. Обычно почти одновременно с повышением температуры возникают острые, мучительные мышечные боли различной локализации: в мышцах груди, живота, спины, конечностей. Они имеют приступообразный характер и усиливаются при движении.

При локализации болей в груди (обычно в нижней ее части) дыхание становится затрудненным, поверхностным. Глубокие вдохи очень болезненны. Иногда появляется икота. Именно этот вариант эпидемической миалгии получил название плевродинии, хотя сущность болезни состоит в поражении не плевры, а мышц грудной клетки и диафрагмы. Плевродиния является острым диафрагматитом. Обнаружение шума трения плевры, указывающего на вовлечение плевры в процесс, явление редкое.

Часто боли локализуются в мышцах брюшного пресса - в эпигастральной области, в области пупка, иногда в подвздошной области. Пальпация живота болезненна, однако симптомов раздражения брюшины не обнаруживается. Иногда у таких больных ставится ошибочный диагноз аппендицита.

Болезнь часто имеет двухфазное течение с новым повышением температуры и возобновлением мышечных болей после интервала в 1-3 дня. Изредка наблюдается третья волна. Общая продолжительность от 2 до 5 дней, а иногда до 10-14 дней (Lazarus A.S. et al., 1952).

Герпетическая ангина (герпангина) впервые описана в 1920 г. Zahorsky, который пришел к заключению об инфекционной природе этого заболевания. Heubner, Armstrong и др. (1951) установили его этиологическую связь с вирусами Коксаки А. Начало заболевания острое - повышается температура, иногда до высокой (39-40°), снижается аппетит, развивается общее недомогание, появляются головные боли и нередко рвота; в некоторых случаях отмечаются боли в животе. У детей раннего возраста изредка наблюдаются судороги. Уже в первый, реже на 2-й день болезни на гиперемированной слизистой оболочке небных дужек, менее часто язычка, миндалин, мягкого и твердого неба, языка появляются мелкие (размером в 1-2 мм) красные папулы, быстро превращающиеся в поверхностные пузырьки. Число их различно - от 2-3 элементов до 1,5-2 десятков. Через 1-2 дня пузырьки лопаются и образуются поверхностные эрозии с серовато-белым дном и узкой каймой гиперемии. Иногда происходит слияние отдельных эрозий. Изменения со стороны зева обычно сопровождаются умеренной болезненностью глотания, а иногда слюнотечением. Регионарные подчелюстные лимфатические узлы увеличиваются и становятся болезненными при ощупывании. В

некоторых случаях отмечается небольшое увеличение лимфатических узлов и других областей (Jubelt B.et al., 2014).

Энтеровирусная экзантема. Экзантема служит нередким симптомом при различных формах ЕСНО и Коксаки А инфекции (тип 9). Заболевание проявлялось общими симптомами, характеризующими ЕСНО инфекцию: лихорадкой (температура 38-39°) с продолжительностью во время бостонской эпидемии в среднем 3,5 дня (в эпидемию в Западной Европе в 1958 г. - 6 дней), головной и мышечными болями, тошнотой, рвотой. Нередко наблюдались боли в животе, а у маленьких детей был жидкий стул. Иногда отмечались катаральные явления со стороны верхних дыхательных путей: насморк, кашель. На 1-2-й день болезни на лице, туловище, а также на конечностях появлялась розовая полиморфная пятнистая или пятнисто-папулезная сыпь, которая у большинства больных во время бостонской эпидемии держалась лишь 1-2 дня (Biesbroeck L.et al., 2013).

Миокардит и энцефаломиокардит. Это тяжелые клинические формы Коксаки В инфекции, наблюдающиеся преимущественно у новорожденных и грудных детей в первые месяцы после рождения. Клинически заболевание характеризуется быстрым, нередко бурным течением. В начале обнаруживаются анорексия, сонливость, нередко рвота, понос и лихорадочное состояние. Температурная кривая не типична. Иногда она имеет двухфазный характер. Наряду с высокой лихорадкой может наблюдаться и полное ее отсутствие. Характерные симптомы: общий цианоз или акроцианоз, одышка, тахикардия. Физикальные и рентгенологические исследования обнаруживают изменения со стороны сердца лишь при полном развитии болезни. Появляются сердечные шумы, нарушения ритма, увеличение печени и иногда селезенки, отеки. Электрокардиографически обнаруживаются (но не всегда) признаки поражения миокарда. При поражении центральной нервной системы отмечаются напряжение родничков, подергивание мышц и приступы судорог. В спинномозговой жидкости наблюдается повышенный цитоз. Исход заболевания обычно становится ясным до 10-го дня. Тяжайшие формы болезни ведут к смерти в течение нескольких часов (Pankuweit S.et al.,2013).

2.2.3 Патогенез энтеровирусной инфекции

Инкубационный период многих энтеровирусных инфекций варьирует от 3 до 10 дней. Вирус проникает в организм через ротовую полость или дыхательные пути, далее реплицируется в верхних дыхательных путях и тонком кишечнике (вблизи лимфоидной ткани – в узлах Пейера, брызжеечных узлах, миндалинах, цервикальных узлах). Затем он входит в кровяное русло, приводя к первичной виремии и диссеминации в различные органы-мишени, включая ЦНС, сердце, печень, поджелудочную железу, кожу и т.д. После этого начинается вторичная виремия в органах-мишенях с диссеминацией в ЦНС, что приводит к появлению

дополнительных клинических симптомов. Виремия, как первичная, так и вторичная, может быть связана с повышением температуры, жаром и болью в горле (Muehlenbachs A. et al., 2015).

2.2.5 Структура и жизненный цикл вируса Коксаки В4

Частицы энтеровирусов круглой формы, диаметром 22-30 нм, имеют икосаэдрическую симметрию и не имеют наружной липидной оболочки. Высоко структурированная белковая оболочка вируса состоит из 60 субъединиц, каждая из которых формируется из 4 мономеров. Внутри нее расположен вирусный геном. Оболочка сформирована из протеинов VP1, VP2 и VP3, а белок VP4 лежит на ее внутренней поверхности и служит для прикрепления капсида к РНК геному (рисунок 2).

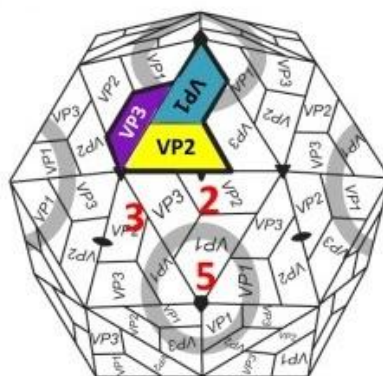


Рисунок 2 – Структура капсида вируса Коксаки В4 (Jiang P. et al., 2014)

Геном Коксаки В4 вируса представлен одноцепочечной «+» РНК. Она содержит 5'-нетранслируемый регион, единственную открытую рамку считывания (7500 тыс. нуклеотидов) и полиаденилированный 3'-конец. Рамка считывания кодирует 250-кДа полипротеин. 5' конец ковалентно связан с белком VPg, являющимся праймером при репликации. Проникшая в клетку вирусная РНК взаимодействует с рибосомами зараженной клетки, и в результате трансляции образуется единый полипротеин. Полипротеин представлен одним структурным регионом Р1 и двумя неструктурными – Р2 и Р3, которые в дальнейшем расщепляются на 11 протеинов: VP1-VP4, 2А-2С, 3А-3Д, соответственно. Неструктурные протеины выполняют следующие функции: 2А — сериновая протеаза, отвечает за разрыв связей между структурными и неструктурными участками в полипротеине; 2В и 3А — небольшие гидрофобные белки, принимающие участие в вызываемом пикорнавирусами изменении мембран клетки; 2С — этот белок имеет гомологию с хеликазами, входит в состав пикорнавирусного репликативного комплекса: осуществляет разрушение межмолекулярных связей в РНК за счет энергии АТФ; 3В — это VPg, белок прикрепляющийся к 5'-концу вирусной РНК и служащий праймером при репликации генома; 3С — цистеиновая протеаза, разрезающая полипротеин в неструктурной части; 3Д — РНК-полимераза, белок, синтезирующий вирусную РНК. Кроме того в геноме РНК

существует *IRES* (участок внутренней посадки рибосомы) – дополнительная структура, позволяющая инициировать процесс трансляции без экзирования 5'-конца. В инициации трансляции ключевую роль играет фактор *eIF4G* (эукариотический трансляционный иницирующий фактор 4 гамма). Данный фактор является адаптерным протеином, служащим платформой для сборки полипротеина. После завершения трансляции начинается синтез «–» РНК на матрице «+». РНК за счет РНК-зависимой РНК полимеразы (она же протеин 3D), причем в качестве праймера служит белок 3B(VPg) (Нууриä Т. et al., 1992; Yamashita Т. et al., 1998) (рисунок3).

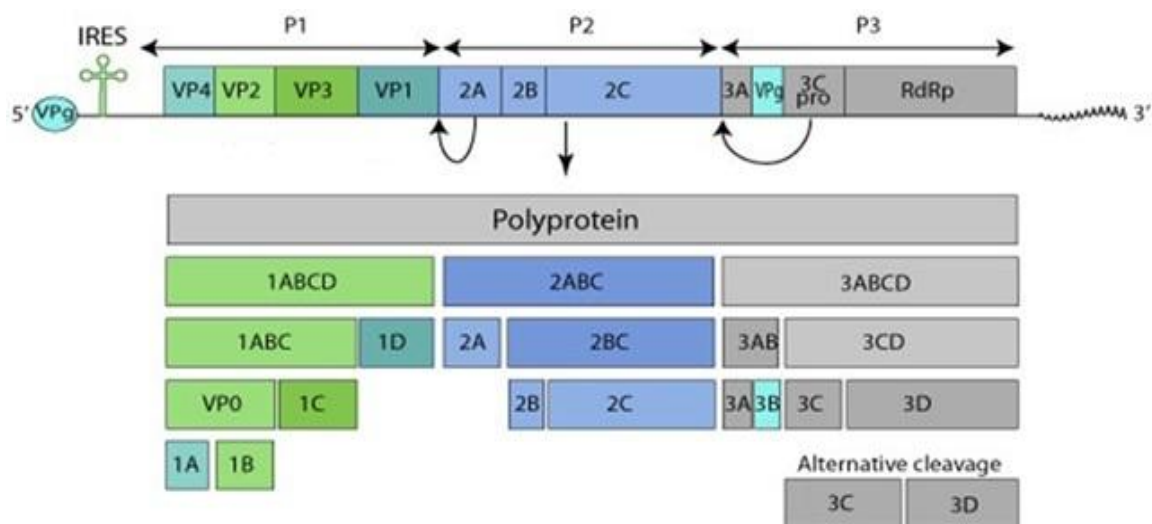


Рисунок 3 - Геном вируса Коксаки В4 (Camby I. et al., 2006)

После синтеза негативных цепей начинают транскрибироваться положительные дочерние цепи, уже на матрице «–» РНК. После завершения этого процесса «+» РНК упаковываются в капсид, синтез которого идет параллельно процессам транскрипции и трансляции. Капсид формируется из структурных протеинов VP1-VP4. После инкапсидации зрелая вирусная частица выходит из клетки.

Началом жизненного цикла вируса Коксаки В4 можно считать момент прикрепления вирусов к клеточным коксаки-аденовирусным рецепторам (*CAR*). Эти рецепторы закорены в мембране клетки-хозяина карбоксильными концами, а на поверхности клетки экспонирован их амино-терминальный домен, который и распознает определенный вирус. Прикрепление вируса происходит в момент связывания рецепторов клетки с гидрофобным углублением в капсиде вируса («каньоном»), расположенным рядом с белком VP1. На этапе раздевания происходит взаимодействие VP4 протеина с мембраной клетки-хозяина и формирование поры, через которую в цитоплазму проникает генетический материал вируса. Вирусный геном служит матрицей для трансляции вирусных белков и репликации РНК. Дальнейшие процессы

(трансляция и транскрипция, формирование вирионов) происходит в цитоплазме зараженной клетки. Новая вирусная частица выходит из зараженной клетки, и начинается диссеминация возбудителя в органы – мишени (Badger J. et al.,1989)(рисунок 4).

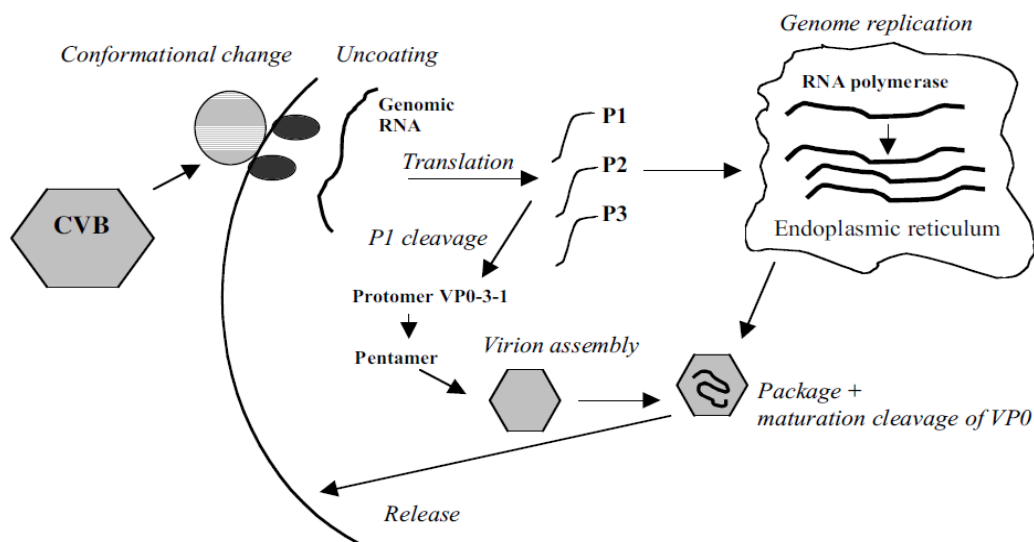


Рисунок 4 –Жизненный цикл вируса Коксаки В4 (Rasilainen S.,2004).

2.2.6 Строение поджелудочной железы

Поджелудочная железа является органом пищеварительной системы, обладающим внешнесекреторной (выделение панкреатического сока, содержащего пищеварительные ферменты) и внутрисекреторной функцией (заключается в секреции клетками панкреатических островков различных гормонов).

Островки Лангерганса — скопления гормон-продуцирующих (эндокринных) клеток, преимущественно в хвосте поджелудочной железы. Островки составляют приблизительно 1-2% массы поджелудочной железы(Dotta F. et al., 2007).

Поджелудочная железа взрослого здорового человека насчитывает около 1 миллиона островков (общей массой от одного до полутора граммов), которые объединяют понятием орган эндокринной системы. Островки Лангерганса состоят из 5 типов клеток: α -клетки (составляют 15-20% пула островковых клеток — секретируют глюкагон (естественный антагонист инсулина); β - клетки (составляют 65-80% пула островковых клеток — секретируют инсулин (с помощью белков-рецепторов проводит глюкозу внутрь клеток организма, активизирует синтез гликогена в печени и мышцах, угнетает глюконеогенез); δ -клетки (составляют 3-10% пула островковых клеток — секретируют соматостатин (угнетает секрецию многих желез); PP-клетки (составляют 3-5% пула островковых клеток — секретируют панкреатический полипептид (подавляет секрецию поджелудочной железы и стимулирует секрецию желудочного сока); обнаружены у акул (катрана), кур, человека и млекопитающих; ϵ -

клетки (составляют <1% пула островковых клеток — секретируют грелин («гормон голода» — возбуждает аппетит)) (Longnecker D. S., 2014) (рисунок5).

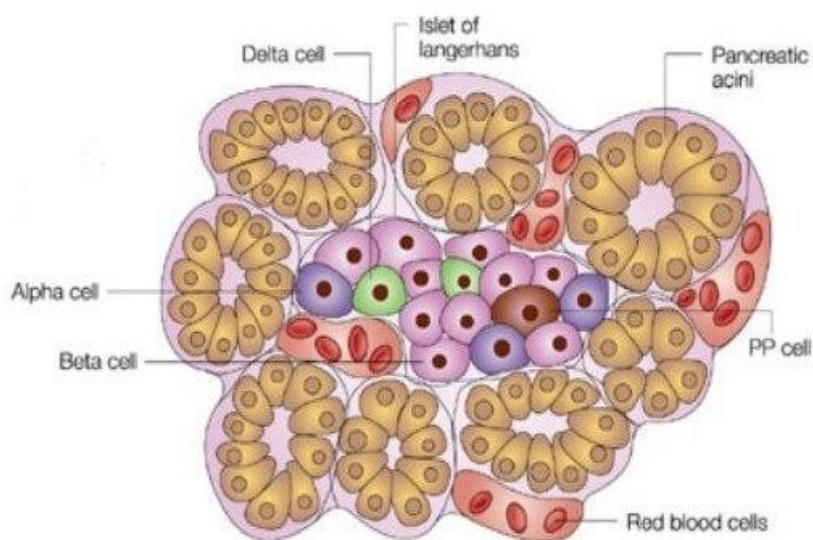


Рисунок 5 -Структура экзокринной и эндокринной части поджелудочной железы (Nabeel Bardeesy and Ronald A. DePinho, 2002)

2.2.7 Патогенез Коксаки В4 инфекции в поджелудочной железе.

Вирус Коксаки В4 является одной из причин возникновения поражений поджелудочной железы, в том числе инсулин-зависимого диабета 1 типа у человека. После первичной репликации в верхних дыхательных путях и диссеминации через кровяное русло, Коксаки В4 вирус атакует β -клетки поджелудочной железы. Именно эти клетки являются базовой платформой для дальнейшей репликации вируса. В результате клетки гибнут от апоптоза или происходит развитие воспалительных процессов в железе. Популяция β -клеток существенно снижается, что сначала приводит к развитию инсулита (воспаление островков ПЖ), а в дальнейшем и к развитию ИЗД 1 типа.

2.3 Этиология инсулин-зависимого диабета 1 типа

Существует два типа диабета: инсулин-независимый диабет 2 типа (ИНЗД 2 типа) и инсулин-зависимый диабет 1 типа (ИЗД 1 типа). Механизм инсулиновой недостаточности при ИЗД и ИНЗД различен. При ИНЗД поджелудочная железа и ее островковый аппарат практически не отличаются от таковых у лиц соответствующего возраста без нарушения углеводного обмена. Островки менее компактны, выявляется дольчатость железы вследствие

развития фиброзной ткани, может быть незначительное снижение числа β -клеток, однако соотношение α -, β -, δ - и PP-клеток не изменено.

Почти во всех случаях в поджелудочной железе обнаруживаются явления гиалиноза, что крайне редко встречается при ИЗД. Признаком функциональной недостаточности β -клеток при ИНЗД является уменьшение размера ядер клеток, комплекса Гольджи и эндоплазматической сети, что, вероятнее всего, связано с развитием склероза сосудов, фиброза и гиалиноза островков. Эти изменения выявляются в большей или меньшей степени в поджелудочной железе лиц пожилого возраста при отсутствии нарушения углеводного обмена. Недостаточность β -клеток при ИНЗД может быть следствием снижения чувствительности этих клеток к глюкозе (недостаток глюкорцептора), нарушения процессов вхождения кальция в β -клетку, его связывания с кальмодулином, изменения микротубулярно-микроворсинчатой системы, дефекта фибриллярных белков цитоплазмы.

ИЗД 1 типа – это аутоиммунное заболевание, причиной которого является деструкция инсулин-продуцирующих β -клеток, расположенных в островках Лангерганса поджелудочной железы (ПЖ). На ИЗД 1 приходится примерно 10% от всех типов диабета, что составляет примерно 20 млн человек по всему миру. Несмотря на то, что диабет поражает все возрастные группы, чаще всего им болеют дети 4-5 лет и подростки. Согласно данным Европейской Диабетической Научно-Исследовательской группы, ежегодно происходит увеличение заболеваемости диабетом на 3,4%. Повышенная смертность от диабета связана, в первую очередь, с осложнениями, а, во вторую с увеличением случаев заболевания у детей. Регионально, наиболее высокие уровни заболеваемости ИЗД 1 типа отмечаются в Северной части Европы и Северной Америке (Балаболкин М. И., 1998) (рисунок 6).

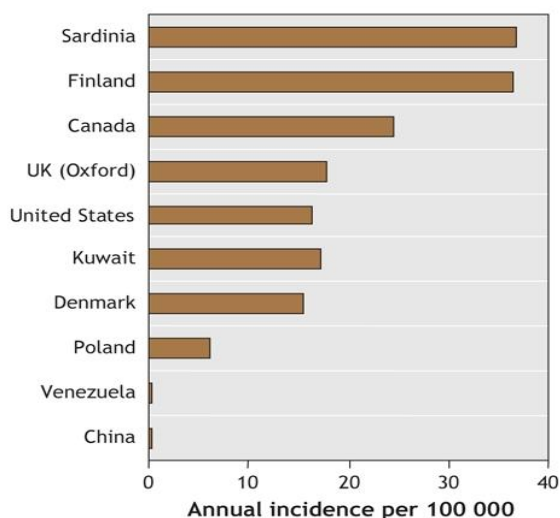


Рисунок 6- Географическое распределение заболевания ИЗД 1 типа (LaPorte R.E. et al., 1995)

Для ИЗД характерна сезонность заболеваемости. Подъем заболеваемости приходится на осенние и зимние месяцы с пиком в октябре и январе, причем минимум новых случаев диабета отмечается в июне и июле.

При ИЗД масса и размеры поджелудочной железы меньше, чем у лиц, не больных диабетом или страдающих ИНЗД. Количество и объем островков у больных диабетом I типа, а также количество инсулина, экстрагируемого из поджелудочной железы, у этих больных снижено по сравнению с нормой. Некоторые авторы называют такие островки «атрофическими», так как в них количество β -клеток резко уменьшено. С помощью иммуноцитохимических методов показано, что такие островки состоят из α -клеток (70%) и δ -клеток (около 30%), причем α - и δ -клетки обнаруживаются и в ацинозной ткани железы. Наряду с такими островками в поджелудочной железе больных ИЗД встречаются отдельные островки, в которых выявляются признаки гиперплазии β -клеток и признаки, указывающие на повышение активности оставшихся β -клеток – дегрануляция и увеличение ядра клеток. Однако количество β -клеток составляет менее 10% от общего их количества, выявляемого в поджелудочной железе практически здоровых лиц (Fillippi C.M. et al., 2008).

Энтеровирусы способны запустить развитие ИЗД I типа. Они могут инфицировать β -клетки напрямую или стимулировать аутоиммунный ответ на сами β -клетки. Штамм вируса также является ключевым моментом в предрасположенности к диабету, поскольку замена лишь одного нуклеотида способна изменить диабетогенность вируса (Nagafuchi S. et al., 2015).

Прямое вирус-индуцированное повреждение β -клеток подтверждается данными от пациентов, умерших от ИЗД I типа. β -клетки таких пациентов повреждены, и кроме того, в них присутствуют энтеровирусные антигены.

Энтеровирусы способны персистировать в β -клетках и вызывать их повреждение следующими путями: напрямую, за счет постоянной репликации энтеровируса и нарушения функционирования клеток или приводить к пролонгированной активации дендритных клеток и эффективной презентации вирусных и β -клеточных антигенов Т-лимфоцитами в островках. Таким образом, и противовирусный и аутоиммунный ответы способствуют повреждению β -клеток. В дальнейшем ЭВИ может усиливать это повреждение за счет стимуляции вирус-специфичных цитотоксичных Т-лимфоцитов (*CTL*). Даже если инфекция носит легкий характер, и репликация происходит только в кишечнике, сильный *CTL*-ответ индуцируется кишечной лимфоидной тканью (*GALT*) (Балаболкин М. И., 1998).

Клиническая картина диабета

Диагностика явного (манифестного) диабета, как правило, не вызывает затруднений. Больные предъявляют характерные жалобы: сухость во рту, полифагию (повышенный аппетит), чрезмерную жажду (полидипсия), полиурию, похудание (при ИЗД), сонливость, общую слабость, склонность к инфекции (фурункулез, пародонтоз); у некоторых женщин отмечается зуд кожи в области наружных гениталий, у мужчин – баланит. При обследовании выявляются гипергликемии и глюкозурия, которая служит причиной полиурии.

Гипергликемия обусловлена снижением утилизации глюкозы вследствие недостатка секреции инсулина или снижения биологического действия инсулина в тканях - мишенях (повышения инсулинорезистентности, что связано как с уменьшением количества рецепторов и их аффинности к инсулину, так и с уменьшением количества транспортеров глюкозы).

Гипергликемия в свою очередь приводит к глюкозурии. Известно, что полная реабсорбция глюкозы в канальцах почек происходит при уровне глюкозы в крови, не превышающем 8,88 ммоль/л (160 мг/100 мл). Превышение этой концентрации становится причиной выделения глюкозы с мочой.

Полиурия, которая в некоторых случаях достигает 8-9 л в сутки (но чаще не превышает 3-4 л), является следствием осмотического диуреза, который обусловлен высокой концентрацией глюкозы в моче.

Сухость во рту, сильная жажда связаны, с одной стороны, с обезвоживанием организма вследствие избыточного выделения жидкости через почки, а с другой – с повышением концентрации в крови глюкозы, мочевины, натрия. При диабете наблюдается угнетение функции слюнных желез.

Снижение массы тела при диабете 1 типа наблюдается вследствие избыточного выделения глюкозы с мочой; при этом экскретируется не только глюкоза, поступившая с пищей, но и образовавшаяся в результате повышенного глюконеогенеза из жиров и белков.

Наряду с гипергликемией при сахарном диабете выявляются и другие обменные нарушения: гиперлипемия (повышение количества липидов в крови), гиперлактацидемия (увеличение содержания молочной кислоты в печени), гиперкетонемия (повышение содержания кетоновых тел в крови), гипергликемия, развивающаяся вследствие снижения утилизации глюкозы при абсолютной или относительной инсулиновой недостаточности. Гиперлипемия обусловлена повышенным липолизом под влиянием контринсулиновых гормонов (катехоламины, глюкагон, соматотропин и др.) и проявляется увеличением содержания холестерина, фосфолипидов, неэтерифицированных жирных кислот (*НЭЖК*), триглицеридов и липопротеидов. Гиперлактацидемия связана с избыточным поступлением лактата из скелетных мышц, почек, легких, что приводит к изменению отношения пируват/лактат. Печень при

диабете не в состоянии утилизировать, т.е. превратить в гликоген, такое повышенное количество лактата, что и приводит к увеличению его уровня в крови. Повышенный липолиз и увеличенное поступление липидов в печень, где они усиленно окисляются, приводят к увеличению образования кетонных тел и гиперкетонемии. Образующийся в процессе окисления жирных кислот ацетил-КоА при недостатке инсулина меньше окисляется в лимоннокислом цикле и превращается в ацетоацетил-КоА, а затем в β -оксимасляную кислоту и ацетон, создавая состояние, называемое диабетическим кетоацидозом.

Нарушение толерантности глюкозы при отсутствии клинических признаков заболевания может не обнаруживаться в течение ряда лет. Клинические симптомы ИЗД развиваются, как правило, остро, чаще у лиц молодого возраста. Во многих случаях выявляется сезонность заболевания (весенне-зимний и осенний период, которые обычно сопровождаются увеличением заболеваемости сезонными вирусными инфекциями). У большинства больных ИЗД развивается вслед за «вторым скачком» роста (пубертатный период), во время которого могут наблюдаться гипогликемии. Нередко лица, страдающие диабетом этого типа, поступают в прекоматозном или коматозном состоянии в больницу, где у них впервые диагностируется заболевание. В этой связи у всех больных, поступающих в стационар в состоянии комы, должно определяться содержание сахара в крови и моче (Балаболкин М. И., 1998).

У больных ИНЗД заболевание, как правило, развивается медленно, в течение нескольких недель или месяцев, а нередко впервые диагностируется во время профилактических осмотров или при обращении к врачу по поводу кожного зуда, фурункулеза и других заболеваний.

По тяжести течения явный диабет делится на легкий, средней тяжести и тяжелый.

К диабету легкой степени (I степень) относят случаи сахарного диабета, при котором компенсация диабета (нормогликемия и агликозурия) достигается только диетой. Как правило, это сахарный диабет II типа.

Диабет средней тяжести (II степень) характеризуется возможностью достижения компенсации углеводного обмена инсулинотерапией или применением пероральных сахароснижающих средств.

Тяжелым течением диабета (III степень) считается при наличии выраженных поздних осложнений – микроангиопатии (пролиферативная ретинопатия, нефропатия II и III стадий), нейропатии. Сюда же относятся случаи лабильного течения диабета.

В норме поджелудочная железа вырабатывает 30-45 ЕД инсулина, и для компенсации углеводного обмена после панкреатэктомии требуется именно такое количество инсулина.

Среди осложнений сахарного диабета первое место по частоте занимают сосудистые ангиопатии, являющиеся наиболее частой причиной инвалидизации и летальности при

сахарном диабете. Диабетические ангиопатии включают в себя поражение крупных и средних сосудов (макроангиопатия) и поражение капилляров, артериол и венул (микроангиопатия).

Поражение крупных сосудов у больных диабетом встречается в виде: а) атеросклероза – жировые бляшки на интиме; б) кальцифицирующего склероза Минкеберга; в) диффузного фиброза интимы. Эти формы поражения встречаются в коронарных, мозговых, почечных артериях и артериях верхних и нижних конечностей. Атеросклеротическое поражение артерий крупного и среднего калибра практически не отличаются от атеросклеротического поражения таких сосудов у лиц без сахарного диабета, за исключением того, что при диабете такие изменения развиваются значительно в более раннем возрасте, чем при его отсутствии (Балаболкин М.И., 1998).

