

*На правах рукописи*

Жернов Юрий Владимирович

**ПЕРВЫЙ ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ КАНДИДАТНЫЙ МИКРОБИЦИД  
НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ  
ДЛЯ ТОПИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ**

03.03.03 – иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

на соискание учёной степени

доктора медицинских наук

Москва, 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

**Научный консультант:**

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор  
Хаитов Муса Рахимович

**Официальные оппоненты:**

**Кадагидзе Заира Григорьевна**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

**Сизякина Людмила Петровна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФПК и ППС Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

**Шмагель Константин Владимирович**, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией экологической иммунологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.°Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «27» марта 2019 г. в 14-00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д°208.017.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу 115522, г.°Москва, Каширское шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте <http://nrcii.ru/dissertatsionnyy-совет/zashchity-dissertatsiy/>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Г.О. Гудима

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

ВИЧ-инфекция продолжает оставаться одной из основных проблем здравоохранения. С момента начала эпидемии ВИЧ-инфекции/СПИДа по данным ВОЗ было инфицировано от 65 млн. до 88 млн. человек. В 2017 г. число живущих с ВИЧ превысило 36,9 млн. человек [UNAIDS Global AIDS Update, 2018; Хаитов, 2018]. В России общее число зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции достигло 1,2 млн. человек. Прогноз развития ситуации по эпидемии ВИЧ-инфекции/СПИДа в России при сохранении нынешних темпов распространения остается неблагоприятным. Экономический ущерб огромен от этой эпидемии, который для России в 2017 составил году 22,5 млрд. рублей [Роспотребнадзор, 2018]. В связи с этим остро стоит вопрос разработки дополнительных средств фармакопрофилактики ВИЧ-инфекции, таких, как микробициды. Анти-ВИЧ-микробициды являются антисептическими топическими лекарственными средствами, способными предотвращать половую передачу ВИЧ-инфекции. В настоящее время в России, как и во всем мире, анти-ВИЧ-микробициды на фармацевтическом рынке отсутствуют, хотя их исследования, как средств противодействия ВИЧ-инфекции, активно ведутся. Установлено, что использование анти-ВИЧ-микробицидов с 50-80% эффективностью позволит снизить ежедневный риск заражения на 28% [Smith et al., 2005]. Микробициды с эффективностью 60%, используемые в 73 развивающихся странах, за 3 года смогут предотвратить от заражения ВИЧ-инфекцией 2,5 млн. людей [Watts et al., 2002]. С учетом значительной распространенности половой передачи ВИЧ-инфекции, высокого уровня смертности и существенных экономических потерь, разработка новых и безопасных иммуноактивных анти-ВИЧ-микробицидов продолжает оставаться актуальной задачей для здравоохранения во всем мире.

Существует ряд предпосылок, по которым гуминовые вещества можно рассматривать как перспективные компоненты микробицидов. Благодаря своей разветвленной химической структуре их можно отнести к группе

дендримероподобных микробицидов, представители которой демонстрируют достаточно высокую эффективность в клинических испытаниях [Moscicki et al., 2012; Cohen et al., 2012; McGowan et al., 2012]. Известны работы по установлению противовирусного действия природных и синтетических гуминовых веществ по отношению к вирусу гриппа A/WSN/1933 (H1N1) [Lu et al., 2002], вирусу простого герпеса 1 типа [Kloecking et al., 2002], вирусу геморрагической лихорадки и вирусу Коксаки А9 [Kloecking et al., 1972]. В экспериментах *in vitro* было показано, что синтетические аналоги гуминовых кислот (HS-1500, Оксигумат, Олипифат) способны ингибировать ВИЧ [Schneider et al., 1996; van Rensburg et al., 2002; Корнилаева и др., 2010]. Имеются литературные данные, что гуминовые вещества способны влиять на активацию иммунного ответа *in vitro*. Было показано, что Оксигумат повышает активность Th-1 клеток и уменьшает продукцию цитокинов Th-2 клетками [Mariette et al., 2002]. Наблюдаемая стимуляция пролиферации лимфоцитов человека была связана с повышением продукции ИЛ-2 и экспрессией ИЛ-2-рецепторов вместе с уменьшением количества ИЛ-10 под действием Оксигумата [Joone et al., 2003]. *In vivo* показано, что пероральный прием гуминовых веществ улучшает параметры врожденного иммунитета у экспериментальных животных: происходит усиление антибактериальной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности, активности лизозима и бактериальной агглютинации [Sanmiguel et al., 2016]. Это делает гуминовые вещества потенциальными продуктами для разработки многомишеневых иммуноактивных микробицидов.

**Цель:** Создание и оценка иммунобиологической активности и безопасности кандидатного микробицида на основе гуминовых веществ с многоцелевым механизмом действия для топической профилактики ВИЧ-инфекции и других вирус-ассоциированных заболеваний.

#### **Задачи исследования**

1. Химико-фармацевтическая характеристика исследуемых фракций гуминовых веществ и установление методом скрининга наиболее анти-ВИЧ-

активной фракции гуминовых веществ как по отношению к епv-псевдовirusам ВИЧ, референс-штаммам ВИЧ, так и актуальному изоляту ВИЧ, с целью дальнейшего создания на ее основе кандидатного микробицида.

2. Изучение механизма анти-ВИЧ-активности гуминовых веществ.
3. Изучение противовирусного действия гуминовых веществ на репликацию ряда оболочечных (вирус везикулярного стоматита, вирус клещевого энцефалита) и необолочечных вирусов (энтеровирус А71, полиовирус и вирус Коксаки).
4. Изучение способности гуминовых веществ к синергическому действию с другими анти-ВИЧ-веществами.
5. Изучение влияния гуминовых веществ на компоненты врожденного иммунитета.
6. Установление структурно-функциональных особенностей фракций гуминовых веществ, проведение анализа их супрамолекулярного пространства.
7. Фармакокинетическая характеристика фармацевтической субстанции кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот.
8. Исследование токсических свойств, иммунотоксического действия и аллергизирующих свойств фармацевтической субстанции кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот.
9. Исследование способности подавления иммуновоспалительной активности фармацевтической субстанцией кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот.
10. Исследование антиоксидантной активности фармацевтической субстанции кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот.

### **Научная новизна**

Впервые проведены скрининговые исследования анти-ВИЧ-активности широкой выборки четырех фракций гуминовых веществ. С использованием филогенетического анализа, установлен актуальный профиль эпидемии ВИЧ-инфекции в России, установлены доминирующие на территории страны субтипы и циркулирующие рекомбинантные формы ВИЧ. На полученных

актуальных изолятах ВИЧ, выделенных от больного, проведено исследование антиретровирусной активности наиболее перспективных гуминовых веществ для дальнейшего создания на их основе кандидатных микробицидов.

Впервые исследован многоцелевой механизм анти-ВИЧ-активности гуминовых веществ. Доказано, что гуминовые вещества способны предотвращать слияние ВИЧ с вирусной клеткой и подавлять обратную транскрипцию вирусной РНК. Установлена структурно-функциональная взаимосвязь между видом фракции, источником получения гуминовых веществ и их антиретровирусной активностью. Впервые доказана антивирусная активность гуминовых кислот в отношении оболочечных вирусов: вируса клещевого энцефалита, вируса везикулярного стоматита. Впервые продемонстрирована синергическая способность гуминовых кислот потенцировать анти-ВИЧ-активность других веществ: азидотимидина, лектинового белка гриффитсина и сульфатов хитозана.

Впервые показана способность гуминовых кислот выступать в качестве активных экзогенных индукторов ИФН- $\alpha$ , ингибиторов активации системы комплемента и ингибиторов адсорбции ЛПС на эритроцитах, как компонента микробной транслокации из кишечника при гиперактивации иммунной системы и прогрессировании ВИЧ-инфекции.

Также в ходе работы предложен новый способ изучения фармакокинетических параметров фармацевтической субстанции кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот путем детектирования их тритий-замещённых атомов водорода в тканях экспериментальных животных.

В токсикологических исследованиях показано, что разовая переносимая доза гуминовых кислот при интравагинальном введении кандидатного микробицида и внутривенном введении фармацевтической субстанции кандидатного микробицида экспериментальным животным составляет 250 мг/кг. Установлено, что разработанный кандидатный микробицид на основе гуминовых кислот при многократном интравагинальном введении (28 дней по одному введению в два дня) в дозе 250 мг/кг не вызывает выраженной

интоксикации, не оказывает повреждающего действия на жизненно важные системы органов и относится к классу малотоксичных соединений.

Установлено, что разработанный кандидатный микробицид не оказывает негативного действия на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета, не обладает местным раздражающим действием, не индуцирует аллергические реакции, такие, как анафилактический шок. Фармацевтическая субстанция кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот обладает выраженной антиоксидантной активностью и способна подавлять иммуновоспалительную активность.

Экспериментально доказана перспективность применения гуминовых кислот природного происхождения в качестве инновационного подхода к топической фармакопрофилактики ВИЧ-инфекции.

### **Теоретическая значимость работы**

Доказана возможность участие гуминовых кислот в регуляции иммунного ответа: гуминовые кислоты способны стимулировать факторы врожденные противовирусного иммунитета, выступая в качестве активных индукторов эндогенного интерферона- $\alpha$ , ингибиторов активации системы комплемента и энтеросорбентов ЛПС. С использованием различных клеточных моделей ВИЧ-инфекции *in vitro*, а также на актуальном для России изоляте ВИЧ, продемонстрирована способность гуминовых кислот подавлять репликацию вируса в клетках. Доказана эффективность применения иммуноактивных микробицидов на основе гуминовых веществ для топической фармакопрофилактики ВИЧ-инфекции. Данные филогенетического анализа, демонстрирующие современный профиль эпидемии ВИЧ-инфекции/СПИДа на территории Российской Федерации и Республики Беларусь, вошли в образовательные программы для студентов вузов медицинских и биологических специальностей и в систему повышения квалификации научно-педагогических работников (акт о внедрении результатов научных исследований в учебный процесс на кафедре акушерства и гинекологии №2 СамГМУ от 27 апреля 2017 г.).

## **Практическая значимость работы**

Практическая значимость диссертационного исследования заключается в том, что была предложена оригинальная композиция и внедрена технология производства кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот и масла какао в виде вагинальных суппозитория, обеспечивающая пролонгированное действие фармацевтической субстанции, что необходимо для получения малых партий препаратов с целью дальнейших доклинических исследований. Созданная и апробированная оригинальная модель исследования анти-ВИЧ-активности лекарственных препаратов на основе референс-штамма ВИЧ-1 MvP-899 и клеточной культуры TZM-bl может быть использована для контроля специфической активности кандидатных микробицидов в доклинических исследованиях, на производстве и для сертификационной оценки анти-ВИЧ-микробицидов. Представлены практические решения для дальнейшего совершенствования подходов к доклиническим исследованиям микробицидов для топической профилактики ВИЧ-инфекции. Определены перспективы практического использования иммуноактивных микробицидов на основе гуминовых веществ.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Гуминовые вещества участвуют в регуляции иммунного ответа, обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностью и могут быть использованы для топической профилактики ВИЧ-инфекции и других вирус-ассоциированных заболеваний.
2. Гуминовые кислоты представляют собой противовирусные компоненты для микробицидов с многоцелевым механизмом ингибирования ВИЧ и других оболочечных вирусов.
3. Разработанный кандидатный микробицид на основе гуминовых кислот для топической профилактики ВИЧ-инфекции является малотоксичным, не оказывает повреждающего действия на жизненно важные системы органов, на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета, не индуцирует аллергические реакции.



4. Фармацевтическая субстанция кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот обладает выраженной антиоксидантной активностью и способна подавлять иммуновоспалительную активность.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на VI (24–26 марта 2014 г., Москва, Россия), VII (30 марта – 1 апреля 2015 г., Москва, Россия) и VIII (28-30 марта 2016 г., Москва, Россия) ежегодных всероссийских конгрессах по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»; на XI всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (20-28 апреля 2016 г., Челябинск, Россия); на IV ежегодной конференции московских фтизиатров «Государство, медицина и общество в борьбе с туберкулезом в столице» (8-9 сентября 2016 г., Москва, Россия); на 6-ом Европейском конгрессе по вирусологии (ECV) (19-22 октября 2016 г., Гамбург, Германия); на XIV международном конгрессе РААКИ «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (22-24 марта 2017 г., Москва, Россия); на 14-ом конгрессе Балтийской ассоциации дерматовенерологов (BADV) (4-7 октября 2017, Вильнюс, Литва); на 36-ом (17-21 июня 2017 г., Хельсинки, Финляндия) и 37-ом (26-30 мая 2018 г., Мюнхен, Германия) конгрессах Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (EAACI).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом государственного задания ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России «Поиск и разработка иммуномодулирующих препаратов» (шифр: «Иммунитет-16»). Диссертационная работа была поддержана грантами РФФИ №16-54-76005 ЭРА\_а «Антивирусные препараты на основе гуминовых веществ: механизмы анти-ВИЧ-активности, влияние на мукозный иммунитет и исследование синергетических эффектов»; РФФИ №15-54-04001 Бел\_мол\_а «Генетическая изменчивость и биологические свойства вирусов иммунодефицита человека, циркулирующих в Российской Федерации и

Республике Беларусь»; РФФИ 16-03-01057 А «Природные гуминовые полианионы как источник потенциальных противовирусных средств»; грантами DAAD и международного гуминового общества (IHSS) в рамках проекта «Antiviral activity of humic substances and its relation to molecular structure» в Helmholtz Zentrum München, Мюнхен, Германия.

Основные результаты диссертационной работы отражены в 21 публикации в ведущих рецензируемых научных журналах, в том числе в 18 отечественных изданиях и в 3 зарубежных изданиях. Получено 3 патента.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа изложена на 348 страницах текста, содержит 62 таблицы, 70 рисунков. Диссертация включает следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение и обсуждение результатов, выводы, список литературы. Библиография включает 355 источника (109 отечественных и 246 зарубежных).

