

А.С.Кабанов¹, Л.Н.Шишкина¹, О.Ю.Мазурков¹, М.О.Скарнович¹,
Н.И.Бормотов¹, О.А.Серова¹, Ал.А.Сергеев¹, Ар.А.Сергеев¹,
Б.А.Селиванов², А.Я.Тихонов², А.П.Агафонов¹, А.Н.Сергеев¹

ОЦЕНКА ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НИОХ-14 В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ЭКТРОМЕЛИИ *IN VIVO*

¹ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская обл.;

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова

Цель. Исследование фармакодинамических показателей противовирусной эффективности химического соединения НИОХ-14 в экспериментах на мышах, инфицированных вирусом эктромелии (ВЭ). **Материалы и методы.** ВЭ (штамм К-1) получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор». Аутбредных мышей ICR интраназально заражали ВЭ в дозе 10 ЛД₅₀/гол. (10х50% летальных доз/голову) и перорально вводили НИОХ-14 или ST-246 в качестве положительного контроля. Химическое соединение НИОХ-14 (7-[N'-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота) синтезировали в Новосибирском институте органической химии. Противоопухолевый препарат ST-246, разработанный компанией SIGA Technologies Inc. (США), был синтезирован в НИОХ СО РАН по описанной авторами методике. **Результаты.** Показано, что 50% эффективные дозы в отношении ВЭ *in vivo* препаратов НИОХ-14 (3,59 мкг/г массы мыши) и ST-246 (5,08 мкг/г массы мыши) достоверно не отличались. При определении терапевтического окна обнаружено, что введение мышам НИОХ-14 за 1 сут или за 1 ч до заражения ВЭ, а также через 1, 2 и 4 сут после заражения ВЭ и далее в течение 9 сут обеспечивало 100% выживаемость животных. Введение НИОХ-14, также как ST-246 приводило к снижению относительно контроля титров ВЭ в легких, носовой полости, головном мозге, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе. **Заключение.** Противовирусная эффективность НИОХ-14 в отношении ВЭ *in vivo* по всем исследованным фармакодинамическим показателям сопоставима с противовирусной эффективностью антипоксвирусного препарата ST-246.

Журн. микробиол., 2015, № 1, С. 58—65

Ключевые слова: мыши, ортопоксвирусы, вирус эктромелии, противовирусная активность, антипоксвирусное химическое соединение

A.S.Kabanov¹, L.N.Shishkina¹, O.Yu.Mazurkov¹, M.O.Skarnovich¹,
N.I.Bormotov¹, O.A.Serova¹, Al.A.Sergeev¹, Ar.A.Sergeev¹,
B.A.Selivanov², A.Ya.Tikhonov², A.P.Agaonov¹, A.N.Sergeev¹

EVALUATION OF THERAPEUTIC-PROPHYLACTIC EFFECTIVENESS OF CHEMICAL COMPOUND NIOC-14 AGAINST ECTROMELIA VIRUS *IN VIVO*

¹State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region;

²Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Russia

Aim. Study pharmacodynamic parameters of anti-viral effectiveness of a chemical compound NIOC-14 in experiments in mice infected with ectromelia virus (EV). **Materials and methods.** EV (K-1 strain) was obtained from the State Collection of Viral Infections and Rickettsioses Causative Agents of the State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector». Outbred ICR mice were intranasally infected with EV at a dose of 10 LD₅₀ per animal (10x50% lethal doses / animal) and per orally received NIOC-14 or ST-246 as a positive control. Chemical compound NIOC-14 (7-[N'-(4-trifluoromethylbenzoyl)-hidrazincarbonyl]-tricyclo[3.2.2.0^{2,4}]non-8-en-6-carbonic acid) was synthesized in Novosibirsk Institute of Organic Chemistry (NIOC). Anti-pox preparation ST-246, developed by SIGA Technologies Inc. (USA), was synthesized in NIOC using the technique described by the authors. **Results.** 50% effective doses against EV *in vivo* were shown not

