

УДК 578.833.26:578.76:577.27:616.831-002

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОПАТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ С ВИЗУАЛЬНЫМИ ПРИЗНАКАМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

¹Саличев А.В., ¹Гришина К.Г., ¹Ворович М.Ф., ²Кожевникова Т.Н.,

²Санин А.В., ²Пронин А.В., ²Наровлянский А.Н., ¹Ожерелков С.В.

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН, Московская обл., Ленинский район, поселок сельского типа Институт полиомиелита, e-mail: antoniyo@yandex.ru;

²НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

Исследована транскрипционная активность генов некоторых цитокинов (ЦТ) в головном мозге мышей при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) после интрацеребрального заражения. Животные были разделены на группы с учетом выраженности признаков ВКЭ-инфекции. Показано, что ВКЭ-инфекция, сопровождающаяся неврологической симптоматикой, ассоциирована с высокими уровнями вирусной РНК в головном мозге. При этом регистрировались высокие уровни экспрессии генов провоспалительных ЦТ, что свидетельствует о выраженной воспалительной реакции, повреждающей головной мозг. Пероральное введение преднизолона достоверно снижало летальность инфицированных мышей. При и.ц. введении препарата на основе полипренилфосфата натрия (ППФ) наблюдалось снижение летальности с 67 % в группе животных, инфицированных ВКЭ, до 9 % в группе мышей, которым одновременно вводили ППФ и ВКЭ. При этом обнаружено, что и.ц. введение ППФ вызывает увеличение экспрессии гена IL6 в головном мозге в 5,4 раз по сравнению с контролем через 6 часов после введения, что, по-видимому, обуславливает активацию механизмов естественной резистентности и раннее подавление репродукции вируса. Эксперименты с антителами (АТ) к ВКЭ показали, что защитные свойства АТ проявляются лишь при условии их применения до или на ранних сроках после инфицирования. Введение АТ через 3–4 суток после интраперитонеального заражения мышей было неэффективно. Использование инъекций ППФ на поздних сроках относительно инфицирования также малоэффективно. По-видимому, это связано со значительным иммунопатогенным действием ВКЭ в этот период времени. В то же время введение ППФ с АТ оказывало защитное действие.

Ключевые слова: иммунопатогенез клещевого энцефалита, цитокиновый шторм, полипренилфосфат натрия, антитела против вируса клещевого энцефалита

MOLECULAR MECHANISMS OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IMMUNOPATHOGENIC EFFECT IN THE BRAIN OF MICE WITH VISIBLE DISEASE SYMPTOMS

¹Salichev A.V., ¹Grishina K.G., ¹Vorovich M.F., ²Kozhevnikova T.N.,

²Sanin A.V., ²Pronin A.V., ²Narovlyansky A.N., ¹Ozherelkov S.V.

¹M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis Russian Academy of Medical Science, e-mail: antoniyo@yandex.ru;

²N.F. Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation

Transcription activity of different cytokines genes in the brain of mice following experimental intracerebral infection tick-borne encephalitis virus (TBEV) was studied. Mice were divided into groups according to degree of TBEV-induced disease symptoms expression. We showed that TBEV-induced infection accompanied by neurologic symptoms is associated with high level of the viral RNA in the brain. Concomitantly we found high level of proinflammatory cytokines genes expression, which might be the evidence of the brain-damaging inflammatory response development. Prednisolon drug given per os was shown to decrease the infected mice mortality. The maximal level of mice protection against TBEV infection was registered with intracerebral application of polyprénylphosphates-containing medicine (PP). 6 hours following PP intracerebral injection 5,4-fold increase of IL6 gene expression in the brain was found, which might promote activation of the innate immunity mechanisms as well as early suppression of TBEV reproduction. Experiments using specific anti TBEV antibodies proved that their protective in vivo effect was observed only at early stages of infection. Inoculation of the antibodies 24–48 hours before visual encephalitis symptoms appearance was not effective. Also PP shown little protective effect when inoculated at later stage of infection. This could be attributed to TBEV significant immunopathogenic effect induced at this period. On the other hand, simultaneous inoculation of PP and antibodies exerted protective effect.