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Объектом исследования явились фракции гуминовых веществ: гуминовые кислоты (ГК), гиматомелановые кислоты (ГМК), фульвовые кислоты (ФК), гумусовые кислоты (ГФК) и структурные аналоги гуминовых веществ, представленные 23 образцами.

### **Характеристика фракций гуминовых веществ**

Элементный количественный анализ исследуемых фракций гуминовых веществ проводили на анализаторе Vario EL (Германия). С целью определения содержания кислотных групп во фракциях гуминовых веществ проводили потенциометрическое титрование. <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопия проводилась на приборе Avance 400 (Bruker, Германия) при рабочей частоте для протонов 400 МГц. Обращённо-фазную хроматографию (RPLC) проводили на гидрофобизированном геле агарозы (Octyl Sepharosa CL-4B, Pharmacia). Для регистрации оптической плотности элюата (280 нм) использовали оптический блок хроматографа Милихром-1. Молекулярный состав фракций гуминовых

веществ определяли методом ИЦР-МС с использованием масс-спектрометра 12 Tesla SOLARIX FTICR (Bruker Daltonics, Бремен, Германия) и электрораспылительной ионизации (ESI) в отрицательном режиме. Для визуализации и анализа каждого молекулярного компонента строили диаграммы Ван Кревелена [Kim et al., 2003], которые представляют собой двумерное корреляционное поле с координатами Н/С к О/С или m/z.

### **Иммуновирологические методы исследования**

Противовирусная активность фракций гуминовых веществ изучалась по профилактической схеме: предобработка клеток гуминовыми веществами с последующим заражением вирусами.

Для изучения анти-ВИЧ-активности фракций гуминовых веществ использовались классические вирус-клеточные модели ВИЧ-1 BRU/CEM-SS, ВИЧ-1 ШВ/MT-2 и оригинальная модель ВИЧ-1 MvP-899/TZM-bl. Репликацию вируса оценивали методом определения p24-антигена ВИЧ при помощи сертифицированной тест-системы ИФА «ВИЧ-1 p24-антиген-ИФА-БЕСТ» (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) согласно инструкции производителя; методом нейтрализации env-псевдовирусов ВИЧ-1 с применением клеток TZM-bl; при помощи тест-системы полной репликации вируса для обнаружения ингибиторов ВИЧ (EASY-НIT) [Kremb et al., 2010]. Цитотоксические свойства фракций гуминовых веществ оценивали в МТТ-тесте.

С целью секвенирования и получения изолятов ВИЧ у пациентов с ранней ВИЧ-инфекцией отбирали кровь для получения сыворотки и выделяли мононуклеары периферической крови (МПК). Филогенетический анализ сиквенсов проводился методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с использованием модели нуклеотидных замен GTR.

Исследование механизма проявления анти-ВИЧ-активности фракций гуминовых веществ методом варьирования порядка добавления реагентов (Time-of-addition assays, ТОА-исследование) проводили с использованием протокола EASY-НIT в стандартных 96-луночных планшетах. Исследование способности фракций гуминовых веществ ингибировать прикрепление ВИЧ к

клеткам проводили, используя GFP-репортерный R5-тропный ВИЧ-1 NL4-3 Gag-iGFP и культуру клеток LC5-RIC-R5 в присутствии ингибитора слияния энфувиртида. Активность обратной транскриптазы определяли с использованием коммерческого набора для анализа обратной транскриптазы EnzChek (Molecular Probes, Inc., США) согласно инструкции производителя.

Определение противовирусной активности фракций гуминовых веществ по отношению к вирусу везикулярного стоматита (ВВС) штамм Indiana проводилось на клетках MDBK путем оценки цитопатического действия (ЦПД). Определение противовирусной активности фракций гуминовых веществ по отношению к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ) штамм Абсеттаров проводилось в тесте по уменьшению количества бляшек [Orlov et al., 2016]. Определение противовирусной активности фракций гуминовых веществ по отношению к энтеровирусу А 71 изолят 46973, вирусу Коксаки В1 изолят 48461 и полиовирусу 1 типа штамм Sabin проводилось в культуре клеток рабдомиосаркомы человека RD по ЦПД на основе микрометода нейтрализации инфекционности в культуре клеток.

Оценку интерферон-индуцирующей активности фракций гуминовых веществ проводили в культуре спленоцитов мышей линии BALB/c. Количество интерферона (ИФН) определяли путем титрования с вирусом ВВС штамм Indiana в культуре MDBK. За единицу активности ИФН (Ед/мл) принималась величина, обратная его максимальному разведению, которая защищает 50% клеток от цитопатогенного действия 100 TCID<sub>50</sub> вируса. Концентрацию сывороточных ИФН-α и ИФН-γ у мышей линии BALB/c при введении ГК определяли методом твердофазного сэндвич-ИФА ELISA, используя сертифицированные тест-системы «ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-БЕСТ»).

Изучение влияния фракций гуминовых веществ на их способность сенсibilизировать ЛПС эритроцитами барана (ЭБ) проводилось методом соинкубирования фракций с ЭБ и сравнения результатов с нативными ЭБ по титрам агглютинации с О-антисывороткой. Изучение влияния фракций

гуминовых веществ на активность системы комплемента определяли в реакции гемолиза ЭБ и гемолиза эритроцитов кролика (ЭКр).

### **Исследование фармакокинетических параметров**

Исследование проницаемости кандидатного микробицида на основе ГК (КМГК) через биомембрану (фрагмента кишечной стенки быка) проводилось методом диализа при различных значениях рН. Количественное определение ГК в диализате определяли спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 350 нм. Исследование распределения по органам и тканям ГК проводилась на мышах линии BALB/c. Для этого 1% раствор ГК с одним <sup>3</sup>Н-замещённым атомом водорода (0,0139 мкКи/мг) в дозе 2 мг/мышь в объёме 0,2 мл вводили внутривенно болюсно в хвостовую вену мыши. В соответствующей временной точке от момента введения ГК мышей подвергали эвтаназии с последующим препарированием. Количество <sup>3</sup>Н-замещённого препарата в органах определяли при помощи сцинтилляционного детектора ядерных излучений.

### **Исследование острой и хронической токсичности**

Острая токсичность КМГК изучалась при интравагинальном пути введения самкам мышей линии BALB/c. Для этого изготавливались модельные микробициды на основе масла какао объемом 50 мкл с концентрацией ГК 100 мг/мл (5 мг/мышь). ГК, как фармацевтическая субстанция микробицида, вводились мышам внутривенно болюсно в физиологическом растворе в хвостовую вену. 1% раствор ГК вводили в дозе 250 мг/кг (5 мг/мышь) в объёме 0,5 мл. Период наблюдения за животными всех групп составлял две недели от момента введения. После чего производился анализ извлеченных органов экспериментальных животных.

Хроническая токсичность изучалась при интравагинальном введении самкам мышей линии BALB/c модельного микробицида на основе масла какао объемом 50 мкл с концентрацией ГК 100 мг/мл курсом 28 дней по одному интравагинальному введению в два дня. По ходу всего исследования у мышей регистрировали проявление клинических признаков токсичности. В конце

исследования животные подвергались эвтаназии с последующим забором органов для гистологического анализа, крови для исследования биохимических и гематологических параметров.

### **Исследование иммунотоксического действия**

Влияние на гуморальный иммунный ответ оценивали по способности ГК изменять количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей при иммунизации их эритроцитами барана (ЭБ). Влияние состояния клеточного иммунитета на введение ГК оценивали на модели индукции реакции ГЗТ к гаптену 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС). С целью оценки возможной неспецифической стимуляции АОК (поликлональной активации) на введение ГК применялась реакция локального гемолиза. Оценка функционального состояния фагоцитирующих клеток крови при воздействии ГК производилась по способности нейтрофилов к окислительному метаболизму в тесте люминолзависимой спонтанной и индуцированной зимозаном (ЗИМ) или форболмеристилацетатом (ФМА) хемилюминесценции.

### **Исследование аллергизирующих свойств**

Изменения уровня антител класса IgE на введение ГК оценивали с методом твердофазного ИФА. С целью оценки наличия специфических антител в сыворотке крови мышей к введенному внутрибрюшинно раствору ГК проводилась реакция активной анафилаксии. Определение развития сенсibilизации у мышей на введение ГК проводилось методом пассивной кожной анафилаксии у крыс. Исследование аллергизирующего действия ГК проводилось методом эпукутаных аппликаций на морских свинках.

### **Исследование подавления иммуновоспалительной активности**

Острое асептическое иммунное воспаление моделировали у крыс линии Wistar путём однократного введения 0,2 мл 1% раствора каррагинина-лямбда (Sigma), которому предшествовала инъекция 0,5 мл 0,1% раствора ГК в физиологическом растворе в дозе 2,5 мг/кг (0,64 мг/особь). В крови животных оценивали изменение содержания эритроцитов, тромбоцитов, общего пула

лейкоцитов, определяли концентрацию гемоглобина, СОЭ, оценивали лейкоцитарную формулу. В сыворотке крови крыс определяли уровень С-реактивного белка (СРБ), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), содержание фибронектина, а также провоспалительных цитокинов: интерлейкин 1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) и фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ).

Хроническое аутоиммунное воспаление моделировали у крыс линии Wistar путем субплантарного введения в правую заднюю лапу 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда, представляющего собой взвесь БЦЖ с концентрацией 2,5 мг/мл, в вазелиновом масле. На второй неделе после инъекции адьюванта Фрейнда внутривенно болюсно в хвостовую вену вводили 0,5 мл 0,1% раствора ГК в физиологическом растворе в дозе 2,5 мг/кг (0,64 мг/особь). Курс введения составил 12 дней ежедневно. Воспалительная реакция оценивалась гистологическим методом.

### **Исследование антиоксидантной активности**

Антиоксидантная активность ГК по отношению к продуктам метаболизма полихлорированных дифенилов изучалась на группе крыс линии Wistar, у которых производилось моделирование процессов свободно-радикального окисления путём однократного внутрижелудочного введения животным смеси полихлорированных дифенилов (ПХД) в растворе оливкового масла в полулетальной дозе 0,1 мг/кг массы тела [Meberg, 1980]. ГК вводились животным парентерально и перорально в виде эмульсии. При анализе гомогената печени и крови определялись показатели альбумина, непрямого билирубина, холестерина, АлАт, АсАт, каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), супероксиддисмутазы (СОД), значение общей антиоксидантной активности (ОАА).

Изучение антиоксидантной активности ГК по отношению к продуктам метаболизма фенилгидразина гидрохлорида проводилось на модели экспериментальной гемолитической анемии по Фишеру на мышях линии BALB/c. Фенилгидразин-индуцированная гемолитическая анемия

диагностировалась путём микроскопического изучения периферической крови и подсчёту эритроцитов при помощи камеры Тома – Горяева.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика фракций гуминовых веществ

Всесторонний молекулярный анализ с использованием RPLC-хроматографии, ИЦР-МС и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии показал, что фракции гуминовых веществ сильно отличаются различными химическими свойствами (рис. 1 и 2).

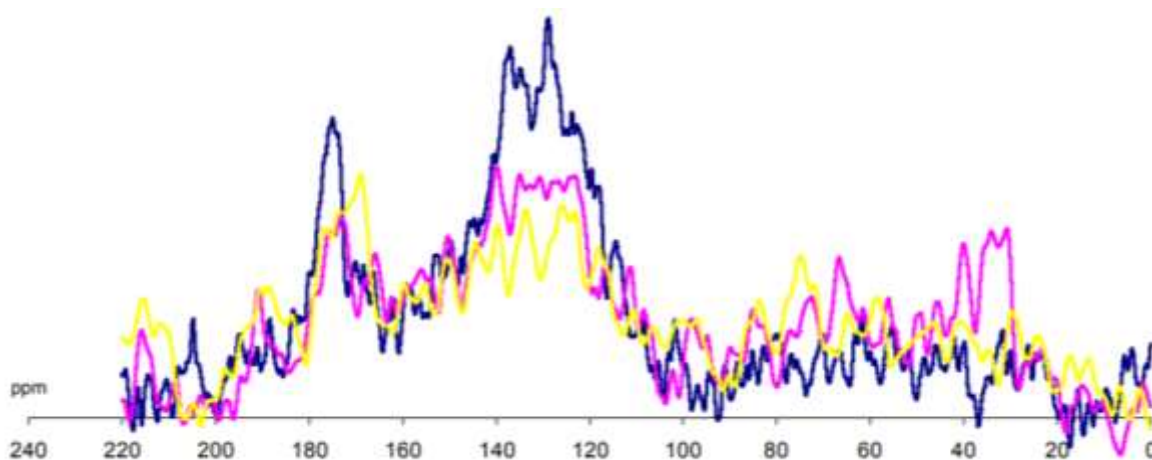


Рис. 1. Пример  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров фульвовых (желтый), гиматомелановых (фиолетовый) и гуминовых (синий) кислот пелоидов.