to differ significantly between the preparations NIOC-14 (3.59 µg/g mouse mass) and ST-246 (5.08 µg/g mouse mass). During determination of therapeutic window, administration of NIOC-14 to mice 1 day or 1 hour before EV infection, as well as 1, 2 and 4 days after EV infection and then for 9 days was found to ensure 100% animal survival. Administration of NIOC-14 as well as ST-246 resulted in the decrease relative to control of EV titers in lungs, nasal cavity, brains, liver, spleen, kidneys and pancreas. *Conclusion.* Anti-viral effectiveness of NIOC-14 against EV *in vivo* was thus comparable by all the studied pharmacodynamic parameters with anti-viral activity of anti-poxvirus preparation ST-246.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2015, No. 1, P. 58—65

Key words: mice, orthopoxviruses, ectromelia virus, anti-viral activity, anti-poxvirus chemical compound

ВВЕДЕНИЕ

Более 30 лет назад была успешно завершена программа глобальной ликвидации оспы, которая показала, что инфекционное заболевание можно не только поставить под контроль, но и полностью элиминировать его [14]. Однако прекращение с 1980 г. всеобщей вакцинации против натуральной оспы привело к тому, что к настоящему времени более половины населения Земли не имеет иммунитета против ортопоксвирусных инфекций. Человеческая популяция в настоящее время подвергается потенциальной опасности применения природных или рекомбинантных штаммов вирусов натуральной оспы (ВНО) и оспы обезьян (ВОО) в качестве биологического оружия [12]. Кроме того, появление вспышек оспы обезьян в популяции людей в Африке (в 1996 — 1997 гг. в Демократической Республике Конго, в 2005 г. в Судане) и ее распространение (в 2003 г. ВОО был завезен в США с партией экзотических животных — гамбийских или хомячковых крыс) представляет собой серьезную угрозу населению всего мира [1, 12]. Противовирусные препараты, эффективные в отношении ВНО и других патогенных для человека ортопоксвирусов, прежде всего ВОО, могли бы существенно снизить последствия возможного возникновения вспышек оспы. Спектр лечебно-профилактических препаратов, используемых для экстренной профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами, чрезвычайно ограничен. К этим средствам относятся тиосемикарбазоны, аналоги нуклеозидов и нуклеотидов, ациклические нуклеозиды и нуклеотиды [13]. В настоящее время проводятся клинические испытания двух эффективных, биодоступных при пероральном введении противовирусных препаратов: CMX001 — эфирно-липидного аналога цидофовира с активностью на стадии репликации ДНК и ST-246 — нового ингибитора выхода вируса из клетки [12]. Препарат ST-246[®], или Tecovirimat[™] разработан компанией SIGA Technologies Inc. по лицензии ViroPharma Inc. (Corvallis, Oregon, США) [14]. ST-246 проявил высокую активность в экспериментах с использованием низших приматов, инфицированных штаммом Zaire-79 (V79-I-005) ВОО [9, 11]. При этом наиболее полное и детальное исследование противовирусной эффективности ST-246 было проведено на модели летальной инфекции мышей вирусом эктромелии (ВЭ), который является естественным патогеном для мышей и вызывает у них генерализованное заболевание, называемое мышинной оспой, аналогичное оспе у человека [12, 16]. Ранее нами было продемонстрировано, что новое химически синтезированное соединение НИОХ-14 обладает высокой, сравнимой с ST-246, активностью в отношении ортопоксвирусов, в том числе ВОО, *in vitro* и *in vivo* [3, 4, 6]. Цель работы — исследование фармакодинамических показателей лечебно-профилактической противовирусной эффективности НИОХ-14 в экспериментах на мышах, инфицированных ВЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментов использовали 235 аутбредных мышей ICR обоего пола массой 12-14 г. При выполнении исследований соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и [5]. Эвтаназию животных осуществляли методом цервикальной дислокации.