Keywords: tick-borne encephalitis immunopathogenesis, neuroinflammation, polyprénylphosphate, cytokines, anti TBEV antibodies

Клещевой энцефалит (КЭ) – инфекционное, вирусное, природно-очаговое заболевание, сопровождающееся воспалительными изменениями в нервной системе. Заболеваемость человека КЭ регистрируется более чем в 30 странах мира [7]. Очаги клещевого

энцефалита распространены на всей территории Российской Федерации. КЭ отличается полиморфизмом клинических проявлений, обусловленных дистрофическими и некробиотическими процессами в нейронах головного и спинного мозга, диффуз-

ным периваскулярным отеком и изменениями миелиновой оболочки нервных волокон [7]. Хотя существуют достаточно надёжные вакцины против КЭ, заболевание имеет тенденцию к расширению, при этом возрастает число тяжёлых форм, на фоне которых регистрируются энцефалиты с летальным исходом. Имеются коммерческие антитела (АТ) к КЭ (класса IgG), однако их применение в качестве лечебных средств при КЭ остаётся под вопросом. Несмотря на интенсивный поиск лечебно-профилактических препаратов (в основном иммуномодуляторов), в настоящее время в медицинской практике большинство из них оказывается недостаточно эффективными. Вышеперечисленные проблемы в значительной степени связаны с недостаточной изученностью иммунопатогенеза КЭ. В настоящем исследовании нами в условиях эксперимента было изучено влияние препарата, содержащего полипренилфосфат натрия (ППФ), на течение инфекции, вызванной ВКЭ, у мышей и индукцию цитокинов (ЦТ) в головном мозге при интрацеребральном (и.ц.) введении вируса и препарата. Было показано, что визуальные признаки КЭ у мышей ассоциированы с выраженным увеличением экспрессии генов провоспалительных ЦТ в ткани головного мозга («цитокиновый шторм»). ППФ, введённый в мозг мышам одновременно с вирусом, предотвращал индуцированный «цитокиновый шторм» и развитие энцефалита. Выявлено, что человеческий IgG, введённый на ранних сроках относительно заражения вирусом, обладал способностью защищать животных, при этом введение АТ в более поздние сроки (за 1–3 суток до проявления клинических признаков КЭ) не препятствовало развитию клинически выраженного КЭ. Нами было экспериментально показано, что иммуномодулирующий препарат на основе ППФ обладал способностью потенцировать защитное действие АТ, введённых на поздних сроках относительно заражения.

Целью настоящего исследования было изучение молекулярных механизмов иммунопатогенного действия ВКЭ в головном мозге мышей с визуальными признаками инфекции и разработка экспериментального подхода к иммунотерапии КЭ.

Материал и методы исследования

Животные

В экспериментах использовали беспородных мышей обоего пола массой 10–14 г, а также самцов мышей линии Balb/c, полученных из питомника «Столбовая» РАМН. опыты на животных проводились согласно правилам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях.

Вирус

Использовали вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) /штамм Софьин/, высокопатогенный для мышей. ВКЭ получали из отделения энцефалитной вакцины Предприятия им. М.П. Чумакова. Вирус использовали в виде мозговой суспензии заболевших мышей-сосунков, заражённых и.ц. Предварительно вирус титровали на беспородных белых мышах массой 10–12 г, заражённых интраперитонеально (и.п.) или и.ц.

Препараты

1. В опытах использовали препарат, содержащий в виде действующего начала ППФ, полученный из ЗАО «Микро-плюс». В случае перорального введения препарата животных выпаивали по 0,1 мл ППФ в концентрации 1 мг/мл (100 мкг/мышь), разведенного в дистиллированной воде. ППФ в разовых дозах вводили животным трёхкратно через день, после чего через 24 часа заражали и.п. ВКЭ в дозе 1LD₅₀. В случае и.ц. заражения мышей препарат вводили однократно одновременно с вирусом в объеме 0,03 мл в концентрации 2 мг/мл ППФ (60 мкг/мышь) и ВКЭ в дозах 0,1LD₅₀, 1LD₅₀, 10LD₅₀. В случае внутримышечного (в.м.) применения препарат вводили в объеме 0,2 мл в концентрации 0,4 мг/мл ППФ (80 мкг/мышь).

2. Преднизолон (ОАО «Биосинтез», г. Пенза, Россия) в форме таблеток, содержащих по 0,005 г активного вещества. 1 таблетку растворяли в 5 мл дистиллированной воды, мышам вводили по 100 мкл *per os* (разовая доза 0,1 мг/мышь), препарат вводили трёхкратно на 6, 7 и 8 сутки после заражения ВКЭ.