2.3.1 Патогенез ИЗД 1 типа

Существует несколько вариантов развития ИЗД 1 типа. В первом случае - диабетогенные штаммы вируса Коксаки В4 могут реплицироваться в β – клетках у генетически чувствительных организмов с возникновением неаутоиммунного диабета. При этом вирусы являются прямыми триггерами диабета. Наиболее частым вариантом считается формирование аутоиммунного диабета у генетически чувствительных организмов. На сегодняшний день обнаружено около 40 генов, увеличивающих риск развития ИЗД 1 типа. Наибольший риск (30-50% развития диабета) связан с генами тканевой совместимости 2 класса (human leukocyte antigen (*HLA-II*)). Молекулы HLA способствуют увеличению числа недифференцированных Т-клеток и образованию аутореактивных $CD4^+$ Т-клеток. Кроме того, недавно открытый ген *IFIH1* также является существенным фактором риска в развитии диабета. Он влияет на выработку интерферона I типа при вирусной инфекции. Полиморфизм этого гена может привести к усиленному иммунному ответу и местному воспалению в β -клетках и, в итоге, привести к иммунной реакции против них. При острой инфекции в поджелудочной железе запускается продукция цитокинов, таких как *IFN α/β* , *IL -1 β* , *IL-2*, что приводит к активации антиген-презентирующих дендритных клеток (*DC*). Вирусные антигены и дендритные клетки генерируют Т-клеточный ответ, при этом формируется прямой противовирусный ответ Т-клеток против вирусного антигена, что и приводит к деструкции β – клеток. Кроме того, существует противоположная гипотеза «молекулярной мимикрии», в основе которой лежит структурное и антигенное сходство между вирусными и клеточными белками. Например, существует кросс-реактивность между неструктурным Р2-С регионом вируса и аутоантигеном *GAD65*, между VP1- протеином и β -клеточным аутоантигеном тирозин-фосфатазой (*IA-2*). Данные процессы может также запускать персистентная ЭВИ β – клеток, при которой наблюдается низкий уровень воспаления и деструкции клеток, что приводит к активации

вируса и аутореактивных Т-клеток. β – клеточные протеины распознаются аутореактивными $CD4^+$ хелперами и $CD8^+$ цитотоксическими Т -лимфоцитами и аутоантителами. Цитокины, вырабатываемые при ЭВИ, могут быть цитотоксичными для β – клеток и стимулировать выброс аутоантигенов, которые захватывают дендритные клетки. Все выделяемые клетками иммунной системы цитокины, интерфероны, свободные радикалы и перфорины приводят к смерти клетки через апоптоз или некроз (Roer В. О. et al., 2002).

Доминантным механизмом β -клеточной смерти является апоптоз. Макрофаги и активированные Т-клетки секретируют провоспалительные цитокины *IL-6*, *IL-2*, *IL-1 β* , *TNF- α* и *IFN- γ* , причем три последних из перечня являются потенциальными индукторами функционального и структурного β -клеточного повреждения. Кроме того, продукция цитокинов усиливается за счет повышенного содержания реактивных форм кислорода (*ROS*)(Carthy С. М. et al., 1998; Huber S. А. et al., 1999).

Кроме апоптоза – основного механизма смерти β -клеток, возможна также гибель их путем ядерного пикноза или некроза.

Роль вирусных белков в мембранной перестройке клетки-хозяина.

Репликация пикорнавирусов происходит в цитоплазме клетки-хозяина, которая претерпевает значительные изменения в процессе вирусной инфекции. У клеток, инфицированных энтеровирусом, в цитоплазме наблюдаются 1- и 2-мембранные структуры, которые видны на электронно-микроскопических фотографиях. На ранних стадиях инфицирования преобладают 1-мембранные трубчатые структуры. На поздних стадиях происходит изменение этих структур – они выравниваются, затем изгибаются и начинают формироваться 2-мембранные структуры (рисунок 7).

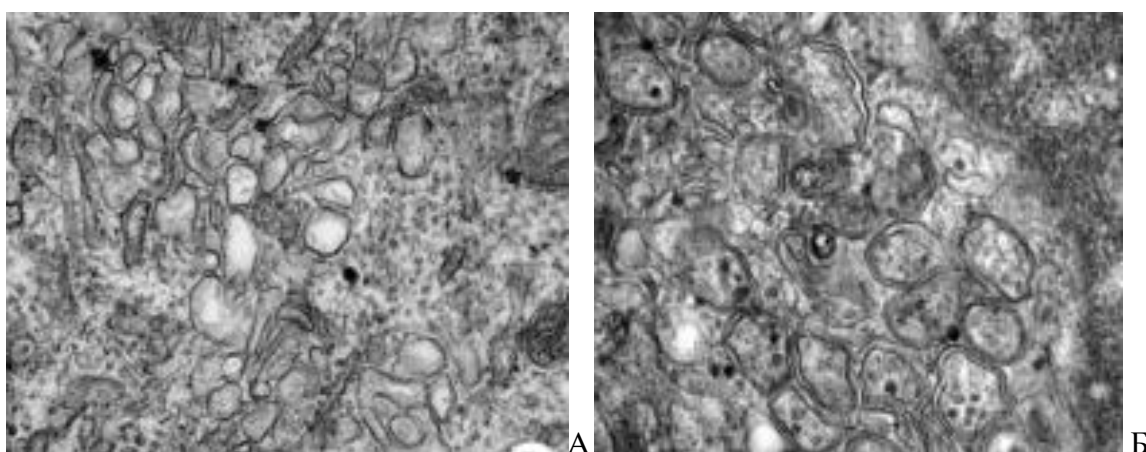


Рисунок 7 – Одномембранные и двумембранные структуры в клетках HeLa, инфицированных полиовирусом. А- 3 часа после инфицирования (одномембранные структуры); Б- 5 часов после инфицирования (двумембранные структуры) (Limpens R.V. et al., 2011)

Затем 2-мембранные структуры окружаются многочисленными цистернами, и образуются мультислойные структуры. Точная причина такой мембранной перестройки не до конца ясна. Среди возможных причин называется преобразование секреторных путей или путей аутофагии. Подтверждением первой теории служит участие брефелдина А в преобразовании секреторного пути в мембранной модификации. Брефелдин А (*BFA*) является ингибитором транспортного пути ЭР – АГ. Также существуют белки из секреторного пути, чувствительные к ЭВ репликации, например, *BFA*-резистентный фактор 1 (*GBF1*). *GBF1* – это фактор, регулирующий транспортный путь ЭР-АГ. У интактных клеток *GBF1* активируется ADP-рибозилированным фактором 1 (*Arf 1*), который локализуется в АГ и ЭР-АГ. *Arf1* – это ключевой регулятор белкового и липидного транспорта в секреторном пути. После активации *Arf1* становится мембран-связанным и стимулирует формирование мембранных структур. При инфицировании вирусный протеин 3А направляет *GBF1* и *Arf1* к репликационным органеллам, что приводит к нарушениям в секреторных путях и блокаде протеиновой секреции. Вследствие этого ухудшается экспрессия *MHC I* класса на клеточной поверхности и цитокиновая секреция. Все это доказывает, что вирусиндуцированная мембранная перестройка не только способствует репликации РНК, но и приводит к подавлению иммунного ответа клетки-хозяина (Chiramel I. A. et al., 2013). Кроме того, вирусные РНК способны «маскироваться» от клеточных иммунных сенсоров типа Толл-подобных рецепторов (*TLRs*), RIG-I-подобных рецепторов (*RLRs*) и *NOD*-подобных рецепторов (*NLRs*). *TLRs* локализованы на плазматической мембране или внутри эндосомального отсека, *RLRs* и *NLRs*, напротив, расположены в цитоплазме. Среди *TLRs* – *TLRs3*, 7/8 и 9 распознают дцРНК, оцРНК и CpG ДНК, соответственно. Многие РНК вирусы выпускают свой генетический материал в цитоплазму для репликации, что позволяет *TLRs* детектировать чужеродный генетический материал. Однако активация эндосомальных *TLRs* может быть ограничена, поскольку вирусная РНК упаковывается в нуклеокапсид или преобразуется в мембранно-связанный репликационный комплекс, за счет чего обеспечивается защита вирусной РНК от распознавания *TLRs* (Chiramel I. A. et al., 2013).

2.3.2 Окислительный стресс при ИЗД 1 типа

Окислительный стресс (ОС) – это результат дисбаланса между продукцией реактивных форм кислорода (*ROS*) и способностью организма их нейтрализовать. Реактивные формы кислорода распространены в организме человека повсеместно. *ROS* стимулируют тканевое повреждение, кроме того участвуют в сигнальных путях и экспрессии генов. Они образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода в электронно-транспортной цепи или посредством некоторых реакций клеточного метаболизма, с участием окисленных ферментов, включающих в себя ксантиноксидазу, P450 моно-оксигеназу, липооксигеназу и

циклооксигеназу. Самыми распространенными *ROS* являются супероксид анион и (O^{2-}), пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (OH^\cdot). *ROS* реагируют с биологическими молекулами - протеинами, липидами, углеводами и нуклеиновыми кислотами, нарушая при этом целостность клетки и подвергая организм воздействию токсических, канцерогенных, мутагенных факторов. При ИЗД 1 типа гипергликемия приводит к увеличению в плазме крови, мембранах и клетках уровня свободных радикалов на фоне недостатка ферментов защитной антиоксидантной системы – окислительному стрессу. Источники *ROS* при ИЗД 1 типа могут быть митохондриального и немитохондриального происхождения. *ROS* участвуют в 4 важных молекулярных механизмах, происходящих при окислительном повреждении тканей: усиление гликозилирования конечных продуктов (*AGEs*); гексозаминовый путь; путь активации протеинкиназы C и полиоловый путь (сорбитол-альдозоредуктазный путь). *AGEs* способствует развитию микросудистых осложнений при диабете: нейропатии, нефропатии и ретинопатии. Глюкоза может реагировать со свободными аминогруппами с образованием так называемых Шиффовых оснований. В Шиффовом основании альдегид карбоно-кислородная группа сахара превращается в карбон-нитрогенную группу с амином. Формирование Шиффового основания происходит быстро и обратимо. Последующая модификация Шиффового основания приводит к формированию продуктов Амадори, которые проходят через комплексную серию реакций химических превращений с образованием конечных продуктов ускоренного гликозилирования (*AGEs*). Они могут образовываться на промежуточной ступени реактивных дикарбонильных соединений в процессе окисления углеводов. *AGE*-продукты - класс чрезвычайно гетерогенных веществ, которые обладают характерной флюоресценцией. Некоторые *AGE*-продукты являются субстанциями, обладающими повышенной способностью к химическим реакциям. Помимо всего прочего, с помощью внутримолекулярных и межмолекулярных поперечных связей они вызывают необратимые изменения структур, в том числе белков, и приводят к нарушениям их функций. В результате присоединения к рецепторным белкам образуются *RAGEs* (receptor agglutinate glucosulation) - продукты, которые вызывают ухудшение различных клеточных функций, в том числе экспрессию генов и внутриклеточную сигнальную трансдукцию (Luo X. et al., 2016) (рисунок 8).

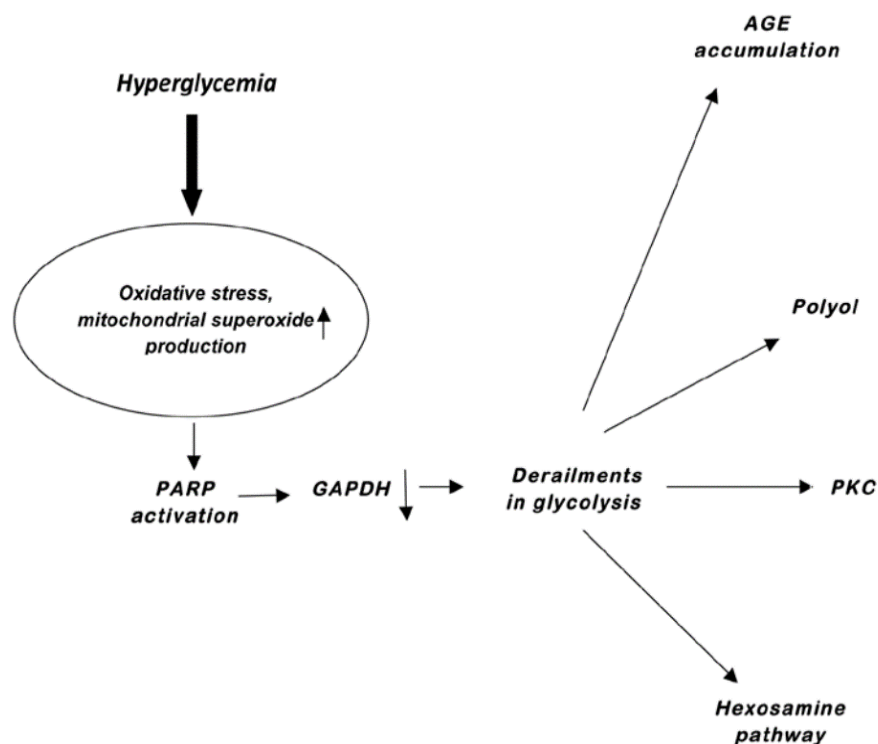


Рисунок 8 – Окислительные механизмы повреждения тканей (Rasilainen S., 2004)

Небольшие *GTPазы Ras* и *Rac1* являются мишенями *ROS* и приводят к изменениям передачи сигнала. За исключением гидроксил-радикала, наиболее вредоносного для организма, у *ROS* есть положительные стороны: они являются стимуляторами и медиаторами внутриклеточного сигнального каскада, принимают участие в уничтожении микробов в течение инфекционного процесса. Однако, их свойства могут меняться в негативную сторону, например, из-за увеличения концентраций, что происходит под влиянием смены pH, pO_2 , дисбаланса метаболизма и др. Чрезмерная продукция *ROS* является симптомом того, что в организме нарушился гомеостаз, и, возможно, это связано с воспалительным процессом или экзотоксинами, которые стимулируют фагоциты вырабатывать *ROS*. В зависимости от окружающей среды *ROS* могут взаимодействовать между собой. К примеру, O_2^- и NO могут образовывать высокотоксичный пероксинитрит $ONOO^-$, который в дальнейшем вступает в реакцию с CO_2 с образованием пероксикарбоксилата $ONOOCO_2^-$. Пероксид водорода может реагировать с $H^+ + Cl^-$ или Cu^+ / Fe^{2+} с образованием высокореактивной гипохлористой кислоты и гидроксильного радикала, соответственно (Babiog B. M., 2000). Даже слегка повышенные уровни *ROS* могут стимулировать апоптозную клеточную смерть.

Окислительный стресс стимулирует выработку реактивных форм кислорода и азота, серьезно ухудшающих β -клеточную функцию, и таким образом, играя определенную роль в патогенезе ИЗД 1 типа. Островковые β -клетки высоко чувствительны к окислительному

стрессу, поскольку имеют пониженные уровни эндогенных антиоксидантов (Pipeleers D. et al., 2001).

В попытке предотвратить *ROS*-повреждение в ходе эволюции выработалась защитная антиоксидантная система. Главная цель этой системы - поддержание гомеостаза в клетке. Антиоксидантная система состоит из компонентов, включающих в себя гем- или тиолозные энзимные системы и неэнзимные сквенджеры. Наиболее распространенным в организме энзимным антиокислителем является глутатионовая система. Она используется в качестве субстрата для элиминации гидроксил радикала, пероксинитрита, гидропероксида. Кроме глутатионовой системы в ряд важных антиоксидантов можно поставить каталазу и супероксид дисмутазу. Они подавляют *ROS*, воздействуя прежде всего на O_2^- . Mn-SOD (марганец-зависимая супероксид дисмутаза) и менее важный Cu/Zn-SOD (цитоплазматическая супероксид дисмутаза) превращают O_2^- в молекулы O_2 и H_2O_2 . Тиреодоксиновый (Trx) механизм защищает клетки от перекисного стресса и обладает антиапоптозным действием.

Неэнзимная группа представлена низкомолекулярными компонентами, к которым относится витамин Е и С, некоторые селен-содержащие компоненты, липоевая кислота и убихиноны. Аскорбиновая кислота (АК, витамин С) и α -токоферол (витамин Е) являются главными водо- и жирорастворимыми антиоксидантами, соответственно. Витамин С действует как донор электронов для некоторых трансмембранных энзимов с оксидоредуктазной активностью, витамин Е уменьшает количество пероксильного радикала. Мочевая кислота, образующаяся в печени, также является сильнейшим антиоксидантом, поскольку участвует в очищении организма от пероксинитрита, способствует стабилизации реактивной гипохлорной кислоты и гидроксильного радикала. С другой стороны, увеличение продукции данной кислоты может являться признаком нарастания количества H_2O_2 , который реагирует с пероксинитритом и формирует новые агрессивные оксидативные метаболиты, включая аллоксан и дериваты нитритов, способные вырабатывать NO. Таким образом, повышение концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови или в моче можно считать одним из признаков дисфункции углеводного обмена и окислительного стресса (Whiteman M. And Halliwell B., 1996; Kooy N. W. et al., 1994).

ROS-индуцированное повреждение клеток при диабете реализуются различными биохимическими путями. Окислительные механизмы участвуют в патогенезе β -клеточной деструкции в предиабетический период и сосудистых повреждениях, эндотелиальной дисфункции при дальнейших осложнениях. Последние развиваются в результате увеличения митохондриальной продукции супероксид аниона, связанной с развитием длительной гипергликемии. *NF- κ B*-фактор, стимулирующий β -клеточное повреждение, является чувствительным к свободным радикалам и также активируется даже небольшим количеством

ROS, вырабатываемых на ранних стадиях β -клеточной деструкции. *NF- κ B* усиливает экспрессию гена *iNOS* и других не менее важных генов: *Pdx-1*, *Glut-2*, *Isl-1*, а также стимулирует продукцию цитокинов и хемокиновых агентов, усиливающих продукцию ROS. Выработка ROS непосредственно через *IL-1 β* + *TNF- α* + *IFN- γ* приводит к β -клеточной дисфункции и смерти через апоптоз или некроз в зависимости от уровня общего стресса. Данная цепь событий имеет сходство с процессами при локальном воспалении островков Лангерганса, при котором Т-клетки и макрофаги внедряются в β -клетки и действуют как источник воспалительных медиаторов и ROS. Параллельно этим процессам идет ослабление антиоксидантных защитных механизмов, поскольку снижается уровень основных антиоксидантов организма: витамина Е, С, мочевой кислоты, *GSH* и *GSH*-связанных энзимов. Но стоит отметить и тот факт, что сами по себе, β -клетки обладают более слабой антиоксидантной защитой, чем другие типы клеток, то есть при повышении выработки окислителей активность антиоксидантов в них ниже. Свойства, присущие другим типам клеток, связанные с увеличением продукции антиоксидантных энзимов при окислительном стрессе, у β -клеток не так ярко выражены, что делает их более уязвимыми по отношению к свободным радикалам (Kajimoto Y. et al., 2004).

2.3.3 Современные методы терапии ИЗД 1 типа

Поскольку диабет считается неизлечимым заболеванием, основной задачей терапии является продление жизни за счет предупреждения осложнений и приостановки процессов дальнейшего развития заболевания.

Основным принципом лечения сахарного диабета, по В. Г. Баранову (1977), является нормализация нарушения обмена веществ, а критериями компенсации нарушений обмена служат аглюкозурия и нормализация уровня сахара в крови в течение суток. Наряду с нормализацией показателей углеводного обмена в этом случае улучшаются показатели жирового, белкового и водно-солевого обмена.

Терапия сахарного диабета комплексная и включает в себя несколько компонентов: 1) диету; 2) применение лекарственных средств; 3) дозированную физическую нагрузку; 4) обучение больного и самоконтроль; 5) профилактику и лечение поздних осложнений сахарного диабета.

Инсулинотерапия. В зависимости от характера течения диабета инсулинотерапия показана примерно в 30-35% случаев. Это больные сахарным диабетом I типа, которые составляют до 15-20% от всех больных диабетом, а также больные сахарным диабетом II типа в острой форме.

Общими показаниями к назначению инсулина больным диабетом являются: 1) ИЗД; 2) кетоацидоз, диабетическая кома; 3) значительное похудание; 4) возникновение

интеркуррентных заболеваний; 5) оперативное вмешательство; 6) беременность и лактация; 7) отсутствие эффекта от применения других методов лечения.

Многочисленные препараты инсулина, имеющиеся на рынке и зарегистрированные в Минздраве РФ, различаются по действию: препараты короткого действия; препараты средней продолжительности и препараты длительного действия. К препаратам инсулина короткого и быстрого действия (начало действия через 30 минут после введения; максимум действия между 2-3 ч после введения и продолжительность – до 6 ч) относятся: Актрапид МС и НМ (NovoNordisk, Дания), Илетин- П-регуляр и Хумулин-регуляр (EliLilly, США), Инсуман-нормаль (Hoechst, Германия), Берлинсулин Н-нормаль (Berlin-Chemie, Германия), инсулрап SPP (Pliva, Хорватия) и др. Препарат семилонг или семилента (NovoNordisk, Дания) решением Фармакологического комитета Минздрава РФ с июля 1997 г. не применяется в клинической практике на территории России. Хумалог (EliLilly, США) отличается более быстрым началом (через 10-15 мин после введения) и более короткой общей продолжительностью действия (3-4 ч) по сравнению с простым инсулином.

К препаратам средней продолжительности действия относятся: Протофан МС и НМ (NovoNordisk, Дания), Хумулин-базаль или НПХ, Лента, Иллетин-2 (EliLilly, США), Инсуман-базаль (Hoechst, Германия), Берлинсулин Н-базаль (Berlin-Chemie, Германия). Начало действия препаратов через 2 ч после введения; максимум действия через 8-10 ч и длительность действия 18-24 ч.

К препаратам длительного действия относятся: Ультратард НМ (NovoNordisk, Дания), Хумулин ультралента (EliLilly, США). Начало действия препарата через 4-5 ч после введения; максимум действия через 8-14 ч и продолжительность действия 24-36 ч.

Как отмечалось выше, в настоящее время установлен и подтвержден аутоиммунный механизм ИЗД. Поэтому идет постоянный поиск средств и методов лечения ИЗД, направленных на подавление этого патогенетического фактора. В этом направлении предложены несколько групп лекарств и различных воздействий, которые направлены на восстановление нормального иммунного ответа. Поэтому это направление получило название иммунотерапия ИЗД.

Общая иммуносупрессия направлена на подавление гуморального иммунитета, то есть образования аутоантител, к которым относятся цитоплазматические, клеточно-поверхностные антитела, антитела к глютаматдекарбоксилазе, к инсулину, к проинсулину и др. С этой целью применяются глюкокортикоиды, антилимфоцитарный глобулин, азатиоприн, циклоспорин А, современный цитостатик-ФК-506 и облучение поджелудочной железы. По мнению большинства исследователей, это направление в лечении сахарного диабета не имеет перспективы, так как перечисленные препараты воздействуют лишь на конечную фазу

иммунного ответа, а не на первичные патогенетические механизмы, приводящие к деструкции бета-клеток поджелудочной железы.

Применение противовоспалительных препаратов: теофиллин, индометацин, кетотифен. С учетом данных, полученных за последние 2 года, указывающих на патогенетическое участие в механизмах деструкции β -клеток простагландинов и оксида азота, перечисленные вещества на ранних (доклинических) этапах развития диабета могут оказывать существенное воздействие на ингибирование процессов, результатом которых является уменьшение и исчезновение β -клеток поджелудочной железы (Балаболкин М.И., 1998).

Неспецифические иммуномодуляторы, к которым относятся плазмаферез, трансфузия лейкоцитов и лимфоцитов, введение γ -глобулина, фактора переноса, α -интерферона, использование левамизола (Elegant, Индия), тимических препаратов и гормонов (тималин, тактивин, тимостимулин, томопозтин и др.), фотофореза (ультрафиолет-активированный 8-метоксипсорален), также показали определенную эффективность в профилактике и терапии диабета на ранних стадиях его развития.

С этой же целью применяется полуспецифическая иммунотерапия, которая включает использование моноклональных антибластных антител (CBL-1), моноклональных антител к CD3+ (Т-лимфоциты), моноклональных антител к T12 (зрелые Т-лимфоциты), моноклональных антител к интерлейкину-2 (IL-2), моноклональных антител к CD4 (Т-хелперы), антител к CD5-рицин А цепи иммунотоксина и интерлейкина-2 (IL-2), конъюгированного с дифтерийным токсином.

Более перспективным является использование веществ, предохраняющих β -клетки (небольшие дозы инсулина), и ликвидаторов свободных радикалов (никотинамид, витамин Е и другие антиоксиданты).

Повсеместно применяемые в настоящее время сахароснижающие препараты делятся на две основные группы: производные сульфонилмочевины и бигуаниды.

Большое разнообразие сахароснижающих препаратов производных сульфонилмочевины связано с различием радикалов у фенольного кольца (рисунок 9).

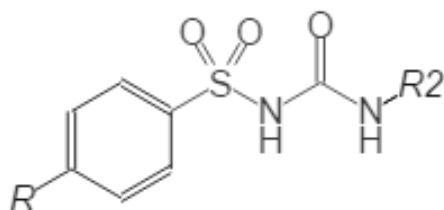


Рисунок 9–Сульфонилмочевина

В России и за рубежом проводятся операции по трансплантации β -клеток островков поджелудочной железы больным ИЗД. Более или менее удовлетворительные результаты получены при трансплантации этих клеток в печень, при введении суспензии культуры β -клеток в воротную (портальную) вену. Подобная процедура позволяет значительно снизить (на 30%) дозу экзогенного инсулина. Однако положительный эффект от трансплантации β -клеток кратковременен (3-4 мес.).

Несмотря на сравнительную простоту метода пересадки β -клеток или островков (аллотрансплантация или ксенотрансплантация), функционирование пересаженных β -клеток непродолжительно, в связи с чем приходится проводить неоднократные повторные операции, но ни в одном случае не удалось добиться такого улучшения углеводного обмена, которое не требовало бы инъекций экзогенного инсулина (дозу инсулина можно было лишь снизить). Каждая трансплантация островковых клеток (чужеродных белков) – это своего рода дополнительная иммунизация, стимулирующая иммунные и аутоиммунные механизмы ИЗД. Поэтому при решении вопроса о возможной пересадке островков или β -клеток необходима идентификация антигенов гистосовместимости у будущих доноров и реципиентов (Балаболкин М.И., 1998).

2.4 Взаимосвязь Коксаки В4 вирусной инфекции и ИЗД 1 типа

На сегодняшний день доказано, что существует взаимосвязь между вирусами и аутоиммунными заболеваниями. Большинство болезней с предполагаемой аутоиммунной этиологией связаны с одним и более вирусом. Считается, что вирус может стимулировать или запускать аутоиммунную тканевую деструкцию за счет трех возможных механизмов: механизма молекулярной мимикрии, механизма «bystander activation» - активация иммунного ответа на один эпитоп в процессе иммунного ответа на другой и прямого инфицирования. В основе механизма молекулярной мимикрии лежит определенная гомология между вирусными и клеточными эпитопами, которая может приводить к кросс-реакции между иммунным ответом, вызванным вирусной инфекцией и эндогенными клеточными протеинами. Принцип механизма «bystander activation» заключается в том, что вирусная инфекция клеток в органах-мишенях приводит к образованию воспалительных очагов зараженных клеток, что является токсичным для неинфицированных клеток. Третья причина аутоиммунной деструкции - это прямое инфицирование клеток-мишеней, которые и «притягивают» иммунный ответ (Yoon J.W., 1991).

Первые исследования по изучению взаимосвязи между ЭВИ и ИЗД 1 типа опубликованы несколько десятилетий тому назад. Представлены многочисленные эпидемиологические работы, поддерживающие эту теорию. Ясно, что ЭВ могут инфицировать островки ПЖ. ЭВ детектируются в человеческих островках *in vivo* с помощью *in situ* гибридизации и

иммунногистохимического окрашивания. Richardson S. J. et al., (2013) обнаружили иммунопозитивность ЭВ капсидного протеина 1 (P1) в островках у 44 пациентов из 72 с диагнозом ИЗД 1 типа. Также, при заражении мышей ЭВ, выделенным из человеческой ПЖ, стимулировалась β -клеточная деструкция и гипергликемия. Точные механизмы β -клеточной деструкции при ЭВ-стимулируемым ИЗД 1 типа не известны (Новицкий В.В. и соавт., 2009).

Способность ЭВ реплицироваться в выделенных из организма панкреатических островках и вызывать β клеточную смерть варьирует в зависимости от штамма и серотипа вируса. Большинство ЭВ штаммов вызывает прямое клеточное повреждение, когда выделенные человеческие островки инфицированы. Кроме того, описана нелитическая ЭВИ в этих островках. Литическая, так же как и нелитическая ЭВИ панкреатических островков *in vitro* приводит к индукции противовоспалительных цитокинов и хемокинов – IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 и IP-10. Они могут вызвать смерть β -клеток напрямую или способствуют развитию инсулита. Интерферон-индуцирующий пептид-10 (IP-10) и моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1) обладают хемоаттрактантными эффектами в отношении специфических иммунных клеток и участвуют в развитии ИЗД 1 типа. Также, возможно, что начальная β -клеточная деструкция, вызванная прямой ЭВИ *in vivo*, приводит к секреции внутриклеточных протеинов. Эти протеины распознаются как чужеродные, и этим можно объяснить появление аутоантител, связанных с аутоиммунным заболеванием.