В работе использовали вирус экстремелии (штамм К-1), полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор». Вирус культивировали в клетках Vero с применением питательной среды DMEM (ГНЦ ВБ «Вектор»). Концентрацию вируса в культуральной жидкости определяли путем титрования методом бляшек в культуре клеток Vero, рассчитывали и выражали в lg БОЕ/мл [2, 15]. Концентрация вируса в использованных для работы образцах составляла $5,63 \pm 0,04$ lg БОЕ/мл. Нарботанные и использованные в работе серии ВЭ с указанным титром хранили при температуре минус 70°C. Величина ЛД₅₀ ВЭ для мышей была равна 1,57 lg БОЕ/гол. Заражение мышей ВЭ производили интраназально по 40 мкл суммарно в обе ноздри в дозе 10 ЛД₅₀, что составляло 2,57 lg БОЕ/гол.

При пероральном введении мышам были исследованы фармакодинамические показатели противовирусной активности химического соединения НИОХ-14 (7-[N'-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота), синтезированного в НИОХ им. Н.Н. Ворожцова [7], с высокой активностью в отношении ортопоксвирусов, ранее описанной нами, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [3, 4, 6]. В качестве положительного контроля использовали химическое соединение с установленной противооспенной активностью — ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[*f*]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид) [14], синтезированное в НИОХ им. Н.Н. Ворожцова по описанной методике [10].

При оценке 50% эффективной дозы (ЭД₅₀) НИОХ-14 вводили перорально один раз в сутки в дозах 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 мкг/г массы мыши через 1 ч после заражения и далее в течение 9 сут после заражения животных. Группе контрольных животных, инфицированных ВЭ, перорально вводили плацебо — раствор, содержащий 0,75% метилцеллюлозы и 1% твина-80. За животными наблюдали в течение 21 сут после заражения, ежедневно регистрируя количество павших мышей, определяли долю павших животных, подсчитывали коэффициент защиты ($KЗ = \% \text{ павших в контроле} - \% \text{ павших в опыте}$) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ). При определении СПЖ в каждой группе учитывали число животных, проживших определенное количество дней после заражения до гибели и число выживших животных. За максимальную продолжительность жизни выживших животных принимали 21 сутки после заражения ВЭ, т.е. гарантированное время прекращения специфической гибели инфицированных мышей, что было установлено эмпирически при многократном повторении аналогичных экспериментов. Для определения терапевтического окна препарат НИОХ-14 вводили один раз в сутки в дозе 50 мкг/г массы мыши в разные сроки до и после заражения ВЭ: за 1 сут до заражения (д/з), за 1 ч д/з, через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 сут после заражения, а далее введение НИОХ-14 продолжали в течение 9 сут после первого введения препарата. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 сут после заражения ВЭ, в каждой группе мышей регистрировали падеж и рассчитывали СПЖ.

Через 6 сут после заражения и ежедневного (начиная с 1 сут после инфицирования) введения препаратов в дозе 50 мкг/г массы мыши у эвтаназированных мышей определяли концентрацию ВЭ (в lg БОЕ/мл) в сыворотке крови и 10% гомогенатах органов, полученных от 4 инфицированных мышей из каждой группы. Для этого использовали стандартный для ортопоксвирусов метод подсчета количества бляшек при внесении последовательных разведений образцов на

монослой культуры клеток Vero [15]. В случаях, когда концентрация ВЭ в гомогенатах органов инфицированных мышей была ниже порога чувствительности метода титрования ($<1,0 \lg$ БОЕ/мл), проводили расширенное тестирование исходных образцов [15, 16]. Если концентрация ВЭ в гомогенатах органов была ниже порога чувствительности расширенного тестирования ($<0,3 \lg$ БОЕ/мл), использовали минимальное значение титра, которое можно было определить при данном способе ($0,3 \lg$ БОЕ/мл).