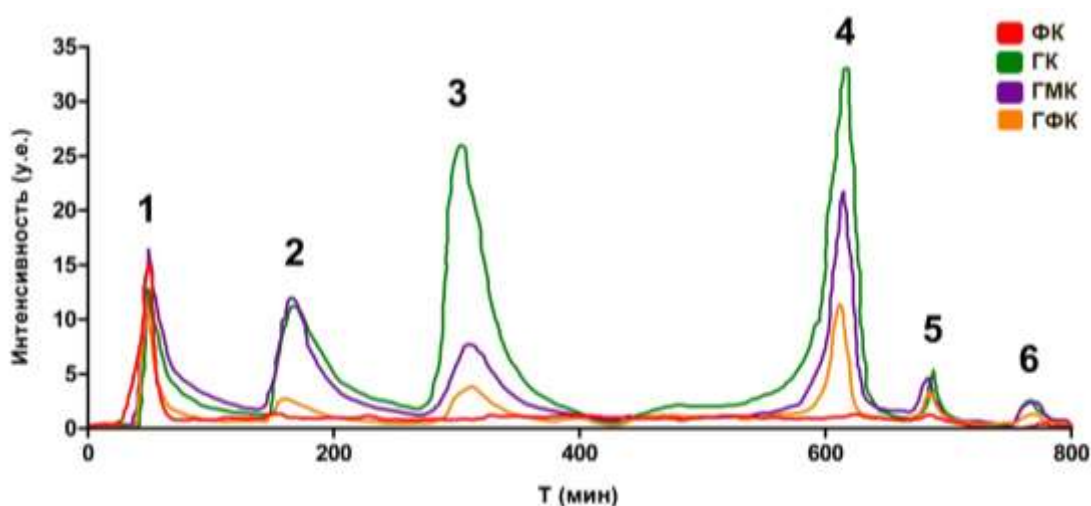


Рис. 2. Пример RPLC-хроматограмм фульвовых (красный), гуминовых (зеленый), гиматомелановых (фиолетовый) и гумусовых (оранжевый) кислот пелоидов.

В отличие от синтетических полимеров, гуминовые вещества не имеют мономеров, и, как следствие, они характеризуются экстремальным молекулярным разнообразием. Тем не менее, наблюдается очевидная



взаимосвязь между способом выделения фракции и наличием конкретных молекулярных составляющих в диаграммах Ван Кревелена (рис. 3).

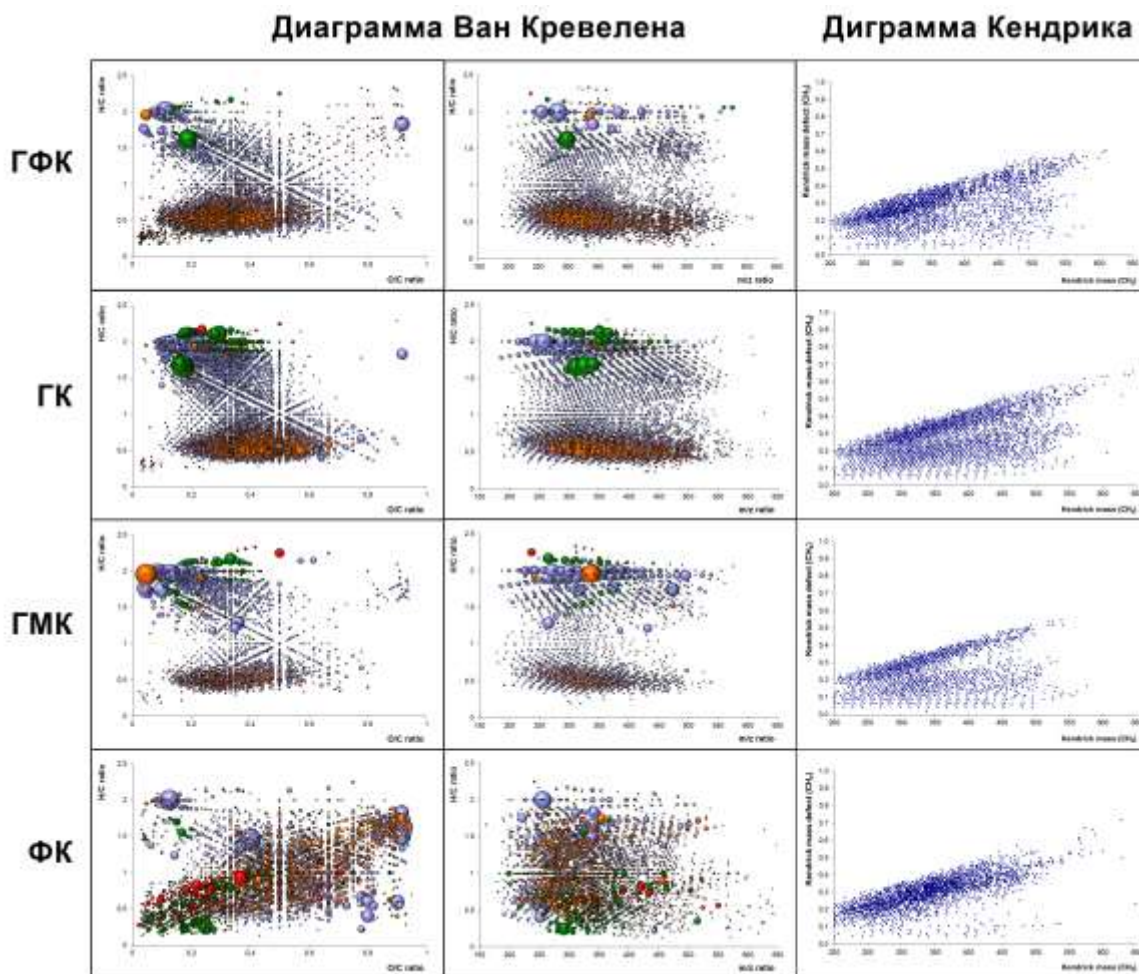


Рис. 3. Диаграммы Ван Кревелена и диаграмма Кендрика для фракций гуминовых веществ. Цвета точек на диаграммах Ван Кревелена используются для обозначения различных атомных композиций: CHO – синий, CHON – оранжевый, CHOS – зеленый, CHNOS – красный. Размер точки пропорционален пиковой интенсивности в масс-спектрах ИЦР-МС.

Наибольшие отличия выявлены между фракциями ГМК и ФК. Кислотно-растворимая фракция ФК по данным масс-спектров характеризуется наивысшим содержанием гетероатомов: площадь поликонденсированных ароматических углеводородов единого молекулярного пространства диаграммы Ван Кревелена покрыта молекулами состава CHON, что свидетельствует о наличии гетероатомных колец. В верхнем левом углу диаграммы Ван Кревелена расположено много серосодержащих компонентов, что свидетельствует об окисленном характере атомов серы, присутствующих во фракции ФК. По данным  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии ФК показали самый высокий

вклад О- и N-замещенных гидрофобных алифатических фрагментов в их структуру. Данные RPLC-хроматографии демонстрируют наивысшую гидрофильность ФК с индексом липофильности равным 0,11. Из полученных данных можно сделать вывод, что фракция ФК представляет собой наиболее богатые карбоксилатом, гидрофильные низкомолекулярные гуминовые полианионы (HPAs) с максимальной степенью окисления.

Нерастворимая в кислотах фракция ГК по данным масс-спектров имеет наивысший индекс ароматичности и содержит большее число гетероатомов, чем ГМК, но меньшее чем ФК. Это свидетельствует о более высокой кислотности ГК, чем ГМК. Единое молекулярное пространство диаграммы Ван Кревелена фракции ГК характеризуется наибольшим количеством лигниноподобных и полифенольных компонентов, расположенных в области значений Н/С от 0,6 до 1,2 и значений О/С от 0,5 до 0,8. Диаграмма Кендрика для фракции ГК указывает на наличие гомологических углеводов с высокой степенью насыщения, показанных на диаграмме в виде параллельной серии точек в нижней области диаграммы, а также диагональной серии точек, полученных полифенольными соединениями, которые не имеют СН<sub>2</sub>-гомологической серии. Результаты <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии демонстрируют содержание гидрофобных ароматических фрагментов в ГК, что совпадает с данными RPLC-хроматографии. Фракция ГК характеризуется самой высокой гидрофобностью (LI = 0,74) из-за максимального количества ароматических единиц и меньшей полярностью по сравнению с фракциями ФК и ГМК.

Растворимые в этаноле ГМК по данным масс-спектров имеет наивысшее содержание СНО-алифатических и алициклических структур с наиболее распространенной последовательностью СН<sub>2</sub>-гомологов, которые могут способствовать наибольшей амфифильности этой фракции в ряду гуминовых веществ (LI = 0,53). В едином молекулярном пространстве на диаграмме Ван Кревелена фракция ГМК характеризуется плотно заполненной областью насыщенных углеводов и конденсированных ароматических соединений и имеет чрезвычайно обедненное содержание гетероатомов и окисленных

алифатических остатков. Это может быть связано с существенным содержанием  $\text{CH}_2$ -цепей, а также с  $\text{CH}_2\text{O}$ -фрагментами, образующими  $\text{CH}_2\text{O}$ -мостики и гетероциклические кольца (например, фуурофураны, тетрагидрофураны и пираны) в липидах, терпеноидах, лигнанах и т.д., присутствующих в молекулярном составе ГМК. Присутствие этих классов веществ ожидаемо, учитывая, что экстракция этанолом или метанолом является распространенным способом выделения таких полярных компонентов из растительной биомассы [Sainvitu et al., 2012]. Необходимо отметить, что молекулярный состав ГК шире по сравнению с ГМК, т.к. фракция ГМК в процессе получения является подфракцией ГК [Grimalt et al., 1989]. Таким образом, фракция ГМК представляет собой наиболее амфифильные НРАs с промежуточной полярностью, богатые компонентами состава СНО, с меньшим зарядом при нейтральной кислотности.

Фракция ГФК, представляющая собой сумму ФК и ГК, по данным масс-спектров отличается высоким индексом ароматичности и содержит большее число гетероатомов, чем ГМК, но меньшее чем ФК. Молекулярные композиции фракции ГФК в едином молекулярном пространстве на диаграмме Ван Кревелена очень близки к фракции ГК. Состав фракции ГФК характеризуется наличием как гидрофильных, так и гидрофобных фрагментов с преобладающим вкладом гидрофобных ( $\text{LI} = 0,63$ ).

На основании полученных данных показано, что применение кислотно-основного фракционирования для получения препаратов гуминовых веществ является весьма эффективным. Зная различия в гидрофильно-гидрофобном и кислотно-основном балансе фракций гуминовых веществ, можно применять эти особенности при разработке лекарственной формы кандидатного микробицида и создании препаратов на основе гуминовых веществ.

### **Изучение анти-ВИЧ-активности фракций гуминовых веществ**

Полученные результаты изучения анти-ВИЧ-активности демонстрируют, что все исследованные препараты фракций гуминовых веществ оказывают ингибирующее действие на репликацию вируса в

исследуемых культурах клеток в диапазоне значений  $EC_{50}$  от 0,33 до 1,41 мкг/мл (рис. 4). На основании этого сделан вывод о том, что фракции гуминовых веществ обладают значительной анти-ВИЧ-активностью *in vitro*.

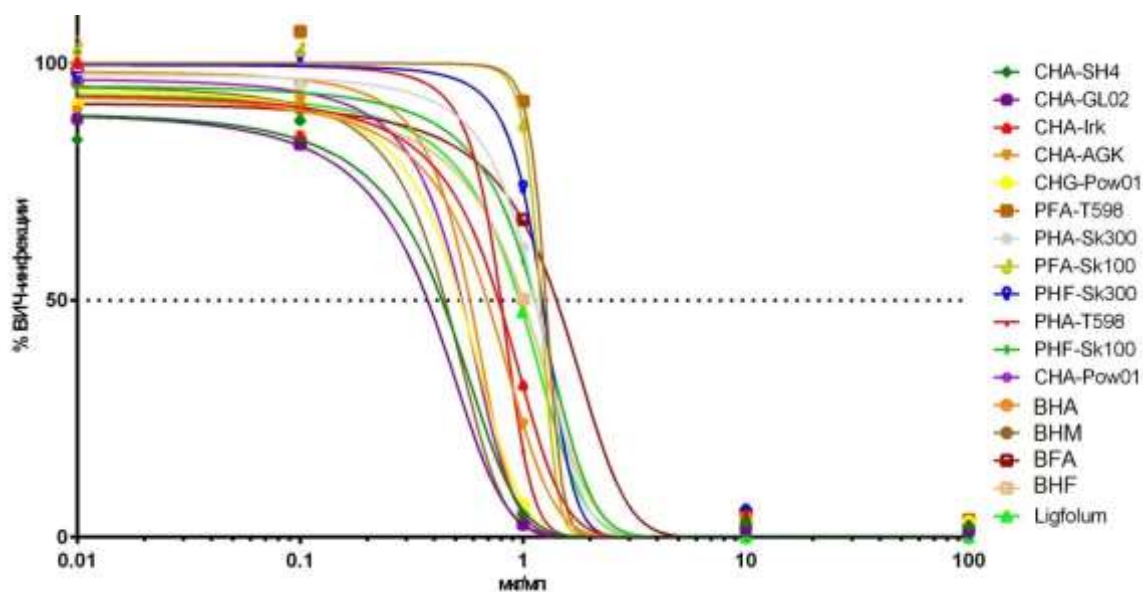


Рис. 4. Дозозависимые кривые анти-ВИЧ-активности гуминовых веществ, проявляющие ингибирующее действие на репликацию ВИЧ-1<sub>BRU</sub> в культуре клеток СЕМ-SS.

Данная активность превышает или сопоставима с данными, полученными для синтетических сульфированных и карбоксилированных полианионов, разрабатываемых для кандидатных микробицидов [Kilby et al., 1998]. Так, соответствующие значения  $EC_{50}$  для декстран сульфата натрия в отношении ВИЧ-1 III-B и ВИЧ-1 NL4-3 варьировали от 0,1 до 1,5 мкг/мл [Baba et al., 1988; Rando et al., 2006; Baranova et al., 2011], для гепарина в отношении ВИЧ-1 значение  $EC_{50}$  составило 0,5 мкг/мл. Большая группа микробицидных препаратов содержит в своем составе производные поликарбоксилированных целлюлоз, для которых описаны значения  $EC_{50}$  в отношении ВИЧ-1 на клетках CD4 LTR  $\beta$ -Gal: ацетатфталат целлюлозы (САР) – 1,5 мкг/мл, тримеллитат ацетата целлюлозы (САТ) – 5,4 мкг/мл, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМСР) – 6,7 мкг/мл, тримеллитат гидроксипропилметилцеллюлозы (НРМСТ) – 0,6 мкг/мл [Rando et al., 2006].