Распознавание и индукция противовоспалительных элементов членами семейства пикорнавирусов осуществляется внутриклеточной хеликазой MDA. Последние генетические исследования обнаружили 4 редких варианта MDA 5, что подтверждает защиту против ИЗД 1 типа. Некоторые варианты MDA 5 делают клетки более чувствительными к ЭВИ или изменяют цитокиновый профиль при ЭВИ, приводя к более диабетогенной иммунной реакции (Richardson S.J. et al., 2013).

2.5 Химиотерапия энтеровирусных инфекций.

По характеру действия клинической значимости, применяемые для терапии ЭВИ препараты, могут быть подразделены на: этиотропные; иммуномодулирующие; патогенетические; симптоматические.

Этиотропные препараты действуют на возбудителя заболевания—энтеровирус. Все препараты в зависимости от своей химической структуры воздействуют на определенный этап жизненного цикла вируса: стадия прикрепления, входа и раздевания вируса; стадия репликации; стадия трансляции (протеазные ингибиторы); стадия сборки и выпуска вирионов (DePalma M.A. et al., 2008).

2.5.1 Ингибиторы прикрепления, входа и раздевания.

Инфицирование и заражение организма энтеровирусом начинается с момента взаимодействия вируса с клеточными рецепторами и заканчивается выходом вирусного потомства из клетки.

WIN- соединения

Название данная группа веществ получила от первых трех букв крупнейшей американской фармацевтической компании - Winthrop-Stearns Incorporated - разработчиков большинства препаратов этой группы. Эти вещества способны избирательно подавлять взаимодействие вируса с CAR рецептором клетки-хозяина. WIN соединения антивирусных препаратов взаимодействуют с гидрофобным «карманом» на дне «каньона» капсида вируса. Связывание WIN молекул с «карманом» приводит к укреплению связи между протеинами капсида, тем самым стабилизируя вирусный капсид и предотвращая его распад (Rossmann M.G. et al., 1989). В итоге вирусная РНК не способна освободиться от капсида и войти в клетку-мишень. WIN препараты обладают широким спектром противовирусной активности в пределах семейства *Picornaviridae*. WIN 54954 был одним из первых препаратов, который подтвердил широкий спектр антипикорнавирусной активности. Терапия на основе данного препарата особенно эффективна в первые 24 часа после заражения, со временем происходит снижение его активности. WIN 63843 (плеконарил) является самым известным препаратом из линейки WIN препаратов. Данное вещество обладает высокой степенью биодоступности при оральном введении. Так же, как и предыдущий препарат, он обладает широким спектром антивирусной активности против таких вирусов как Коксаки В1-В5 (Diana G.D. et al., 1995) (рисунок 10).

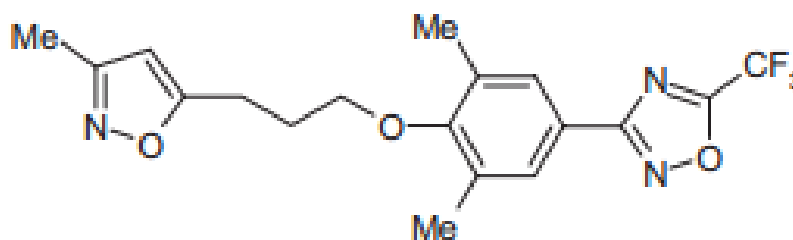


Рисунок 10 – Плеконарил

R618737, пиродавир и его производные - оксимы эфира.

Пиродавир и его предшественник (R61837) относится к серии пиридазиновых аналогов. По сравнению с R61837, пиродавир был в 500 раз активнее *in vitro*, подавляя при этом 80% из 100 серотипов риновируса в концентрациях 0,064 мг/мл и менее. Действие R61837 на вирион схоже с механизмом действия WIN-соединений. В клинических испытаниях препарат проявил себя как профилактически эффективное средство, подавляющее респираторную инфекцию,

вызванную риновирусом 9 типа. На сегодняшний день, пиродавир является единственным препаратом, успешно прошедшим клинические испытания.

Другой аналог пиродавира ВТА-188 обладал хорошей биодоступностью (62-63% у крыс и 21-28% у собак) и подавлял 56 HRV лабораторных штаммов (Andries K. et al., 1992) (рисунок 11).

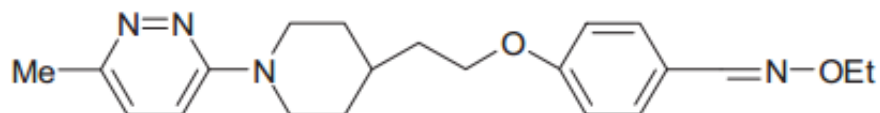


Рисунок 11 – ВТА-188

Дериваты изоксазола.

Поскольку плеконарил является неактивным по отношению к некоторым энтеровирусам, например, к кардиовирулентному штамму CVB3, была разработана серия новых изоксазольных дериватов плеконарила. Оценка эффективности данных веществ на культуре клеток показала положительные результаты по противовирусному действию в отношении HRV-2 и отсутствие противовирусной активности к HRV-14. Соединение VIa оказалось самым активным из этой группы и более того, оно могло подавлять плеконарил-резистентный штамм CVB3 Nancy. Кроме него эффективными оказались соединения 19,20 и 21, которые обладали антивирусной активностью *in vitro* (Kuz'min V.E. et al., 2007) (рисунок 12).

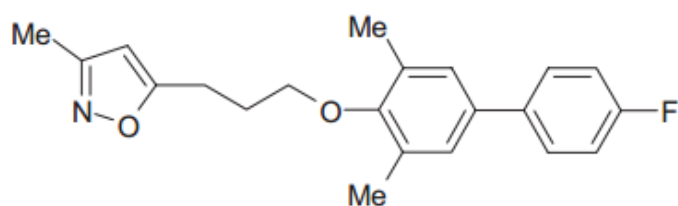


Рисунок 12 – Соединение VIa (Kuz'min V.E. et al., 2007)

Пиридинные имидазолидиноны.

Ввиду того, что плеконарил оказался не способен нейтрализовывать цитопатический эффект, вызываемый энтеровирусом 71 типа, был создан новый класс соединений на основе аналогов плеконарила, которые обладали значительной антивирусной активностью. Ключевым моментом в формировании антивирусной активности была арильная замена в пара-положении фенокисьного кольца. BPR0Z-194 (представитель имидазолидинонов) оказался мощным

антивирусным соединением против таких вирусов как энтеровирусы 68, 71 типа, коксакиА9 и А24 и эховирус 9. BPR0Z-194 эффективно подавляет вирусную репликацию на ранних стадиях (Chang C.S. et al., 2005) (рисунок 13).

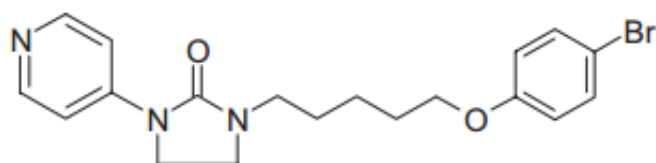


Рисунок 13 - BPR0Z-194

Халконы

Ro 09-0410 (40-этоксигидрокси-20-гидрокси-4,6-диметоксигалкон) был идентифицирован как мощный ингибитор риновирусов, но не был активен в отношении других пикорнавирусов. Данное соединение специфически связывается с капсидом риновируса и стабилизирует его (Yasin S.R. et al., 1990) (рисунок 14).

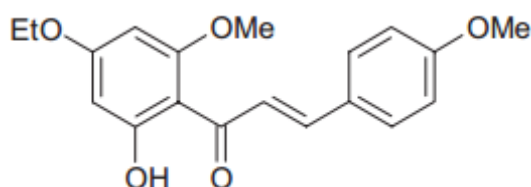


Рисунок 14 - Ro 09-0410

Роданин

2-тио-4-оксотиазолидин также известен как роданин – специфический ингибитор эховируса 12 в концентрации 12,5 мг/мл. Данное вещество ингибирует процесс раздевания вируса, но не влияет на вирусную абсорбцию или вход в клетку-мишень. Вирионы, подвергшиеся действию роданина, оказываются защищенными от тепловой инактивации и щелочной деградации, что делает невозможным введение генетического материала вируса в клетку-хозяина. В результате данный препарат блокирует жизненный цикл вируса на стадии раздевания (Kraus W. et al., 1997) (рисунок 15).

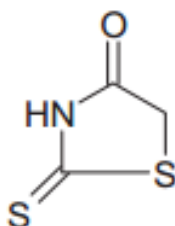


Рисунок 15– Роданин

Фенокисбензолы, фенокситиридины и их производные.

Самое активное вещество этой группы - 2-(3,4-дихлорофенокси)-5-нитробензонитрил (MDL-860) - обладает широким спектром антипикорнавирусной активности, подавляя 80% штаммов риновирусов (72/90) и энтеровирусов (8/10) штаммов при дозе 1 мкг/мл. Более того, данный препарат показал противовирусную активность *in vivo* против CVB-3 индуцированного миокардита и летальной инфекции, вызванной вирусом А21 (Kenny M.T. et al., 1986) (рисунок 16).

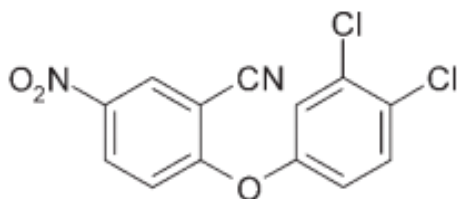


Рисунок 16 - MDL-860

2.5.2 Препараты, направленные на подавление вирусной репликации.

Данные препараты взаимодействуют с неструктурными белками, вирусными протеазами или РНК-зависимой РНК- полимеразой и, таким образом, подавляют процесс репликации вируса в инфицированных клетках. Ряд веществ, таких как гуанидин гипохлорид, НВВ, MRL-1237 и TBZE-029 взаимодействуют с вирусным протеином 2С, приводя к подавлению вирусного РНК-синтеза и защите клетки от вирусиндуцированного лизиса. Доноры NO-группы – это другой класс молекул, которые также воздействуют на неструктурные белки вируса. Они подавляют протеазы 2А и 3С за счет S-нитрозилирования. Обе протеазы участвуют в «выключении» клеточного ответа на проникновение вируса, развитии ЦПД. Доноры NO - GTN и ISDN - способны подавлять вирусные протеазы и стимулировать значительный антивирусный эффект *in vitro*. Более того, GTN значительно уменьшает клеточную инфильтрацию и вирусиндуцируемый фиброз в течение первых 14 дней постинфекции. Донор NO – NO-метопролол значительно уменьшает число копий вирусных РНК, потерю веса, а также инфильтрацию и множественный фиброз (Norder H. et al., 2011).

Гуанидин гидрохлорид

Данная молекула подавляет репликацию полиовируса, некоторых коксакивирусов, эховирусов, FMDV, но не вируса гепатита А. Исследования *in vitro* показали, что гуанидин подавляет начало синтеза вирусной РНК без ингибирования элонгации или высвобождения «+» РНК молекул. Данное соединение подавляет деятельность 2С региона, который необходим для синтеза РНК. Кроме того гуанидин предотвращает связывание 2С/2ВС регионов с

мембранными структурами клетки-хозяина в процессе репликации (Klein M., 2000) (рисунок 17).

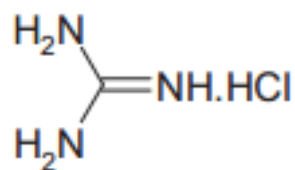


Рисунок 17 – Гуанидин гидрохлорид

Энвироксим

Энвироксим ((2-амино-1-(изопрорилсульфонил)-6-бензимидазолфенил кетон оксим) (LY122771-72) – бензимидазольный дериват, который является высокоактивным веществом против репликации риновирусов и энтеровирусов *in vitro*. Было проведено клиническое исследование энвироксима. 21 волонтеру 6 раз в день ежедневно интраназально вводили энвироксим после инфицирования риновирусом 9 (HRV9). Клиническая картина была значительно лучше статистических данных, наблюдалось уменьшение степени ринореи и вирусных титров из назальных смывов (Heinz B.A. et al., 1995; Heinz B.A. et al., 1996) (рисунок 18).

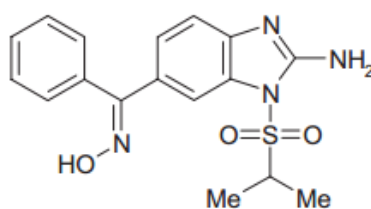


Рисунок 18– Энвироксим

Флавоноиды

Флавоноиды – вещества фенольной природы, содержащиеся в фотосинтезирующих клетках, а также фруктах, овощах, орехах. Они образуются из ароматических аминокислот фенилаланина, тирозина и малоната. Основной структуры флавоноида является ядро флавана, состоящее из 15 углеродных атомов, организованных в три кольца (С₆-С₃-С₆). Они отмечены на рисунке буквами А,В,С (рисунок 19).

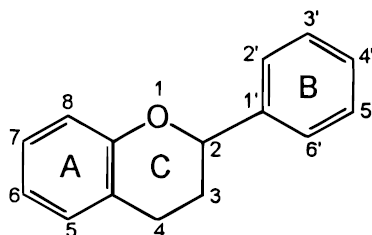


Рисунок 19– Структурная формула флавоноидов

Различные классы флавоноидов отличаются друг от друга степенью окисления и структурными заменами в С кольце, в то время как различия внутри класса формируются в результате замен в А и В кольцах. Среди многочисленных классов флавоноидов наибольший научный интерес представляют: флавоны, флавононы, изофлавоны, флавонолы, флавононолы, флаван-3-олы, антиоцианиды. Другие флавоноидные классы включают в себя бифлавоны, халконы, ауроны, кумарины (Conti C. et al., 2005).

На протяжении столетий человечество боролось со многими болезнями благодаря лекарствам, получаемым из растений, которые содержали флавоноиды, обладающими не только антимикробными, но и противовирусными свойствами.

Вещество Ro 09-0179 (4,5'-дигидрокси-3,3,7'-триметоксифлаван), экстрагированное из многоколосника морщинистого, подавляет *in vitro* активность широкого спектра пикорнавирусов, включая риновирусы, коксакивирусы и полиовирусы. Предполагается, что данное соединение влияет на процесс вирусной репликации в промежутке между стадиями вирусного раздевания и началом синтеза РНК (Tait S. et al., 2006) (рисунок 20).

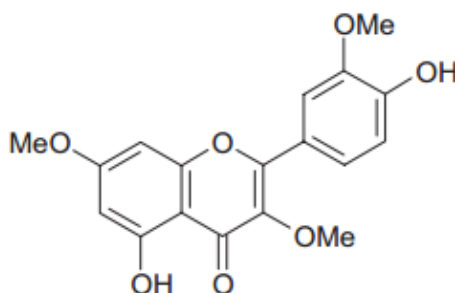


Рисунок 20 - Ro 09-0179

3-метилкверцетин (3-MQ), выделенный из растительного экстракта *Euphorbia grantii* (Молочай Гранта), оказался многообещающим противовирусным агентом, который подавлял вирусную репликацию *in vitro* полио-, коксаки- и риновирусов в концентрации ниже 10 нг/мкл. При дозе 20 мг/кг данный препарат защищал мышей от летальной инфекции вирусом Коксаки В4.

Другие флавоноиды, экстрагированные из медицинских растений, включая 3-метилкемпферол и 3,4'-диметилкемпферол из *Psiadia dentata* (Псиадея Зубчатая) подавляют синтез полиовирусной (+) РНК и флавоноид из *Pterocaulon sphacelatum* (Птерокаулон Шаровидный), обеспечивают защиту от ЦПД, вызванного полиовирусом. Было обнаружено, что флавононы обладают меньшей противовирусной активностью в отношении коксакивирусов

по сравнению с флавонами, и 3`-замена необходима для усиления активности (Desideri N. et al., 1995; Desideri N. et al., 1997).

Глиотоксин

Глиотоксин – это грибковый метаболит с противовирусной активностью. В окисленном состоянии он подавляет синтез РНК полиовирусов. Кроме того, активная форма глиотоксина содержит дисульфидный мостик в окисленном состоянии. Предполагается, что глиотоксин воздействует на РНК-зависимую РНК полимеразу за счет формирования смешанных дисульфидных и сульфгидрильных групп на энзиме (Larin N.M. et al., 1965) (рисунок 21).

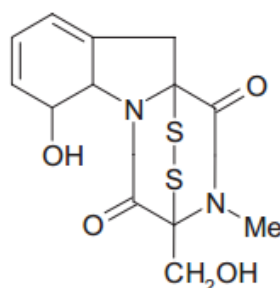


Рисунок 21– Глиотоксин

Пирролидин дитиокарбонат (PDTC)

Антиоксидант PDTC обладает противовирусной активностью в отношении полиовируса, вируса Коксаки В3 и риновируса. Данное вещество внедряется в процессы транскрипции и трансляции, кроме того оно влияет на транспорт ионов Zn^{2+} в клетку (Lanke K. et al., 2007) (рисунок 22).

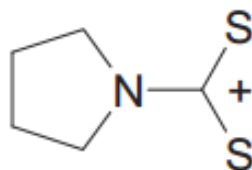


Рисунок 22–PDTC

2.5.3 3С протеазные ингибиторы

А) Пептидные ингибиторы

Данные вещества являются продуктами энзимного расщепления определенного пептидного субстрата. К ним относятся нитрозотиолы, азапептиды, diazometil кетоны, кетоглутаминовые производные и AG7088/Rupintrivir (Рупинтривир). Данное соединение воздействует на 3С^{pro}, что обуславливает его мощную противовирусную активность против широкого спектра пикорнавирусов и низкую токсичность. Так, на клеточной линии Beas2B

(человеческие бронхоэпителиальные клетки) рупинтривир показал увеличение секреции IL-6,-8, связанной с антириновирусным эффектом (Zalman L.S. et al., 2000).

Азапептиды

Азапептиды содержат модифицированный глутамин, необратимо инактивирующий 3С протеазу за счет алкилирования тиоловой группы активного сайта цистеина (Hill R. D. et al., 1999)(рисунок 23).

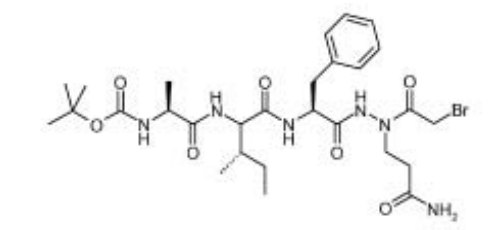


Рисунок 23 – Соединение 10 (Venkatraman S. et al., 1999)

Диазометилкетоны (ДМК)

Ингибитор трипептидил-ДМКZ-L-F-Q-CHN₂ показал анти-3С-протеазную активность и противовирусное действие в отношении вирусов HRV-14 и HRV-16. Данный ингибитор блокирует синтез вирусного полипротеина, что было доказано уменьшением количества детектируемой 3С протеазы и аккумуляцией 3СD полипептида (Murray M.A. et al., 2001) (рисунок 24).

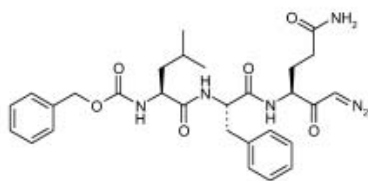


Рисунок 24 - трипептидил-ДМКZ-L-F-Q-CHN₂

S-нитрозотиолы

S-нитрозотиолы класс широко используемых соединений, ингибирующих протеины вируса через S-транснаитрозилирование. Наиболее активным среди нитрозотиолов считается EALFQCG-SNO. Он был специально синтезирован для ингибирования HRV 3С протеазы и имеет в своей структуре последовательность Glu-Ala-Leu-Phe-Gln, являющуюся субстратом для 3С протеазы (Xiam M. et al., 2000)(рисунок 25).

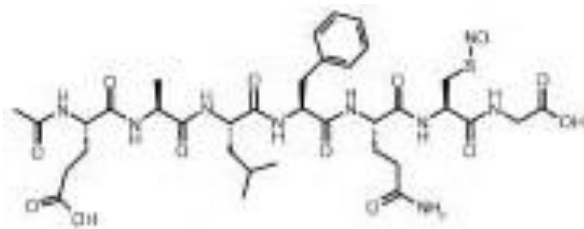


Рисунок 25 – Соединение EALFQCG-SNO

Б) Непептидные ингибиторы

Изатины

Данные 2,3-диоксиндол(изатин)-коровые ингибиторы показали высокую селективную активность против HRV 3C_{pro}. Они обладают антивирусной активностью, однако при этом являются высоко токсичными *in vitro* (Webber S.E. et al., 1996).

β -лактоны

Данные соединения необратимо инактивируют протеазу HAV (вирус гепатита А) путем алкилирования тиоловой группы активного сайта, с образованием ковалентной связи (Lowe C. et al., 1995).

В) Микробные экстракты

Они являются кандидатами в качестве ингибитора репликации HRV 3C- протеазы и включают в себя нафтохинон лактол, а также хининоподобный цитринин, радицинин и сульфатированный тритерпен (Brill G.M. et al., 1996) (рисунок 26).

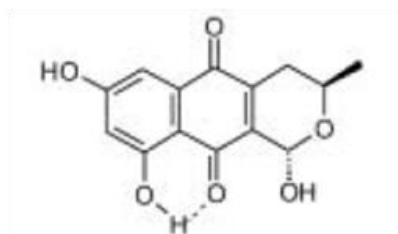


Рисунок 26 – нафтохинон лактол

Интерфероны (гриппферон капли, обладающие противовирусным, иммуномодулирующим действием; виферон свечи подавляют размножение вируса, обладают иммуностимулирующим эффектом).

Интерфероны – мощные селективные медиаторы, стимулирующие различные иммунологические, противовирусные и антипролиферативные реакции со стороны клетки-хозяина в ответ на пикорнавирусную инфекцию. Клеточные противовирусные эффекты обусловлены стимуляцией экспрессии протеинов с противовирусными свойствами. Данный путь противовирусной защиты можно представить следующим образом: 1) 2',5' - аденилатсинтетаза, 2) 2-цепочечная РНК-зависимая протеинкиназа, 3) Мх протеины. 2',5' - аденилатсинтетазная система связана с ингибированием пикорнавирусной репликации через системы трансфекции/экспрессии. Дополнительный синергетический эффект происходит при добавлении к терапии с α -ИФН капсид-ингибирующих компонентов, γ -ИФН, нуклеозидных аналогов (пирозафурин). Кроме того, ИФН могут работать совместно с антителами, макрофагами для элиминации пикорнавирусной инфекции. Применение ИФН в терапии риновирусной инфекции показало положительный результат. При экспериментальной риновирусной инфекции интраназальное применение ИФН в 1 день после инфицирования уменьшило вирусовыделение, а также симптомы заболевания, но не подавило развитие вирусной инфекции полностью.

Индукторы интерферона (амиксин, лавомакс, обладающие выраженным иммуномодулирующим эффектом; циклоферон, улучшающий иммунный статус больного, способствуя выработке в организме интерферонов, обладающий противовоспалительным, противовирусным действием; афлубин – комплексный гомеопатический препарат с иммуномодулирующим, противовирусным, жаропонижающим действием.). Под воздействием данных препаратов происходит элиминация РНК генома из организма человека (Fairweather D. et al., 2004).

Иммуноглобулины

Антитела предотвращают развитие вирусной инфекции путем непосредственного связывания с вирусом и блокирования его связывания с клеткой-хозяином, таким образом, происходит полная нейтрализация вируса. Применение сыворотки иммуноглобулинов необходимо в 2 случаях: для лиц с ослабленным иммунитетом, а также для новорожденных. Данные по результатам клинических исследований носят противоречивый характер. Например, у новорожденных с сепсисом, а также у лиц с дефицитом антител в одних случаях наблюдалась положительная динамика при терапии ЭВИ, в других – заболевание прогрессировало и приводило к смерти больного (Takada H. et al., 1995).

Патогенетическая интенсивная терапия (коррекция защитных функций организма) заключается в проведении в стационаре при тяжелых формах энтеровирусных инфекций дезинтоксикационного лечения. При менингитах и менингоэнцефалитах – проводится дегидратационная терапия с применением форсированного диуреза (мочегонные) под строгим контролем лабораторных изменений водно-солевого обмена. При поражении сердца – кардиопротекторы, головного мозга – средства, улучшающие кровоснабжение и реологические свойства крови. Данный вид терапии возможен исключительно в стационаре.

В симптоматической терапии применяются жаропонижающие, анальгетики, противовоспалительные, антигистаминные, кишечные адсорбенты, сосудосуживающие средства для носа.

Отвлекающая и местная терапия включает в себя паровые ингаляции с раствором соды, растворами трав – шалфей, ромашка (что актуально при катаральной форме и герпангине); орошение зева дезинфицирующими растворами во избежание бактериальной обсемененности места поражения; противовоспалительные капли в глаза при конъюнктивите (Новокшенов А.А. и соавт., 2010).

2.6 Биологическая активность флавоноидов

Флавоноиды - это большая группа полифенольных соединений с бензо-γ-пиронной структурой, в основе которых лежит скелет, состоящий из двух бензольных колец (А и В), соединенных между собой трехуглеродной цепочкой (пропановый скелет), т.е. состоящий из С6-С3-С6 углеродных единиц.

Они синтезируются через шикимовую кислоту (шикиматный путь) и ацетатно-малонатным путем. В растительной клетке синтез осуществляется шикиматным путем. Процесс этот многоступенчатый и протекает с участием АТФ с образованием 5-фосфо-шикимовой кислоты, а затем через несколько стадий получается неустойчивое соединение — префеновая кислота. На стадии префеновой кислоты пути биосинтеза расходятся. По первому пути идет синтез фенилпировиноградной кислоты, а по другому — п-оксипировиноградной кислоты. При аминировании двух последних веществ образуются фенилаланин и L-тирозин. Данные аминокислоты могут участвовать в биосинтезе молекул белков и некоторых групп алкалоидов при дезаминировании аминокислот в присутствии ферментов — аммонийлиаз получают транс-коричная и транс-гидроксикоричная кислоты.

Из коричных кислот с помощью гидроксилирующих и метоксилирующих ферментов синтезируются соединения фенилпропанового ряда — оксикоричные кислоты (например, кофейная, феруловая, синаповая) и кумарины.

Второй путь — ацетатно-малонатный — связан с промежуточным синтезом поликетометиленовых (поликетидных) предшественников. Исходный продукт — ацетил-СоА — образуется в результате гликолизасахаров и содержит макроэргическую тиоэфирную связь. Ацетил-СоА при участии карбоксилазы и АТФ в присутствии ионов Mn^{2+} превращается в малонил-ацетил-СоА. Таким путем при постепенном наращивании углеродной цепи возникает поли-(3-кетометиленовая) цепочка. Циклизация поликетидной цепи приводит к образованию различных фенольных соединений. Так, циклизация по C_1 -и C_6 -атомам приведет к синтезу производных флороглюцина, а циклизация по C_2 — C_7 -атомам — к возникновению производных орселлиновой кислоты, которая является исходным продуктом в биогенезе лишайниковых кислот. Ацетатно-малонатный путь биосинтеза фенольных соединений широко распространен у грибов, лишайников и микроорганизмов.

Химическая природа флавоноидов зависит от их класса, степени полимеризации, степени гидроксирования и др. Большой научный интерес к этим веществам вызван наличием у них антиоксидантных свойств, положительно влияющих на многие процессы, происходящие в организме человека. Флавоноиды обнаружены в тканях растений в мезофильных клетках и встречаются в виде мономеров, димеров, олигомеров и полимеров. На сегодняшний день существуют различные классы флавоноидов (флавоны, флавонолы, флавононы, флаванолы, изофлавоны, флаван-3-олы) (Mahomoodally M.F. et al., 2005) Роль флавоноидов в организме человека огромна. Они выполняют антиоксидантную, гепатопротективную, антибактериальную, противовоспалительную и антиканцерогенную функцию.

2.6.3 Биологическая активность дигидрокверцетина

Дигидрокверцетин, также известный, как таксифолин - флавоноид обнаруженный в луке (Slimestad R., 2007) в молочном чертополохе (Wallace S.N. et al., 2005) во французском экстракте коры сосны (Rohdewald P. A., 2002), в экстракте ели Дугласа (Kiehlmann E. and Edmond P. M., 1995).

Дигидрокверцетин ((2R,3R)-2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-2,3-дигидрохромен-4-ил) был впервые экстрагирован из экстракта ели Дугласа (*Pseudotsuga taxifolia*), а позднее из Даурской и Сибирской лиственницы (*Larix sibirica* Leder. и *Larix gmelini* Rupr. (Rupr), синоним *Larix dahurica* Turcz (Сосновые, *Pinaceae*) (рисунок 28).

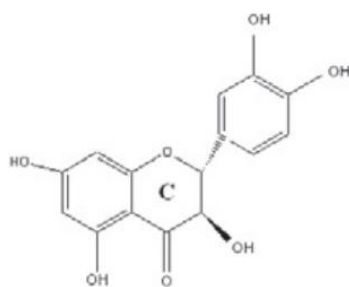


Рисунок 28 – Химическая структура дигидрокверцетина

HPLC-анализ показал, что ДКВ может состоять из цис- и транс- форм, которые кристаллизуются в две независимые молекулы в клетке. Оба изомера растворимы в водно-спиртовых растворах и полярных растворителях. (+) транс-ДКВ окисляется более активно, приводя к образованию кверцетина (2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5,7-тригидрокси-4H-хромен-4-1) (Rogozhin V. V И Peretolchin D. V., 2009). ДКВ относится к сильным антиоксидантам за счет наличия о-дигидрокси структуры в В-кольце, повышающей стабильность молекулы, и присутствия 5- и 7-ОН группы с 4-оксо группой в А и С кольцах, которые отвечают за максимальный антирадикальный потенциал. (Salah N. et al., 1995). На сегодняшний день ДКВ успешно применяется в качестве профилактического и лечебного средства при ССЗ, онкологии и болезнях печени.