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [2] с помощью [8] с оценкой достоверности отличий ($p \leq 0,05$) для 95% доверительного уровня (I_{95}). Сравнение доли выживших животных в инфицированных группах проводили по критерию χ^2 [2, 8]. Расчет ЭД₅₀ производили на основании показателей выживаемости животных по методу Спирмана-Кербера [2]. Титры ВЭ в органах и СПЖ мышей представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm S_M$). Для сравнения титров ВЭ в органах использовали U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента, а для сравнения СПЖ мышей — U-критерий Манна-Уитни [2, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе была проведена сравнительная оценка ЭД₅₀ НИОХ-14 и ST-246, вводимых в разных дозах, при инфицировании мышей ВЭ в дозе, равной 10 ЛД₅₀/гол. Было показано, что по показателю ЭД₅₀ in vivo препараты НИОХ-14 и ST-246 достоверно не отличаются (табл. 1).

При оценке выживаемости и СПЖ мышей, инфицированных 10 ЛД₅₀ ВЭ, получавших НИОХ-14 и S-246 в разных дозах, было показано, что в дозе 12,5 мкг/г и выше оба препарата достоверно повышают относительно контроля и процент выживаемости, и СПЖ зараженных ВЭ мышей. Вместе с тем, при введении

Таблица 1. Противовирусная эффективность препаратов НИОХ-14 и ST-246 в экспериментах на мышах, инфицированных 10 ЛД₅₀ ВЭ (штамм К-1)

Группы мышей, получавших препараты	Доза препарата, мкг/г массы мыши	Показатели выживаемости мышей, зараженных 10 ЛД ₅₀ ВЭ			ЭД ₅₀ , мкг/г массы мыши
		Кол-во и % выживших	Коэффициент защиты, %	СПЖ (сут) $M \pm S_M$	
НИОХ-14, n=10 для каждой дозы препарата	50,0	10* (100)	100	21,0 $\pm$ 0,00 &	3,59 (2,29—5,63)^
	25,0	10* (100)	100	21,0 $\pm$ 0,00 &	
	12,5	8* (80)	80	19,7 $\pm$ 2,98 &	
	6,25	7* (70)	70	17,9 $\pm$ 5,30 &	
	3,12	6* (60)	60	16,8 $\pm$ 5,59 &	
	1,56	2 (20)	20	12,7 $\pm$ 4,76	
	0,78	0 (0)	0	9,8 $\pm$ 2,30	
ST-246, n=10 для каждой дозы препарата	50,0	10* (100)	100	21,0 $\pm$ 0,00 &	5,08 (3,04—8,48)^
	25,0	10* (100)	100	21,0 $\pm$ 0,00 &	
	12,5	7* (70)	70	18,5 $\pm$ 4,09 &	
	6,25	3 (30)	30	16,0 $\pm$ 3,74 &	
	3,12	3 (30)	30	13,6 $\pm$ 5,30	
	1,56	2 (20)	20	11,3 $\pm$ 5,12	
	0,78	3 (30)	30	12,5 $\pm$ 5,99	
Контроль ВЭ, n=10	—	0 (0)	—	10,2 $\pm$ 2,78	—

Примечание. ^ Доверительные интервалы, нет достоверных отличий по ЭД₅₀ препаратов НИОХ-14 и ST-246; * отличие от контроля по критерию χ^2 при $p < 0,003$; & отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,001$; n — число животных в группе (здесь и в табл. 2).

НИОХ-14 в дозах 6,25 и 3,12 мкг/г исследуемые показатели достоверно отличаются от контроля, но не отличаются от значений, наблюдаемых при введении S-246 в тех же дозах. На основании анализа полученных результатов можно сделать заключение, что НИОХ-14 обладает сравнимой с ST-246 противовирусной эффективностью в отношении ВЭ in vivo.

Далее для НИОХ-14 проводили определение терапевтического окна, т. е. периода времени, в течение которого введение препарата после инфицирования организма оказывается эффективным (табл. 2).