Анти-ВИЧ-активность препаратов гуминовых веществ также сравнивали с их структурными аналогами. Так значение  $EC_{50}$  коммерческого препарата Лигфол, представляющего собой бутанольную фракцию ГК, составила

0,96±0,11 мкг/мл, что сопоставимо со значениями EC<sub>50</sub> для ГК углей, находящегося в пределах от 0,37 до 0,77 мкг/мл, и EC<sub>50</sub> ГМК, значение которой составило 0,44±0,14 мкг/мл. Значение EC<sub>50</sub> структурного аналога фульвокислот MNQ-FA [Zherebker et al., 2015] составила 1,27 мкг/мл, что коррелирует с полученными данными активности фракций ФК из разных источников (EC<sub>50</sub> от 1,26 до 1,41 мкг/мл). Изучение цитотоксических свойств в МТТ-тесте продемонстрировало малотоксичность всех препаратов гуминовых веществ в изучаемом диапазоне концентраций.

Для установления временной стадии цикла репликации ВИЧ-1, на которую приходится действие препаратов гуминовых веществ, нами было проведено исследование EASY-НIT в вирус-клеточной системе ВИЧ-1 LAI/LC5-RIC. Специфической особенностью тест-системы EASY-НIT является то, что измерение параметров инфекции происходит в две временные стадии цикла репликации ВИЧ-1: ранние события в цикле репликации ВИЧ-1 (1°этап) и образование инфекционных вирионов (2°этап). Полученные результаты указывают на то, что все фракции гуминовых веществ препятствуют ранней стадии цикла репликации ВИЧ-1. В раннюю стадию репликации вируса происходят такие события, как взаимодействие вириона с клеткой и его слияние, обратная транскрипция и интеграция ВИЧ.

Нами впервые установлена общая концепция в проявлении противовирусной активности для препаратов гуминовых веществ. Препараты гуминовых веществ, полученные из углей и пелоидов, превосходят по антивирусной активности препараты гуминовых веществ торфов. А внутри фракций гуминовых веществ наблюдаются значительные различия в антивирусной активности и цитотоксичности: ФК значительно слабее ингибируют репликацию ВИЧ-1 и обладают большей цитотоксичностью по сравнению с фракциями ГК, ГФК и ГМК (рис. 5).

На основе предложенной концепции и рассчитанных терапевтических индексов (IS) нами были определены наиболее подходящие фракции гуминовых веществ для создания кандидатного микробицида: ГК углей или

пелоидов, ГМК пелоидов. Отметим, что наибольшей анти-ВИЧ-активностью в тесте EASY-HIT обладала фракция ГМК пелоидов. Достигнутые значения  $EC_{50}$  для неё на 1 и 2 этапе теста EASY-HIT составляли 0,038 и 0,044 мкг/мл соответственно, а значение  $EC_{50}$  на клетках МПК достигали 0,98 мкг/мл, что ниже значений полуэффективных концентраций всех классов сульфированных и карбоксилированных полианионных микробицидов, рассмотренных выше. Однако фракция ГМК является спирторастворимой подфракцией ГК, что означает, что молекулы, отвечающие за противовирусную активность в этих двух фракциях, практически идентичны. А стадия выделения ГМК из ГК будет сильно повышать себестоимость кандидатного микробицида.

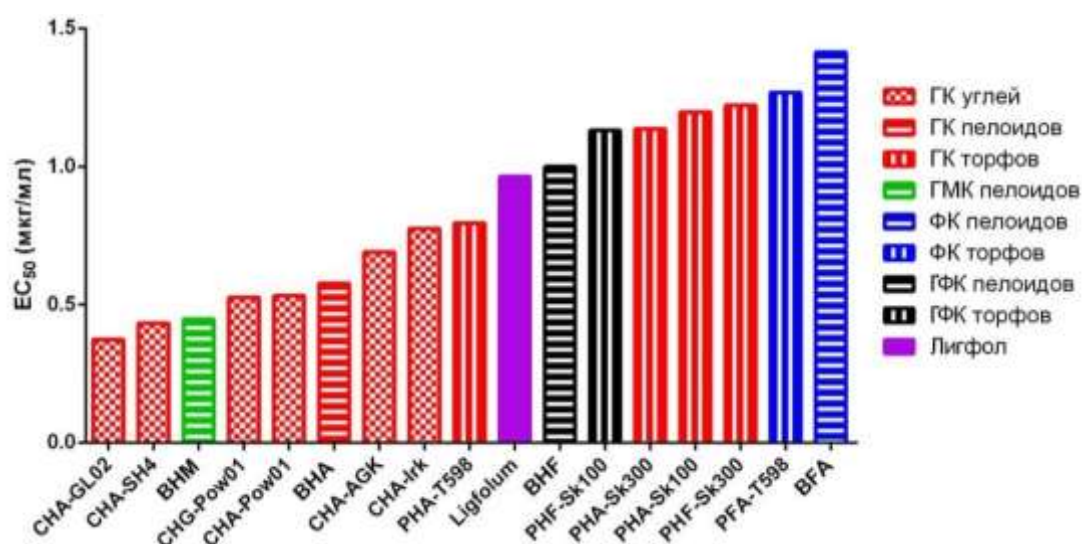


Рис. 5. Значения полуэффективной концентрации исследуемых препаратов в вирус-клеточной системе ВИЧ-1 BRU/CEM-SS в зависимости от источника их получения.

Для выявления особенностей ингибирования гуминовыми веществами различных субтипов и циркулирующих рекомбинантных форм (ЦРФ) ВИЧ нами проводилось изучение активности методом нейтрализации env-псевдовирусов с применением клеток TZM-bl. Установлено, что для всех env-клонов ВИЧ-1 подавление инфекции ГК характеризовалось значениями  $EC_{50}$  в диапазоне от 0,44 мкг/мл (ВИЧ X2278\_C2\_B6) до 2,48 мкг/мл (ВИЧ 816763.c02). Впервые выявлено, что ГК проявляют большой анти-ВИЧ-ингибирующий эффект к вирусам поздних стадий по Фибигу, когда субтип/ЦРФ и способ передачи вируса достоверно не влияют на их активность.



Определение наличия синергического эффекта фракции ГК и последующий расчет комбинационного индекса (CI) выявило высокую синергию между анти-ВИЧ-активностью ГК и азидотимидином (AZT) (CI = 0,14), гриффицитином (CI находился в диапазоне от 0,3 до 0,7) и сульфатами хитозана (CI = 0,1). Впервые установленный синергический эффект ГК можно будет использовать при разработке комплексных микробицидов, включающих в свой состав несколько фармацевтических субстанций, работающих одновременно и имеющих разные точки приложения при ингибировании ВИЧ-инфекции.

Чтобы получить представление о механизме действия фракций гуминовых веществ, было проведено ТОА-исследование. Нами впервые установлены существенные различия во временных профилях анти-ВИЧ-активности тестируемых препаратов (рис. 6).

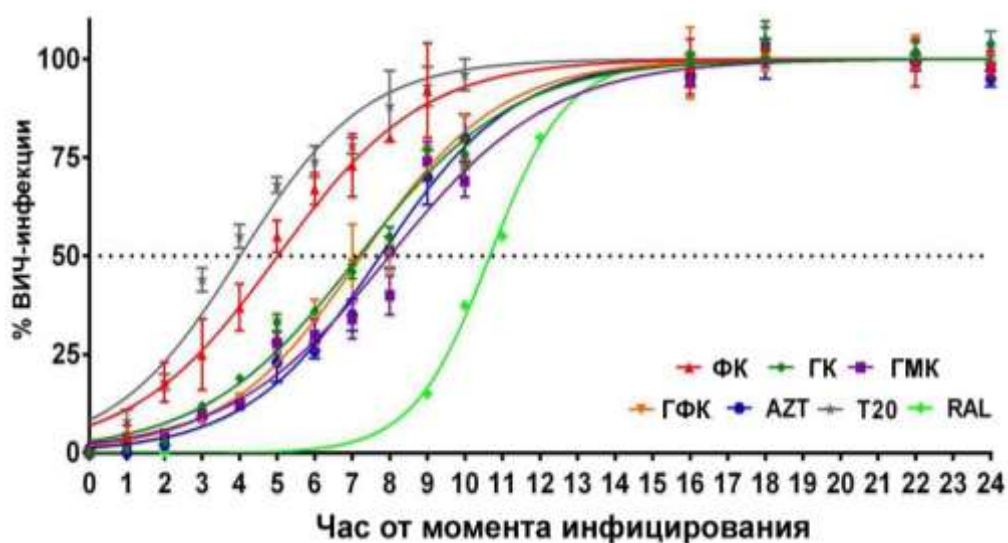


Рис. 6. Временные профили анти-ВИЧ-активности тестируемых фракций гуминовых веществ и референс-препаратов.

Фракции ГК, ГМК и ГФК теряли 50% своей эффективности на 7-8 часах от момента внесения вируса, что было близко к значениям AZT (7,7±0,2 часа). Тогда как временный профиль ФК был аналогичен профилю энфувиртида (T20) с 50% потерей эффективности, достигнутой при 5,0±0,3 часах. Полученные данные ТОА-исследования подтвердили ранее полученные данные теста EASY-НПТ, что все фракции гуминовых веществ препятствуют ранней стадии цикла репликации ВИЧ-1.

Исследование способности фракций гуминовых веществ ингибировать прикрепление флуоресцентно-меченных частиц вируса ВИЧ-1 NL4-3 Gag-iGFP показало, что все фракции снижают прикрепление вируса в среднем в 3-4 раза по отношению к положительному ВИЧ-контролю (рис. 7). Из этого можно сделать вывод, что все фракции гуминовых веществ можно рассматривать как мощные ингибиторы прикрепления вируса.

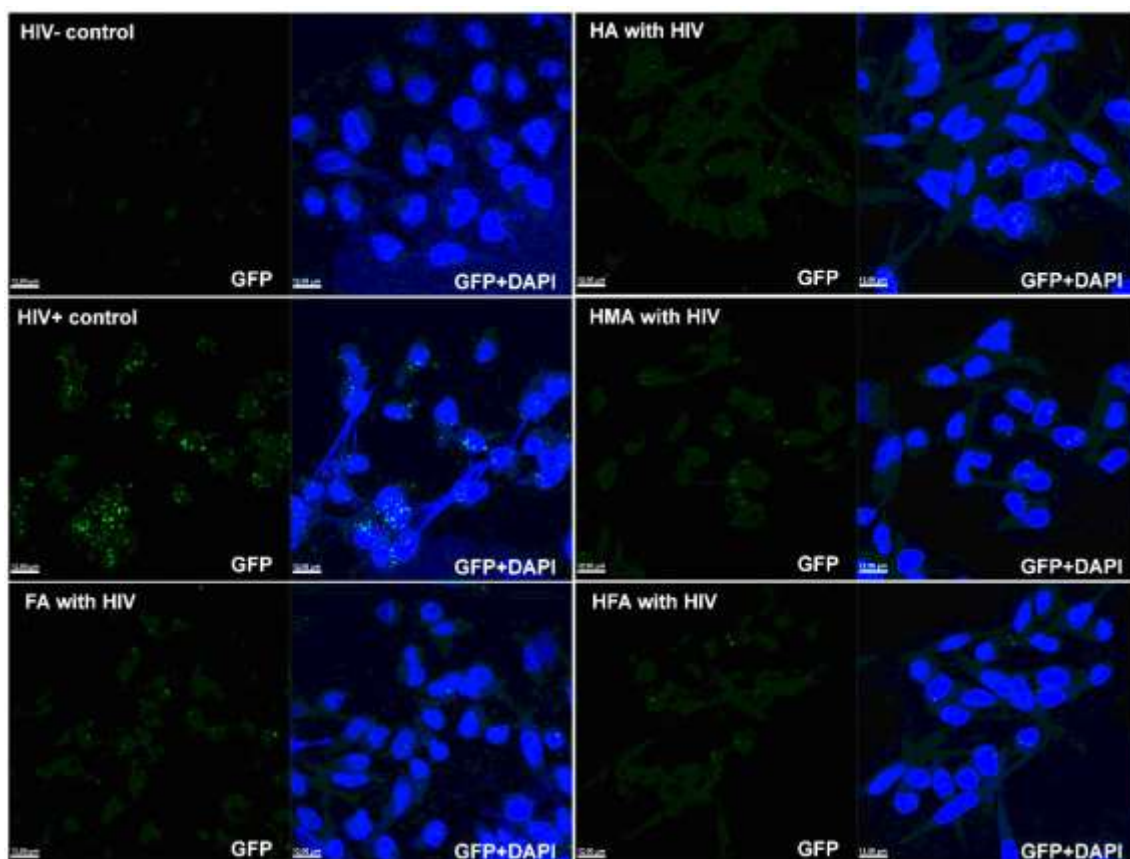


Рис. 7. Ингибирование прикрепления флуоресцентных меченых вирионов ВИЧ-1 NL4-3 Gag-iGFP к клеткам LC5-RIC-R5 в присутствии фракций гуминовых веществ: флуоресцентное изображение для контролей (HIV- и HIV+) и исследуемых фракций (HA – гуминовые кислоты, HMA – гиматомелановые кислоты, FA – фульвокислоты, HFA – гумусовые кислоты).