При онкозаболеваниях ДКВ может подавлять цитохром P₄₅₀ и последующее липидное окисление, активировать ARE (*Antioxidant responsible element*). При ССЗ ДКВ подавляет окисление ЛПНП, артериальные окислительные процессы в ССЗ, снижает вязкость крови (после инфаркта). При заболеваниях печени ДКВ способен выполнять следующие функции: 1) стабилизировать клеточные мембраны и регулировать их проницаемость 2) способствовать синтезу рРНК 3) выступать как радикальный скавенджер 4) подавлять трансформацию фибробластов в миофибробласты. Например, препарат Силамарин, в состав которого входит ДКВ, способен блокировать развитие хронического гепатита С, ингибируя TNF- α и NF- κ B-зависимую транскрипцию, при этом подавляя пролиферацию и продукцию воспалительных цитокинов от Т-клеток (Wagoner J. et al., 2010).

Исходя из вышеперечисленных фактов, можно говорить о том, что ДКВ имеет молекулярные мишени для предотвращения и терапии различных заболеваний. Имеющиеся данные свидетельствуют о перспективе исследования ДКВ в отношении инфекций вирусной и невирусной природы.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Исследуемые препараты

Препарат АОК-Р (антиоксидантный комплекс лиственницы сибирской), дигидрокверцетин (ДКВ) и комплексные соединения ДКВ с ионами металла - цинком (ДКВ+Zn²⁺), медью(ДКВ+Cu²⁺), и кальцием (ДКВ+Ca²⁺), 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 (рисунок 29);

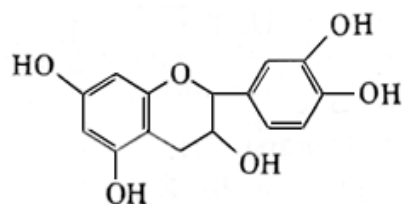


Рисунок 29 – Формула катехина (флаван-3-ол)

фракция 6 – олигомеры, состоящие из спирофлавоноидов и флаван-3-олов (рисунок 30);

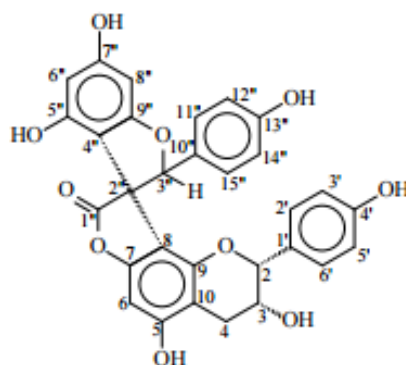


Рисунок 30 – Формула спирофлавоноида лариксинол

фракция 7 – полимеры, состоящие из спирофлавоноидов и флаван-3-олов.

По данным хроматографического анализа, содержание спирофлавоноидных соединений составляет 40-45% от количества фенольных соединений коры лиственницы. Доминирующий флавоноид – спирибифлавоноид лариксинол.

3.2. 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 (3×10^5 клеток/мл и 4×10^5 клеток/мл, соответственно) рассеивали на 96-луночные микропланшеты (Orange Scientific, Бельгия) по 0,1 мл в лунку и инкубировали при 37°C при концентрации CO₂ 5% до образования клеточного монослоя на дне микропланшетов.

3.3. Подготовка вируса

Вирус Коксаки В4 культивировали в культуральных флаконах площадью 12,5 см² с суточным клеточным монослоем *Vero*, заражая его 10^5 TCID₅₀/10мл, и инкубировали в термостате 24 часа при +37°C в атмосфере 5% CO₂.

3.4. Питательные среды

В работе использовали питательную среду α-MEM (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).

3.5. 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°C при концентрации CO₂ 5% в присутствии растворенных препаратов, после чего степень деструкции клеточного монослоя оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ) (Mosmann, 1983). 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 мг/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 Victor²1420 (PerkinElmer, США). На основании полученных результатов в программе Statistica 8.0 рассчитывали 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀), то есть концентрацию препарата, при которой происходит 50% деструкция клеточного монослоя. Исходя из значения ЦТД₅₀, рассчитывали рабочие концентрации препарата для дальнейших экспериментов.

3.6. Определение антиоксидантной активности препаратов

Антиоксидантную активность (АОА) вещества определяли в реакции с DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (Sigma, США), растворенного в этаноле (Хасанов В.В. и др, 2004). 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 мг/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 OD₅₃₅ вдвое по сравнению с контрольными значениями в лунках без антиоксидантов. Кратность снижения OD₅₃₅ рассчитывали по формуле: $\frac{K - \Phi}{O - \Phi}$, где K – OD без препарата, O – OD с препаратом, Φ – OD с препаратом без DPPH.

3.7. 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_2 - инкубаторе 48 часов при 37°C (5% CO_2). 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_{535} 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.

Дополнительно титр вируса определяли методом бляшек. Для этого клетки Vero рассеивали на 6-луночные панели. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки заражали десятикратными разведениями 10^2 - 10^4 TCID₅₀ /1 мл и инкубировали при комнатной температуре 30 минут. По истечении указанного времени клетки промывали средой и заливали раствором, состоящим из среды DMEM с растворенным в ней ДКВ в концентрации 60 мкг/мл и жидким авицеллом (SigmaAldrich, США) в соотношении 1:1. Контрольные лунки заливали по той же схеме в отсутствие препарата. После этого панели инкубировали в термостате в течение 6 суток. На 6 сутки в лунки вносили по 1 мл 0,1% спиртового раствора кристалвиолета и окрашивали в течение 15 мин. По истечении указанного времени 6-луночные панели промывали дистиллированной водой, подсушивали при комнатной температуре и подсчитывали число вирусных бляшек в каждой лунке.

3.8. 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°C . 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 ЭД₅₀, 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 ЦТД₅₀ к ЭД₅₀. Активными считались препараты, ХТИ которых был 10 и выше.

3.9. Животные

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

3.10 Исследование противовирусной активности препаратов *in vivo*.

Вирус в дозе 10^6 TCID₅₀/0,2 мл вводили внутривентриально в объеме 0,2 мл/мышь. Препараты вводили внутривентриально по лечебно-профилактической схеме: за час до заражения и через 1, 2, 3 и 4 сутки после заражения. Часть желез 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 TissueLyserII (QIAGEN, Германия). Далее из полученных гомогенатов готовили серию десятикратных разведений и вносили их на культуру клеток *Vero*, где инкубировали в течение 6 суток при температуре 37⁰С (5% CO₂). Для вирусспецифического подтверждения ЦПД в качестве контроля использовали гомогенаты поджелудочных желез интактных мышей.

Инфекционную активность вируса оценивали, как описано выше (п. 3.7.)

Противовирусную активность препаратов оценивали по снижению вирусных титров в ткани поджелудочных желез животных, получавших препараты по сравнению с контрольными животными, получавшими плацебо.

3.11 Определение антиоксидантной активности препарата *in vivo*

Для определения уровня АОА в ПЖ 10 мышей заражали внутривентриально вирусом Коксаки В4 по 0, 2 мл. 5 животным ежедневно вводили ДКВ в дозе 100 мг/кг. На 4 сутки после инфицирования ПЖ у всех групп мышей извлекали асептически и гомогенизировали на приборе TissueLyserII (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 в разделе 3.6.

3.12 Определение уровня интерферона *in vivo*

Для определения уровня ИФН в крови у зараженных и пролеченных ДКВ 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 CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. По истечении этого срока клетки отмывали средой αMEM и добавляли среду αMEM, содержащую 100 ЦТД₅₀ /лунку VSV. Микропланшеты вновь помещали в термостат на 24 часа. После этого из микропланшетов удаляли среду и окрашивали клетки 0,1% кристалвиолетом при комнатной температуре 10 минут. Краситель экстрагировали из клеток 30% этанолом в течении 30 минут при 37⁰С, после чего оптическую плотность в лунках планшета измеряли на ридере Victor 1420 (PerkinElmer, США) при длине волны 590 нм. За титр ИФН принимали величину, обратную наибольшему разведению исходной сыворотки, при котором сохранялось 50% клеточного монослоя.

3.13 Приготовление гистологических срезов и проведение гистологической окраски.

Для получения гистологических срезов поджелудочные железы мышей на 5 сутки после заражения вирусом Коксаки В4 (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 37⁰С, после чего образцы дважды переносили в парафин на 1 час при 56⁰С. 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
- ксилол – 5 мин
- смесь спирт/ксилол (1:1) – 5 мин
- 96% спирт – 2 мин
- 96% спирт- 2 мин
- 50% спирт – 1 мин
- дистиллированная вода – 1 мин
- гемаоксилин – 3 мин
- вода- 3 мин
- дистиллированная вода – 15 с

- эозин -15 с
- 50% спирт – 1 мин
- 96% спирт – 2 мин
- 96% спирт – 2 мин
- ксилол – 2 мин
- ксилол – 2 мин

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 20⁰С и исследовали под световым микроскопом. При исследовании оценивали степень и локализацию очагов цитодеструкции, а также выраженность, локализацию и клеточный состав воспалительного инфильтрата.

3.14 Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия дигидрокверцетина.

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 инициируется 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, готовых к заражению других клеток.

Опыт проводили на клеточной культуре *Vero*, посеянной на 24-луночном планшете (JetBiofil, Китай). Для этого препарат в дозе 80 мкг/мл добавляли в различное время до, после или одновременно с внесением вируса. Время внесения препарата отсчитывали от точки 0 – времени входа вируса в клетку. В период (-1)- 0 клетки вместе с вирусом находились при температуре +4⁰С. Все остальное время эксперимент проходил при температуре 37⁰С.

Вирус в дозе 5×10^6 TCID₅₀/1 мл добавляли к клеткам во время, условно обозначаемое как точка -1, после чего в течение часа клетки выдерживали при температуре +4⁰С. Далее, в точке 0, несвязавшийся вирус отмывали, добавляли свежую среду с препаратом в той же концентрации и переносили клетки в термостат на 37⁰С, 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.

3.15 Изучение вирулицидного действия препаратов.

Данный опыт проводили в бесклеточной системе, для чего препараты инкубировали в течение часа с вирусом в дозе 10^5 TCID₅₀/1 мл, после чего оценивали титр вируса как описано выше. В качестве положительного контроля использовали этанол, в качестве отрицательного – физиологический раствор.

3.16 Получение устойчивых к дигидрокверцетину штаммов вируса Коксаки В4.

Для получения устойчивых штаммов вирус Коксаки В4 выращивали в клеточной культуре *Vero* на 6-луночных планшетах (JetBiofil, 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 EC₅₀) в отношении пассированных вирусов по сравнению с исходными судили о приобретении ими резистентности.

3.17 Электронная микроскопия

Клетки *Vero*, посеянные на 24-луночном планшете, инфицировали вирусом в дозе 5×10^6 TCID₅₀/1 мл и инкубировали 1 час при +4⁰С. 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 +37⁰С и 5% CO₂. 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 +4⁰С 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 0,1M 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 фиксировали им клеточные осадки в течение 30 минут. Клетки обезвоживали последовательно по 10 мин 30%, 50% и 70% этанолом и фиксировали в течение 30 мин 0,5% раствором уранилацетата (Fluka, кат. №A58190) на 70% этаноле. Дальнейшее

обезвоживание 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.

3.18 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. Расчет 50% эффективных концентраций проводили при помощи метода Рида и Менча или программы GraphPad Prism.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 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 также 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. Схематически это можно представить следующим образом: $Z^* + AH = ZH + A^*$, где Z^* - DPPH, AH – антиоксидант, ZH - восстановленная форма DPPH, A^* - свободный радикал с низкой окислительной активностью. DPPH молекула Z^* подавляется веществом AH, за счет его антиоксидантной активности, при этом происходит осветление окраски раствора. При этом одна молекула DPPH-окислителя соответствует одной молекуле его восстановленной формы. Данная реакция моделирует свободно-радикальные процессы, происходящие в организме. Метод DPPH позволяет получить наиболее релевантные результаты по измерению АОА, поскольку дает полную оценку функциональной активности антиоксидантной системы в биологических образцах.

В эксперименте измеряли оптическую плотность в лунках микропланшета при разных концентрациях изучаемых веществ и сравнивали полученные показатели с контрольными значениями без препаратов. На основании этих данных рассчитывали снижение OD по сравнению с контролем и 50% эффективную антиоксидантную концентрацию (EC_{50}) каждого препарата в бесклеточной системе. Таким образом, чем ниже оказывалось значение EC_{50} , тем активнее было вещество как антиоксидант.

Препараты были разделены на две группы: в первую входили ДКВ и его комплексные соединения с ионами металлов, а во вторую ЭА-ЕСи его фракции. На рисунке 31 представлены результаты измерения антиоксидантной активности дигидрокверцетина и его производных.

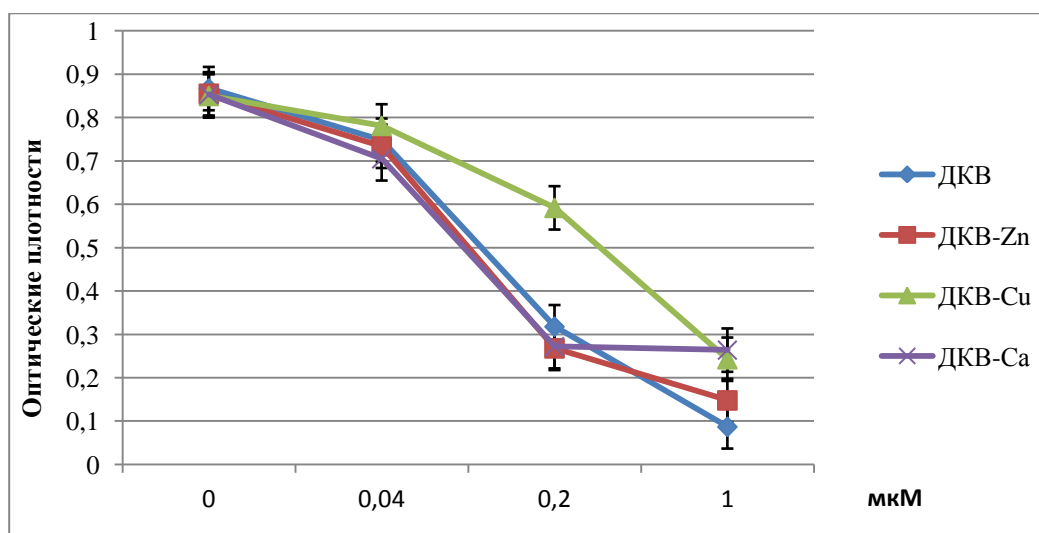


Рисунок 31 - Антиоксидантная активность дигидрокверцетина и его производных

Таблица 2 -50% эффективная АО концентрация дигидрокверцетина и его производных

Препараты	EC ₅₀ , мкМ	Препараты	EC ₅₀ , мкМ
ДКВ	155±10	ДКВ-Са	180±12
ДКВ-Zn	155±9	ДКВ-Cu	395±20

В таблице 2 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. Таким образом, введение металла в качестве колмплексообразующего компонента влияет на общую антиоксидантную активность полученного соединения.

Все три металла – медь, цинк и кальций - входят в разные группы, согласно таблице Менделеева. Кальций является щелочным металлом, медь – переходным, цинк – обычный металл. Из изученных ионов металлов, находящиеся в комплексе с ДКВ, цинк в наименьшей степени влиял на общую АОА всего вещества. Соединения ДКВ с цинком и кальцием оказались более эффективными антиоксидантами по сравнению с комплексом ДКВ-Cu. Возможно, это связано с тем, что медь принадлежит к группе переходных металлов, и при ее добавлении к ДКВ происходит резкое снижение АОА соединения.

На следующем этапе исследования была изучена АОА фракций, содержащих другие флавоноиды, спирофлавоноиды, протоантоцианидины и др.

На рисунке 32 представлены результаты изучения АОА ЭА-ЕС и его фракций.

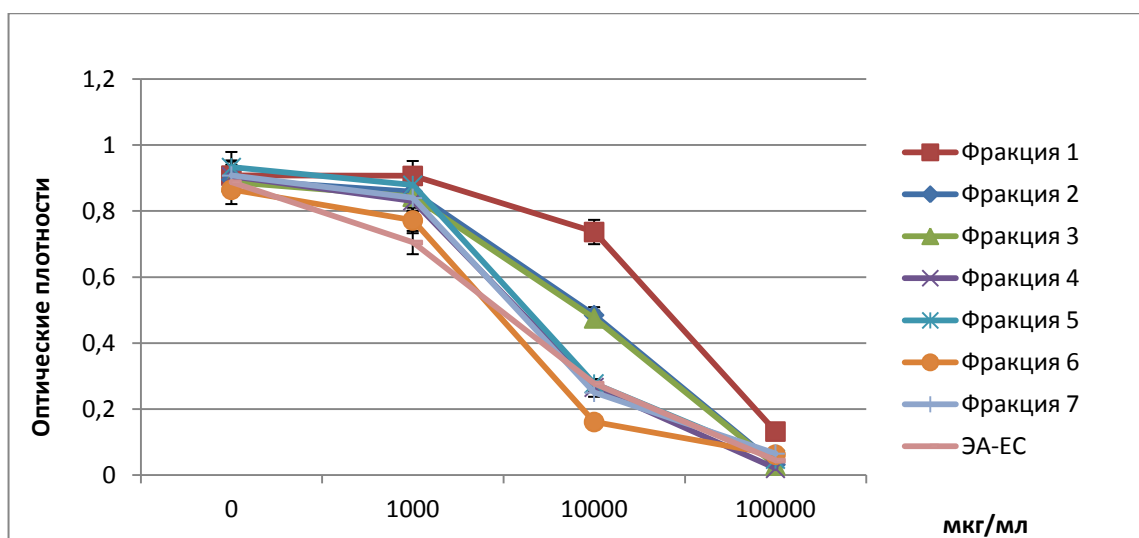


Рисунок 32 - Антиоксидантная активность ЭА-ЕСи его фракций

Таблица 3 - Эффективная АО концентрация ЭА-ЕСи его фракций.

Препараты	EC ₅₀ , мкг/мл
Фракция 1	224±23
Фракция 2	115±11
Фракция 3	100±10
Фракция 4	63±6
Фракция 5	74±6
Фракция 6	52±4
Фракция 7	61±4
ЭА-ЕС	40±3

В таблице 3 представлены расчеты 50% эффективной антиоксидантной концентрации суммарного препарата этилацетатного экстракта лиственницы ЭА-ЕС и его фракций. 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 и 7 оказались более активными по сравнению с фракциями 1 и 2. Это обстоятельство позволяет высказать предположение о зависимости АОА фракций от химической структуры. Фракции 6-7 представляют собой смесь олиго- и полимеров, состоящих из спирофлавоноидов и флаван-3-олов, соответственно. Доминирующим спирофлавоноидом является лариксинол. В состав фракций 1 и 2 помимо флавоноидов, входят фенолокислоты. Возможно, у фракций ЭА-ЕС, имеющих в своем составе фенокислоты

происходит снижение общей АОА фракции. 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.

4.2 Моделирование коксактивирусной инфекции в культуре клеток

На следующем этапе для оценки противовирусной активности веществ-антиоксидантов в условиях *in vitro* была разработана модель на клеточной линии *Vero*. Клеточная Линия *Vero* является интерферон-дефицитной, то есть при ее инфицировании вирусом она не секретирует $INF\alpha/\beta$, что свойственно другим культурам. Таким образом, при постановке опытов на *Vero* мы можем оценивать прямое противовирусное действие химического соединения на репродукцию вируса, без возможного побочного противовирусного эффекта самой культуры.

Клеточная культура *Vero* была заражена вирусом Коксаки В4 в дозе $10^2 TCID_{50}/0,2$ мл (m.o.i. 0,01). Для выявления динамики роста вируса *in vitro*, ЦПДв клеточной культуре ежедневно оценивалось под микроскопом. Результаты титрования вируса и визуальной оценки вирусспецифического ЦПД представлены на рисунках 33, 34, соответственно.

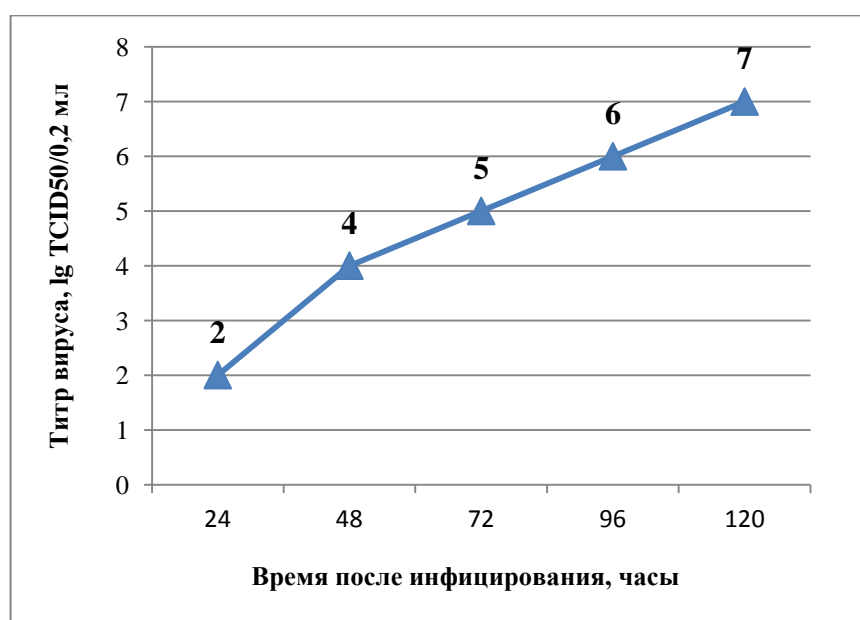


Рисунок 33 – Динамика роста вируса Коксаки В4 *in vitro* в культуре клеток *Vero*

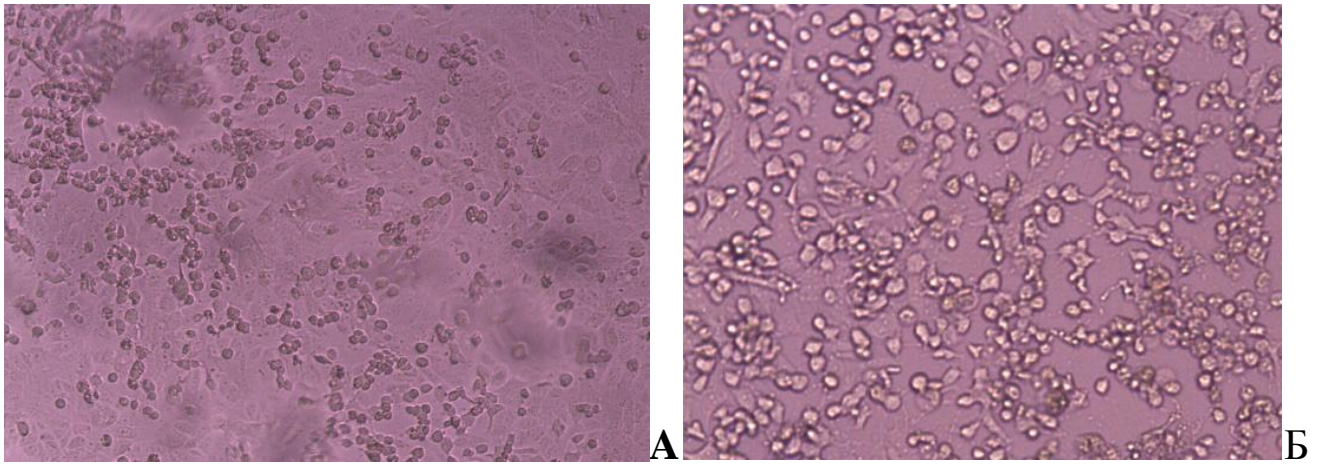


Рисунок 34 – Вируссpezifическое цитопатогенное действие вируса Коксаки В4 на клеточной культуре *Vero* в дозе 10^2 TCID₅₀/0,2 мл

А – через 24 часа после инфицирования;

Б – через 48 часов после инфицирования.

Фазовый контраст, $\times 100$

Как видно из рисунка 34, визуально в зараженной клеточной культуре уже через 24 часа культивирования обнаруживались признаки вирусспецифического ЦПД. Они заключались в округлении клеток, появлении в клеточной цитоплазме гранул, выпячиваниях цитоплазмы и откреплении отдельных клеток от субстрата, что приводило к появлению дефектов в монослое клеток (рисунок 34 А). Через 48 часов после инфицирования эти признаки усиливались, что приводило в дальнейшем к полной деградации монослоя клеток (рисунок 34 Б).

4.2.1 Оценка противовирусной активности соединений в опытах *in vitro*

Целью следующего этапа исследования была характеристика противовирусных свойств дигидрохверцетина и других растительных антиоксидантов в клеточной культуре. В этой серии опытов оценивали цитотоксические и вирусингибирующие свойства растительных антиоксидантов в культуре клеток *Vero*.

4.2.1.1 Цитотоксичность веществ-антиоксидантов

На первой стадии экспериментов оценивали токсические свойства изучаемых соединений. Для этого в культуру клеток *Vero* вносили изучаемые соединения в разных концентрациях, после чего при помощи микротетразолиевого метода (МТТ) определяли количество выживших клеток при каждой из концентраций. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀) каждого препарата (таблицы 4,5), величина которой служила характеристикой цитотоксичности веществ.

Таблица 4 - Цитотоксичность ДКВ, его производных и АОК-Р на клеточной линии Vero

Вещество	ЦТД ₅₀ , мкг/мл
ДКВ	140±12
ДКВ-Zn	100±9
ДКВ-Ca	100±8
ДКВ-Cu	90±7
АОК-Р	110±5

Как видно из таблицы 4, среди экстракта природных антиоксидантов АОК-Р и комплексов ДКВ с металлами наименее токсичными соединениями по сравнению с остальными веществами являются дигидрокверцетин и АОК-Р. Токсичность комплексов с металлами несколько выше, однако показатели токсичности для производных ДКВ статистически не различаются, поскольку имеют близкие значения.

Таблица 5 - Цитотоксичность ЭА-ЕС и его фракций клеточной линии Vero

Вещество	ЦТД ₅₀ , мкг/мл
ЭА-ЕС	80±7
Фракция 1	>120
Фракция 2	>120
Фракция 3	>120
Фракция 4	>120
Фракция 5	>120
Фракция 6	>120
Фракция 7	>120

Как следует из представленных результатов, при оценке токсичности экстракта антиоксидантов ели сибирской ЭА-ЕС и его фракций наличие достоверной токсичности обнаружено только у суммарного экстракта (ЭА-ЕС). Значения цитотоксичности фракций ЭА-ЕС находятся за пределами тестируемых дозировок веществ.

4.2.1.2 Противовирусная активность соединений

На данном этапе работы для определения противовирусной активности препаратов был выбран вирус Коксаки В4, который, как было показано на предыдущем этапе, способен эффективно реплицироваться в клетках *Vero*. Как и в контрольных образцах, в зараженной клеточной культуре уже через 24 часа культивирования обнаруживались признаки вирусспецифического ЦПД, такие как округление клеток и появление в них гранул, а также открепление отдельных клеток от клеточного монослоя. Присутствие ДКВ полностью тормозило развитие цитодеструкции в первые 24 часа, что отмечалось при визуальной оценке состояния монослоя. Признаки ЦПД появились лишь на 2 сутки и отмечались только при высоких инфицирующих дозах вируса (МОИ 1-100). В ходе экспериментов оценивали противовирусную активность каждого вещества и определяли 50% эффективную дозу ($ЭД_{50}$). На основании данных о цитотоксичности каждого вещества и его противовирусной активности вычисляли отношение $ЦТД_{50к} / ЭД_{50}$ - химиотерапевтический индекс (ХТИ). Препарат считали активным, если значение ХТИ превышало 10. В таблицах 6-9 представлены значения 50% эффективной дозы ($ЭД_{50}$) для дигидрохверцетина и его производных, а также для ЭА-ЕС и его фракций.

Таблица 6 - 50% эффективная доза ($ЭД_{50}$) ДКВ и его производных

Вещество	$ЭД_{50}$, мкг/мл
ДКВ	12±1
ДКВ-Zn	18±2
ДКВ-Ca	13±3
ДКВ-Cu	17±2
АОК-Р	6±1

Как видно из таблицы 6, наименьшие значения 50% эффективной дозы, а следовательно, наибольшая противовирусная активность, отмечены у вещества ДКВ и АОК-Р. Данные соединения эффективно ингибируют репродукцию вируса даже при низких концентрациях. Соединения ДКВ-Cu и ДКВ-Zn обладают менее выраженным противовирусным потенциалом, о чем свидетельствуют более высокие значения 50% эффективной концентрации $ЭД_{50}$.

В таблице 7 представлены результаты аналогичных опытов по определению 50% эффективной дозы для ЭА-ЕС и его фракций.

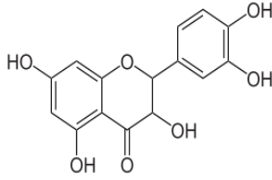
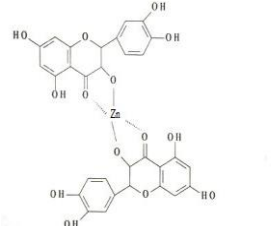
Таблица 7 - Вирусингибирующая активность ЭА-ЕС и его фракций в отношении вируса Коксаки В4 в культуре клеток Vero.