3. Иммуноглобулин человеческий против вируса клещевого энцефалита (ЗАО «Микроген», Россия), содержащий титр гемагглютинирующих антител 1:80, разводили физиологическим раствором в 10 раз и вводили в.м. в объеме 0,2 мл/мышь (разовая доза составила 1 мл/кг). В случае лечебно-профилактического применения иммуноглобулин вводили на 1-е, 0, 1-е, 3-и сутки относительно заражения ВКЭ. В случае лечебного применения на 3-и и 4-е сутки относительно заражения ВКЭ.

Наблюдение за животными проводили ежедневно в течение 21 суток. По окончании эксперимента проводили расчёт показателей:

1) выживаемости: отношение количества выживших мышей к общему количеству животных в группе (в %);

2) летальности: отношение количества погибших мышей к общему количеству животных в группе (в %);

3) средней продолжительности жизни (СПЖ) по формуле:

$$\frac{1}{t} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{1}{t_i}}{N},$$

где t – СПЖ; t_i – срок жизни каждого животного; N – число животных в группе. Оставшимся в живых животным присписывается условное время выживания, равное ∞ . Для полученных значений рассчитывали величину среднего квадратического отклонения. Достоверность различий летальности и выживаемости животных определяли с помощью t -критерия Стьюдента.

ОТ-ПЦР в реальном времени

Синтез кДНК проводили при помощи набора с MMLV обратной транскриптазой (ОТ) фирмы

«Силекс», Россия. При постановке ПЦР в реальном времени использовались наборы с Hot Start Taq ДНК-полимеразой и интеркалирующим красителем SYBR GREEN производства фирмы «Синтол», Россия. Подбор праймеров осуществлялся в программе OLIGO 6. Для предотвращения синтеза с геномной ДНК, присутствующей в образцах РНК, праймеры подбирались таким образом, чтобы 3'-концевой участок хотя бы одного из пары, состоящий не более чем из 5 нуклеотидов, перекрывал границы двух соседних экзонов исследуемого гена. Величина относительной экспрессии исследуемого гена вычислялась по формуле:

$$\text{Относительная экспрессия}_{(\text{гена } x)} = 2^{(C_{T(\text{контроль})} - C_{T(\text{образца})})}$$

где $C_{T(\text{контроль})}$ – среднее значение порогового цикла $C(t)$ для контрольного образца; $C_{T(\text{образца})}$ – среднее $C(t)$ для экспериментального образца. Значения относительной экспрессии исследуемых генов нормировались по уровням относительной экспрессии гена HPRT1. Фрагменты кДНК исследуемых генов амплифицировали с использованием праймеров следующих последовательностей: HPRT1: прямой 5' GGATACAGGCCAGACTTTTGTT 3' и обратный 5' GGCTTTTCCAGTTTCACTAATG 3', IFN γ : прямой 5' GAGGAAGTGGCAAAGGATG 3' и обратный 5' GCTGATGGCCTGATTGTCTT 3', TNF α : прямой 5' CAGACCCTCACACTCAGATCA 3' и обратный 5' CACTTGGTGGTTTGCTACGA 3', IL1a: прямой 5' CCCGTGTTGCTGAAGGAGT 3' и обратный 5' CCAGAAGAAAATGAGGTCGGT 3', IL1b: прямой 5' CAGGCTCCGAGATGAACAAC 3' и обратный 5' TCATGGAGAATATCACTTGTGG 3', IL2: прямой 5' AGAAGATGAACTTGGACCTCTG 3' и обратный 5' TGTGTTGTCAGAGCCCTTAG 3', IL4: прямой 5' TCCTCACAGCAACGAAGAAC 3' и обратный 5' TGCAGTCCATGAGAACAATA 3', IL6: прямой 5'