Было показано, что если НИОХ-14 начина-

ли вводить мышам за 1 сут или за 1 ч до заражения ВЭ, а также через 1 и 2 сут после заражения ВЭ и далее один раз в день в течение 9 сут, то выживаемость в этих группах мышей была 100%. Введение НИОХ-14 через 3 и 4 сут после заражения мышей ВЭ тоже обеспечивало соответственно 90 и 100% выживаемость животных. Дальнейшее задерживание сроков начала введения препарата до 5 и 6 сут после инфицирования животных ВЭ приводило к снижению их выживаемости до 60%, хотя этот показатель все равно оставался достоверно выше, чем в контрольной группе. Нами было установлено, что без применения противовоспалительных препаратов пик гибели (до 50%) мышей наблюдается через 7 сут после заражения ВЭ, поэтому начинать введение НИОХ-14 через 7 сут после инфицирования мышей ВЭ не было целесообразным для данного исследования.

При оценке титров ВЭ через 6 сут после заражения мышей его не обнаружили в сыворотке крови у контрольных животных и у мышей после введения препаратов. В это время у контрольных животных наиболее высокие титры ВЭ наблюдались в носовой полости, легких и селезенке (табл. 3).

В остальных органах (трахее, головном мозге, печени, почках и поджелудочной железе) титры ВЭ были достоверно меньше, чем в легких. Введение НИОХ-14, также как ST-246, приводило к снижению титров ВЭ в легких более чем на 1 lg относительно контроля. В носовой полости и головном мозге при использовании обоих противовирусных соединений количество ВЭ становилось значимо меньше, чем в контроле. Более того, через 6 сут после заражения ВЭ при введении НИОХ-14 в печени, селезенке, почках и поджелудочной железе концентрация ВЭ у всех 4 мышей была ниже порога чувствительности метода титрования ($<1,0 \lg \text{ БОЕ/мл}$), а при расширенном тестировании диапазон титров ВЭ составлял $0,3 - 0,9 \lg \text{ БОЕ/мл}$. В результате применение НИОХ-14 и ST-246 приводило к достоверному снижению продукции ВЭ в легких, носовой полости и головном мозге, а также практически полному отсутствию ВЭ в трахее, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе инфицированных мышей.

Таблица 3. Титры ВЭ в органах у мышей через 6 сут после инфицирования 10 ЛД_{50} ВЭ в контроле и ежедневном введении препаратов НИОХ-14 или ST-246

Группы мышей, получавших препараты	Средние величины титров ВЭ ($\lg \text{ БОЕ/мл}$, $M \pm S_M$) в органах мышей, зараженных 10 ЛД_{50} ВЭ							
	Носовая полость	Трахея	Легкие	Мозг	Печень	Селезенка	Почки	Поджелуд. железа
НИОХ-14, $50,0 \text{ мкг/г}$, $n=4$	$1,15 \pm 0,44$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #	$4,85 \pm 0,39$ *	$0,85 \pm 0,53$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #
ST-246, $50,0 \text{ мкг/г}$, $n=4$	$1,19 \pm 0,73$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #	$4,68 \pm 0,43$ *	$0,71 \pm 0,38$ * #	$0,73 \pm 0,40$ * #	$0,63 \pm 0,30$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #	$0,60 \pm 0,26$ * #
Контроль ВЭ, $n=4$	$5,43 \pm 1,51$ #	$2,44 \pm 0,45$ #	$6,18 \pm 0,46$ #	$2,15 \pm 0,48$ #	$4,61 \pm 0,91$ #	$5,82 \pm 1,75$ #	$1,51 \pm 0,28$ #	$3,03 \pm 0,80$ #

Примечание. * Отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$; # отличие от титров ВЭ в легких в соответствующей группе животных по U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Таблица 2. Определение терапевтического окна препарата НИОХ-14 в экспериментах на мышях, инфицированных 10 ЛД_{50} ВЭ (штамм К-1)