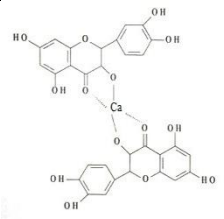
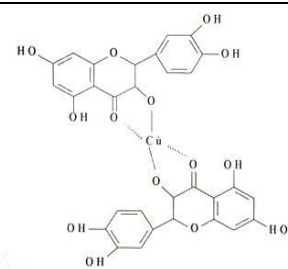
Вещество	ЭД ₅₀ , мкг/мл
ЭА-ЕС	>120
Фракция 1	60±3
Фракция 2	45±4
Фракция 3	>120
Фракция 4	>120
Фракция 5	>120
Фракция 6	>120
Фракция 7	90±8

Как видно из представленных данных, значения ЭД₅₀ для фракций сильно варьируют между собой. При этом наименьшие значения ЭД₅₀ отмечены у фракций 1 и 2, что свидетельствует об их максимальной противовирусной активности среди изученных образцов.

В таблице 8-9 суммированы данные об абсолютной величине снижения инфекционного титра вируса Коксаки В4 в присутствии изучаемых образцов в максимально переносимой концентрации (1/2 ЦТД₅₀), а также данные об их селективности в отношении вируса по сравнению с токсичностью для клеток Vero.

Таблица 8 - Активность ДКВ и его производных в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro*

Вещество	Формула	ХТИ	Снижение титра вируса (lgTCID ₅₀ /0,2 мл) при концентрации образца 1/2 ЦТД ₅₀
ДКВ		12	3
ДКВ-Zn		5	1,5

ДКВ-Са		7	1,5
ДКВ-Сu		5	1,5
АОК-Р	суммарный экстракт антиоксидантов лиственницы сибирской	18	2

Базовым критерием, используемым для оценки противовирусной активности считается ХТИ. Согласно данному критерию, из исследованных образцов природных антиоксидантов только ДКВ и АОК-Р могут быть признаны активными в отношении вируса Коксаки В4, так как имеют значение ХТИ больше 10. Видно также, что значение ХТИ коррелирует с показателем снижения титра вируса. Так, ДКВ и АОК-Р, имея ХТИ 12 и 18, снижают инфекционную активность вируса соответственно на 3 и 2 порядка, тогда как производные ДКВ с ХТИ ниже 10, снижают уровень вирусной репродукции на 1,5 TCID₅₀/0,2 мл.

Вторая группа тестируемых препаратов была представлена ЭА-ЕС и его фракциями. Результаты по аналогичному анализу противовирусной активности данных соединений представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Активность ЭА-ЕС и его фракций в отношении вируса Коксаки В4 *in vitro*

Вещество	ХТИ	Снижение титра вируса (1gTCID ₅₀ /0,2 мл) при концентрации образца ½ ЦТД ₅₀
ЭА-ЕС	1	0
Фракция 1	2	0,5
Фракция 2	3	0,5
Фракция 3	1	0
Фракция 4	1	0,5

Фракция 5	1	0
Фракция 6	1	0
Фракция 7	1	0

Как следует из представленных результатов, вторая группа химических веществ не является активной в отношении вируса Коксаки В4, поскольку большинство этих соединений не снижают инфекционную активность вируса в клетках, и значения их ХТИ не превышают 10. Данные соединения, следовательно, не обладали противовирусным потенциалом и были исключены из дальнейших исследований. Таким образом, противовирусная активность природных антиоксидантов в отношении вируса Коксаки В4 не зависит от собственно антиоксидантных свойств соединения, а определяется другими его свойствами.

Для анализа специфичности противовирусной активности ДКВ его ингибирующие свойства были изучены в отношении филогенетически родственного ему вируса CVB3 и неродственного вируса – вируса гриппа. Результаты суммированы в таблице 10.

Таблица 10 - Противовирусная активность ДКВ в отношении различных вирусов

	CVB4 (Powers)	CVB3 (Nancy)	Грипп (A/PR/8/34)
СТD ₅₀ , мкг/мл	140±12	140±10	154±8
EC ₅₀ , мкг/мл	12±0,8	18±1,5	8±0,4
SI	12	7	17
Снижение титра вируса при конц ½ СТD50	3	2	3

Как следует из представленных данных, препарат ДКВ эффективно ингибировал представителей семейства *Picornaviridae* – вирус CVB4 (EC₅₀ =12, SI=12) и CVB3 (EC₅₀ =18, SI=7). В отношении вируса CVB4, штамма Powers, соединение оказалось более активно, чем против вируса CVB3. Кроме того, препарат показал эффективную противовирусную защиту в отношении вируса гриппа штамма A/PR/8/34 (EC₅₀=8, SI=17).

Таким образом, на основании полученных данных можно говорить о широком спектре вирусингибирующего действия ДКВ в отношении вирусов разных семейств независимо от их филогенетической принадлежности.

4.2.2 Изучение противовирусных свойств ДКВ методом бляшек

Для дополнительной количественной оценки противовирусной активности ДКВ был использован метод бляшек. Клеточный монослой заражали различными дозами вируса, после чего клетки заливали авицелом для локализации фокусов репродукции вируса. В результате в клеточной культуре *Vero* в течение 6 суток происходило формирование вирусспецифических бляшек. При помощи этого метода можно количественно определять инфекционную активность вируса и противовирусные свойства вещества путем визуального подсчета числа бляшек. По истечении 6 суток наблюдалась полная деструкция монослоя в максимальной дозе вируса $10^4 \text{TCID}_{50} / 0,2 \text{ мл}$, при этом в лунках с препаратом в этой же дозе сохранялся частичный монослой с бляшками. При дальнейших разведениях вируса цитодеструкция была более выраженной в лунках с контролем вируса, чем в лунках с препаратом. Данные по протективной активности дигидрохлорокверцетина при коксакивирусной инфекции *in vitro* суммированы в таблице 13 и для наглядности представлены на рисунке 35 .

Таблица 13 – Вирусингибирующие свойства дигидрохлорокверцетина на модели коксакивирусной инфекции вызванной CVB4 в культуре клеток *Vero*.

	Количество бляшек при разведении вируса		
	-2	-3	-4
Контроль вируса	Полная деструкция монослоя	> 100	90± 10
ДКВ	>80	40 ±5	4 ± 1

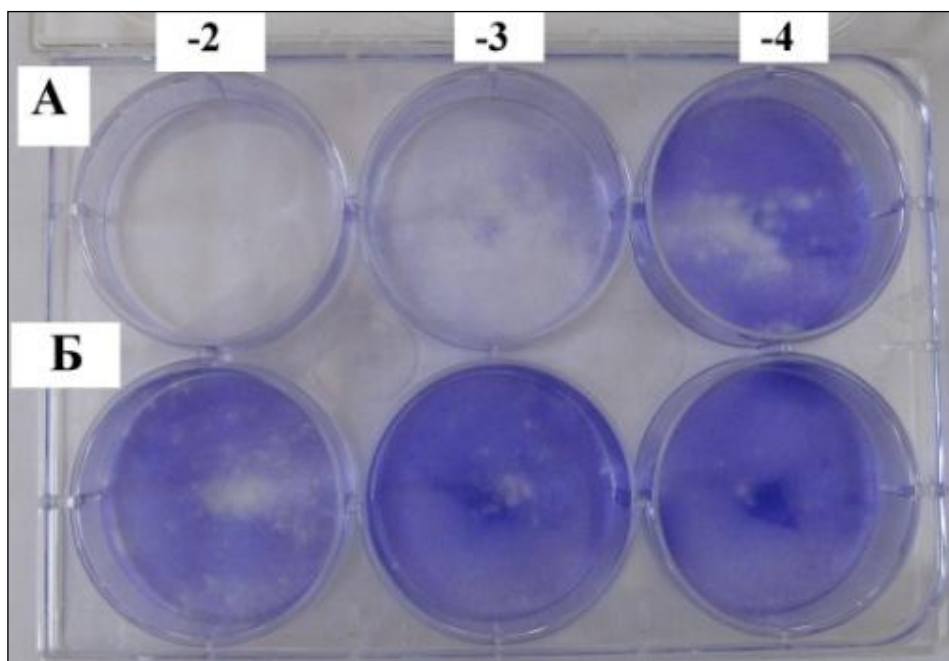


Рисунок 35 – Цитопатогенное действие CVB4 в присутствии ДКВ.

А – ряд контроля вируса;

Б – ряд ДКВ;

-2-3-4 – доза вируса $10^4 - 10^2 \text{TCID}_{50}/0,2 \text{ мл}$, соответственно

Представленные данные свидетельствуют о выраженных противовирусных свойствах препарата ДКВ в культуре клеток и подтверждают ранее полученные результаты о способности ДКВ снижать инфекционную активность вируса Коксаки В4 в клеточной культуре *Vero*.

4.3. Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия ДКВ

В следующей серии экспериментов была изучена противовирусная активность ДКВ в зависимости от срока его добавления в культуральную среду. Жизненный цикл вируса CVB4 включает в себя несколько стандартных стадий: стадию прикрепления, конформационных изменений, входа, раздевания, трансляции, транскрипции, сборки вируса и выхода вириона. Противовирусные агенты в зависимости от своей природы и свойств могут оказывать воздействие на любую из этих стадий, ингибируя при этом весь репликационный цикл вируса. Выявление стадии жизненного цикла вируса, во время которой происходит ингибирование его репродукции, позволяет ориентировочно определить, на какие вирусные структуры действует вещество, поскольку разные вирусные компоненты играют ведущую роль в формировании вирусного потомства на разных стадиях вирусного цикла. Например, вещество гидантоин ингибирует вирус на поздней стадии цикла - стадии сборки, при этом воздействуя на вирусный белок VP1, подавляя тем самым инкапсидацию РНК (Verlinden Y. и соавт., 2000).

Для оценки активности дигидрокверцетина в зависимости от стадии вирусной инфекции его 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. Полученные результаты суммированы на рисунке 36.

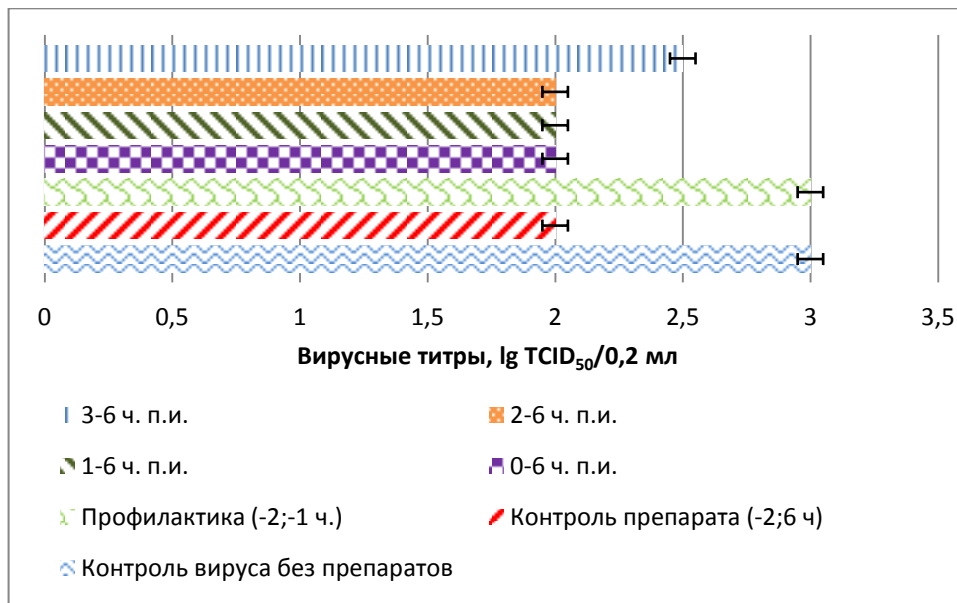


Рисунок 36 - Зависимость интенсивности репродукции CVB4 в присутствии ДКВ от времени внесения препарата.

Как следует из представленных результатов, титр вируса в контроле составил 10^3 TCID₅₀/0,2 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 lgTCID₅₀/0,2 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 или рецепторы на поверхности клетки, тем самым мешая 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 вируса Коксаки В4. Таким образом, ДКВ является этиотропным препаратом, воздействующим не на клеточную, а на вирусную мишень.

4.4 Вирулицидное действие ДКВ

Вирулицидная активность ДКВ (концентрация 100 мкг/мл) была изучена в бесклеточной системе в отношении вируса Коксаки В4, для чего соединения инкубировали совместно с вирусом в течение часа, после чего оценивали инфекционную активность вируса. Для контроля использовали 70% этанол, эффективно снижающий инфекционные свойства всех вирусов и бактерий.

Как было показано в ходе экспериментов, данный препарат статистически достоверно (U-критерий Манна-Уитни) не снижал инфекционную активность вируса, тогда как обработка 70% этанолом (отрицательный контроль) приводила к его полной инактивации (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$, таблица 14).

Таблица 14 - Вирулицидное действие ДКВ в бесклеточной системе.

	Титр вируса, (lgTCID ₅₀ /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 разрушением или инактивацией непосредственно вирусных частиц. Этанол, использованный в качестве отрицательного контроля, снижал инфекционную активность вируса на 5,5 порядков, что лежало ниже порога детекции.

4.5 Селекция и изучение вирусов, устойчивых к ДКВ.

Одной из часто возникающих проблем при длительной химиотерапии является возникновение резистентности к препарату и как следствие неэффективность лечения. Важным этапом оценки терапевтического потенциалов веществ как средств химиотерапии вирусных инфекций является их тестирование на способность к селекции мутантных штаммов вируса, резистентных к исследуемому веществу.

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-П) вируса

на клетках *Vero*. Результаты суммированы в таблице 15 и для наглядности представлены на рисунке 37.

Таблица 15 - Сравнение активности ДКВ в отношении вируса Коксаки В4 до и после совместного пассирования с концентрацией этого препарата 100 мкг/мл.

Вирус	Титр вируса в присутствии ДКВ, (lgTCID ₅₀ /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-П 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-П составил 5 lgTCID₅₀/0,2 мл, в то время как титр исходного вируса достигал 6,5 lgTCID₅₀/0,2 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.

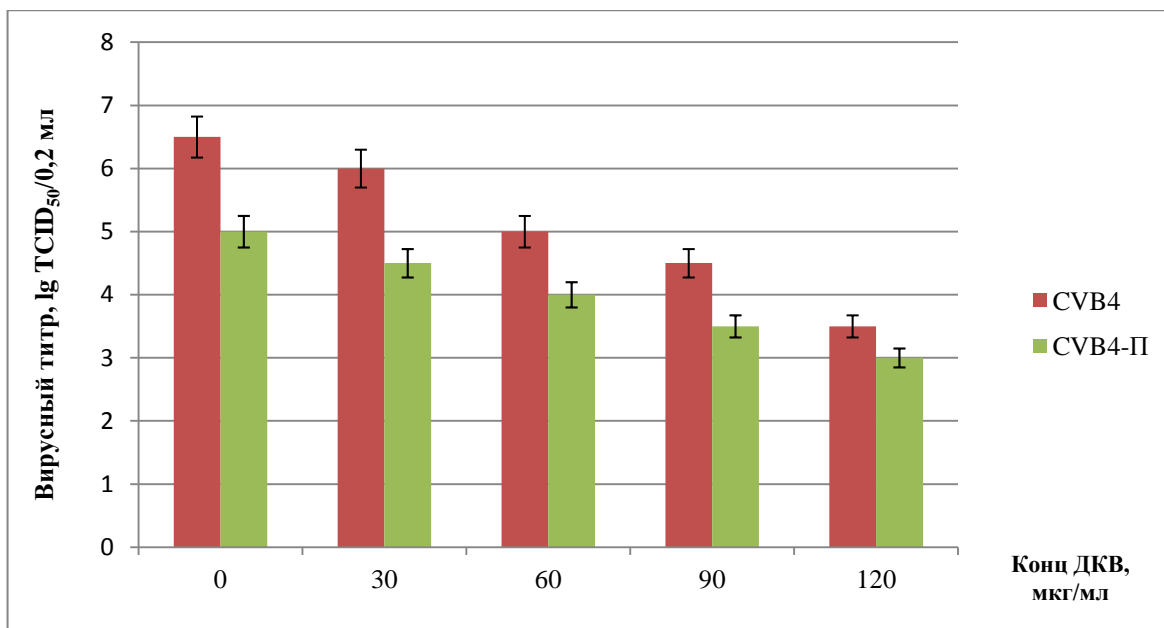


Рисунок 37 - Сравнение активности ДКВ в отношении вируса Коксаки В4 до и после совместного пассирования с препаратом в концентрации 100 мкг/мл.

Кроме того, из результатов исследования видно, что снижение вирусной репродукции у пассированного с ДКВ вируса было более выражено, чем у исходного вируса. Инфекционная активность такого вируса была ниже, а чувствительность к ДКВ оставалась на том же уровне, что и у исходного вируса. Таким образом, на основании сравнения титров вируса в присутствии разных концентраций ДКВ можно заключить, что после пяти совместных пассажей с ДКВ вирус не выработал устойчивости к соединению.

Эти результаты были подтверждены расчетом IC_{50} . Для исходного вируса IC_{50} составляла 18 ± 3 мкг/мл, для вируса, пассированного в присутствии ДКВ - 20 ± 2 мкг/мл. Статистически значимых различий, таким образом, не было выявлено.

Для наглядности результаты расчета представлены на рисунках 38 и 39.

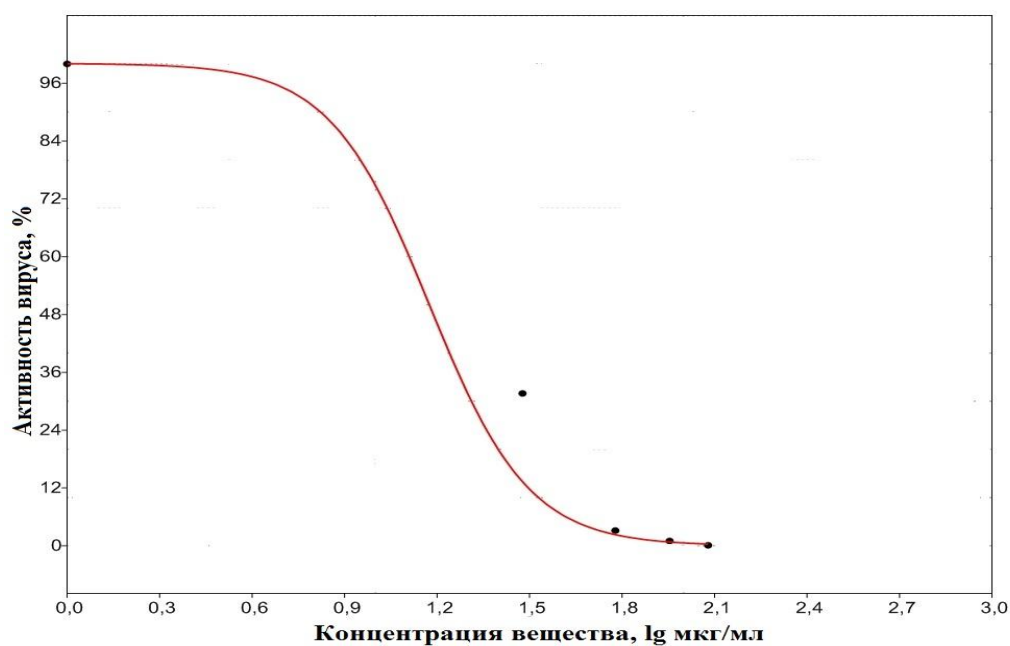


Рисунок 38 –Ингибирующая концентрация (IC₅₀) дигидрокверцетина в отношении исходного вируса Коксаки В4 на клеточной культуре *Vero*.

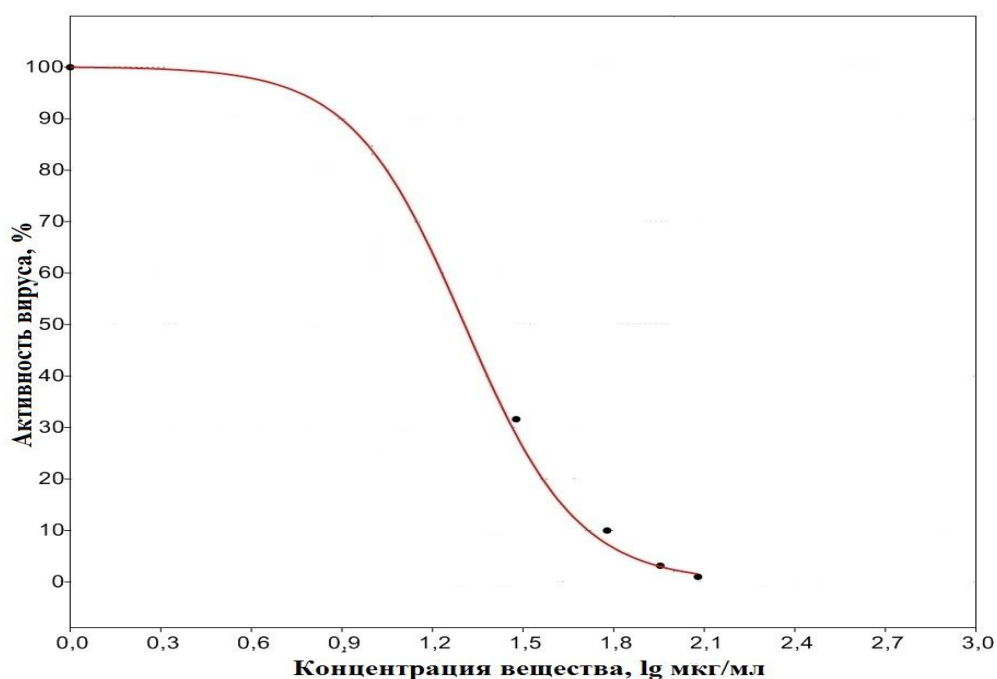


Рисунок 39 – Ингибирующая концентрация (IC₅₀) дигидрокверцетина в отношении вируса Коксаки В4, пассированного в течение 5 пассажей в присутствии ДКВна клеточной культуре *Vero*.

Из представленных графиков, характеризующих зависимость ингибирующего эффекта дигидрокверцетина от его концентрации в отношении вирусов Коксаки В4 (исходного и

пассированного) отмечено отсутствие статистически значимых различий во всех тестовых концентрациях ДКВ.

Таким образом, анализируя полученные результаты, можно говорить об отсутствии резистентности соединения дигидрокверцетина к вирусу Коксаки В4, по крайней мере в течение пяти последовательных пассажей в культуре клеток.

4.6 Разработка и характеристика модели коксакивирусного поражения ПЖу белых мышей

4.6.1 Сравнительная оценка эффективности внутрибрюшинного и внутримышечного способов эффективности заражения

Задачей следующего этапа исследования была оптимизация модели энтеровирусной инфекции на лабораторных животных для дальнейшей оценки противовирусных свойств соединений в опытах *in vivo*. На основании анализа литературных источников (Li Z.H. et al., 2008; Oestereich L. et al., 2014). по различным способам инфицирования животных были выбраны два вида заражения: внутрибрюшинное и внутримышечное. В качестве рабочего объема инокулята использовали 0,2 мл/мышь. Для создания модели энтеровирусного панкреатита у белых мышей сначала был определен наиболее эффективный метод инфицирования животных вирусом Коксаки В4. Для этого 10 мышей заражали вирусом: 5 мышей внутрибрюшинно (i.p.) по 0,2 мл и 5 мышей внутримышечно (i.m.) также по 0,2 мл в дозе $10^6 \text{TCID}_{50}/0,2 \text{ мл}$. На 2 и 3 сутки после инфицирования ПЖ извлекали, гомогенизировали и определяли в гомогенатах инфекционную активность вируса. Титрование гомогенизированных ПЖ осуществляли на клеточной культуре *Vero*. Из цельного гомогената ПЖ готовили серию 10-кратных разведений в культуральной среде до от 10^{-1} до 10^{-7} , после чего полученными разведениями инфицировали клетки *Vero*.

Было отмечено, что в цельном гомогенате и в разведении 10^{-1} наблюдалась полная деструкция клеточного монослоя. Это отмечалось как для животных, инфицированных вирусом (независимо от способа инфицирования), так и для интактных, незараженных, животных. По-видимому, в данном случае наблюдалась цитодеструкция, связанная с секретлируемыми ПЖ ферментами (амилазой, липазой, трипсином и др.), разрушающими клетки и приводящими к деструкции монослоя. Поэтому при оценке инфекционной активности вируса эти разведения не учитывались.

В результате этой серии экспериментов было обнаружено, что наиболее высокие вирусные титры оказывались у мышей, которых заражали внутрибрюшинно (таблица 16). Инфекционные титры вируса в этом случае были на $0,5 - 1 \text{ lgTCID}_{50}/0,2 \text{ мл}$ выше, чем у

животных, инфицированных внутримышечно. Поэтому в дальнейших экспериментах использовали внутрибрюшинный, а не внутримышечный способ заражения.

Таблица 16 - Репродукция вируса CVB4 в ПЖ белых мышей при разных способах заражения

Способ заражения	Титр вируса, lgTCID ₅₀ /0,2 мл	
	48 часов после инфицирования	72 часа после инфицирования
Внутримышечное заражение	3±0,0	3,5±0,0
Внутрибрюшинное заражение	3,5±0,5	4,5±0,0

4.6.2 Динамика репродукции вируса в ткани поджелудочной железы.

Для каждого инфекционного процесса существует определенная схема динамики клинического течения. Понимание клинической картины инфекционного заболевания, а также характеристика общей динамики репродукции вируса является обязательным условием как для правильного моделирования инфекции, так и для подбора адекватной терапии. При создании экспериментальной модели на животных определение такой фазы поможет определить оптимальные сроки забора экспериментального материала для оценки вирусных титров как в условиях терапии с исследуемыми веществами, так и в условиях плацебо.

Для оценки динамики репродукции вируса в ткани поджелудочной железы 20 мышей были заражены 10⁶TCID₅₀ по 0,2 мл внутрибрюшинно. На 1, 3, 5, 7, 10 и 14 сутки после инфицирования у 4 мышей в каждой группе извлекали поджелудочные железы для оценки вирусных титров. Вирусные титры на разные сроки после заражения сравнивали между собой для определения динамики репродукции вируса при инфекции.

В ходе эксперимента был выявлен пик вирусной репродукции, приходящийся на 5 сутки после инфицирования и составляющий 10^{6,5}TCID₅₀/0,2 мл. В дальнейшем инфекционная активность вируса снижалась, и на 7, 10 и 14 сутки наблюдались более низкие вирусные титры, свидетельствующие о ремиссии инфекционного процесса или конвертации его в латентную энтеровирусную инфекцию (рисунок 40). На основании полученных данных срок 5 суток после инфицирования был выбран как срок забора материала для анализа инфекционной активности вируса в ткани в ходе дальнейших опытов.



Рисунок 40 - Динамика репродукции вируса CVB4 в ткани поджелудочной железы белых мышей при внутрибрюшинном заражении (10^6 TCID₅₀ /0,2 мл).

Тем не менее, даже на поздних сроках после заражения (14 сутки) вирус в ткани детектировался, что говорит о способности вируса к длительной персистенции в поджелудочной железе животных.

4.7 Исследование активности природных антиоксидантов на модели коксакивирусной инфекции у белых мышей

На следующем этапе исследования активность ДКВ и АОК-Р была изучена *in vivo* на модели коксакивирусной инфекции у белых мышей, вызванного CVB4. Для опыта был использован препарат ДКВ и АОК-Р как показавшие наибольшую противовирусную активность *in vitro* и рибавирин в качестве референс-препарата. Для определения рабочих концентраций в предварительных экспериментах определяли значения LD₅₀ (50% летальной дозы) каждого из препаратов. В качестве рабочей концентрации была выбрана нелетальная доза 100 мг/кг для всех трех образцов - рибавирин, ДКВ и АОК-Р, не приводящая к гибели животных. Дозировка, помимо собственных данных, была выбрана на основе анализа литературных источников по тестированию токсичности рибавирин на животных (Li Z.H. et al., 2008; Oestereich L. et al., 2014; Sidwell R.W. et al., 1988). Препараты ДКВ, АОК-Р и рибавирин вводились внутрибрюшинно раз в день за 1 сутки до инфицирования и раз в день в течение последующих 4 суток после инфицирования.

Поскольку энтеровирусный панкреатит на сроках, использованных в настоящем исследовании, не приводит к специфической гибели мышей, критериями активности

патологического процесса служили вирусные титры в поджелудочных железах у инфицированных мышей, а также морфологическая структура ткани поджелудочной железы.

4.7.1 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 41).