CGTGGAAATGAGAAAAGAGTTGT 3' и обратный 5' GCATCCATCATTTCTTTGTATCT 3', IL10: прямой 5' TGAGGCGCTGTCATCGATT 3' и обратный 5' GACACCTGGTCTTGGAGCTT 3', IL12a: прямой 5' ATGAGCTGATGCAGTCTCTGAA 3' и обратный 5' ACTCTGTAAGGGTCTGCTTCTC 3', IL12b: прямой 5' TTCATCAGGGACATCATCAAAC 3' и обратный 5' TGACCTCCACCTGTGAGTTCTT 3', IL15: прямой 5' AACTGCTTTCTCCTGGAATTG 3' и обратный 5' CCAGATTCTGCTACATTCCTTGT 3', IL18: прямой 5' TGAAGAAAATGGAGACCTGGA 3' и обратный 5' TCTGGGGTTCAGTGGCACT 3', IL23: прямой 5' ACTCAAGGACAACAGCCAGTTC 3' и обратный 5' AGTAGGGAGGTGTGAAGTTGCT 3', CD4: прямой 5' CCAAGATGAGACTGACCCCTGAA 3' и обратный 5' TTCACCCCTCTGGATAAAACCT 3', CD25: прямой 5' STGCAAGATGAAGTGTGGGAA 3' и обратный 5' TGTGGGTGTGGGAAGTCTG 3', TBEV: прямой 5' GTACAACATGATGGCAAGAGA 3' и обратный 5' GCCAGCCCAGGTAGTTCAAG 3', OT-праймер 5' TTGACAACCTTTGAGGTGCCA 3'. ПЦР в реальном времени проводилась на амплификаторе CFX96, Bio-Rad, США. Анализ результатов ПЦР и статистическая обработка производились при помощи программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager Software Ver. 1.6.

Результаты исследования и их обсуждение

Защитное действие ППФ при и.ц. способе заражения и введения препарата

В результате проведенных исследований нами было установлено, что после и.ц. заражения мышью у животных с визуальными признаками заболевания регистрируется картина «цитокинового шторма» (рис. 1).

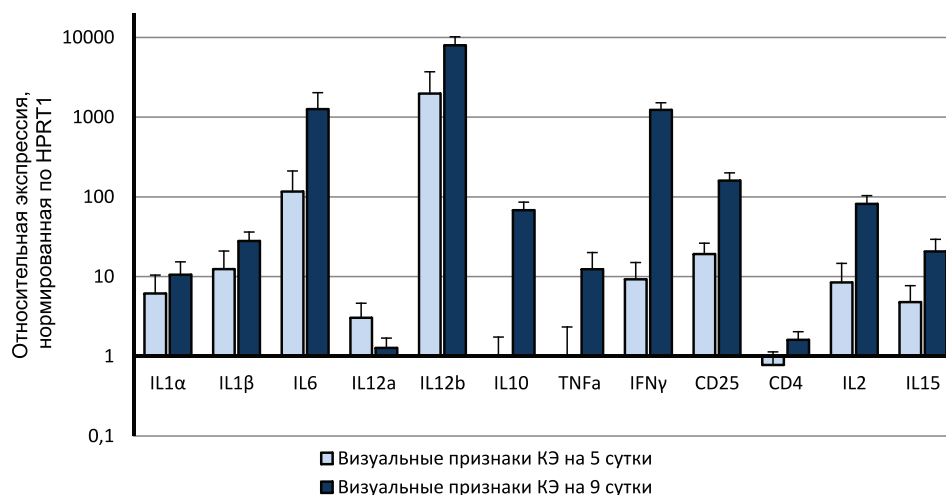


Рис. 1. Увеличение экспрессии генов некоторых иммунорегуляторных молекул в головном мозге мышей с визуальными признаками КЭ по сравнению с интактными животными

Этот факт свидетельствует о том, что одной из причин летального исхода КЭ является развитие вирус-индуцированного воспалительного процесса в головном мозге. Для предотвращения развития данного патологического процесса необходим

тщательный выбор соответствующих препаратов. В нашем исследовании был использован ППФ, входящий в состав таких известных и хорошо зарекомендовавших себя препаратов, как «Фортепрен», «Фоспренил», «Гамапрен». Препараты «Фо-

спренил» и «Гамапрен» широко используются в ветеринарии для профилактики и лечения вирусных инфекций [1, 2, 4]. Фортепрен в настоящее время проходит клинические испытания для внедрения в медицинскую практику в качестве

иммуномодулятора с противовирусной активностью.

Показано, что максимальное снижение летальности и увеличение СПЖ ППФ обеспечивает при и.ц. введении ВКЭ в дозе, вызывающей гибель 67% животных (табл. 1).

Таблица 1

Протективная активность ППФ при и.ц. заражении вирусом в 3-х разных 10-кратных разведениях и введении препарата мышам линии Balb/c (*n* = 15 мышей в группе).

Группы	Летальность	СПЖ (сут.)	ΔСПЖ
1. ВКЭ (10 ⁻⁷)	67 ± 12%	9,1 ± 1,3	62,9
2. ВКЭ (10 ⁻⁷) + ППФ	9 ± 7%	72 ± 3,3	
3. ВКЭ (10 ⁻⁸)	33 ± 12%	27,2 ± 2,7	52,8
4. ВКЭ (10 ⁻⁸) + ППФ	10 ± 8%	80 ± 5,6	
5. ВКЭ (10 ⁻⁹)	27 ± 11%	67,8 ± 4,5	н.о.
6. ВКЭ (10 ⁻⁹) + ППФ	0%	н.о.	