Скрининг ингибирования активности обратной транскриптазы для всех исследуемых фракций показал аналогичную тенденцию данным ТОА-исследования: фракции ГК, ГМК и ГФК дозозависимо ингибировали обратную транскриптазу ВИЧ-1 подобно референс-препарату AZT, тогда как фракция ФК не оказывала никакого эффекта при низких концентрациях. Полученные значения активности обратной транскриптазы в присутствии ГМК и ГК лежат в пределах диапазона, определенного для смесей различных природных



лигнанов, включая фуурофуранлигнан, тетрагидрофуранлигнан и неолигнан [Chen et al., 2006; Cunha et al., 2012; Han et al., 2015], а также для полифенолов [Landete, 2011; Andrae-Marobela et al., 2013], включая флавоноиды и гидролизуемые танины [Lin et al., 2011]. Это доказывает, что наиболее гидрофобные фракции гуминовых веществ (ГК и ГМК) можно рассматривать как новые мощные нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ.

### **Филогенетический анализ и изучение антиретровирусной активности гуминовых веществ на актуальном изоляте ВИЧ**

Для исследования анти-ВИЧ-активности гуминовых веществ на актуальном для РФ изоляте вируса был проведен филогенетический анализ. В анализ вошли 56 и 22 образцов плазмы крови, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов, постоянно проживающих на территории Республики Беларусь и Московской области Российской Федерации соответственно. Установлено, что на территории Московской области обширно циркулируют штаммы ВИЧ субтипа А1, которые относятся к кластеру постсоветского пространства филогенетического дерева, что подтверждает единство эпидемического процесса ВИЧ-инфекции. Значение aLRT-SH демонстрирует высокую гомогенность популяции. Среди 14 исследованных образцов было найдено 2 некластеризующихся образца, которые демонстрируют занос ВИЧ-1 на территорию Московского региона Российской Федерации с территории стран постсоветского пространства.

Выявлено 4 случая инфекции ВИЧ субтипом В на территории Московской области, не имеющих филогенетических связей между собой. Это может указывать на 4 разных источника вируса. Два исследованных образца 48\_PRRT и 26\_PRRT лежали в одном кластере вместе с референсами из г. Санкт-Петербурга. Установлено 2 случая заноса ВИЧ субтипа В на территорию Республики Беларусь с территории Российской Федерации, каждый из которых привел к передаче вируса уже внутри Беларуси. ВИЧ субтипа G, выявленный у мужчин, практикующих секс с мужчинами, был занесен на территорию Московской области России из Дании.

На основании проведенного филогенетического анализа для дальнейшего изучения анти-ВИЧ-активности гуминовых веществ нами был выбран и выделен из крови ВИЧ-инфицированного пациента изолят ВИЧ-1 субтипа А1, как наиболее распространенный субтип вируса на данный момент эпидемии в странах постсоветского пространства. Было установлено, что исследуемые препараты ГК и ГМК эффективно ингибируют клинический изолят ВИЧ-1 субтип А1 (табл. 1).

Табл. 1. Показатели анти-ВИЧ-активности исследованных образцов гуминовых веществ по отношению к клиническому изоляту ВИЧ-1 субтип А1.

Препарат гуминовых веществ	Вирус	Клетки	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	IS
СНА-SH4	ВИЧ-1 субтип А1 (клинический изолят)	МПК	0,29	>1000	3448
ВНА			0,38	>1000	2631
ВНМ			0,32	>1000	3125

При этом значение EC<sub>50</sub> сопоставимо с результатами изучения активности на референс-штаммах, а индекс селективности препаратов составлял более 2630. Продемонстрированная высокая активность исследуемых фракций ГК и ГМК по отношению к актуальному в данный момент ВИЧ/СПИД эпидемии изоляту вируса является предпосылкой для создания на их основе кандидатных микробицидов и тестирования их в испытаниях *in vivo*.

### **Изучение противовирусной активности фракций гуминовых веществ на других оболочечных и безоболочечных вирусах**

Исследование противовирусной активности фракций гуминовых веществ показало, что этот класс соединений обладает выраженным ингибирующим эффектом по отношению к ВВС (титр для ГК (100 мкг/мл) составил <1,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл; контроль вируса 7,9-8,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл) и ВКЭ (титр для ГК (100 мкг/мл) составил 1,8-2,2 lg БОЕ<sub>50</sub>/мл; контроль вируса 4,5-5,2 lg БОЕ<sub>50</sub>/мл), то есть ко всем изученным нами оболочечным вирусам. При этом прослеживается общая тенденция с полученными данными по анти-ВИЧ-активности: препараты гуминовых веществ углей и пелоидов превосходят по противовирусной активности препараты гуминовых веществ торфов, хотя этот

эффект выражен достаточно слабо для ВКЭ, что может быть связано с отличным от ВИЧ классом белка слияния. Внутри фракций гуминовых веществ наблюдаются выявленные ранее различия в активности: ФК слабее ингибируют репликацию вирусов по сравнению с ГК и ГМК.

Для всех исследованных нами энтеровирусов было показано отсутствие противовирусной активности. Это может быть связано с отсутствием оболочки у данных вирусов, и, как следствие, отсутствием мишени для фракций гуминовых веществ. Также была отмечена выраженная цитотоксичность препаратов гуминовых веществ для культур клеток RD.

Таким образом, фракции гуминовых веществ связываются с белками оболочки вирионов в критически важных местах, останавливая процесс конформационной перестройки белков вириона при слиянии, что было показано для ВИЧ, ВСВ и ВКЭ. Наряду с этим, фракции гуминовых веществ не влияют на внедрение в мембрану безоболочечных вирусов, таких как энтеровирус А71, полиовирус и вирус Коксаки.

Обнаруженная противовирусная активность, заключающаяся в ингибировании белков слияния оболочечных вирусов, предположительно позволит снижать вирусную нагрузку на организм. Этот механизм чрезвычайно важен для топических микробицидных препаратов. Наличие нескольких ингибиторов слияния вируса ВИЧ, вышедших на фармацевтический рынок [Wheeler et al., 2004], свидетельствуют о перспективности такого подхода в борьбе с вирусными инфекциями. Более того, в экспериментах по изучению механизма анти-ВИЧ-активности было продемонстрировано наличие у фракций ГК, ГМК и ГФК способности ингибировать обратную транскрипцию ВИЧ. Поэтому данные фракции гуминовых веществ могут рассматриваться как «портманто ингибиторы» (Portmanteau inhibitor) – препараты, которые представляют собой комбинацию двух молекул лекарственного средства, каждое из которых само по себе является отдельным типом ингибитора [Wang et al., 2007]. Поиск таких портманто-молекул является новой приоритетной задачей медицинской химии.

## **Влияние гуминовых веществ на компоненты врожденного иммунитета**

Известно, что важнейшим компонентом врожденного противовирусного иммунитета является ИФН. Одним из критериев оценки эффективности препаратов с интерфероногенной активностью является определение количества ИФН в ответ на введение индуктора *in vitro*. При изучении интерфероногенной активности гуминовых веществ было установлено, что фракции ГК, ГМК и ГФК являются активными индукторами эндогенного ИФН (индукция ИФН от 16 до 32 МЕ/мл), а фракция ФК является слабоактивной (индукция ИФН менее 4-8 МЕ/мл). При определении вида и группы интерферонов, индицируемых гуминовыми кислотами, было установлено, что ГК более активно индуцируют ранний вид ИФН (более 300 Ед/0,1 мл крови мышей), продукция которого приходится примерно через 6 часов после индукции. Методом твердофазного сэндвич-ИФА показано, что данный ИНФ относится к группе ИФН- $\alpha$ . Уровень позднего вида ИФН, определяемого через 24 ч после индукции ГК, колебался от 10 до 120 Ед/0,1 мл крови мышей.

Нативный ЛПС является интегральным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий, выполняющим в норме ряд важнейших функций. Показана способность ЛПС участвовать в ионном обмене и сорбировать вирусы и бактериофаги. При патологии, когда по тем или иным причинам ЛПС высвобождается из клеточной стенки, он становится эндотоксином, способным в микрограммовых дозах нанести вред организму человека. Целью данной части работы была оценка влияния фракций гуминовых веществ на сорбцию ЛПС на поверхности гликофориновых или иных рецепторах эритроцита. При этом ставилась задача установить механизм взаимодействия фракций гуминовых веществ с ЛПС.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что обработка ЭБ фракциями гуминовых веществ не изменяет их способности сенсibilизировать ЛПС. Также нами впервые установлено, что только сильно гидрофобные фракции гуминовых веществ (ГК и ГФК) взаимодействуют с

гидрофобным липидом А молекулы ЛПС, а слабо гидрофобные фракции (ГМК и ФК) не взаимодействуют. Механизм взаимодействия фракций гуминовых веществ с ЛПС является гидрофобно-гидрофобным. Также выявлено, что фракции ГК, ГМК и ГФК ингибируют активацию системы комплемента человека по классическому и альтернативному пути.

Полученные данные позволяют говорить о возможности создания на основе гуминовых веществ препаратов, способных предотвращать транслокацию грамотрицательных бактерий через кишечный гематотканевой барьер. Это особенно важно, так как эндотоксин, как маркер микробной транслокации из кишечника, имеет ведущую роль в патогенезе гиперактивации иммунной системы и прогрессирования ВИЧ-инфекции [Хасанова и др., 2013].

Известно, что система комплемента может принимать важное участие в различных процессах при ВИЧ-инфекции. Об активации системы комплемента при ВИЧ-инфекции свидетельствует повышение концентрации в крови инфицированных продуктов расщепления базовых белков системы комплемента – С4d, Ва и С3d, а также продуктов процессинга, характерных для альтернативного и классического пути, независимо от стадии инфекции.

Нами установлено, что фракции ГК, ГМК и ГФК в концентрации 1 мг/мл ингибируют активацию системы комплемента в сыворотке крови человека по классическому и альтернативному пути. Поскольку в организме ВИЧ-инфицированного человека вырабатывается меньшее количество молекул, ингибирующих активацию комплемента, то установленная ингибирующая комплемент активность является весьма значимой в практическом отношении при дальнейшем проведении доклинических испытаний кандидатного микробицида.

### **Структурно-функциональные особенности гуминовых веществ**

Учитывая, что в отличие от синтетических полиэлектролитов супрамолекулярные ансамбли НРАs могут обладать несколькими молекулярными каркасами – скаффолдами, способствующими проявлению противовирусной активности, нами впервые было определены общие и

уникальные брутто-формулы, присутствующие во всех фракциях гуминовых веществ. При проведении этого анализа обращалось особое внимание на общие скаффолды, которые могут быть ответственны за ингибирование слияния ВИЧ с клеткой, наблюдаемое для всех фракций гуминовых веществ (рис. 6).

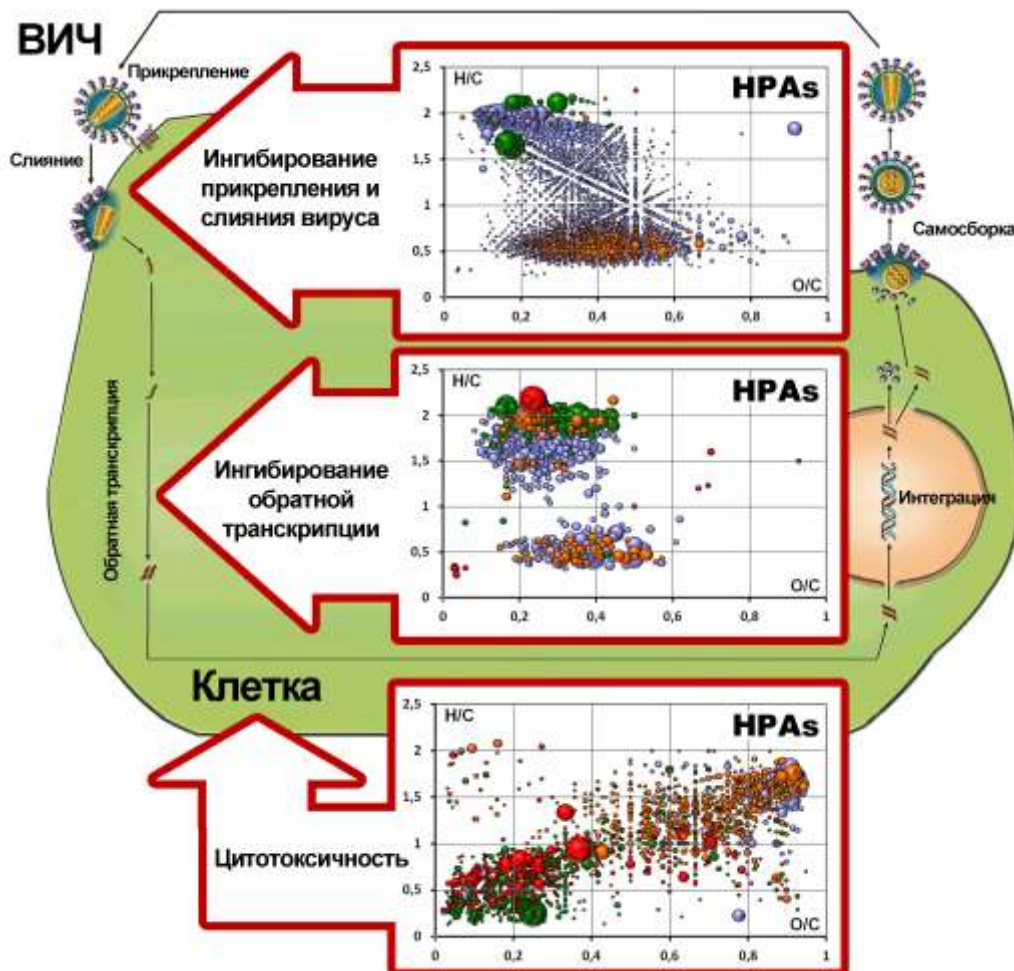


Рис. 6. Диаграммы Ван Кревелена для: общих брутто-формул ГК, ГМК и ФК – верхний ряд; общих брутто-формул ГК и ГМК – средний ряд; уникальных брутто-формул для ФК – нижний ряд. Диаграммы размещены в контексте жизненного цикла ВИЧ.