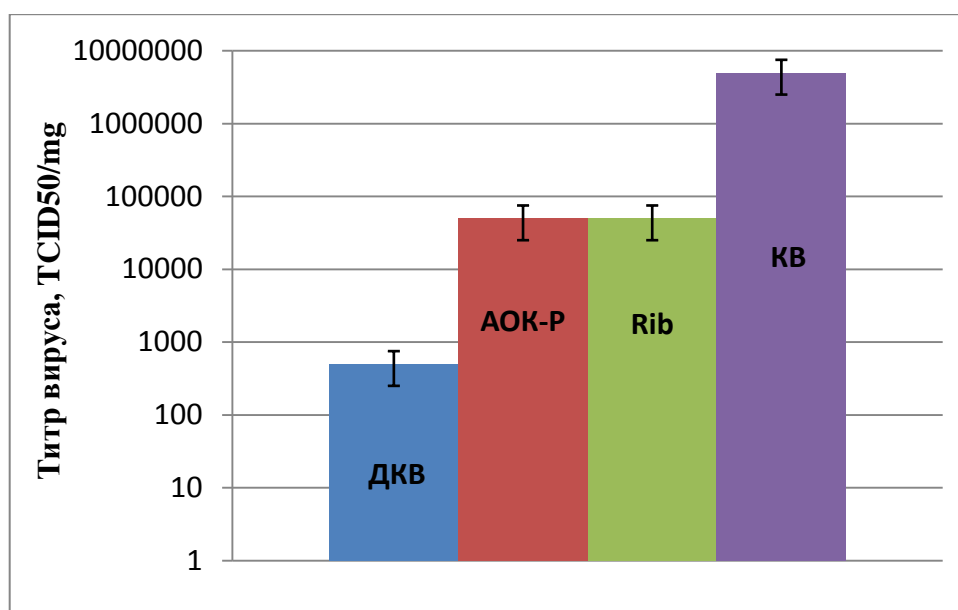


Рисунок 41 –Противовирусная активность дигидрокверцетина, рибавирина и АОК-Р в опытах *in vivo*

На основании титрования *in vitro* образцов группы вирусного контроля можно говорить о максимально высоких вирусных титрах в этой группе эксперимента, достигающих 5×10^6 TCID₅₀/mg. В группе референс-препарата рибавирина, обладающим широким противовирусным спектром активности, наблюдалась снижение вирусных титров на 5×10^4 TCID₅₀/mg ($p=0,03$). Соединения дигидрокверцетина АОК-Р, ранее продемонстрировавшие ингибирующие свойства в культуре клеток, подтвердили свою активность в отношении вируса Коксаки В4 и в эксперименте *in vivo*. ДКВ существенно снизил вирусный титр в пораженной железе на 5×10^2 TCID₅₀/mg ($p<0,0001$), также как и АОК-Р, применение которого позволило снизить титр на 5×10^4 TCID₅₀/mg ($p=0,0001$). Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о наличии противовирусных свойств у всех трех препаратов *in vivo* в отношении вируса

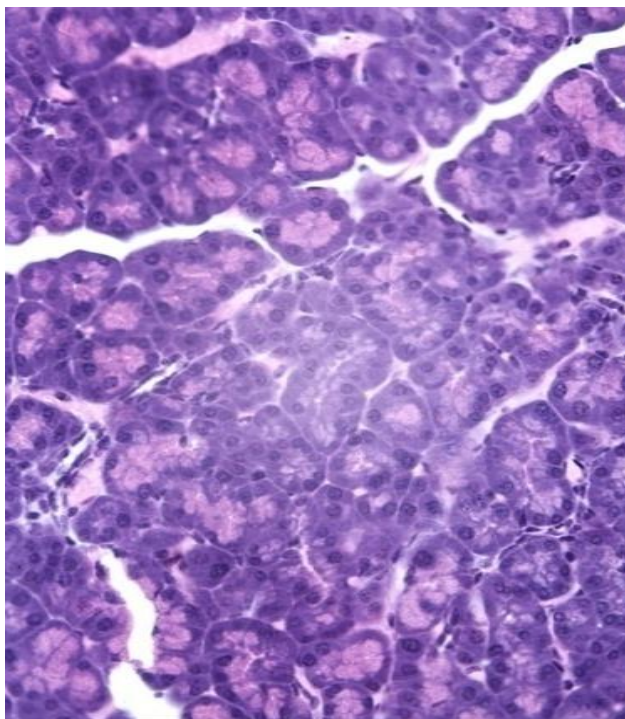
Коксаки В4, причем активность ДКВ превосходила активность АОК-Р и препарата сравнения-рибавирина($p=0,001$; $p<0,0001$), соответственно.

4.7.2 Влияние природных антиоксидантов на морфогенез экспериментальной коксакивирусной инфекции у мышей.

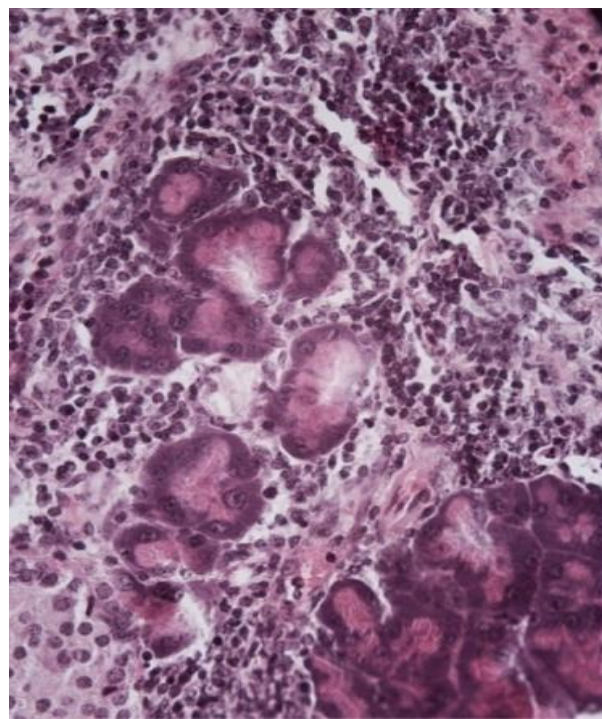
Для оценки действия изучаемых природных антиоксидантов на тканевые структуры поджелудочных желез был проведен гистологический анализ желез интактных животных, животных, зараженных вирусом Коксаки В4, а также инфицированных животных, получавших препарат ДКВ.

Как было показано в ходе гистологического исследования, ткани ПЖ интактных животных имели типичную для этого органа архитектонику и состояли из экзокринной и эндокринной частей. Паренхима экзокринной части была представлена многочисленными дольками, отделенными друг от друга прослойками соединительной ткани. Большая часть долек поджелудочной железы была представлена концевыми секреторными отделами—ацинусами, клетки которых выделяют соответствующие пищеварительные ферменты. Эндокринная часть была представлена четко очерченными островками Лангерганса, снабженными микровеносными сосудами и не имеющими выводных протоков. ПЖ животных, не зараженных вирусом, не имели макроскопических признаков воспаления, клеточной инфильтрации или тканевой деструкции.

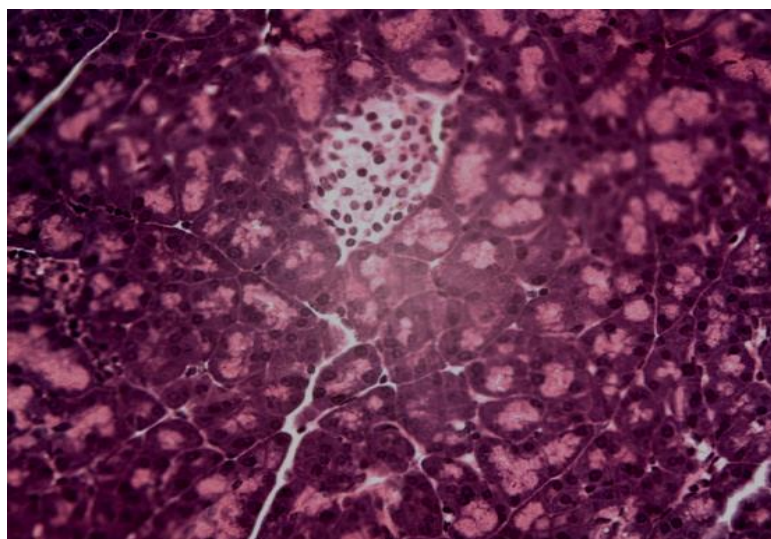
Ткани поджелудочных желез зараженных животных были воспалены, в них присутствовали многочисленные некротические очаги и воспалительные клеточные инфильтраты со скоплением мононуклеарных клеток и нейтрофилов. Также можно было наблюдать обширный адипонекроз, количество ацинарных структур по сравнению с интактными животными было снижено. Отмечались также зоны пролиферации фибробластов, что свидетельствует о процессах замещения функциональной ткани ПЖ соединительной тканью. При этом в структуре ткани, как экзокринной, так и эндокринной ее части, оставались зоны, которые были не повреждены. У животных, получавших ДКВ, тканевые повреждения были выражены намного меньше. На гистологических срезах, как и в группе животных группы отрицательного контроля, отмечались некротические поражения и воспалительные инфильтраты, но менее обширные по сравнению с контрольной группой (рисунок 42).



42 – А



42 – Б



42 – В

Рисунок 42 - Поражения, вызванные вирусом Коксаки В4 в ткани поджелудочной железы.
А-интактные мыши. Структура ацинусов сохранена, признаки воспалительной инфильтрации и деструкции ткани отсутствуют;
Б-контроль вируса. Ацинусы частично разрушены и замещены фиброластами. Интенсивная клеточная воспалительная инфильтрация и выраженные признаки цитодеструкции;
В-инфицированные животные в условиях применения ДКВ. Структура ацинусов сохранена, признаки деструкции ткани отсутствуют. Воспалительная инфильтрация выражена слабо. Гематоксилин-эозин, $\times 400$.

Таким образом, в результате проведенного гистологического анализа ПЖ мышей, зараженных вирусом Коксаки В4, было установлено наличие вирус-индуцированных поражений ткани в виде воспалительных инфильтратов и некротических очагов. Применение ДКВ в значительной степени нормализовало морфологию ткани ПЖ, снижая степень воспаления и цитодеструкции.

Аналогичный анализ был проведен в отношении другого образца, также показавшего высокий уровень вирусингибирующей активности в опытах *in vitro* - антиоксидантного комплекса, выделенного из лиственницы сибирской. У животных, получавших этот образец, архитектура ПЖ была нарушена в намного большей степени, чем у животных группы отрицательного контроля - инфицированных вирусом и не получавших никаких препаратов. В структуре поджелудочной железы наряду с вирусспецифическими поражениями в виде воспалительных инфильтратов отмечались обширные зоны тотальной деструкции ткани (риунок 43). Ацинусы ПЖ были разобщены и большей частью разрушены, в ткани присутствовало большое количество клеточного детрита. Наблюдаемая картина свидетельствует о сильном токсическом действии изучаемого комплекса антиоксидантов на ткань железы.

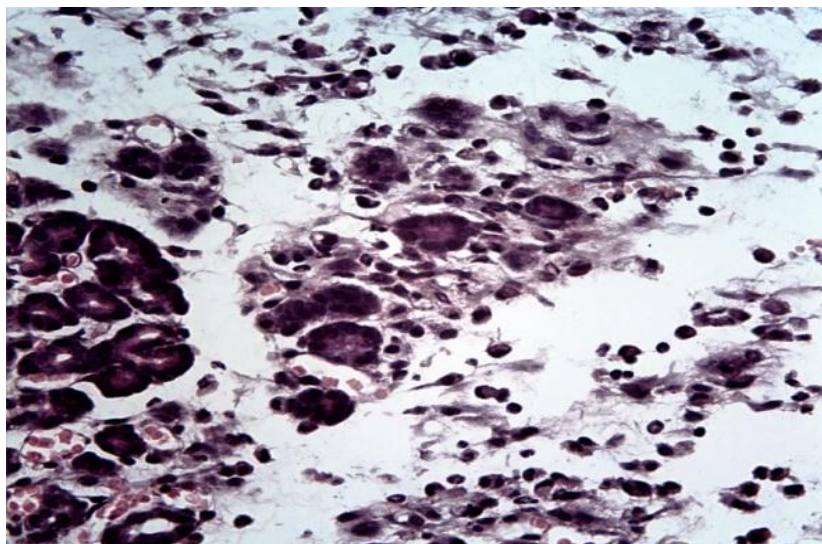


Рисунок 43 - Поджелудочная железа мыши на 5 сутки после внутрибрюшинного инфицирования вирусом Коксаки В4 в условиях применения антиоксидантного комплекса АОК-Р. Ацинусы разрушены, интенсивная клеточная воспалительная инфильтрация, полнокровие сосудов и выраженные признаки цитодеструкции. Гематоксилин-эозин, $\times 400$.

Таким образом, несмотря на наличие противовирусной активности вещества АОК-Р в экспериментах *in vitro*, а также на выраженную способность к подавлению вирусной репродукции в ткани поджелудочной железы *in vivo*, при гистологическом анализе органа-мишени данный образец оказался токсичным. Несмотря на отсутствие у него острой токсичности в использованных дозах, приводящих к гибели животных, столь выраженное деструктивное действие на ткани ПЖ не позволяет отнести его к перспективным противовирусным соединениям.

4.7.3 Антиоксидантная активность ткани поджелудочной железы при энтеровирусном панкреатите

На следующей стадии экспериментов была проведена оценка антиоксидантной активности в ткани поджелудочной железы у животных контрольных групп и животных, получавших в ходе вирусной инфекции дигидрохверцетин. На 4 сутки после инфицирования вирусом ПЖ мышей были асептически извлечены и гомогенизированы. Определение АОА *in vivo* проводилась по той же схеме, что и *in vitro*. В эксперименте измеряли способность восстанавливать DPPH для гомогенизированного надосадка от всех групп мышей: интактных, зараженных и леченных ДКВ. На основании этих данных была составлена таблица 17, отражающая степень АО защиты у мышей разных групп.

Таблица 17 - Антиоксидантная активность ткани поджелудочной железы, инфицированной вирусом Коксаки В4 в условиях применения ДКВ

	ФОН (DPPH+ физиологический раствор)	Здоровые мыши	Зараженные мыши	Зараженные мыши, пролеченные ДКВ
Значения оптической плотности (OD ₅₃₅) в 10% гомогенатеткани ПЖ	1,100±0,015	0,090±0,004	0,267±0,001	0,085±0,007

Из таблицы видно, что фоновые значения OD₅₃₅ являются наиболее высокими, поскольку в контрольных лунках находится только окислитель DPPH, и полностью отсутствует какой-либо антиоксидант. 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. В гомогенатах ткани ПЖ здоровых мышей отмечены низкие значения оптической плотности, что соответствует нормальным показателям антиоксидантных процессов у интактных мышей. В образцах от зараженных мышей наблюдаются высокие значения оптической плотности, что говорит о низком уровне АО защиты при коксакивирусной инфекции *in vivo*. В группе мышей, инфицированных вирусом и получавших 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 дигидрохверцетина при энтеровирусной инфекции белых мышей приводит к уменьшению окислительного стресса в ПЖ, вызванного инфицированием животных вирусом Коксаки В4. Снижение уровня окислительного стресса снижает тяжесть КВИ, что наряду с противовирусной активностью ДКВ обуславливает его терапевтические свойства.

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

Для более подробного изучения биологической активности дигидрохверцетина и механизма его противовирусной активности был проведен анализ уровня выработки интерферона при КВИ. Образцы крови от интактных, больных и получавших терапию ДКВ мышей были взяты на 4 сутки после инфицирования вирусом. Для оценки выработки ИФН в разных группах мышей сыворотки крови были раститрованы на культуре клеток L-929, инфицированных вирусом везикулярного стоматита, приводящим к деструкции монослоя. Метод измерения титра интерферона основан на способности ИФН-содержащей сыворотки крови предотвращать эту цитодеструкцию и повышать тем самым оптическую плотность лунок по сравнению с контрольными лунками без интерферона. В эксперименте измеряли снижение оптической плотности образцов от разных групп мышей в серии двукратных разведений сывороток крови. Чем больше оптическая плотность в лунке, тем больше ИФН содержится в данной лунке. Полученные данные суммированы на рисунке 44.

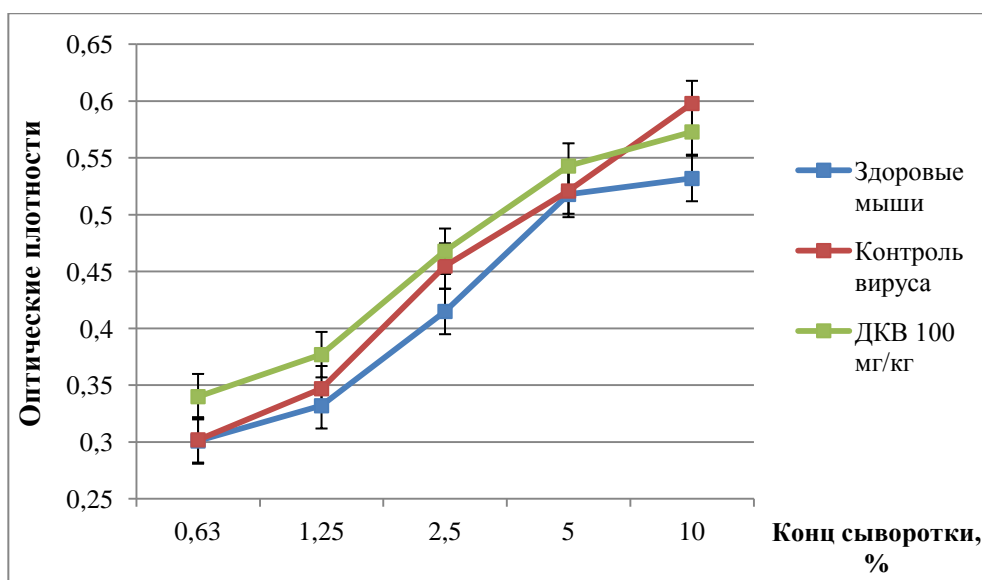


Рисунок 44 – Индукция ИФНа в сыворотке крови мышей

В данном эксперименте проверялась гипотеза о способности ДКВ индуцировать дополнительную выработку ИФН в сыворотке крови животных, инфицированных CVB4. В результате титрования ИФН при увеличении разведения сыворотки наблюдалось снижение оптической плотности в лунках. ИФН защищает клеточный монослой интерферон-дефицитных клеток *Vero* от деструкции, вызванной VSV. Предполагалось, что терапия КВИ при помощи дигидрокверцетина способна индуцировать дополнительную выработку ИФН. Однако полученные результаты указывают на то, что ДКВ существенно не влиял на индукцию ИФН при вирусной инфекции. Значения оптической плотности, отражающие выработку ИФН в различных разведениях при КВИ с терапией ДКВ и без него оказывались статистически неразличимы.

4.8 Влияние ДКВ на ультраструктурные особенности морфогенеза коксакивирусной инфекции в культуре клеток

Целью следующего этапа была оценка влияния ДКВ на ультраструктурные особенности морфогенеза коксакивирусной инфекции в культуре клеток. Полный репликационный цикл CVB4 в культуре клеток *Vero* осуществляется за 6-7 часов (Karalyan Z.A. et al., 2013). В ходе этого процесса под влиянием вируса происходит формирование в клеточной цитоплазме специфических мембранных структур. Ядра приобретают остrokонечную форму и перемещаются к периферии клетки, в то время как кластеры вирусных репликационных структур располагаются на большой площади цитоплазмы клетки и обычно объединяются в перинуклеарном регионе.

Для того чтобы исследовать вирус-индуцированные изменения в клетках Vero в процессе репликации, клетки, зараженные вирусом, были собраны через 3 и 6 часов после инфицирования. 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 новых вирусных частиц и осуществляется их сборка и выход из клетки (Miller S. et al., 2008) В качестве отрицательного контроля были проанализированы интактные клетки Vero (рисунок 45 А).

Как было показано в ходе ультраструктурных исследований, интактные клетки Vero имеют полигональную форму с четко выраженными границами. Их цитоплазма не зернистая, ядра клеток округлой формы с 1-4 ядрышками. Клеточные органеллы – митохондрии, эндоплазматический ретикулум, рибосомы, комплекс Гольджи - хорошо выражены и четко идентифицируются. В цитоплазме интактных клеток отсутствовали специфические вирус-индуцированные, в том числе мембранные, структуры (рисунок 45).

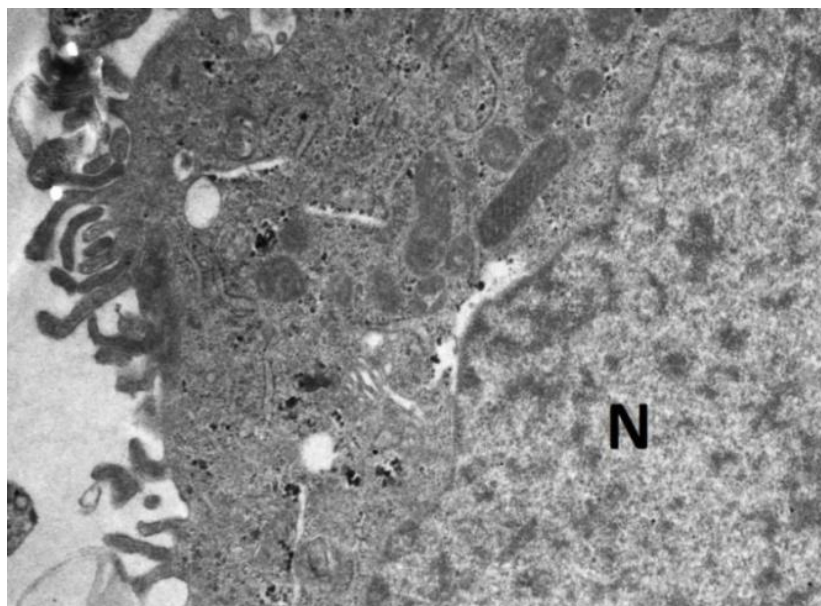


Рисунок 45 - Интактная клетка Vero.

N—ядро;

Трансмиссивная электронная микроскопия, $\times 10\ 000$.

Ультраструктура клеток, инфицированных CVB4 на сроках 3 и 6 часов после заражения, представлена на рисунках 46 Б, В. На рисунке 46 (Б) представлены первые мембранные перестройки, детектированные через 3 часа после инфицирования вирусом Коксаки В4. В это время вирус-индуцированные структуры проявляются как небольшие кластеры, связанные между собой округлой или вытянутой мембраной примерно 100-200 нм в поперечном сечении.

Внутреннее пространство таких одномембранных структур обычно пустое, хотя иногда они заполнены аморфоподобным содержимым. Одномембранные структуры имеют разнообразную форму, в том числе разветвленную трубчатую организацию.

На рисунке 46 (В) показаны вирусспецифические мембранные структуры, сформировавшиеся через 6 часов после инфицирования. С 3 до 6 часов после инфицирования происходят изменения в одномембранных структурах: они начинают скапливаться и изгибаться, образуют сеть, однако при этом остаются одномембранными и структурно незаполненными. Кроме того происходит формирование двухмембранных перфорированных сферических структур (100-300 нм), которые постепенно замещают одномембранные, и к 6 часам последних остается крайне мало. Могут присутствовать и многослойные структуры.

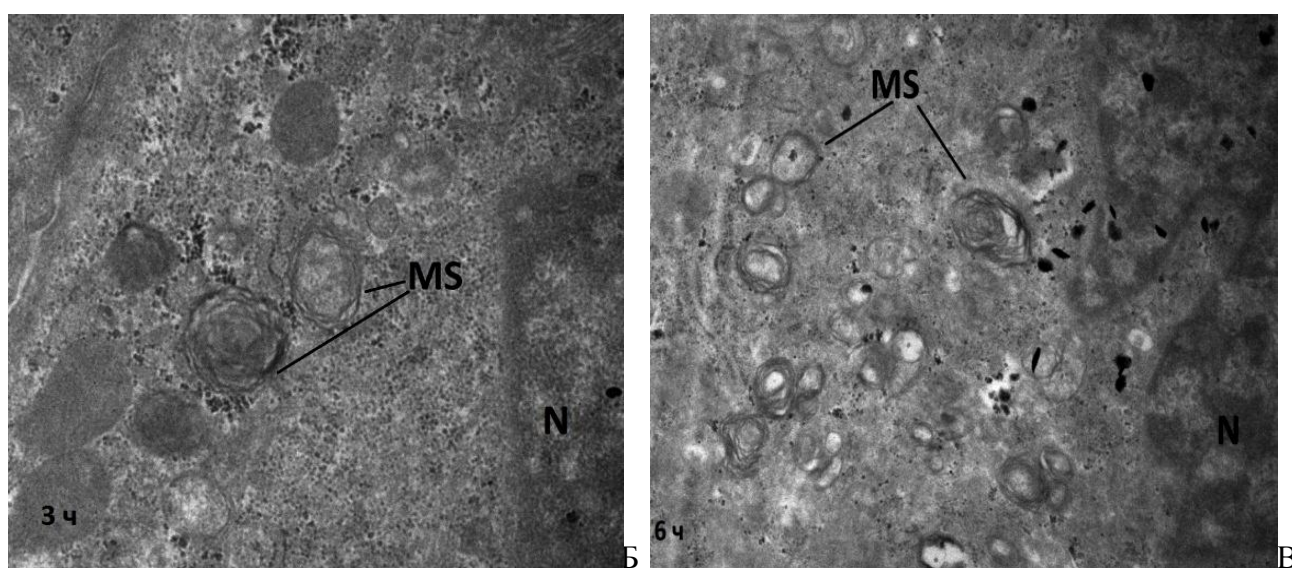


Рисунок 46Б, В - Электронно-микроскопические фотографии мембран клеток *Verona* ранней (3 часа) и поздней (6 часов) стадии после инфицирования вирусом Коксаки В4

Б-контроль вируса через 3 часа после инфицирования;

В-контроль вируса через 6 часов после инфицирования

N- ядро; MS – вирус-индуцированные мембранные структуры инфицирования.

Трансмиссивная электронная микроскопия, $\times 10\ 000$.

Также для оценки влияния ДКВ на ультраструктурные изменения в клетках при вирусной инфекции были изучены клетки *Vero* через 3 и 6 часов после инфицирования (рисунок 47 Г, Д), культивируемые в присутствии 100 мкг/мл дигидрокверцетина.

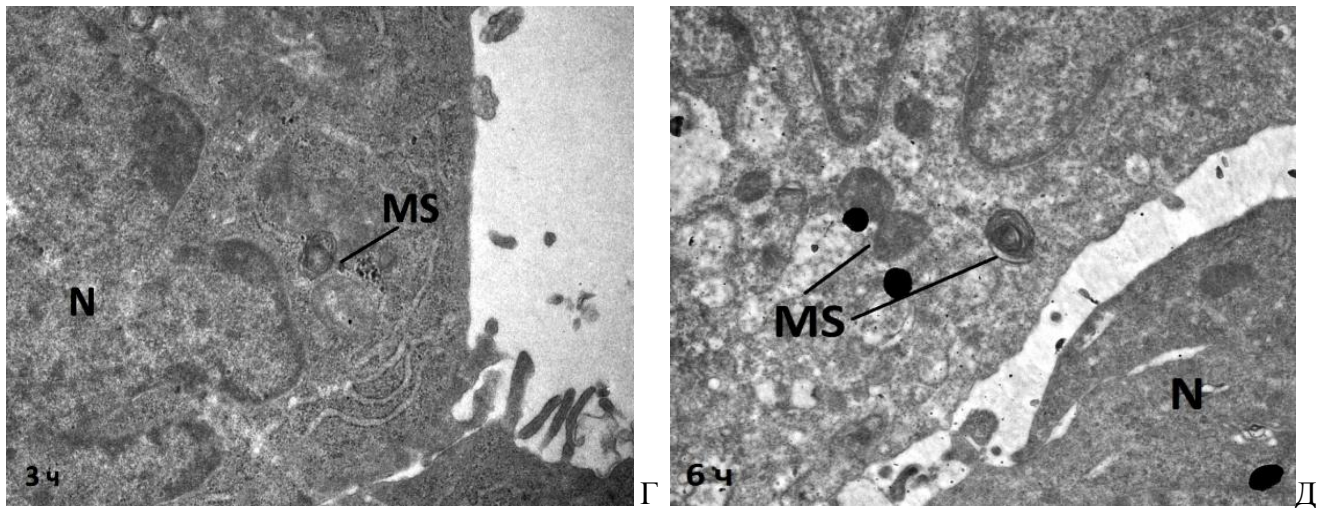


Рисунок 47 - Ультраструктура клеток Vero на ранней (3 часа) и поздней (6 часов) стадии после инфицирования вирусом Коксаки В4 в присутствии ДКВ.

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.

N- ядро; MS – вирус-индуцированные мембранные структуры

Из представленных фотографий видно, что несмотря на присутствие ДКВ, инфицирование клеток индуцирует формирование вирусспецифических мембранных структур в клетках. Однако количество таких структур заметно меньше по сравнению с контролем вируса без ДКВ.

Таким образом, в проведенной серии опытов показано, что при сравнении клеток, зараженных вирусом, и клеток, подвергнутых лечению ДКВ, можно обнаружить различия в их ультраструктуре при помощи электронно-микроскопического анализа. Как на ранней, так и на поздней стадии вирусного репликативного цикла наблюдается меньшее число вирусиндуцированных одно- и двумембранных структур в клетках с ДКВ по сравнению с контролем вируса. Данные по ЭМ указывают на способность ДКВ к ингибированию структурных преобразований клетки в процессе вирусной инфекции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Энтеровирусные инфекции считаются одной из наиболее актуальных проблем мирового здравоохранения. Особенностью энтеровирусных инфекций является разнообразие клинических форм, то есть даже в пределах одной вспышки могут регистрироваться совершенно разные симптомы болезни. К наиболее распространенным энтеровирусным заболеваниям относятся герпангина, панкреатит, серозный менингит, миокардит, энтеровирусная экзантема, эпидемическая миалгия и др. Многие энтеровирусы способны вызывать не только тяжелые инфекционные заболевания, но и целые эпидемии со смертельными исходами, как это было, например, в 2000 году в Сингапуре, когда энтеровирус 71 типа инфицировало около 1000 человек 4 смертельными случаями. (<http://www.pitermed.com/simptomny-bolezni/?cat=6&word=55036>).

В терапии ЭВИ, и в частности КВИ, существует проблема, связанная с трудностью в диагностике инфекции из-за разнообразия клинических симптомов. Кроме того, специфическая терапия практически не используется в ЛПУ в связи с небольшим количеством на фармацевтическом рынке препаратов, прошедших все стадии клинических испытаний. Поэтому при лечении врачи-клиницисты чаще всего используют иммуномодулирующие, патогенетические и симптоматические средства.