Группы мышей, которым начинали вводить НИОХ-14:	Показатели выживаемости мышей, зараженных 10 ЛД_{50} ВЭ		
	Кол-во и % выживших	Коэффициент защиты, %	СПЖ (сут) $M \pm S_M$
За 1 сут д/з, $n=10$	10* (100)	100	$21,0 \pm 0,00$ &
За 1 ч д/з, $n=10$	10* (100)	100	$21,0 \pm 0,00$ &
Через 1 сут п/з, $n=10$	10* (100)	100	$21,0 \pm 0,00$ &
Через 2 сут п/з, $n=10$	10* (100)	100	$21,0 \pm 0,00$ &
Через 3 сут п/з, $n=10$	9* (90)	90	$19,8 \pm 3,79$ &
Через 4 сут п/з, $n=10$	10* (100)	100	$21,0 \pm 0,00$ &
Через 5 сут п/з, $n=10$	6* (60)	60	$17,5 \pm 4,90$ &
Через 6 сут п/з, $n=10$	6* (60)	60	$16,1 \pm 6,38$
Контроль ВЭ, $n=10$	0 (0)	—	$10,2 \pm 2,78$

Как видно из всех представленных в данной работе результатов, НИОХ-14 обладает сравнимой с ST-246 противовирусной эффективностью в отношении ВЭ *in vivo* в применяемых дозах и схемах введения препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, химическое соединение ST-246 послужившее прототипом для синтеза новых полициклических гидрированных функциональных производных изоиндола, в том числе НИОХ-14 [7], обладает противовирусной активностью в отношении ортопоксвирусов [16]. При этом ST-246 не было активным в отношении респираторно-синцитиального вируса (Paramyxoviridae, одноцепочечная отрицательная РНК), ротавирусов (Reoviridae, двухцепочечная РНК), вируса диареи крупного рогатого скота (Flaviviridae, положительная одноцепочечная РНК), вируса лихорадки долины Рифт (Bunyaviridae, одноцепочечная отрицательная РНК) и некоторых других РНК- и ДНК-содержащих вирусов, за исключением ортопоксвирусов [16].

Оценка противовирусной активности НИОХ-14 в отношении аденовируса человека 5 серотипа, вируса простого герпеса 2 типа, вируса Коксаки А7 и вируса Западного Нила показала, что это соединение не ингибирует их репликацию *in vitro* в концентрациях до 80 мкг/мл. Отсутствие активности препаратов в отношении двух типов ДНК-содержащих вирусов и двух типов РНК-содержащих вирусов говорит о специфичности действия НИОХ-14 в отношении ортопоксвирусов [7]. Вероятно, НИОХ-14 обладает аналогичным механизмом противовирусной активности, что и ST-246. Было установлено, что мишенью ST-246 является белок р37 — высоко консервативный продукт гена F13L вируса осповакцины (гомологичные гены: С17L в ВНО и С19L в ВОО). Блокируя активный центр белка р37, ST-246 ингибирует образование внеклеточного оболочечного вируса, обеспечивающего его диссеминацию, и, следовательно, препятствует распространению ортопоксвирусных патогенов *in vitro* и *in vivo* [16].

Ранее нами была выявлена высокая противовирусная активность химически синтезированного соединения НИОХ-14 в отношении ортопоксвирусов, в том числе в отношении ВОО и ВНО, в культуре клеток Vero [3]. При этом 50% ингибирующие (эффективные) концентрации НИОХ-14 *in vitro* для данных вирусов находились в диапазоне от 0,001 до 0,051 мкг/мл. Последующие эксперименты на мышах, инфицированных ВЭ или ВОО, позволили предположить, что НИОХ-14 проявляет противовирусную активность, сравнимую с активностью ST-246 [4, 6].

Что касается значения ЭД₅₀ для ST-246 *in vivo*, то данных об определении этой величины в экспериментах при интраназальной ортопоксвирусной инфекции у мышей в доступной научной литературе не найдено. Однако было показано, что при внутривенном заражении ВОО нечеловекообразных приматов ST-246 обеспечивал их эффективную защиту от гибели (от 50 до 95%) при его пероральном введении в диапазоне доз от ≥ 3 мг/кг до ≤ 10 мг/кг, причем введение ST-246 в дозах выше 20 мг/кг приводило к 100 % выживаемости инфицированных ВОО животных [11, 12, 16].