Скаффолды, характерные для всех трех фракций гуминовых веществ, занимают значительное пространство на диаграмме Ван Кревелена в пределах от насыщенных липидных компонентов со значениями Н/С, достигающими 2, до конденсированных ароматических компонентов со значениями Н/С около 0,4. Содержание кислорода в этих молекулах достаточно низкое: значения О/С находятся в диапазоне от 0,1 до 0,5. Для таких структур характерно блокирование адсорбции ВИЧ к мембране клетки хозяина (блокирование CD4+) посредством взаимодействий с V3 петлёй гликопротеина 120 (gp120)

или 41 (gp41). Это свойство является общим для всех полианионов, включая карбоксилированные, сульфированные и сульфатированные полимеры независимо от их молекулярных формул.

Следующим шагом работы явилось определение общих молекул, которые присутствуют во фракциях ГК, ГФК и ГМК, но отсутствуют в ФК (рис. 7). Эти молекулы могут отвечать за ингибирование обратной транскрипции, поскольку такая активность наблюдается у ГК, ГФК и ГМК, но отсутствует у ФК.

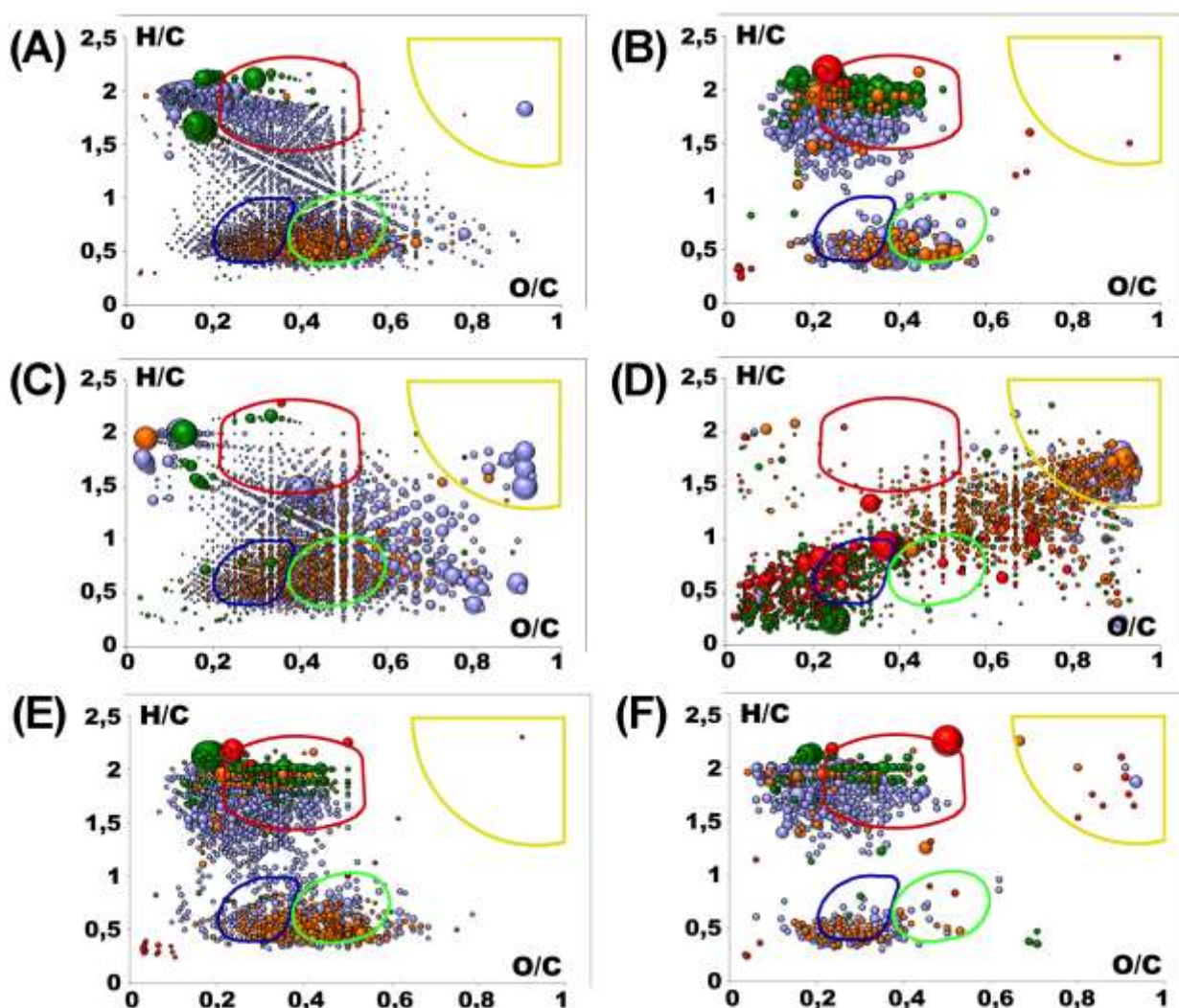


Рис. 7. Общие и уникальные скаффолды НРАs и их совпадение с молекулярным пространством других химических классов полианионов. (А) Скаффолды, присутствующие во всех фракциях гуминовых веществ. Интенсивность по ГК. (В) Общие скаффолды, присутствующие в ГК и ГМК. (С) Скаффолды, присутствующие во всех фракциях гуминовых веществ. Интенсивность по ФК. (D) Уникальные скаффолды, присутствующие только в ФК. (Е) Уникальные скаффолды, присутствующие только в ГК. (F) Уникальные скаффолды присутствуют только в ГМК. Области полианионов: красный цвет – высокомолекулярные пептиды; синий цвет – синтетические поликарбоксилаты, зеленый цвет – полифенольные полианионы, желтый цвет – полисахариды.



Пул молекул представлен двумя отдельными областями на диаграмме Ван Кревелена. Первая область лежит в диапазоне липидных и пептидных насыщенных молекул: от терпеноидов со значениями Н/С в диапазоне 1,1-1,7 и значениями О/С от 0,1 до 0,4 до пептидов со значениями Н/С в диапазоне от 1,6 до 2 и значениями О/С от 0,25 до 0,7. Вторая область включает конденсированные ароматические молекулы – лигнаны, флавоны, флавонолы, кумарины, хинонные терпеноиды, танины и другие полифенолы [Kujawinski et al., 2006; Hockaday et al., 2009]. Наличие подобных липофильных структур может указывать на способность ГК и ГМК проходить внутрь клетки, что подтверждается исследованиями других авторов, в которых было показано, что наиболее гидрофобные гуминовые вещества из угля накапливаются в бактериальных клетках [Kulikova et al., 2010].

Это имеет особое значение, так как ГМК и ГК обогащены молекулами, расположенными в области терпеноидов, лигнанов, флавоноидов и других полифенолов, ингибирующая активность которых по отношению к обратной транскриптазе была показана в ряде работ [Landete, 2011; Lin et al., 2011; Cunha et al., 2012; Andrae-Marobela et al., 2013; Han et al., 2015]. Также это подтверждается работами, в которых было показано, что хиноидные компоненты гуминовых веществ могут выступать в качестве нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы [Biscoleri, 2013], что также согласуется с многочисленными данными о высокой анти-ВИЧ-активности синтетических гуминовых веществ, полученных путем полимеризации хинонов [Kloecking et al., 1972; Kloecking et al., 2002].

### **Химико-фармацевтические особенности КМГК**

Проницаемость КМГК в форме вагинальных суппозиториев на гидрофобной (масло какао) и гидрофильной (желатино-глицериновая композиция) основах изучали в модельных условиях кислотности влагалища (рН = 4,1). Для оценки полноты всасывания ГК из кандидатного микробицида использовали показатель площади под фармакокинетической кривой (AUC). Установлено, что AUC для кандидатных микробицидов на гидрофильной



основе составляет 38,36 мкг/мл/час, а для кандидатных микробицидов на гидрофобной основе АUC равен 20,31 мкг/мл/час (рис. 8).

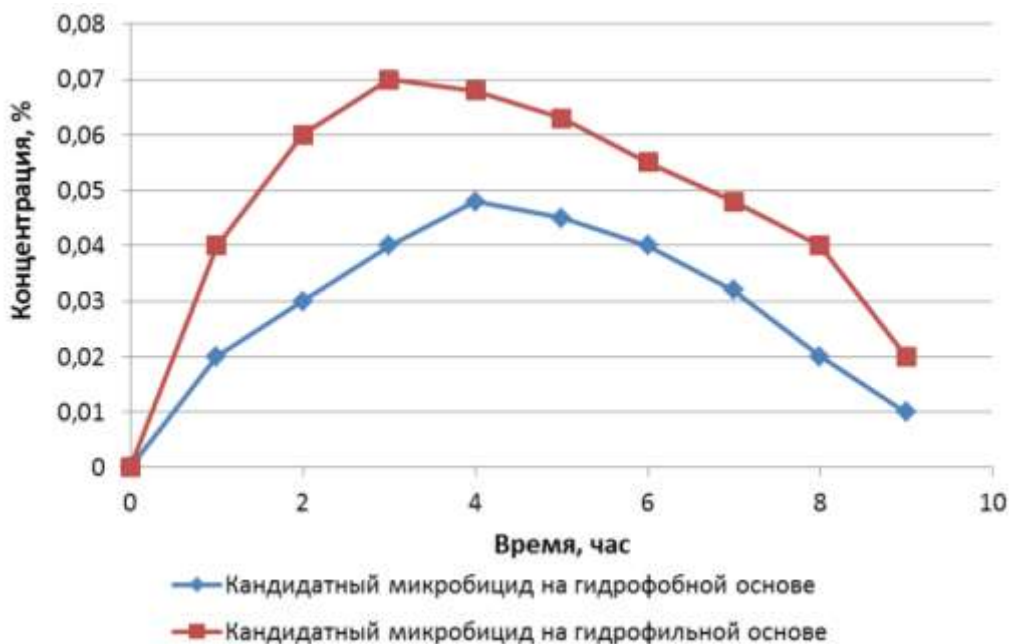


Рис. 8. Часть фармакокинетической кривой высвобождения глуминовых кислот из лекарственной формы с гидрофильной и гидрофобной основами при кислотности среды 4,1.

Таким образом, высвобождение фармацевтической субстанции из кандидатных микробицидов, приготовленных на основе масла какао, происходит почти в два раза медленнее, что создает пролонгированное действие топического препарата. ГК в составе гидрофобной основы характеризуются оптимальной скоростью высвобождения из кандидатного микробицида, поэтому для дальнейших исследований *in vivo* использовался КМГК на основе масла какао.

При исследовании распределения по органам и тканям фармацевтической субстанции КМГК, меченного тритием, специфического органа накопления обнаружено не было. Органом выделения ГК являются почки. В них на пятой минуте фиксировалось высокое накопление ГК (1,84 мкКи/г), которое резко увеличивалось к 30 минуте эксперимента (4,81 мкКи/г). В других крупных паренхиматозных органах и крови с 5 по 30 минуту с момента введения ГК наблюдалась снижение накопления вещества.

Нами впервые установлено, что ГК в большой концентрации проникают через гематоэнцефалический барьер. Их концентрация в головном мозге к 5

минуте от момента введения составляла 5,7 мкг/кг (0,08 мкг/г). Такая способность ГК является полезной при разработке на их основе компонентов доставки лекарственных препаратов через ГЭБ, различных адъювантов, препаратов для лечения ВИЧ-инфекции при наступлении нейро-СПИДа и др.

### **Острая и хроническая токсичность КМГК**

В экспериментах по острой токсичности на мышах линии BALB/c не удалось установить летальные дозы для фармацевтической субстанции и лекарственной формы КМГК. Эти данные совпадают с данными изучения цитотоксичности *in vitro*, которая не была достигнута во всем диапазоне исследуемых концентраций. Установленная разовая переносимая доза составила 250 мг/кг (5 мг/мышь) при интравагинальном пути введения модельного микробицида на основе ГК и внутривенном введении ГК.

Изучение хронической токсичности КМГК при интравагинальном введении самкам мышей линии BALB/c не выявило признаков нарушения здоровья животных при клиническом осмотре, по приросту массы тела, потреблению корма и воды, гематологическим показателям, результатам биохимического анализа сыворотки крови и мочи. Многократное интравагинальное введение модельного КМГК не вызывало нарушений в углеводном и липидном обменах, содержании мочевины, хлоридов в сыворотке крови, что свидетельствовало о сохранности функции печени и почек. Гистологический анализ срезов внутренних органов, включая яичники, показал отсутствие патологических процессов, что крайне важно, поскольку предполагаемый клинический путь введения для ГК – интравагинальный. Установлено, что при многократном интравагинальном введении модельного КМГК (28 дней по одному введению в два дня) в дозе 250 мг/кг не происходит выраженной интоксикации и повреждающего действия у мышей.

Проведенные исследования показали, что фармацевтическая субстанция КМГК относится к 4 классу опасности химических веществ – малотоксичные вещества, что дает основания использовать данный КМГК для проведения дальнейших доклинических исследований.

## Иммунологическая безопасность КМГК

При исследовании иммунотоксического действия ГК было установлено, что в дозе 2,5 мг/кг ГК проявляет выраженное иммуностимулирующее действие, приводящее к 3-кратному усилению иммунного ответа на ЭБ. При дозе 25 мг/кг активность ГК повышается в два раза. Выявленный эффект сохраняется и при пересчете индекса стимуляции на 1 млн. ядросодержащих клеток (ЯСК) в органе, что свидетельствует о реализации стимулирующего действия ГК вследствие возрастания количества активных антителопродуцентов среди ЯСК. Выявленная активация АОК является объяснимой, так как по данным ИЦР-МС фракция ГК содержит в своем составе пул белков и коротких пептидов, которые могут выступать в качестве иммуногенов.