Весьма интересно, на наш взгляд, что введение в головной мозг мышей вируса и ППФ приводит к максимальной защите животных (по сравнению с другими способами его введения), что, по-видимому, свидетельствует о способности ППФ предотвращать развитие «цитокинового шторма» в непосредственной мишени для ВКЭ – головном мозге. При определении РНК ВКЭ у инфицированных животных выявлено, что у мышей с выраженной неврологической симптоматикой (параличи и парезы задних конечностей) в мозге обнаруживалась РНК ВКЭ в количествах, эквивалентных 10¹⁰–10¹¹ БОЕ/мл. У незаболевших на 15-е сутки животных РНК ВКЭ обнаруживалась в следующих соотношениях. В случае одновременного введения ВКЭ и ФП – в 64% случаев, а при введении ВКЭ без ФП – в 33%. При этом коли-

чество вирусной РНК было эквивалентно 10³–10⁴ БОЕ/мл.

Нами было изучено влияние ВКЭ и ППФ на экспрессию генов цитокинов в головном мозге на ранние сроки после и.ц. заражения или введения ППФ (рис. 2). При и.ц. введении среды 199 или вирусной суспензии было выявлено увеличение по сравнению с интактными животными экспрессии гена IL6, что является реакцией на черепно-мозговую травму при данном способе введения. В то же время уровень экспрессии гена IL6 в группе мышей, которым и.ц. вводили ППФ, превышал таковой уровень в группе мышей, которым и.ц. вводили среду 199, в 5,4 раза (*p* < 0,05). По-видимому, это свидетельствует о способности ППФ активировать механизмы врожденного иммунитета, что способствует раннему подавлению репродукции вируса.



Рис. 2. Экспрессия гена IL6 в головном мозге мышей через 6 часов после и.ц. заражения или введения ППФ

Пероральное применение ППФ и преднизолона при периферическом заражении мышей

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что ППФ при пероральном способе введения увеличивал СПЖ ($p < 0.05$) животных, зараженных ВКЭ и.п. в дозе $1LD_{50}$ (табл. 2, группы 2 и 1) по сравнению с контрольными животными, которых выпаивали водой.

Таблица 2

Оценка профилактического противовирусного действия ППФ и преднизолона, введенных *per os*, при экспериментальном клещевом энцефалите у беспородных мышей обоего пола массой 18–20 г ($n = 15–16$)

Группы	Летальность	СПЖ (сут.)
1. Вода	$56 \pm 13\%$	19 ± 3
2. ППФ	$50 \pm 13\%$	$22,2 \pm 0,8$
3. Преднизолон	$33 \pm 12\%$	$35,7 \pm 3,4$

Примечание. Различия СПЖ в группах 1 и 2, 1 и 3, 2 и 3 статистически достоверны.

Пероральное введение мышам преднизолона приводило к защите 67% животных, тогда как в контроле выживало лишь 44% (табл. 2, группы 3 и 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что на поздних сроках после заражения и при клинически выраженном КЭ применение противовоспалительных гормонов эффективнее, чем профилактика при помощи ППФ. Данный результат полностью согласуется с вышеописанной картиной «цитокинового шторма» в головном мозге мышей с визуальными признаками заболевания.

Профилактическое действие ППФ в сочетании с антителами к вирусу клещевого энцефалита

В следующей серии экспериментов животных заражали вирусом (в до $10LD_{50}$) и вводили внутримышечно: АТ, ППФ, АТ+ППФ (табл. 3) на –1-е, 0, 1-е, 3-и сутки относительно заражения ВКЭ. Наблюдение за животными проводили ежедневно в течение 21 суток. Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что введение АТ к ВКЭ на ранних сроках (–1-е, 0, 1-е, 3-и сутки) относительно заражения вирусом приводит к защите животных в 100% случаев, тогда как в контроле животные выживали лишь в 20% (табл. 3., группы 3 и 1). Гораздо менее эффективно в.м. введение ППФ (табл. 3, группы 2 и 1). В то же время необходимо отметить, что сочетание введения АТ и ППФ не приводило к утяжелению инфекционного процесса.