Далее для определения терапевтического окна НИОХ-14 и сравнительной оценки противовирусной активности НИОХ-14 и ST-246 у инфицированных ВЭ мышей нами была использована доза 50 мкг/г массы мыши, поскольку в предварительных экспериментах было показано, что НИОХ-14 и ST-246 в этой дозе проявляют 100% эффективность в отношении ВЭ. Кроме того, эта доза была выбрана на основании литературных данных, согласно которым ST-246 в диапазоне доз от 30 до 100 мкг/г массы мыши был эффективным в отношении летальных ортопоксвирусных инфекций у мышей [12, 14, 16].

В литературе описаны результаты определения терапевтического окна пре-

парата ST-246, аналогом которого является НИОХ-14, в экспериментах на мышах, инфицированных ВЭ [12]. У мышей, которые начинали получать ST-246 в день заражения или через 4 и 5 сут после заражения, была 100% выживаемость. Если мышам начинали перорально вводить ST-246 через 6 сут после заражения, то живыми оставалось 73%, а в группах животных, получавших ST-246 начиная с 7, 8 или 9 сут после заражения, выживали соответственно 47, 13 и 13%, что не было статистически значимым отличием от контроля, где летальность составляла 100% инфицированных мышей [12].

Аналогичные нашим данные по снижению титров ВЭ в печени, селезенке и легких у мышей через 4, 6 и 8 сут после инфицирования были получены при изучении протективного действия ST-246 в дозе 50 мкг/г массы мыши при летальной инфекции ВЭ (штамм Moscow, 100 ЛД₅₀) [16]. Авторы показали, что у мышей, получавших ST-246, титры ВЭ в печени, селезенке и легких зараженных животных были ниже предела обнаружения [16].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что НИОХ-14 также, как ST-246, ингибирует системное распространение вируса и защищает мышей от летальной инфекции ВЭ. По-видимому, это обусловлено тем, что НИОХ-14, являясь аналогом, вернее предшественником ST-246 [7], может иметь аналогичный механизм действия, а именно, ингибировать вирусный белок р37 и препятствовать освобождению внеклеточных форм вируса, которые обеспечивают диссеминацию вируса в организме и развитие заболевания [16].

Таким образом, в данной работе показано, что химическое соединение НИОХ-14 обладает высокой противовирусной эффективностью в отношении ВЭ *in vivo*. Более того, противовирусная эффективность НИОХ-14 по всем исследованным фармакодинамическим показателям сопоставима с противовирусной эффективностью аналогичного соединения ST-246, на основе которого в США разработан и проходит клинические испытания препарат против ортопоксвирусных инфекций [11, 12, 14]. Это позволяет сделать заключение о перспективности дальнейшего исследования НИОХ-14 с целью его использования в качестве субстанции для создания нового отечественного противооспенного препарата.

Работа была выполнена при поддержке ГК № 78-Д и ГК № 47-Д в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 — 2014 годы)».

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисевич С.В., Маренникова С.С., Махлай А.А., Терентьев А.И., Логинова С.Я., Перкрест В.В., Краснянский В.П., Бондарев В.П., Рыбак С.И. Оспа обезьян: особенности распространения после отмены обязательного оспопрививания. Журн. микробиол. 2012, 2: 69-73.
2. Закс Л. Статистическое оценивание. М., Статистика, 1976.
3. Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Бормотов Н.И., Шишкина Л.Н., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Скарнович М.О., Шевцов А.Р., Селиванов Б.А., Тихонов А.Я., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 2: 54-59.
4. Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Шишкина Л.Н., Булычев Л.Е., Скарнович М.О., Сергеев Ар.А., Бормотов Н.И., Пьянков О.В., Серова О.А., Боднев С.А., Селиванов Б.А., Тихонов А.Я., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Сравнительное изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vivo*. Вопросы вирусологии. 2013, 4: 39-43.
5. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
6. Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Таранов О.С., Боднев С.А., Туманов Ю.В., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Использо-