Альтернативой применения химиотерапии при лечении КВИ являются разработки, ведущиеся в области генной инженерии. Например, антисмысловая терапия считается многообещающей стратегией действий в подавлении вирусной активности. Антисмысловая терапия - это метод лечения, основанный на выключении/остановке синтеза белка, участвующего в развитии заболевания, путем ингибирования трансляции его мРНК с помощью комплементарных к ней коротких нуклеотидных последовательностей (антисмысловых олигонуклеотидов). Данные олигонуклеотиды могут рассматриваться, в том числе, и в качестве «инструмента» в подавлении вирусов группы Коксаки. Ингибирование размножения вируса происходит за счет прямого воздействия олигонуклеотидов на нетранслируемые регионы 5' и 3' концов, причем, как правило, мишенью является 3' UTR. Олигонуклеотиды воздействуют на РНК вирусы путем ингибирования синтеза протеинов (Lim T. et al., 2008).

К методам генной инженерии также относится РНК интерференция. РНК интерференция – это процесс подавления экспрессии генов при помощи коротких двуцепочечных интерферирующих РНК (*siRNA*) длиной 21 нуклеотид, 19 из которых формируют дуплекс. Они внедряются в мультимерный протеиновый комплекс (*RISC*). При этом одна из двух РНК цепочек «отбрасывается», другая цепочка транспортирует *RISC* прямо к комплементарной мишени в РНК, что приводит к эндонуклеолитическому расщеплению последней. Действие *RNAi* может быть направлено как на сам вирус, так и на вирусные рецепторы. *RNAi*

синтезируется не только за счет *siRNAs*, но также коротких «шпилечных» РНК (*shRNAs*) или искусственных микро-РНК (*amiRNAs*).

siRNAs обладают противовирусной активностью только против кодирующих регионов РНК. Главной проблемой длительной противовирусной терапии является потенциальная возможность возникновения «ускользающих» мутаций. Этот фактор существенно ограничивает противовирусную низкомолекулярную терапию. Возникновение таких мутаций является следствием аккумуляции точечных мутаций в м сайте связывания или рядом с ним *siRNA*. Существуют три разные стратегии, направленные на подавление «ускользающих» мутаций. 1) ориентация препаратов на конкретную мишень - консервативные участки РНК 2) комбинирование наиболее эффективных *siRNAs* 3) устранение факторов в самой зараженной клетке, необходимых для жизненного цикла вируса.

Мутации в консервативных регионах РНК могут вызвать потерю вирулентности. Воздействие *siRNAs* на неструктурные белки кодирующего региона является более эффективным, чем на структурные, поскольку последние часто теряют активность при мутациях. *siRNAs* не активны в отношении *IRES*, поскольку последний негативно воздействует на *siRNA*-подавляемый молчащий ген, что существенно снижает противовирусную активность. Действие *siRNA* может быть направлено на *cis*-активный репликационный элемент (*CRE*), располагающийся в 2С регионе, что предотвращает появление жизнеспособных «ускользающих» мутаций. Поскольку *CRE* является идентичной у всех пикорнавирусов, то и *siRNA* имеет универсальную анти-энтеровирусную активность.

Другой подход связан с комбинацией 2 и более активных *siRNAs* или *shRNAs*. Комбинация из 2 *shRNAs* экспрессионных «кассет» в одном векторе поддерживает элиминирующую активность против мутагенных *RNAs* вируса Коксаки, при этом вторая *shRNA* может компенсировать потерю элиминирующей активности первой *shRNA*. Однако «ускользающие» мутанты могут образовываться даже при комбинации 3 наиболее сайт-специфичных *siRNAs*. Создание пула *siRNAs*, охватывающего 3,5 кб геномной последовательности, предотвращает формирование мутантов. Данный пул образуется из двуцепочечных РНК, соответствующих региону, кодирующему неструктурные белки вируса. Эти РНК расщепляются на *siRNAs* специфической эндорибонуклеазой *DICER*.

Третья стратегия заключается в воздействии на молчащие гены в клетке-хозяине, которые необходимы для проникновения и репликации вируса. Преимуществом данного подхода является то, что вирусы ограничены в адаптации к изменениям клетки-хозяина. Как уже известно, рецептором прикрепления вируса Коксаки является *CAR*, который служит мишенью для терапевтических препаратов. В исследованиях с вирусом CVB3 была доказана экспрессия молчащего *CAR* рецептора с *siRNAs*. В одном из экспериментов при трансфекции

HeLa клеток *siRNAs*, *siCAR2* или *siCAR9*, почти полностью прекращалась экспрессия CAR, что подтвердило также уменьшение образования вирусных бляшек на 60%. В другом опыте использовали *HL-1* клетки и первичные кардиомиоциты. Терапия рекомбинантным и аденовирусными экспрессирующими *shRNAs* против *CAR* показала полное прекращение экспрессии *CAR* на обеих клеточных линиях. Нокаут *CAR* приводит к ингибированию Коксаки В3 инфекции до 97% в *HL-1* клетках и до 90% в культуре клеток первичных кардиомиоцитов (Rothe D. et al., 2008).

Применение в терапии растворимых рецепторных аналогов также дает положительный результат. Растворимые рецепторные аналоги (*SRA*) связываются с вирусом до того, как вирус взаимодействует с клеточными рецепторами, таким образом, блокируя связывание вируса с клеткой-мишенью и дальнейшее его проникновение внутрь. *SRA* входят в состав клеточных протеинов и образуются в результате альтернативного соединения клеточных рецепторных транскриптов или являются продуктом генной инженерии. Многие *SRA* лишены трансмембранного домена. Этот домен необходим для «заякоривания» протеиновых рецепторов в мембране клетки, и его отсутствие способствует тому, что *SRA* проходит сквозь клеточную мембрану и аккумулируется во внеклеточном пространстве. Таким образом, *SRA* содержит исключительно сайты, отвечающие за связывание вируса с мембраной клетки, необходимые чтобы нейтрализовать вирус. Однако их эффективность порой бывает слишком низка, чтобы использовать их в терапии. Генная инженерия может решить этот вопрос. Большинство разработок в этой области направлены на синтез домена, отвечающего за прикрепление вируса и -COOH конца Fc- региона человеческого *IgG1*, приводящего в итоге к формированию димерных антитело-подобных молекул. Последние способствуют растворению *SRA*, и IgG-Fc распознается Fc-рецепторами, экспрессированными на макрофагах, которые, в свою очередь, и очищают клетку от вируса, после того как последний связался с растворимыми рецепторами.

Другой механизм действия *SRA* заключается в том, что связывание Коксаки вируса с *SRA* может стимулировать конформационные изменения вирусных частиц (А-частица). А-частицы имеют низкую плотность и могут вызвать утрату VP4 белка, что снизит инфекционность вируса (Yang D. et al., 2013).

Терапия мезенхимальными стволовыми клетками (*MSC*) имеет существенное преимущество перед остальными клетками – они не иммуногенны, что позволяет их использовать при терапии. *MSC* уменьшают апоптоз и оксидативный стресс при поражении клеток вирусом Коксаки. Более того, они уменьшают выход новых вирионов из клетки-мишени в среднем в 5 раз. Протективный эффект *MSC* достигается посредством NO-зависимого механизма и требует участия *IFN-γ*.

Известно, что вирус Коксаки В4, представитель семейства *Picornaviridae*, рода *Enterovirus* является одним из возможных причин развития диабета 1 типа. Вирус Коксаки В4 инфицирует β -клетки ПЖ, что в приводит к их гибели. β -клетки ответственны за выработку гормона инсулина в организме. Таким образом, глюкоза, образующаяся в организме, лишается возможности модифицироваться в гликоген при действии инсулина и начинает накапливаться в организме. β -клетки перестают выполнять свою функцию и постепенно разрушаются, что в конечном итоге, приводит к деградации эндокринной части ПЖ. Данную дисфункцию эндокринной части ПЖ можно рассматривать как преддиабетическое состояние.

В качестве главного механизма повреждения эндокринной части ПЖ мы рассматривали вариант прямого инфицирования вирусом Коксаки В4 β -клеток и связанного с ним состояния окислительного стресса как дополнительно-отягощающего патогенетического фактора. ОС— это состояние инфицированной клетки, характеризующееся повышенной концентрацией свободных радикалов, разрушающих ее структурные компоненты (протеины, нуклеиновые кислоты и др.). Для борьбы со свободными радикалами собственных защитных механизмов у β -клеток не хватает, поэтому введение в терапию дополнительных АО препаратов могло бы приостановить или ослабить процесс поражения тканей ПЖ. Для поиска оптимальных компенсующих средств при ОС нами был изучен ряд антиоксидантных соединений на модели инфекции, вызванной вирусом Коксаки В4 *in vitro* и *in vivo*. Перед проведением скрининга соединений на противовирусную активность все вещества были протестированы на антиоксидантную активность в бесклеточной системе.

В результате первичного скрининга *in vitro* на клеточной линии *Vero* было обнаружено активное соединение ДКВ со значением индекса селективности (SI) равным 11, превышающим значение индекса селективности референс-препарата – рибавирина (SI=5) и других исследуемых веществ. Препарат рибавирин обладает широким спектром активности в отношении многих ДНК и РНК вирусов (Sidwell R.W. et al., 1972; Huffman J.H. et al., 1973; Kirsi J.J. et al., 1983). Однако, известно, что рибавирин проявляет слабую эффективность в отношении рино-, полио- и коксакивирусов на клеточной линии *Vero* (Kirsi J.J. et al., 1983). Возможно, это объясняется тем фактом, что рибавирин способен индуцировать мутагенез у вирусов. В сочетании с отсутствием у вирусной 3D – полимеразы механизма коррекции ошибок, стимуляция мутагенеза может приводить к дополнительному повышению частоты мутаций. Это, в свою очередь, может вызывать возникновение рибавирин-резистентных вирусных штаммов. Это было доказано, например, в отношении вируса гепатита С (HCV), энтеровируса 71 типа, а также вируса гриппа (Cheung P. P. et al., 2014), воздействие на которые рибавирином приводит к мутагенным эффектам в РНК-зависимой РНК полимеразе вируса

(Kung-ChiaYoung et al., 2003). Таким образом, наши данные согласуются с ранее полученными результатами зарубежных исследователей.

Дальнейшие опыты *in vitro* подтвердили, что являясь сильным антиоксидантом, ДКВ обладает противовирусными свойствами в отношении вируса Коксаки В4. Данные электронно-микроскопического анализа культуры клеток *Vero*, инфицированных вирусом (КВ) и клеток, обработанных ДКВ, показали различия в ультраструктуре клеток. В контрольных клетках наблюдалось большое количество одно- и двухмембранных ультраструктур, присущих только зараженной клетке. В то же время в клетках, подвергнутых терапии ДКВ, таких вирус-индуцированных структур было намного меньше.

Изученные АО, как химически родственные, так и отличные от ДКВ, не показали противовирусных свойств в отношении данного вируса. При этом различия в их АОА были невелики. Например, значения 50% эффективной АО концентрации ДКВ и его производного - ДКВ-Zn были идентичными и составляли 155 мкМ. Таким образом, можно сделать вывод о том, что наличие АО активности у соединения не гарантирует существования у него противовирусных свойств.

Также нами были проведены эксперименты по определению цитотоксичности исследуемых веществ. Интересные результаты были получены при оценке токсичности суммарного экстракта ели сибирской и его фракций. Каждая фракция по отдельности не была токсичной в рамках исследуемых дозировок веществ, при этом общий экстракт показал высокую степень токсичности - 80 мкг/мл. Возможно данный факт объясняется кумулятивным цитотоксическим действием всех фракций в экстракте. Кроме того, можно предположить, что фракционный состав экстракта намного шире заявленных в исследовании фракций и нерасфракционированные вещества в экстракте оказывали токсическое действие на клетки.

Подавление репликации пикорнавирусов может происходить различными механизмами. На сегодняшний день существуют химические соединения, ингибирующие пикорнавирусы на различных стадиях жизненного цикла: на стадии прикрепления, входа, раздевания, сборки и выхода вируса. Другие ингибиторы могут подавлять вирусную репликацию, воздействуя на вирусную РНК, структурные или неструктурные белки. Известно, что антиоксидант – пирролидиндитиокарбамат (ПДК) обладает противовирусной активностью в отношении пикорнавирусов (Коксаки В3 вируса, полиовируса, риновируса), но не за счет своих антиоксидантных свойств, а за счет влияния на вирусную РНК и синтез протеинов (Gaudernak E. et al., 2002; Si X. Et al., 2005) (рисунок 48).

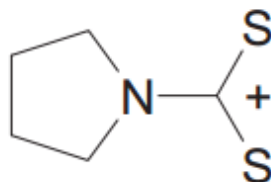


Рисунок 48 – Пирролидиндитиокарбамат (ПДК)

Другой флавоноид 4,6 –дихлорофлаван (BW 683C) также обладает противовирусными свойствами в отношении риновирусов. Механизм его действия заключается во взаимодействии дихлорофлавана с VP1 протеином в гидрофобном каньоне капсида вируса, что приводит к блокировке в стадии раздевания вируса (рисунок 49).

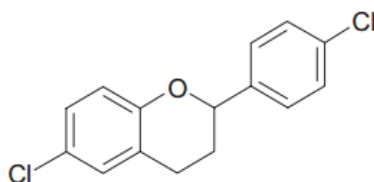


Рисунок 49 - 4,6 –дихлорофлаван (BW 683C)

Особо следует отметить близкое по строению к ДКВ соединение Ro 09-0179 (4',5-дигидрокси-3,3'-7- триметоксифлаван), который обладает противовирусной активностью в отношении широкого спектра пикорнавирусов, включая риновирусы, коксакивирусы и полиовирус. Механизм его действия заключается не в угнетении окислительного стресса, вызванного вирусной инфекцией, а подавления репродукции вируса путем блокировки синтеза вирусной РНК (Ishitsuka H. Et al., 1982) (рисунок 50).

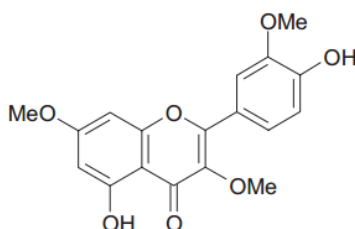
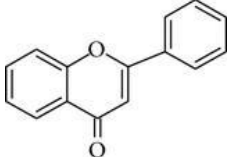
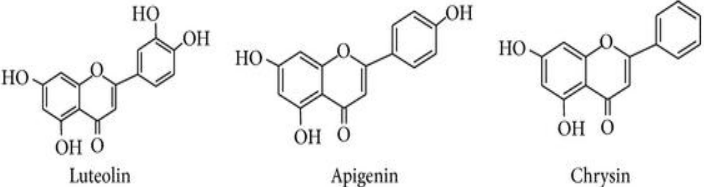
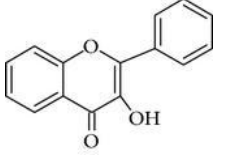
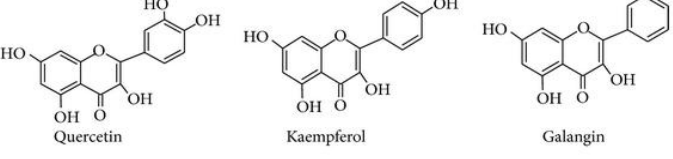
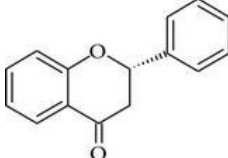
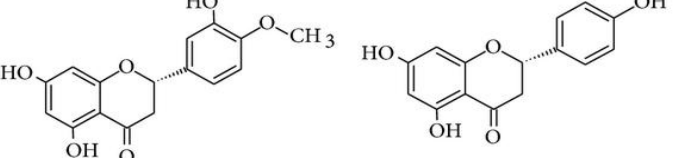
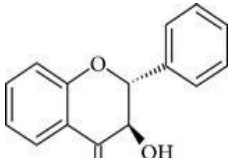
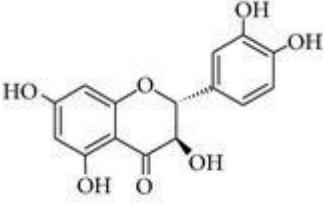
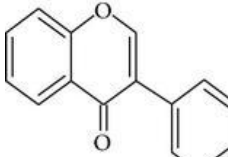
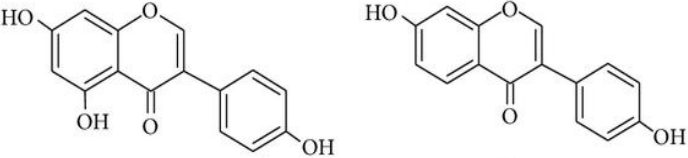


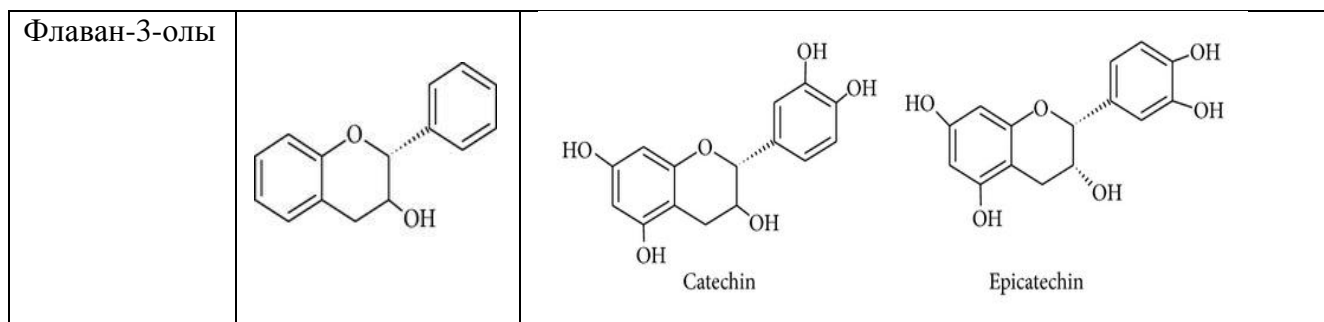
Рисунок 50 - Ro 09-0179 (Ninomiya Y. et al., 1985)

Таким образом, несмотря на сходство химической структуры, механизмы противовирусного действия этих двух соединений принципиально различны.

Антиоксиданты принадлежат к классу растительных полифенолов – флавоноидам (Pietta P. G., 2000). Флавоноиды можно подразделить на несколько групп: флавоны, флавонолы, катехины и антоцианиды (таблица18).

Таблица18 - Химическая структура различных классов флавоноидов

Группа флавоноидов	Химическая структура	ПРЕДСТАВИТЕЛИ
Флавоны		 <p>Luteolin Apigenin Chrysin</p>
Флавонолы		 <p>Quercetin Kaempferol Galangin</p>
Флавононы		 <p>Hesperetin Naringenin</p>
Флаванолы		 <p>Taxifolin</p>
Изофлавоны		 <p>Genistein Daidzein</p>



Флавононы являются менее активными в отношении пикорнавирусов, чем флавоны. Кроме того, определенные замены в 3'-положении могут существенно усилить противовирусную активность препарата (Rice-Evans C. A. et al., 1996). Эксперименты *in vitro* показали, что флавоноиды обладают противовоспалительными, противоаллергическими, противовирусными и противоопухолевыми свойствами (Kumar S. and Pandey A.K., 2013). Непосредственная функция антиоксидантов – это очистка клетки от избытка свободных радикалов, разрушающих ее структуру. Антиоксидантная система организма включает в себя такие ферменты, как супероксид дисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, а также химические соединения неэнзимного происхождения: глутатион, аскорбиновая кислота и α -токоферол. Антиоксидантная активность (АОА) флавоноидов зависит от расположения функциональных групп в структуре ядра. Конфигурация, замена и общее число гидроксильных групп влияет на следующие механизмы АОА: радикальную очистку и способность к комплексообразованию с ионами металлов. Положение гидроксильной группы в В-кольце является определяющим фактором при очистке от свободных радикалов, поскольку при взаимодействии с окислителем гидроксильная группа отдает ему атом водорода и электрон, тем самым стабилизируя радикал.

Механизмы АО действия включают в себя: подавление образования свободных радикалов, полную очистку от радикалов и регулирование АО защиты организма.

Липидное окисление является следствием окислительного стресса. Флавоноиды защищают липиды от окислительного повреждения различными механизмами. Свободные ионы металлов усиливают образование радикалов за счет удаления пероксида водорода с образованием высоко-реактивного гидроксильного радикала. Флавоноиды способны уменьшать степень окисления свободных радикалов за счет отдачи последним атома водорода. Кроме того, флавоноиды известны своей способностью хелатировать ионы металлов (железо, медь и др.), что также приводит к ингибированию синтеза свободных радикалов. Например, кверцетин известен своими железо-хелатирующими и железо-стабилизирующими свойствами. Следовые количества металлов связываются со специфическими позициями в кольцах флавоноидов (рисунок 51).

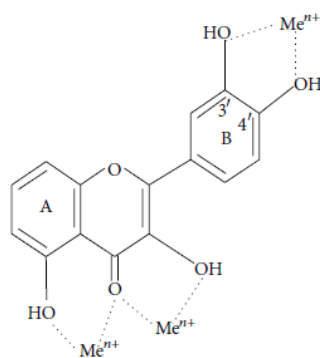


Рисунок 51 – Связывающие сайты для металлов в структуре флавоноида, где Me^{n+} - ионы металлов

3',4'- катехольная структура в В-кольце ослабляет липидное окисление. Эта особенность делает флавоноиды наиболее эффективными сквенджерами пероксильного, супероксидного и пероксинитритного радикалов. Например, эпикатехин и рутин являются ингибиторами липидного окисления *in vitro* (Halliwell В. et al., 1998). При окислении В-кольца флавоноида, имеющего катехольную группу, образуется стабильный ортосемихиноновый радикал с высоким уровнем радикальной очистки. Флавоны, у которых нет катехольной группы, образуют при окислении нестабильные радикалы с низким уровнем антирадикальной активности.

Противовоспалительная функция флавоноидов может реализовываться несколькими путями: подавлением синтеза простагландинов, ингибированием продукции гистамина, подавлением фосфодиэстеразы/протеинкиназы. Воспаление - это естественный биологический процесс в ответ на повреждение ткани, вирусное или микробной инфицирование или химическое воздействие. Воспаление начинается с миграции иммунных клеток к месту повреждения и выработке медиаторов. Большое число флавоноидов, таких как гесперидин, апигенин, лутеолин и кверцетин обладают противовоспалительными свойствами. Флавоноиды способны подавлять экспрессию изоформ нитрит оксид синтазы, циклооксигеназы и липооксигеназы, которые отвечают за индукцию оксида нитрита, простаноидов и лейкотриенов и других медиаторов воспалительного ответа. Кроме того, они участвуют в биосинтезе цитокинов, через адгезию циркулирующих лейкоцитов к месту повреждения. Обнаружено, что кверцетин, близкий по молекулярному строению к дигирокверцетину, подавляет иммуноглобулиновую секрецию *IgG*, *IgM* и *IgA in vitro* (Manthey J. A., 2000).

Кроме выше указанных свойств антиоксиданты выполняют и гепатопротективную функцию. Различные хронические заболевания, например, диабет, могут приводить к повреждению печени. Некоторые флавоноиды, среди которых следует отметить катехин, апигенин, нарингинин и рутин обладают гепатопротективной функцией. Существует также

силамарин - флавоноид, имеющий три структурные формы: силабинин, силадианин и силахристин, которые экстрагируются из семян и плодов чертополоха *Silybum marianum* (*Compositae*). Силамарин стимулирует энзимную активность ДНК-зависимой РНК полимеразы I и последующий синтез РНК и протеинов, приводя к активации биосинтеза ДНК и клеточной пролиферации, тем самым, восстанавливая поврежденные клетки печени. Силамарин увеличивает пролиферацию гепатоцитов в ответ на FB1 (фумонизин B1 – микотоксин, вырабатываемый *Fusarium verticillioides*), вырабатываемого при смерти клетки. Фармакологические свойства силамарина заключаются в участии в регуляции проницаемости и целостности клеточных мембран, подавлении образования и активности лейкотриенов, супрессии NF-kB активности, угнетении киназ и продукции коллагена. Силамарин нашел свое применение в лечении цирроза, ишемического воспаления печени, а также при ее токсическом повреждении ацетаминофеном и грибами (HeQ. et al., 2004).

Также антиоксиданты обладают и антибактериальной функцией. К антибактериальным флавоноидам относятся апигенин, галангин, гликозиды флавонов и флавонолов, изофлавононы, флаваноны и халконы. Антибактериальные флавоноиды действуют на многочисленные клеточные мишени. Одним из механизмов контакта флавоноида с клеткой является образование комплекса с белками за счет водородных и ковалентных связей, и гидрофобного взаимодействия. Таким образом, антимикробное действие заключается в способности инактивировать микробные адгезины, энзимы, а также в транспорте белков через клеточную оболочку. Липофильные флавоноиды могут разрушать микробную мембрану. Например, липохалконы А и С, экстрагируемые из корней лакричника (*Glycyrrhiza inflata*) активны в отношении *S. Aureus* и *Micrococcus luteus*. Липохалкон подавляет включение радиоактивного предшественника в макромолекулы (ДНК, РНК и протеины). Этот способ похож на действие антибиотиков, подавляющих дыхательную цепь. В ходе дальнейших исследований было обнаружено, что воздействие липохалкона происходит в промежутке между CoQ и цитохромом С в бактериальной дыхательной электронно-транспортной цепи (Naraguchi H. et al., 1998).

Кроме выше указанных свойств, у флавоноидов существует ряд механизмов, с помощью которых они снижают онкогенную активность:

1. Регуляция мутантного p53 протеина
2. Блокировка клеточного цикла
3. Подавление тирозинкиназы
4. Подавление белков теплового шока
5. Подавление экспрессии *Ras* белков
6. Эстроген рецепторная связывающая способность

Известно, что кверцетин способствует торможению клеточного цикла в пролиферирующих лимфоидных клетках. Кроме того, он подавляет рост опухолевых клеток *in vitro*, включая клетки лейкемии (P-388), желудочные раковые клетки (*HGC-27*, *NUGC-2*, *NKN-7*, и *MKN-28*), раковые клетки толстой кишки (*COLON 320 DM*) и другие. Предположительно, противораковая активность кверцетина связана с его взаимодействием с эстроген-связывающим сайтом 2 ядерного типа (*nuclear type II estrogen binding sites, EBS*). Это было экспериментально доказано увеличением сигнальной трансдукции в человеческих клетках рака груди, где кверцетин действовал как антипролиферативный агент (Davis W. L. and Matthew S. B., 2000).

Противовирусные эффекты АО флавоноидов также доказаны многочисленными исследованиями, например Wang J. и соавт., (2014). Многие флавоноиды ингибируют активность таких вирусов как вирус герпеса 1 и 2 типа, вирус парагриппа, аденовирус, респираторно-синцитиальный вирус. Кроме того, АО могут воздействовать на внутриклеточную репликацию вирусов или подавлять инфекционные свойства вирусов (Peterhans E., 1997). Было подтверждено, что флаван-3-олы более эффективны, чем флавоны и флавонолы в качестве ингибитора HIV-1, HIV- 2 (таблица 19).

Таблица 19 – Противовирусная активность флавоноидов

ФЛАВОНОИД	ВИРУС
Кверцетин	Вирус герпеса, парагриппа, полиовирус, Менго вирус, вирус бешенства, вирус болезни Ауески (псевдобешенства)
Рутин	Вирус гриппа, парагриппа, вирус картофеля
Апигенин	Вирус иммунодефицита, простого герпеса, вирус болезни Ауески
Нарингенин	Респираторно-синцитиальный вирус
Лутеолин	Вирус болезни Ауески
Морин	Вирус картофеля
Галангин	Вирус простого герпеса

Байкалин, флавоноид экстрагируемый из Шлемника Байкальского *Scutellaria baicalensis* (Губоцветные, *Lamiaceae*), подавляет репликацию HIV-1. Байкалин и другие флавоноиды, такие как робустфлавоны и хинокифлавоны ингибируют обратную транскриптазу HIV-1. Кверцетин обладает противовирусной активностью в отношении вируса псевдобешенства и простого герпеса. Многие флавоноиды, среди которых, дигидрокверцетин, дигидрофисетин, лейкоцианидин, хлорид пеларгонидина и катехин показывают активность в отношении

нескольких вирусов, в том числе, и против полиовируса, HSV, респираторно синцитиального вируса и вируса Синдбис (Li B. Q. et al., 2000).

В нашей работе эксперименты *in vivo* также подтвердили наличие противовирусных свойств у ДКВ. При титровании на клетках *Vero* гомогенатов из ПЖ мышей, зараженных вирусом Коксаки В4 и пролеченных ДКВ, были выявлены более низкие вирусные титры по сравнению с контролем вируса. Данные сравнительного гистологического анализа каждой из групп (КВ, интактные мыши и КВ+ДКВ) подтвердили эффективность терапии ДКВ, выявив уменьшение воспалительных инфильтратов и большую сохранность морфологии ткани.

В этих группах животных также было определен уровень общего ИФН в сыворотке крови. В результате было выявлено отсутствие дополнительной выработки ИФН при ЭВИ. Согласно литературным источникам, при ЭВИ происходит угнетение экспрессии ИФН γ , фактора некроза опухоли и ИФН-стимулирующего гена 54. Ингибирование указанных факторов происходит за счет действия 3С протеазы вируса, которая блокирует вирус-индуцированную активацию ИФН γ , воздействуя на цитозольную хеликазу *IRIG-I* (Pålsson-McDermott E.M. et al., 2007). Можно предположить, что способность использованного в экспериментах энтеровируса к блокированию выработки настолько эффективна, что не позволяет выявить усиления его продукции при вирусной инфекции. Дигидрокверцетин, как было показано в экспериментах, не проявил интерферон-стимулирующей активности у инфицированных животных.