Таблица 3

Профилактическое действие ППФ в сочетании с антителами к вирусу (на –1-е, 0, 1-е, 3-и сутки относительно заражения ВКЭ)

Группы	Кол-во мышей в группе	Летальность	СПЖ (сут.)
1. ВКЭ	20	$80 \pm 9\%$	$9,8 \pm 1,1$
2. ВКЭ + ППФ	15	$87 \pm 9\%$	10 ± 1
3. ВКЭ + АТ	14	0%	н.о.
4. ВКЭ + АТ + ППФ	14	0%	н.о.

Таблица 4

Профилактическое и лечебное действие ППФ в сочетании с антителами к вирусу.

АТ и ППФ вводили в.м. по схемам:

^a – на 3 и 4 сутки после заражения;

^b – на 4, 5 и 6 сутки после заражения

Группы	Летальность	СПЖ (сут.)
1. ВКЭ ^a	$87 \pm 8,7\%$	$8,6 \pm 2,5$
2. ВКЭ + АТ ^a	$93 \pm 6,6\%$	$8,1 \pm 1,5$
3. ВКЭ + ППФ ^a	$80 \pm 10,3\%$	$8,5 \pm 1,3$
4. ВКЭ + АТ + ППФ ^a	$60 \pm 12,6\%$	$12,7 \pm 1,8$
5. ВКЭ ^b	$80 \pm 10,3\%$	$10,8 \pm 2,4$
6. ВКЭ + АТ ^b	$73 \pm 11,5\%$	$14,1 \pm 1,2$
7. ВКЭ + АТ + ППФ ^b	$47 \pm 12,9\%$	$19,2 \pm 1,5$

Примечание. Количество мышей в группе $n = 15$. Различия СПЖ в группах 1 и 4, 2 и 4, 3 и 4, 5 и 6, 5 и 7, 6 и 7 статистически достоверны ($p < 0,05$).

Иная картина регистрировалась при введении АТ или АТ+ППФ на более поздних сроках: на 3-е, 4-е или на 4-е, 5-е, 6-е сутки относительно заражения ВКЭ (табл. 4). В данном случае антитела не оказывали защитного действия. Введение ППФ, напротив, защищало зараженных мышей в 20% случаев, что в 1,5 раза выше контрольного показателя (табл. 4, группы 3 и 1). Одновременное введение АТ+ППФ существенно усиливало протективный эффект (табл. 4, группы 4 и 1; 3 и 4). Таким образом, применение иммуномодулятора в сочетании с АТ на более поздних сроках способствует защите от вирусной инфекции.

Обнаруженная нами ассоциация гиперэкспрессии провоспалительных цитокинов в головном мозге зараженных ВКЭ животных и неврологической симптоматики заболевания свидетельствует о том, что иммунное воспаление является одним из основных патогенетических факторов, приводящих к развитию подобного рода осложнений инфекционного процесса. Ис-

ходя из того, что наибольший эффект ППФ по снижению летальности при экспериментальной инфекции ВКЭ наблюдался при и.ц. способе введения вируса и препарата, можно сделать вывод, что ППФ обладает выраженным свойством снижать нейровирулентность ВКЭ. Механизм такого действия остается неясным, что, вероятно, связано с полифункциональностью препарата. Среди гипотез можно выделить следующие: активация врожденного иммунитета и раннее подавление репликации вируса, предотвращение летальной воспалительной реакции и «цитокинового шторма» в головном мозге [3, 5, 6], влияние на метаболизм липидов и, как следствие, изменение реологических и зарядовых свойств клеточных мембран, препятствующее процессу слияния вируса с клеткой. Не исключено, что ППФ может непосредственно связываться с ВКЭ или с отдельными вирусными белками. Периферическое заражение и введение препарата показало, что при данном способе введения ППФ проявлял незначительное защитное действие. При этом нами было отмечено снижение частоты появления мышей с визуальными признаками КЭ и увеличение СПЖ (при пероральном применении ППФ). Также нами было показано, что ППФ обладает способностью потенцировать защитное действие АТ против ВКЭ. По-видимому, это объясняется способностью препарата замедлять развитие неврологической симптоматики и препятствовать развитию «цитокинового шторма» в головном мозге.