- ние мыши в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия препаратов против оспы обезьян. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 2: 60–65.
7. Селиванов Б.А., Беланов Е.Ф., Бормотов Н.И., Балахнин С.М., Серова О.А., Святченко В.А., Киселев Н.Н., Казачинская Е.И., Локтев В.Б., Тихонов А.Я. Производные трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6,7-дикарбоновой кислоты высоко эффективно ингибируют репликацию различных видов ортопоксвирусов. Доклады академии наук. 2011, 441 (3): 414–418.
 8. Халафян А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных. М., Бинوم-Пресс, 2010.
 9. Jordan R., Leeds J.M., Tyavanagimatt Sh., Hruby D.E. Development of ST-246® for treatment of poxvirus infections. Viruses. 2010, 2 (11): 2409–2435.
 10. Jordan R., Bailey T.R., Rippin S.R. Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopoxvirus infections and associated diseases. Patent WO, N 2004/112718 A3; 2005.
 11. Leeds J.M., Fenneteau F., Gosselin N.H. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling to determine the dose of ST-246 to protect against smallpox in humans. Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57 (3): 1136–1143.
 12. Parker S., Chen N.G., Foster S. et al. Evaluation of disease and viral biomarkers as triggers for therapeutic intervention in respiratory mousepox — an animal model of smallpox. Antiviral Res. 2012, 94 (1): 44–53.
 13. Parker S., Handley L., Buller M. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infections. Future Virol. 2008, 3 (6): 595–612.
 14. SIGA Technologies Inc. Advisory Committee Briefing Book. Human BioArmor. Background Package for FDA Advisory Committee Meeting on December 14–15, 2011. vol. 1. USA, 2011.
 15. Virology Methods Manual. Brian W.J. et al. (ed.). San Diego, Academic Press, 1996.
 16. Yang G., Pevear D.C., Davies M.H. et al. An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge. J. Virol. 2005, 79 (20): 13139–13149.

Поступила 10.09.14

Контактная информация: Кабанов Алексей Сергеевич,
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово, а/я 257, р.т. (383)336-60-10

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

Ю.Л.Набока¹, М.И.Коган¹, И.А.Гудима¹, Х.С.Ибишев¹,
Д.Г.Пасечник¹, А.К.Логвинов^{1,2}, Ш.Б.Илмдаров¹

МИКРОБИОТА НИЖНИХ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ И ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И ПРИ ИНФЕРТИЛЬНОСТИ

¹Ростовский государственный медицинский университет, ²НИИ нейрокибернетики, Ростов-на-Дону

Цель. Изучить микробиоту мочи, эякулята, соскоба уретры в норме и эякулята при infertility. **Материалы и методы.** Обследованы 2 группы мужчин: I (28) — контрольная, условно здоровые мужчины (20 — 25 лет), II (26) — пациенты с бесплодием (25 — 35 лет). В I группе исследовали среднюю порцию утренней мочи, эякулят, соскоб уретры, во II — эякулят. Бактериологическое исследование мочи и эякулята проводили на расширенном наборе питательных сред (HiMedia) для факультативно-анаэробных (ФАБ) и неклостридиальных анаэробных бактерий (НАБ). В I группе соскоб уретры и эякулят исследовали с помощью ПЦР. **Результаты.** В I группе методом ПЦР в соскобе уретры и эякуляте обнаружен широкий спектр ФАБ и НАБ. Доминирующими кластерами ФАБ были *Corynebacterium* spp. и коагулазоотрицательные стафилококки (по 67,9%). В группе НАБ — *Eubacterium* spp. Бактериологическое исследование эякулята коррелировало в ПЦР с аналогичными результатами доминирующих бактерий. При бактериологическом исследовании эякулята пациентов II группы среди ФАБ доминировали те же кластеры,