Нами показано отсутствие влияния введения ГК на ГЗТ к гетерологичному антигену (табл. 2) и отсутствие поликлональной стимуляции иммунокомпетентных клеток (табл. 3).

Табл. 2. Влияние ГК на клеточный иммунный ответ к тест-антигену.

Вводимый препарат	Масса тела, г	Масса лапы, мг (М + m)		Индекс реакции, %
		контроль	опыт	
Контроль, ФР	22,3 ± 0,31	136,8 ± 0,64	164,3 ± 1,06	20,13 ± 0,40
0,1% ГК (2,5 мг/кг)	22,0 ± 0,23	135,2 ± 1,05	162,4 ± 1,68	20,07 ± 0,48
1% ГК (25 мг/кг)	22,5 ± 0,38	132,6 ± 0,85	159,7 ± 1,33	20,45 ± 0,58
Интактные мыши.	22,4 ± 0,42	130,0 ± 5,75	135,2 ± 5,91	4,07 ± 0,52

Табл. 3. Оценка поликлональной активности ГК.

Вводимый препарат	Кол-во АОК на селезенку		Кол-во АОК на млн. ЯСК		Кол-во ЯСКx10 <sup>6</sup> на селезенку
	Абсолютное значение	ИС	Абсолютное значение	ИС	
Тест-антиген ЭБ					
Контроль, ФР	95 ± 9,0	1,00 ± 0,17	0,4 ± 0,4	1,00 ± 0,09	227 ± 5,22
0,1% ГК (2,5 мг/кг)	78 ± 14,3	0,83 ± 0,15	0,4 ± 0,8	1,00 ± 0,18	188 ± 6,34
1% ГК (25 мг/кг)	159 ± 31,0	1,68 ± 0,33	0,9 ± 0,18	2,23 ± 0,43	171 ± 4,75
Тест-антиген ТНБС					
Контроль, ФР	1032 ± 101,2	1,00 ± 0,12	4,6 ± 0,45	1,00 ± 0,10	227 ± 15,22
0,1% ГК (2,5 мг/кг)	987 ± 117,6	0,96 ± 0,11	5,3 ± 0,63	1,16 ± 0,14	188 ± 16,34
1% ГК (25 мг/кг)	1011 ± 78,8	0,98 ± 0,08	5,9 ± 0,46	1,3 ± 0,10	171 ± 14,75

Исследование влияния ГК на активность фагоцитов крови не выявило эффектов, характеризующих возможное иммунотоксическое действие. Предварительное внутрибрюшинное введение ГК в дозах 2,5 мг/кг и 25 мг/кг либо не оказывало влияния на активность фагоцитов крови, либо приводило к повышению их ответа на дополнительный стимул. Влияние на активность фагоцитов перитонеального экссудата показало сохранение их способности высоко реагировать на дополнительный стимул *in vitro*.

При изучении аллергизирующих свойств установлено, что профилактическое введение ГК в минимальной исследуемой дозе 2,5 мг/кг приводит к трехкратному снижению уровня сывороточных аллерген-специфических IgE-антител. Введение ГК на фоне развивающегося IgE-ответа на аллерген не вызывало существенных изменений в уровнях специфических IgE в сыворотке в сравнении с профилактическим введением, за исключением дозы 25 мг/кг, введение которой двукратно снижало уровень данных антител. Можно заключить, что ГК не усиливают аллергическую реакцию на антиген, а в профилактическом режиме введения в дозах, близких к терапевтической, наоборот, препятствует ее развитию.

Исследования анафилактической активности ГК показало отсутствие гомототропных специфических антител класса IgE у экспериментальных животных, специфичных к компонентам ГК, способных вызвать анафилаксию.

При исследовании аллергизирующего действия гуминовых кислот методом эпикутаных аппликаций на морских свинках установлено, что 1, 10 и 25% растворы ГК не вызывают каких-либо реакций на выстриженном участке поверхности кожи морских свинок. После нанесения разрешающей дозы раствора ГК в той же концентрации на 21 день кожных аллергических реакций не наблюдалось.

Проведенные исследования показали, что фармацевтическая субстанция КМГК не оказывает негативного действия на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета, не обладает местным раздражающим и

аллергизирующим действием, не индуцирует аллергические реакции, такие, как анафилактический шок.

### Подавление иммуновоспалительной активности фармацевтической субстанции КМГК

На модели острого иммунного воспаления была установлена положительная дозозависимая активность ГК. Наибольшая противовоспалительная активность ГК обнаруживалась в дозе 2,0 мг/кг. Данная доза ГК уменьшала отек у экспериментальных животных, приводя к восстановлению ко второму дню эксперимента, тогда как в контрольной группе восстановление после отека наступало только на третий день. При изучении характера изменений иммунологических и гематологических показателей при подавлении острого иммунного воспаления ГК выявлено, что противовоспалительный эффект вызван в первую очередь воздействием на активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов (табл. 4).

Табл. 4. Влияние ГК на изменение иммунологических и гематологических показателей при остром иммунном воспалении у крыс.  $p < 0,05$  \* от нормы и \*\* от контроля.

Показатели	Норма	Контроль	ГК
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,8 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,1*	4,7 $\pm$ 0,3
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	8,2 $\pm$ 0,6	24,4 $\pm$ 0,2*	8,5 $\pm$ 0,8**
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	425,4 $\pm$ 23,0	432,6 $\pm$ 24,4	425,5 $\pm$ 27,5
Гемоглобин, г/л	109,3 $\pm$ 5,2	102,4 $\pm$ 5,6	108,7 $\pm$ 4,1
СОЭ, мм/час	2,3 $\pm$ 0,1	11,2 $\pm$ 0,2*	*3,7 $\pm$ 0,2**
СРБ	–	+++	–
Лимфоциты, %	67,3 $\pm$ 4,9	54,6 $\pm$ 3,8	69,8 $\pm$ 1,4**
Нейтрофилы, %:	30,4 $\pm$ 2,6	44,2 $\pm$ 2,0	28,1 $\pm$ 1,0**
палочкоядерные, %	3,2 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 0,1*	3,6 $\pm$ 0,3**
сегментоядерные, %	25,8 $\pm$ 1,6	34,8 $\pm$ 2,6*	22,7 $\pm$ 1,2**
Моноциты, %	1,8 $\pm$ 0,09	2,2 $\pm$ 0,1*	1,9 $\pm$ 0,4
Эозинофилы, %	1,5 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2*
Базофилы, %	0,24 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,01
Миелопероксидаза, %	46,5 $\pm$ 3,8	54,2 $\pm$ 1,2*	*61,3 $\pm$ 2,0**
Спонтанная хемилюминесценция, мВ/с	0,125 $\pm$ 0,01	0,520 $\pm$ 0,03*	*0,245 $\pm$ 0,01**
Стимулированная хемилюминесценция, мВ/с	0,418 $\pm$ 0,04	0,535 $\pm$ 0,02*	0,362 $\pm$ 0,03**
Индекс стимуляции	2,4 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,01*	*1,5 $\pm$ 0,02**
ИЛ-1 $\beta$ , пкг/мл	22,2 $\pm$ 1,4	42,3 $\pm$ 2,0*	24,1 $\pm$ 1,5**
ФНО- $\alpha$ , пкг/мл	39,8 $\pm$ 2,0	40,7 $\pm$ 1,4	38,9 $\pm$ 3,0
Фибронектин, мкг/мл	251,4 $\pm$ 18,8	231,9 $\pm$ 22,2	238,3 $\pm$ 24,4
ЦИК, %	96,7 $\pm$ 0,8	98,7 $\pm$ 0,5	98,2 $\pm$ 0,2

Это можно объяснить способностью ГК обратимо ингибировать избыточную продукцию ИЛ-1 $\beta$  гиперактивированными макрофагами и уменьшать усиленный выход нейтрофильных гранулоцитов из костно-мозгового депо в кровь. ГК также способны уменьшать потребление кислорода активированными фагоцитами с последующим снижением генерации активных форм кислорода (АФК), что говорит об их антиоксидантной активности.

Необходимо отметить, что патогенез острого асептического иммунного воспаления имеет несколько стадий. Первая стадия воспаления начинается после инъекции каррагинина-лямбда и длится около одного часа. Вторая стадия начинается со второго часа после введения каррагинина-лямбда, достигая максимума через 3 часа, и стихает примерно через 7 часов [Чернух, 1979]. ГК предположительно воздействуют на обе стадии воспаления. В первую стадию – за счет снижения АФК с вышеописанным механизмом уменьшения потребления кислорода активированными фагоцитами, проявляя антиоксидантную активность. Во вторую стадию – за счет комплексного воздействия на компоненты клеточного и гуморального звеньев иммунитета.

Влияние ГК на динамику хронического воспаления изучали на экспериментальной модели хронического аутоиммунного воспаления у крыс. При введении ГК животным с моделированным хроническим аутоиммунным воспалением наблюдалась положительная динамика к снижению выраженности воспалительного процесса. Выраженный противовоспалительный эффект ГК наблюдался с 21 дня эксперимента, который заключался в восстановлении развивающихся патологических изменений в органах иммуногенеза у экспериментальных животных. ГК уменьшали отек паренхимы и стромы органов, плазматическую имbibицию стенок центральных и трабекулярных артерий (рис. 9).

Представленный анализ результатов свидетельствует о подавлении иммуновоспалительной активности гуминовыми кислотами, проявляющемся в нормализации показателей при остром и хроническом иммунном воспалении.

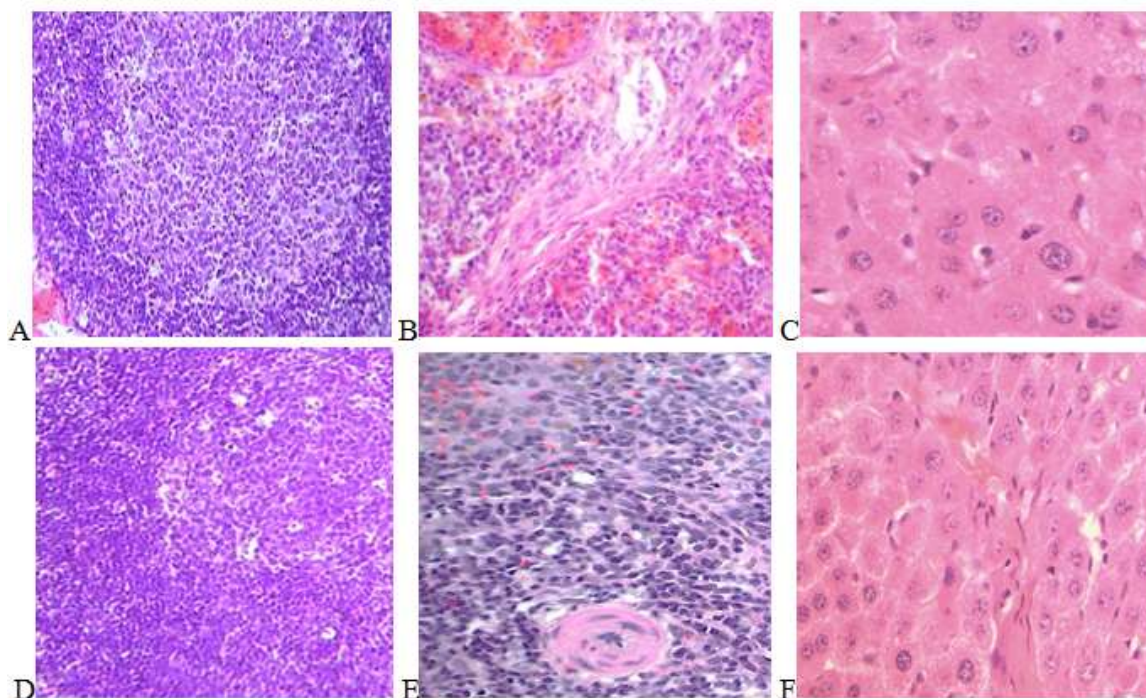


Рис. 9. Гистологические препараты органов иммуногенеза при хроническом аутоиммунном воспалении (А, В, С) и при введении ГК на фоне хронического аутоиммунного воспаления (D, E, F) на 21 день эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. А и D – препараты лимфатического узла со стороны введения адьюванта Фрейнда (увеличение x400). В и E – препараты селезенки (увеличение x400). С и F – препараты печени (увеличение x600).

### **Антиоксидантная активность фармацевтической субстанции КМГК**

Свободнорадикальное окисление является неспецифическим унифицированным звеном патогенеза различных заболеваний, к которым относятся сахарный диабет, гепатиты [Мехтиев, 2008], патологии сердечно-сосудистой системы [Решетова и др., 2004], множество онкологических [Fukushima et al., 1984] и аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидный полиартрит, ревматизм, склеродермия [Казначеев и др., 1988].

Результаты исследования антиоксидантной активности ГК на модели окислительного стресса демонстрируют, что ГК обладают антиоксидантной активностью по отношению к продуктам метаболизма ПХД (табл. 5). ГК мобилизуют эндогенные системы организма, повышая уровень основных антиоксидантных ферментов как в печени, так и в плазме крови. По-видимому, это связано со структурой молекул фракции ГК, а именно с большим жирнокислотным периферическим фрагментом. Благодаря данному фрагменту

молекулы ГК способны проникать через биомембраны напрямую или опосредованно, нормализуя окислительно-восстановительный гомеостаз клетки.

Табл. 5. Влияние ГК на показатель общей антиоксидантной активности в крови и гомогенате печени крыс на 3 и 10 сутки при острой интоксикации ПХД.