Использование в наших экспериментах преднизолона выявило его способность защищать животных от ВКЭ. Этот факт является показателем необходимости применения противовоспалительных препаратов при КЭ. Эксперименты с АТ к ВКЭ явно свидетельствуют о том, что защитные свойства АТ проявляются лишь при условии их применения на ранних сроках относительно инфицирования. В случае их использования на поздних сроках, защита от ВКЭ не регистрировалась. Таким образом, по крайней мере в условиях эксперимента использование АТ против КЭ в качестве лечебных препаратов недостаточно эффективно. Использование инъекций ППФ за 24-48 часов до проявления визуальных признаков КЭ также малоэффективно. По-видимому, это связано с тем обстоятельством, что иммунный ответ при КЭ в данный период времени уже сформировался и применение иммуномодулятора неэффективно. В то же время введение ППФ с АТ даже в этот период достаточно оправданно, так как ППФ поли-

функционален и обладает свойством коррекции иммунопатологических реакций, вызываемых АТ.

Заключение

Неврологическая симптоматика экспериментальной ВКЭ-инфекции ассоциирована с целым каскадом увеличения экспрессии генов иммунорегуляторных молекул, что является проявлением активации клеток микроглии – резидентных макрофагов головного мозга – и привлечения в очаг воспаления дендритных клеток, нейтрофилов и Т-лимфоцитов. Данное осложнение инфекционного процесса также характеризуется выраженным увеличением количества вирусной РНК в головном мозге зараженных животных по сравнению с особями, у которых не отмечалось видимых признаков заболевания в течение всего периода наблюдения. Несомненно, чрезмерная активация иммунных клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины, в головном мозге является непосредственной причиной неврологических осложнений инфекционного процесса. Эффективная элиминация вируса из организма при помощи иммуноглобулина против ВКЭ достигается только при введении препарата антител до или на максимально ранних сроках после инфицирования. Учитывая, что препараты антител обладают определенным иммуномодулирующим свойством, введение их на поздних сроках после инфицирования в некоторых случаях может привести к утяжелению инфекционного процесса (в условиях эксперимента на лабораторных животных). Для предотвращения неврологических осложнений инфекционного процесса терапевтические мероприятия должны быть направлены на максимально раннюю элиминацию вируса из организма и на предотвращение развития чрезмерной воспалительной реакции и цитокинового шторма в головном мозге. При этом представляется оправданным применение противовирусных антител совместно с проведением иммуномодулирующей терапии.

Список литературы

1. Противовирусная и иммуномодулирующая активность полипренилфосфатов при вирусных инфекциях / А.Н. Васильев, С.В. Ожерелков, В.В. Козлов, А.В. Пронин, А.В. Санин, Т.М. Парфёнова, А.В. Измestьева, А.Н. Амченкова, Т.Н. Кожевникова, Т.Н. Степанова, А.Н. Наровлянский // Антибиотики и Химиотерапия. – 2008. – Т. 53, № 3-4. – С. 3-8.
2. Кожевникова Т.Н. Морапренилфосфаты подавляют размножение вируса энцефаломиелита мышей Тейлера и накопление вирусного белка VP3 в чувствительных культурах клеток ВНК-21 и P388D1 / Т.Н. Кожевникова, Е.Г. Викторова, В.Г. Козлов, А.Н. Наровлянский, А.В. Санин, А.В. Пронин, Ожерелков С.В. // Журн. Микробиол. – 2007. – № 3. – С. 26-30.

3. Влияние препаратов Гамапрена и Фоспренила, созданных на основе полипептидов растительного происхождения, на продукцию некоторых регуляторных цитокинов в норме и при экспериментальном клещевом энцефалите у мышей / Т.Н. Кожевникова, С.В. Ожерелков, А.В. Измestьева, В.Ю. Санина, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, А.В. Санин // Рос. Иммунол. Журн. – 2008. – Т. 2(11), № 2–3. – С. 250.

4. Защитное действие нового противовирусного препарата Фоспренил при экспериментальном клещевом энцефалите у мышей / А.В. Санин, А.П. Суслев, О.Ю. Третьяков, Р.В. Зварцев, А.В. Саличев, Т.Н. Кожевникова, В.Ю. Санина, Е.Г. Смирнова, С.В. Ожерелков // Журн. микробиол. – 2011. – № 5. – С. 56–61.

5. Разнонаправленное влияние MIF и полипренилфосфата натрия на течение экспериментальной флавивирусной инфекции у мышей / А.В. Санин, А.П. Суслев, О.Ю. Третьяков, Р.В. Зварцев, А.В. Саличев, Т.Н. Кожевникова, В.Ю. Санина, Е.Г. Смирнова, С.В. Ожерелков // Журн. микробиол. – 2011. – № 5. – С. 56–61.