В ходе проведенных экспериментов нами было показано значительное снижение уровня антиоксидантных процессов в ткани поджелудочной железы мышей при энтеровирусном панкреатите. Известно, что любое воспаление сопровождается повышением активности окислительных процессов в его очаге. Для поддержания гомеостаза ткани в организме запускаются механизмы антиоксидантной защиты, призванные предотвратить избыточную генерацию свободных радикалов и разрушение ткани. Особую важность эти механизмы приобретают в случае массовой миграции в очаги воспаления полиморфноядерных лейкоцитов, как это имеет место при вирусном панкреатите и показано нами при помощи морфологического анализа ткани. Можно предполагать, что в этом случае происходит избыточная генерация свободных радикалов, и потенциалы антиоксидантной защиты истощаются, что и было зафиксировано нами как снижение антиоксидантной активности. Вследствие этого в ткани нарушается баланс окислительных и антиоксидантных процессов, что является дополнительным фактором повреждения органа-мишени.

В результате проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что внедрение в схему лечения энтеровирусной инфекции дополнительной АО терапии или создание комплексного противовирусного препарата на основе АО может приостановить развитие вирус-индуцированного поражения ПЖ, в том числе, возможно, и ИЗД 1 типа. Препарат ДКВ,

успешно зарекомендовавший себя в наших экспериментах, может стать базовой платформой при создании комплексного противовирусного препарата в отношении вируса Коксаки В4, а также положить начало исследованиям в РФ по поиску и разработке новых АО соединений и препаратов для борьбы с пикорнавирусами.

Для наглядности все результаты побиологической активности ДКВ, полученные в рамках разработки нашего направления исследований, сведены в таблицу 20. В таблице знаками "+" и "-" отмечено наличие или отсутствие того или иного типа активности, соответственно.

Таблица 20 – Оценка свойств ДКВ в качестве противовирусного средства в отношении вируса CVB4

Название опыта	Наличие или отсутствие активности
АОА// <i>cell free system</i>	+
Противовирусная активность, в том числе и методом бляшек// <i>in vitro</i>	+
Вирулицидная активность// <i>in vitro</i>	–
Выработка вирусом резистентности// <i>in vitro</i>	–
Противовирусная активность// <i>in vivo</i>	+
Нормализация морфологических характеристик ткани ПЖ// <i>in vivo</i>	+
АОАвткани// <i>in vivo</i>	+
Индукция ИФН// <i>in vivo</i>	–

Многие вирусные инфекции вызывают состояние окислительного стресса в зараженной клетке, ткани и целом органе. Это было доказано в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах. Например, вирус герпеса 1 типа, вызывающий развитие спорадического энцефалита, стимулирует выработку свободных радикалов в клеточной культуре *P19N* (клетки карциномы мышей нейронного фенотипа). Kavouras J. H. и соавт., 2007 предположили, что окислительный стресс необходим данному вирусу для его входа в клетку и дальнейшей репликации. Таким образом, можно предположить, что и при инфицировании Коксаки В4 клеточной культуры *Vero* происходит повышение числа свободных радикалов, необходимых вирусу на определенном этапе жизненного цикла. Точный механизм воздействия окислительного стресса, как и свободных радикалов в целом, на его репликацию пока не известен.

Окислительный стресс при вирусной инфекции на модели *in vivo* можно рассматривать как важный фактор вирусного патогенеза. Препарат ДКВ, доказавший свою эффективность в опытах *in vivo*, работает как прямой противовирусный препарат. Мы предполагаем, что ДКВ обладает комплексным механизмом активности. Во-первых, он способен к прямому вирусингибирующему действию, что было зафиксировано нами в культуре клеток. Во-вторых, дополнительным механизмом его действия может быть собственно антиоксидантная активность, что имеет важное значение при инфекции у животных. Окислительный стресс в поджелудочной железе, помимо свободных радикалов, индуцируемых непосредственно в инфицированных клетках, обусловлен также компонентами системы неспецифического иммунитета, в частности, нейтрофилами, мигрирующими в очаг вирусного воспаления. Генерируемые нейтрофилами свободные радикалы являются существенным фактором патогенеза панкреатита, и их нейтрализация при помощи антиоксидантов может существенно облегчать ход заболевания, обеспечивая сохранность ткани-мишени.

На правомочность такого вывода указывают данные авторов, исследовавших биологическую активность ДКВ. Например, Weidmann A. E. (2012) сообщает о противовирусном действии ДКВ в отношении вируса гепатита С за счет подавления радикальных реакций, вызванных апоптозными процессами в печени крыс. С другой стороны, нельзя исключать возможность другого противовирусного механизма. Например, антиоксидант силамарин ингибирует вирус гепатита С за счет угнетения активности вирусной РНК-полимеразы. Не исключено также и наличие у ДКВ, наряду с двумя упомянутыми типами активности, противовоспалительных свойств, что также может вносить вклад в его суммарное протективное действие при энтеровирусном панкреатите. Спорные моменты в обсуждении механизма действия ДКВ являются почвой для дальнейших исследований в этой области, выявления возможной связи между химической структурой природных антиоксидантов и механизмом их действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М.И. Эндокринология – М.: Универсум Паблишинг, 1998- 450с
2. Баранов В.Г. Руководство по клинической эндокринологии – Л.: Медицина, 1977-663с
3. Королева Г.А., Лашкевич В.А., Савинов А.П. Штамм вируса echo типа 11 для серологической диагностики энтеровирусного увеита у детей [электронный ресурс]//– Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/203/2031942.html> (дата обращения: 07.06.2015)
4. Новицкий В.В., Гольдберг Е.Д., Уразова О.И. Патолофизиология. Том 1- 4-е изд., перераб. и доп. –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - Т. 1. - 848 с.
5. Новокшенова А.А., Учайкин В.Ф., Соколова Н.В. Этиопатогенетическая терапия острых кишечных инфекций у детей на современном этапе. //Леч. Врач-2010-В.1
6. Франклин Рузвельт [электронный ресурс]//Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Рузвельт,_Франклин (дата обращения: 01.02.2014)
7. Энтеровирусные инфекции, лечение, причины, симптомы, профилактика [электронный ресурс]//Режим доступа: <http://www.pitermed.com/simptomny-bolezni/?cat=6&word=55036> (дата обращения: 02.03.2016).
8. Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусных (неполио) инфекций. Методические указания. МУУ. 3.1.1.2363-08 (Утверждено Роспотребнадзором 25.05.2008)[электронный ресурс]//Режим доступа: <https://www.lawmix.ru/expertlaw/60032> (дата обращения: 04.06.2013)
9. Эпидемический геморрагический конъюнктивит [электронный ресурс]//Режим доступа: <http://www.krasotaimedicina.ru/diseases/ophthalmology/epidemic-hemorrhagic-conjunctivitis> (дата обращения: 04.04.2015)
10. Alidjinou E.K., Sané F., Engelmann I., Geenen V., Hober D. Enterovirus persistence as a mechanism in the pathogenesis of type 1 diabetes. // Discov Med.- 2014 –V.18-P.273-282.
11. Andries K., Dewindt B., Snoeks J., Willebrords R., Van Eemeren K., Stokbroekx R., Janssen P.A. In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. // Antimicrob Agents Chemother-1992-V.36-P.100–107.
12. Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. // Am J Med-2000- V.109-P.33-44
13. Badger J., Minor I., Oliveira M.A., Smith T.J., Rossmann M.G. Structural analysis of antiviral agents that interact with the capsid of human rhinoviruses. // Proteins -1989-V.6-P.1–19.
14. Biesbroeck L., Sidbury R. Viral exanthems: an update. // Dermatol Ther.- 2013-V.26-P.433-438.
15. Brill G.M., Kati W.M., Montgomery D., Karwowski J.P., Humphrey P.E, Jackson M., Clement J.J., Kadam S., Chen R.H., McAlpine J.B. Novel triterpene sulfates from *Fusarium compactum* using a rhinovirus 3C protease inhibitor screen. // J Antibiot – 1996-V.49-P.541–546.

16. Camby I., Le Mercier M., Lefranc F., Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions // *Glycobiology* -2006-V.16- 137R–157R.
17. Carthy C.M., Granville D.J., Watson K.A., Anderson D.R., Wilson J.E., Yang D., Hunt D.W. and McManus B.M. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. // *J Virol* -1998—V.72- P. 7669-7675.
18. Chang C.S., Lin Y.T., Shih S.R., Lee C.C., Lee Y.C., Tai C.L., Tseng S.N., Chern J.H. Design, synthesis, and antipicornavirus activity of 1-5-(4-arylphenoxy)alkyl-3-pyridin-4-ylimidazolidin-2-one derivatives. // *J Med Chem*- 2005-V.48-P.3522–3535
19. Cherian A., Baheti N.N., Easwar H.V., Nair D. S., and Iype T. Recurrent meningitis due to epidermoid // *J Pediatr Neuroscience* -2012 –V.7(1)-P.47–48
20. Cheung P.P., Watson S.J., Choy K.T., Fun S. S., Wong D.D., Poon L.L., Kellam P., Guan Y., Malik P.J.S., Yen H.L. Generation and characterization of influenza A viruses with altered polymerase fidelity // *Nat Commun.* -2014 –V.5- doi: 10.1038/ncomms5794.
21. Chiramel I. A., Brady R.N. and Bartenschlager R. Divergent Roles of Autophagy in Virus Infection // *Cells*-2013-V.2-P.83-104
22. Conti C., Mastromarino P., Goldoni P., Portalone G., Desideri N. Synthesis and anti-rhinovirus properties of fluoro-substituted flavonoids. // *Antivir Chem Chemother*-2005-V.16-P.267–276
23. Daniel S. Longnecker. Anatomy and Histology of the Pancreas // *Pancreapedia*- 2014 – V.1.0- DOI: 10.3998/panc.2014.3/
24. Davis W.L. and Matthew S.B. Antioxidants and cancer III: quercetin. // *Alternative Medicine Review*-2000- V. 5-P.196– 208
25. De Palma M. A., Vliegen I., De Clercq E., Neyt J. Selective Inhibitors of Picornavirus Replication // *Medicinal Research Reviews*-2008- DOI 10.1002/med.20125.
26. Desideri N., Conti C., Sestili I., Tomao P., Stein M.L., Orsi N. In vitro evaluation of the anti-picornavirus activities of new synthetic flavonoids. // *Antivir Chem Chemother*- 1995-V.6-P.298–306.
27. Desideri N., Olivieri S., Stein M.L., Sgro R., Orsi N., Conti C. Synthesis and anti-picornavirus activity of homo-isoflavonoids. // *Antivir Chem Chemother* -1997-V.8-P.545–555.
28. Diana G.D., Rudewicz P., Pevear D.C., Nitz T.J., Aldous S.C., Aldous D.J., Robinson D.T., Draper T., Dutko F.J., Aldi C. Picornavirus inhibitors: Trifluoromethyl substitution provides a global protective effect against hepatic metabolism. // *J Med Chem* -1995-V.38-P.1355–1371.
29. Dotta F., Censini S., Van Halteren A.G.S., Marselli L., Masini M., Dionisi S., Mosca F., Boggi U., Muda A.O., Del Prato S., Elliott J. F., Covacci A., Rappuoli R., Roep B. O., and Marchetti P. Coxsackie B4 virus infection of cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic // *PNAS*-2007-V.104(12)-P.5115-5120

30. Fairweather D., Frisancho-Kiss S., Yusung S. A., Barrett M. A., Davis S. E., Gatewood S. J. L., Njoku D. B., Rose N. R. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart // *American Journal of Pathology*-2004-V.165(6)-P.1883-94
31. Gaudernak E., Seipelt J., Triendl A., Grassauer A., Kuechler E. Antiviral effects of pyrrolidinedithiocarbamate on human rhinoviruses.// *J Virol*- 2002-V.76-P.6004–6015.
32. Christophe M. F. and Matthias G. von H. Viral trigger for type 1 diabetes// *Diabetes*-2008-V.57(11)-P.2863-2871
33. Grist N. R., Bell E. J., Reid D. The epidemiology of enteroviruses.// *Scott Med J.* -1975- V.20(1)-P.27-31
34. Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine* // Oxford University Press-1998
35. Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K. and Kinoshita T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. // *Phytochemistry*-1998-V. 48-P.125–129
36. He Q., Kim J., Sharma R. P. Silymarin protects against liver damage in balb/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases// *Toxicological Sciences* - 2004-V.80-P.335–342
37. Heinz B. A., Vance L. M. The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus. // *J Virol* -1995-V.69-P.4189–4197
38. Heinz B. A., Vance L. M. Sequence determinants of 3A-mediated resistance to enviroxime in rhinoviruses and enteroviruses. // *J Virol* -1996-V.70-P.4854–4857
39. Hill R. D., Vederas J. C. Azodicarboxamides: A new class of cysteine proteinase inhibitor for hepatitis A virus and human rhinovirus 3C enzymes. // *J Org Chem*- 1999-V.64-P.9538–9546.
40. Hollman P. C. H., Buijsman M. N. C. P., Van Gameren Y., Cnossen P. J., De Vries J. H. M., Katan M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man// *Free Radical Research*-1999- V. 31-P. 569– 573
41. Huber S. A., Budd R. C., Rossner K. and Newell M. K. Apoptosis in coxsackievirus B3- induced myocarditis and dilated cardiomyopathy. // *Ann N Y Acad Sci* -1999- V.887-P.181-190
42. Huffman J. H., Sidwell R. W., Khare G. P., Witkowski J. T., Allen L. B., Robins R. K. In Vitro Effect of 1-β-d-Ribofuranosyl-1,2,4-Triazole-3-Carboxamide (Virazole, ICN 1229) on Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid Viruses// *Antimicrob Agents Chemother*-1973-V.3(2)-P.235–241.
43. Hyypiä T., Hovi T., Knowles N. J., and Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties// *J Gen Virol* -1997 –V.78-P. 1-11.

44. Hyypiä T., Horsnell C., Maaronen M., Khan M., Kalkkinen N., Auvinen P., Kinnunen L. and Stanway G. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. //Proc Natl Acad Sci - 1992- V.89-P. 8847-8851
45. Ishitsuka H., Ohsawa C., Ohiwa T., Umeda I., Suhara Y. Antipicornavirus flavone Ro 09-0179// Antimicrob Agents Chemother -1982-V.22-P.611–616.
46. Jiang P., Ying Liu Y., Ma H.-C., Paul A.V., Wimmer E. Picornavirus morphogenesis//Microbiol. Mol. Biol. Rev.-2014-V.78-№3-P.418-437
47. Jubelt B., Lipton H.L. Enterovirus/picornavirus infections. //Handb Clin Neurol. -2014-V.123-P.379-416.
48. Kajimoto Y., Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. //Ann N Y Acad Sci. -2004-V.1011-P.168-76/
49. Karalyan Z.A., Avagyan H.R., Zakaryan H.S., Abroyan L.O., Hakobyan L.H., Avetisyan A.S., Karalova E.M.Changes in the Nuclei of Infected Cells at Early Stages of Infection with EMCV//CellBio-2013-V.2- No.3
50. Kenny M.T., Dulworth J.K., Torney H.L. In vitro and in vivo anti-picornavirus activity of some p-benzoylphenoxypyridines.// Antiviral Res -1986-V.6-P.355–367.
51. Kiehlmann E., Edmond P.M. Isomerisation of dihydroquercetin. //J. Nat. Prod.-1995-V. 58-P.450–455
52. King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Knowles N.J., Lemon S.M., Palmenberg A.C., Skern T. and Stanway G. Picornaviridae. In "Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses"//Academic Press- 2000-P.996.
53. Kirsi J.J., North J.A., McKernan P.A., Murray B.K., Canonico P.G., Huggins J.W., Srivastava P.C.,Robins R.K. Broad-spectrum antiviral activity of 2-beta-D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide, a new antiviral agent//Antimicrob Agents Chemother- 1983-V.24(3)-P.353–361.
54. Klein M., Hadaschik D., Zimmermann H., Eggers H.J., Nelsen-Salz B. The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: The significance of viral protein 2C. //J Gen Virol 2000-V.81-P.895–901.
55. König H., Rosenwirth B. Purification and partial characterization of poliovirus protease 2A by means of a functional assay. //J Virol- 1988-V.62-P.1243–1250.
56. Kooy N.W., Royall J.A., Ischiropoulos H. and Beckman J.S.Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. //Free Radic Biol Med -1994-V.16-P.149-156
57. Kraus W., Zimmermann H., Eggers H.J., Nelsen-Salz B. Rhodanine resistance and dependence of echovirus 12: A possible consequence of capsid flexibility. //J Virol- 1997-V.71-P.1697–1702.

58. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview//The ScientificWorld Journal-2013- ID 162750
59. Kuz'min V.E., Artemenko A.G., Muratov E.N., Volineckaya I.L., Makarov V.A., Riabova O.B., Wutzler P., Schmidtke M. Quantitative structure-activity relationship studies of (biphenyloxy)propylisoxazole derivatives. Inhibitors of human rhinovirus 2 replication. //J Med Chem -2007-V.50-P.4205–4213.
60. Lanke K., Krenn B.M., Melchers W.J., Seipelt J., Van Kuppeveld F.J. PDTC inhibits picornavirus polyprotein processing and RNA replication by transporting zinc ions into cells. //J Gen Virol -2007-V.88-P.1206– 1217
61. Larin N.M., Copping M.P., Herbst-Laier R.H., Roberts B., Wenham R.B. Antiviral activity of gliotoxin. //Chemotherapy -1965-V.10-P.12–23.
62. Lazarus A.S., Johnston E.A., Galbraith J.E. An outbreak of epidemic pleurodynia, with special reference to the laboratory Diagnosis of Coxsackie Virus Infections //Amer. J. of Public Health-1952-V.42-P.20-26
63. Li B.Q., T. Fu T., Dongyan Y., Mikovits J. A., Ruscetti F. W. and Wang J. M. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry//Biochemical and Biophysical Research Communications-2000-V. 276-P.534–538.
64. Li Z.-H., Li C.-M., Ling P., Shen F.-H., Chen S.-H., Liu C.-C., Yu C.-K.Chen S.-H. Ribavirin Reduces Mortality in Enterovirus 71–Infected Mice by Decreasing Viral Replication//J Infect Dis.-2008-V.197(6)-P.854-857
65. Lim T., Yuan J., Zhang H.M, Sall A., Liu Z., Su Y., Yang D. Antisense DNA and RNA agents against picornaviruses//Front Biosc.-2008-V.1-P.4707-25
66. Limpens R.W.A.L.,Hilde M. van der S.,Darshan K.,Koster A.J.,Snijder E.J.,Frank J. M. van Kuppeveld,Bárcena M. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments//mBio-2011-V.2(5)-doi:10.1128/mBio.00166-11
67. Lowe C., Vederas J.C. Naturally-occurring beta-lactones—Occurrence, syntheses and properties—A review. //Org Prep Proc Int -1995-V.27-P.305–346.
68. Luo X., Wu J., Jing S., Yan L.J.Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity//Aging Dis. -2016-V.2-P.90-110. doi: 10.14336/AD.2015.0702/
69. Mahomoodally M.F., Gurib-Fakim A., Subratty A.H. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius// Pharmaceutical Biology-2005 -V. 43-P. 237–242.
70. Manthey J.A.Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation.// Microcirculation-2000- V. 7-P. S29–S34

71. Melnick J.L. The discovery of enteroviruses and the classification of poliovirus among them//*Biologicals* - 1993-V.21-P.305-309
72. Melnick J.L, Phillips C. A. Enteroviruses: vaccines, epidemiology, diagnosis, classification // *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* -1970-V.1(1)-P.87-118.
73. Miller S. and Krijnse-Locker J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication // *nature reviews / microbiology* – 2008- V.6 – P.363-374
74. Molla A., Hellen C.U., Wimmer E. Inhibition of proteolytic activity of poliovirus and rhinovirus 2A proteinases by elastase-specific inhibitors.// *J Virol*- 1993-V.67-P.4688–4695.
75. Muehlenbachs A., Bhatnagar J., Zaki S.R. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection//*J Pathol.* -2015-V.235-P.217-218.
76. Murray M.A., Janc J.W., Venkatraman S., Babe .LM. Peptidyl diazomethyl ketones inhibit the human rhinovirus 3C protease: Effect on virus yield by partial block of P3 polyprotein processing // *Antivir Chemotherapy*- 2001-V.12-P.273–281.
77. Nagafuchi S., Toniolo A. Viral diabetes: Virus diabetogenicity and host susceptibility// *Immunoendocrinology* -2015-V.2-P.1-13
78. Ninomiya Y., Aoyama M., Umeda I., Suhara Y., Ishitsuka H. Comparative studies on the modes of action of the antirhinovirus agents Ro 09-0410, Ro 09-0179, RMI-15,731, 4_o,6-dichloroflavan, and enviroxime.// *Antimicrob Agents Chemother*- 1985-V.27-P.595–599.
79. Norder H., De Palma A.M., Selisko B., Costenaro L., Papageorgiou N., Arnan C., Coutard B., Lantez V., De Lamballerie X., Baronti C., Solà M., Tan J., Neyts J., Canard B., Coll M., Gorbalenya A.E., Hilgenfeld R. Picornavirus non-structural proteins as targets for new antivirals with broad activity// *Antiviral Research*-2011-V.89(3)-P.204-218
80. Oestereich S., Rieger T., Neumann M., Bernreuther C., Lehmann M., Krasemann S., Wurr S., Emmerich P., De Lamballerie X., Ölschläger S., Günther S. Evaluation of Antiviral Efficacy of Ribavirin, Arbidol, and T-705 (Favipiravir) in a Mouse Model for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever// *PLOS*-2014-DOI: 10.1371/journal.pntd.0002804
81. Palacios G., Oberste M.S. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases// *J Neurovirol.* -2005-V.11(5)-P.424-33.
82. Pallansch M.A. Coxsackievirus B epidemiology and public health concerns. // *Curr Top Microbiol Immunol.* -1997-V.223-P.13-30.
83. Pålsson-McDermott E.M., O’Neill L.A. Building an immune system from nine domains. *Biochem.*// *Soc. Trans.*-2007-V.35 –P.1437–1444.
84. Pankuweit S., Klingel K. Viral myocarditis: from experimental models to molecular diagnosis in patients. // *Heart Fail Rev.* -2013-V.18-P.683-702.
85. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants// *J Nat Prod.*-2000 –V.63(7)-P.1035-42

86. Pipeleers D., Hoorens A., Marichal-Pipeleers M., Van de Casteele M., Bouwens L. and Ling Z. Role of pancreatic beta-cells in the process of beta-cell death. //Diabetes -2001 –V.50 – P.52-57.
87. Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation//J. Nutritional Sciences-1997-V.127-P.9625-9655
88. Rasilainen S. Coxsackievirus infections and oxidative stress as mediators of beta cell damage – Academic Dissertation- 2004–P.70
89. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids//Free Radic Biol Med -1996-V.20(7)-P.933-956.
90. Richardson S.J., Leete P., Bone A.J., Foulis A.K., Morgan N.G. Expression of the enteroviral capsid protein VP1 in the islet cells of patients with type 1 diabetes is associated with induction of protein kinase R and downregulation of Mcl-1// Diabetologia-2013 –V.56-P.185-93.
91. Roep B.O., Hiemstra H.S., Schloot N.C., De Vries R.R., Chaudhuri A., Behan P.O. and Drijfhout J.W. Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus. //Ann N Y Acad Sci-2002-V.958-P. 163-165
92. Rogozhin V.V., Peretolchin D.V. Kinetic regulation of dihydroquercetin oxidation with horseradish peroxidase. Russ.// J. Bioorg. Chem.-2009- V.35-P.576–580
93. Rohdewald P.A. review of the French maritime pine bark extract (pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. //Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.-2002-V. 40-P.158–168.
94. Rossmann M.G. The canyon hypothesis. //Viral Immunol -1989- V.2-P.143–161
95. Rothe D., Werk D., Dutkiewicz M., Schubert S., Grunert H.P., Zeichhardt H., Erdmann V.A., Fechner H., Kurreck J. Inhibition of picornaviruses by means of RNA interference//Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)- 2008-V.52-P.63-4
96. Salah N., Miller J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidants. //Arch. Biochem. Biophys.-1995-V. 322-P.339–346
97. Sawyer M.H. Enterovirus infections: diagnosis and treatment.// Pediatr Infect Dis J. 1999 – V.18(12)-P.1033-9.
98. Si X., McManus B.M., Zhang J., Yuan J., Cheung C., Esfandiarei M., Suarez A., Morgan A., Luo H. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces coxsackievirus B3 replication through inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway//J Virol- 2005-V.79-P.8014–8023

99. Sidwell R.W., Huffman J.H., Khare G.P., Allen L.B., Witkowski J.T., Robins R.K. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide//*Science*-1972-V.177(4050)-P.705-6.
100. Sidwell R.W., Huffman J.H., Barnett B.B., Pifat D.Y. In vitro and in vivo phlebovirus inhibition by ribavirin//*Antimicrobial agents and chemotherapy*-1988-V.32(3)-P.331-336
101. Skog O. Effects of enterovirus infection on innate immunity and beta cell function in human islets of Langerhans. //Upsala University-2012
102. Slee E.A., Zhu H., Chow S.C., MacFarlane M., Nicholson D.W., Cohen G.M. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of C PP32.//*Biochem J* -1996-V.315-P.21–24
103. Slimestad R., Fossen T., Vagen I.M. Onions: a source of unique dietary flavonoids.// *J. Agric. Food Chem.*-2007-V. 55-P.10067–10080
104. Tait S, Salvati AL, Desideri N, Fiore L. Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses. //*Antiviral Res* 2006-V.72-P.252–255.
105. Takada H., Kishimoto C., and Hiraoka Y. Therapy with immunoglobulin suppresses myocarditis in a murine coxsackievirus B3 model. Antiviral and anti-inflammatory effects.// *Circulation*-1995 -V.92-P.1604-11
106. Venkatraman S., Kong J., Nimkar S., Wang Q.M., Aube J., Hanzlik R.P. Design, synthesis, and evaluation of azapeptides as substrates and inhibitors for human rhinovirus 3C protease// *Bioorg Med Chem Lett*-1999-V.9-P.577–580.
107. Verlinden Y., Cuconati A., Wimmer E., Rombaut B. The antiviral compound 5-(3,4-dichlorophenyl) methylhydantoin inhibits the post-synthetic cleavages and the assembly of poliovirus in a cell-free system.// *Antiviral Res* -2000-V.48-P.61–69
108. Wagoner J., Negash A., Kane O.J., Martinez L.E., Nahmias Y., Bourne N., Owen D.M., Grove J., Brimacombe C., McKeating J.A., Pécheur E.L., Graft N. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle.// *Hepatology* -2010-V.51-P. 1912–1921
109. Wallace S.N., Carrier D.J., Clausen E.C. Batch solvent extraction of flavonolignans from milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertner).// *Phytochem. Anal.*-2005-V. 16-P.7–16.
110. Wang Q.M., Johnson R.B., Jungheim L.N., Cohen J.D., Villarreal E.C. Dual inhibition of human rhinovirus 2A and 3C proteases by homophthalimides.//*Antimicrob Agents Chemother* -1998-V.42-P.916–920
111. Webber S.E., Tikhe J., Worland S.T., Fuhrman S.A., Hendrickson T.F., Matthews D.A., Love R.A., Patick A.K., Meador J.W., Ferre R.A., Brown E.L., DeLisle D.M., Ford C.E., Binford S.L. Design, synthesis, and evaluation of nonpeptidic inhibitors of human rhinovirus 3C protease.//*J Med Chem*- 1996 -V.39-P.5072–5082

112. Weidmann A.E. Dihydroquercetin: More than just an impurity? //European Journal of Pharmacology-2012-V.684- P. 19–26
113. Whiteman M. and Halliwell B. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. //Free Radic Res -1996-V.25-P. 275-283.
114. Xian M., Wang Q.M., Chen X., Wang K., Wang P.G. S-nitrosothiols as novel, reversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease //Bioorg Med Chem Lett- 2000-V.10-P.2097–2100.
115. Yamashita T., Sakae K., Tsuzuki H., Suzuki Y., Ishikawa N., Takeda N., Miyamura T. and Yamazaki S. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. //J Virology - 1998-V.72- P.8408-8412.
116. Yang D., Zhang H.M., Xin Ye X., Zhang L., Dai H. New Trends in the Development of Treatments of Viral Myocarditis// Intech-2013-V.8-P.167-196
117. Yasin S.R., Al Nakib W., Tyrrell D.A. Pathogenicity for humans of human rhinovirus type 2 mutants resistant to or dependent on chalcone Ro 09-0410. //Antimicrob Agents Chemother - 1990-V.34-P.963–966.
118. Yin-Murphy M., Phoon MC, Ishak B. Enterovirus and enterovirus infections. //Ann Acad Med Singapore. -1987-V.16(4)-P.683-8.
119. Yoon J.W. Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. //Ann Med. -1991-V.23(4)-P.437-45.
120. Zalman L.S., Brothers M.A., Dragovich P.S., Zhou R., Prins T.J., Worland S.T., Patick A.K. Inhibition of human rhinovirus-induced cytokine production by AG7088, a human rhinovirus 3C protease inhibitor. //Antimicrob Agents Chemother 2000-V.44-P.1236–1241.