6. Исследование противовоспалительной активности фоспренила в эксперименте / А.В. Санин, С.А. Суханова, О.В. Проскурина, Н.М. Митрохин, И.В. Ганшина, Г.Ф. Судьина, В.Ю. Санина, А.А. Виденина, Т.Н. Кожевникова, А.А. Санин, С.В. Ожерелков, А.В. Саличев, А.В. Пронин, А.Н. Наровлянский // Российский ветеринарный журнал. – 2011. – № 4. – С. 17–20

7. Tick-borne Virus Diseases of Human Interest in Europe / Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Suss J., Zlobin V.I., De Lamballerie X. // *Clinical Microbiology and Infection*. 2004. no. 10(12). pp. 1040–1055.

References

1. Vasil'ev A.N. Protivovirusnaya i immunomoduliruyushchaya aktivnost poliprenil-fosfatov pri virusnykh infektsiyakh. / Vasil'ev A.N., Ozherelkov S.V., Kozlov V.V., Pronin A.V., Sannin A.V., Parfyenova T.M., Izmest'eva A.V., Amchenkova A.N., Kozhevnikova T.N., Stepanova T.N., Narovlyanskiy A.N. // *Antibiotiki i Khimioterapiya*. 2008. no. 3–4. Vol. 53. pp. 3–8.

2. Kozhevnikova T.N. Moraprenilfosfaty podavlyayut razmnozhenie virusa entsefalomielita myshey Teylera i nakoplenie virusnogo belka VP3 v chuvstvitel'nykh kulturakh kletok VNK-21 i R388D1. / Kozhevnikova T.N., Viktorova E.G., Kozlov V.G., Narovlyanskiy A.N., Sannin A.V., Pronin A.V., Ozherelkov S.V. // *Zhurn. Mikrobiol.* 2007. no. 3. pp. 26–30.

3. Kozhevnikova T.N. Vliyanie preparatov Gamaprena i Fosprenila, sozdannykh na osnove poliprenolov rastitel'nogo proiskhozhdeniya, na produktsiyu nekotorykh regulatorynykh

tsitokinov v norme i pri eksperimental'nom kleshchevom entsefalite u myshey. / Kozhevnikova T.N., Ozherelkov S.V., Izmest'eva A.V., Sannin V.Yu., Narovlyanskiy A.N., Pronin A.V., Sannin A.V. // *Ros.Immunol.Zhurn.* 2008. Vol. 2(11), no. 2–3. p. 250.

4. Ozherelkov S.V. Zashchitnoe deystvie novogo protivovirusnogo preparata Fosprenil pri eksperimental'nom kleshchevom entsefalite. / Ozherelkov S.V., Timofeev A.V., Novikova G.P., Deeva A.V., Narovlyanskiy A.N., Sannin A.V., Pronin A.V. // *Vopr. Virusol.* 2000. no. 1. Vol. 45. pp. 33–37.

5. Sannin A.V. Raznonapravlennoe vliyanie MIF i poliprenilfosfata natriya na teche-nie eksperimental'noy flaviviruznoy infektsii u myshey. / Sannin A.V., Suslov A.P., Tretyakov O.Yu., Zvartsev R.V., Salichev A.V., Kozhevnikova T.N., Sannin V.Yu., Smirnova E.G., Ozherelkov S.V. // *Zhurn.mikrobiol.* 2011. no. 5. pp. 56–61.

6. Sannin A.V. Issledovanie protivovospalitel'noy aktivnosti fosprenila v eksperimente. / Sannin A.V., Sukhanova S.A., Proskurina O.V., Mitrokhin N.M., Ganshina I.V., Sudina G.F., Sannin V.Yu., Videnina A.A., Kozhevnikova T.N., Sannin A.A., Ozherelkov S.V., Salichev A.V., Pronin A.V., Narovlyanskiy A.N. // *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal*. 2011. no. 4. pp. 17–20.

7. Charrel R. N. Tick-borne Virus Diseases of Human Interest in Europe / Charrel R. N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Suss J., Zlobin V.I., De Lamballerie X. // *Clinical Microbiology and Infection*. 2004. no. 10(12). pp. 1040–1055.

Рецензенты:

Варгин В.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Московская область, Ленинский район, поселок сельского типа Институт полиомиелита;

Ляпустин В.Н., д.б.н., заведующий отделением криогенного хранения клеточных культур и коллекционных штаммов вирусов, ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Московская область, Ленинский район, поселок сельского типа Институт полиомиелита.

Работа поступила в редакцию 08.04.2013.