Группа животных	Общая антиоксидантная активность	
	Плазма крови (% ингиб.)	Гомогенат печени (% ингиб.)
3 сутки		
1 группа (контроль)	47,48±2,15	73,16±0,57
2 группа (ПХД)	47,2±3,66 p<0,05	61,5±1,31 p<0,05
3 группа (ПХД+ГК п/к)	45,90±2,86 p<0,05	85,06±4,61 p<0,05
4 группа (ПХД+ГК п/о)	36,51±2,95 p<0,002	85,78±4,70 p<0,05
10 сутки		
1 группа (контроль)	55,35±0,8	57,09±8,25
2 группа (ПХД)	62,21±1,99 p<0,05	59,27±0,58 p<0,05
3 группа (ПХД+ГК п/к)	64,09±0,3 p<0,5	62,91±1,64 p<0,02
4 группа (ПХД+ГК п/о)	70,56±1,24 p<0,02	55,89±0,63 p<0,05

Таким образом, для коррекции метаболических нарушений при острой интоксикации ПХД могут быть использованы ГК, которые выступают как антиоксиданты: эффективно повышают антиокислительную защиту организма, снижают интенсивность течения свободнорадикального окисления. Возможным механизмом антитоксической и антиоксидантной активности гуминовых веществ пелоидов является присоединение ионов негеминового железа, что выводит их из прорадикального процесса. В результате цепная реакция образования липидных радикалов существенно замедляется. Другим механизмом блокирования АФК является каталитическая активность.

Полученные экспериментальные результаты с острой интоксикацией ПХД имеют принципиальное значение с позиции лечения отравлений гепатотропными ядами при помощи ГК. При этом отсутствие в организме специфических ферментных систем, разлагающих ГК, делает их устойчивыми,



способными к пролонгированному действию, что может быть эффективно использовано в профилактике окислительного стресса.

Антиоксидантная активность ГК также оценивалась на модели фенилгидразин-индуцированной гемолитической анемии, патогенез развития которой сводится к массивному внутрисосудистому лизису цитоплазматических мембран эритроцитов, вызванному действием на них АФК, как продуктов метаболизма фенилгидразина гидрохлорида [Павлов и др., 1973]. Фенилгидразин существенно нарушает морфологию эритроцитов, приводя к их деформации и агрегации, что выражается в увеличении доли патологически изменённых клеток и неизбежно приводит к существенному угнетению кислородтранспортной функции крови [Шперлинг и др., 2001].

При изучении активности ГК на метаболические процессы в модельной системе гемолитической анемии выявлено, что внутрижелудочные инъекции фракций ГК нормализует ход течения экспериментальной анемии (табл. 6).

Табл. 6. Динамика гематологических и биохимических показателей периферической крови анемизированных мышей линии BALB/c (n=10), которым вводился внутрижелудочно раствор ГК (0,2 мл; 2 мг/кг) в течение 30 дней после моделирования анемии.

Показатели (M±m; p<0,05)	Норма	Время исследования (сутки)						
		1-4	5	1	3	7	21	30
		Фенил- гидразин	Пик анемии	Раствор ГК				
Эритроциты (млн/мкл)	6,7±0,9	5,4±0,6	4,1±0,3	4,1±0,3	4,5±0,5	5,5±0,5	6,3±0,5	6,7±0,5
Лейкоциты (тыс/мкл)	8,8±3	7,3±0,5	5,5±0,5	6,2±0,5	6,5±0,2	7,5±0,2	8,5±0,2	9,8±0,2
Нейтрофилы (%)	24-37	22,5±0,1	22,5±0,1	22,6±0,1	22,8±0,1	31,1±0,1	30,5±0,1	31,0±0,1
Эозинофилы (%)	1,0-4,5	2,8±0,1	2,8±0,1	2,9±0,1	3,1±0,1	3,3±0,1	3,1±0,1	3,3±0,1
Базофилы (%)	0-1,5	0±0,1	0±0,1	0±0,1	0±0,1	0±0,1	0±0,1	1±0,1
Моноциты (%)	0,7-3,5	2,0±0,1	1,9±0,1	2,2±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,5±0,1	2,5±0,1
Лимфоциты (%)	61-75	72,7±0,1	72,8±0,1	72,3±0,1	71,7±0,1	63,2±0,1	63,9±0,1	62,2±0,1
Общий билирубин (мкмоль/л)	7,5±0,7	31,4±0,5	45,4±0,3	13,4±0,3	10,2±0,5	10,3±0,5	7,5±0,5	6,9±0,5

У анемизированных животных к концу 1 недели после пика анемии наблюдается явная динамика улучшения состояния организма, а к концу 30-х суток – нормализация патологического состояния. Показатель общего билирубина плазмы крови при введении ГК возвращался к значениям физиологической нормы к 20 суткам эксперимента.

Установлено, что дополнительная профилактическая доза ГК за 3 дня до моделирования анемии создаёт более выраженный терапевтический эффект, повышая устойчивость организма экспериментальных животных к оксидантным поражениям.

Можно заключить, что ГК стабилизируют окислительно-восстановительный гомеостаз, достоверно снижая развившееся анемическое состояние. Они способны связывать избыток образовавшихся АФК и нивелировать последствия окислительного стресса. Полученные данные характеризуют ГК как антитоксический фактор по отношению к продуктам метаболизма гидразинов, обладающий антианемической и антиоксидантной активностью. Достоверно выявлено, что введение профилактической дозы до развития анемии позволяет повысить устойчивость организма к последующей интоксикации фенилгидразином.

На основе всей совокупности полученных экспериментальных данных можно утверждать, что ГК, как фармацевтическая субстанция кандидатного микробицида, обладает высокой антиоксидантной активностью.

## **ВЫВОДЫ**

1. Доказано участие гуминовых кислот в регуляции иммунного ответа при внутривенном введении. Гуминовые кислоты способны стимулировать факторы врожденные противовирусного иммунитета, выступая в качестве активных индукторов эндогенного интерферона- $\alpha$ , ингибиторов активации системы комплемента и энтеросорбентов ЛПС.

2. Гуминовые кислоты эффективно ингибируют репликацию оболочечных вирусов (ВИЧ, ВСВ, ВКЭ) и не оказывают влияния на

репликацию необолочечных вирусов (энтеровирус А71, полиовирус и вирус Коксаки).

3. Гуминовые кислоты представляют собой противовирусные компоненты для микробицидов с многоцелевым механизмом ингибирования репликации вируса: ингибирование слияния ВИЧ с клеткой и ингибирование обратной транскрипции ВИЧ.

4. Гуминовые кислоты проявляют синергический эффект с другими антиретровирусными веществами: азидотимидином, лектиновым белком гриффитсином и сульфатами хитозана.

5. Экспериментально доказана перспективность применения микробицидов на основе гуминовых кислот природного происхождения для топической фармакопрофилактики ВИЧ-инфекции.

6. Предложен новый способ изучения фармакокинетических параметров гуминовых кислот путем детектирования их тритий-замещённых атомов водорода в органах и тканях экспериментальных животных.

7. Установлена разовая переносимая доза гуминовых кислот в составе кандидатного микробицида при интравагинальном и внутривенном введении экспериментальным животным, которая составила 250 мг/кг.

8. Разработанный кандидатный микробицид на основе гуминовых кислот при многократном интравагинальном введении (курсом 28 дней по 1 введению в 2 дня) в дозе 250 мг/кг не вызывает выраженной интоксикации, не оказывает повреждающего действия на жизненно важные системы органов у экспериментальных животных и относится к классу малотоксичных соединений.

9. Фармацевтическая субстанция кандидатного микробицида не оказывает местно негативного действия на компоненты врожденного и приобретенного иммунитета, не обладает местным раздражающим действием, не индуцирует аллергические реакции, такие, как анафилактический шок.

10. Фармацевтическая субстанция кандидатного микробицида на основе гуминовых кислот обладает выраженной антиоксидантной активностью и способна подавлять иммуновоспалительную активность.

11. Разработанный кандидатный микробицид на основе гуминовых кислот для топической профилактики ВИЧ-инфекции является перспективным для последующих доклинических исследований.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Научные статьи

1. Аввакумова Н.П., Кривопалова М.А., **Жернов Ю.В.** ИК-спектроскопическое изучение гуматов магния и серебра пелоидов. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т. 12. № 1-8. С. 2003-2006.

2. Аввакумова Н.П., Жданова А.В., Глубокова М.Н., **Жернов Ю.В.** Влияние гуминовых веществ пелоидов на процессы свободнорадикального окисления. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 1-8. С. 1960-1963.

3. **Жернов Ю.В.** Анализ цитотоксичности гуминовых веществ пелоидов. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. № 1-8. С. 1996-1998.

4. Аввакумова Н.П., **Жернов Ю.В.** Симультантный эффект природных гуминовых кислот как фактор их применения в фармакопрофилактике и фармакотерапии отравлений производственными ядами. Традиционная медицина. Научно-практический журнал. 2011. №5. С. 321-325

5. Карамов Э.В., **Жернов Ю.В.**, Хаитов Р.М. Микробициды – новый класс медицинских иммунобиологических препаратов для профилактики ВИЧ-инфекции. Часть 1. Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. 2014. Т. 18. № 6. С. 3-13.

6. Карамов Э.В., **Жернов Ю.В.**, Хаитов Р.М. Микробициды – новый класс медицинских иммунобиологических препаратов для профилактики ВИЧ-

инфекции. Часть 2. Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. 2014. Т. 18. № 7. С. 3-8.

7. **Жернов Ю.В.**, Кривцов Г.Г., Корнилаева Г.В., Карамов Э.В. Анти-ВИЧ-активность ограничено деполимеризованного азотистой кислотой хлорида хитозония. Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8. № 3 (17). С. 798-801.

8. Аввакумова Н.П., Кривопалова М.А., Глубокова М.Н., Жданова А.В., **Жернов Ю.В.** Влияние ионов серебра на проницаемость через биомембраны гуминовых веществ пелоидов. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16. № 5-2. С. 1036-1038.

9. Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Корнилаева Г.В., Гринкина С.Д., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л., Пронин А.Ю., **Жернов Ю.В.**, Томсон М.М., Бобкова М.Р., Гинцбург А.Л., Черешнев В.А., Хаитов Р.М., Карамов Э.В. Антигенная и генетическая изменчивость вируса иммунодефицита человека 1 типа в Российской Федерации на современном этапе. Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. 2015. Т. 19. № 7. С. 3-12.

10. Карамов Э.В., **Жернов Ю.В.**, Хаитов Р.М. Фармакологическая профилактика ВИЧ-инфекции. Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. 2015. Т. 19. № 6. С. 3-15.

11. Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Тургиев А.С., Корнилаева Г.В., Гринкина С.Д., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л., Пронин А.Ю., **Жернов Ю.В.**, Томсон М.М., Бобкова М.Р., Гинцбург А.Л., Черешнев В.А., Хаитов Р.М., Карамов Э.В. Молекулярная эпидемиология и выбор прототипных штаммов ВИЧ-1 с целью конструирования кандидатных отечественных анти-ВИЧ-вакцин. Иммунология. 2015. Т. 36. № 5. С. 268-275.

12. Цунина Н.М., Аюпова Л.В., **Жернов Ю.В.** Анализ наркологических расстройств в системе социально-гигиенического мониторинга на региональном уровне. Санитарный врач. 2015. № 1. С. 41-45.

13. Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л., Корнилаева Г.В., Пронин А.Ю., **Жернов Ю.В.**, Томсон М.М., Бобкова М.Р., Карамов Э.В. Стремительное распространение циркулирующей рекомбинантной формы CRF02\_AG ВИЧ-1 на территории России и сопредельных стран. Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60. № 6. С. 14-19.
14. Аввакумова Н.П., Глубокова М.Н., Кривопалова М.А., **Жернов Ю.В.**, Жданова А.В., Семионова М.А. Сезонные изменения группового состава низкоминерализованных пелоидов Самарского региона как показатель уровня их биологической активности. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2015. Т. 17. № 5-1. С. 247-250.
15. Воробьев Д.В., **Жернов Ю.В.** Экопрофилактика лекарственной болезни в современных спортивно-тренировочных и оздоровительных технологиях. Безопасность жизнедеятельности. 2016. № 8 (188). С. 12-14.
16. Кривопалова М.А., Аввакумова Н.П., **Жернов Ю.В.**, Воробьев Д.В., Шарипова С.Х., Фомин И.В. О природе полос в ИК-спектре гуматов пелоидов. Ульяновский медико-биологический журнал. 2016. № 3. С. 151-157.
17. Цунина Н.М., **Жернов Ю.В.** Алгоритм применения результатов социально-гигиенического мониторинга на региональном уровне. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2016. Т. 24. № 2. С. 77-81.
18. **Жернов Ю.В.**, Сосинович С.В. Генетическая изменчивость вариантов ВИЧ, циркулирующих на территории Республики Беларусь и Московской области Российской Федерации. Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10. № 3(1) (19). С. 259-261.
19. **Zhernov Y.V.**, Kremb S., Helfer M., Brack-Werner R., Schindler M., Harir M., Mueller C., Hertkorn N., Schmitt-Kopplin P., Avvakumova N.P., Konstantinov A.I., Perminova I.V. Supramolecular combinations of humic polyanions as potent microbicides with polymodal anti-HIV-activities. New Journal of Chemistry. 2016. V. 41. № 1. P. 212-224.

20. Целкович Л.С., Балтер Р.Б., Макарова Е.С., Никулина И.Е., **Жернов Ю.В.** Данные кольпоцитологического исследования у женщин с привычным невынашиванием беременности в зависимости от экологического состояния среды проживания. Аспирантский вестник Поволжья. 2017. №1-2. С. 39-42.

21. Аввакумова Н.П., Катунина Е.Е., Кривопалова М.А., **Жернов Ю.В.**, Глубокова М.Н., Жданова А.В. Характеристика фракционного состава иловых сульфидных грязей различной минерализации. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017. Т. 19. № 2-2. С. 201-206.

22. **Жернов Ю.В.**, Жданова А.В., Аввакумова Н.П., Хаитов М.Р. Иммуноантиоксидантная активность гуминовых кислот. Российский аллергологический журнал. 2018. Т. 15. №1. Часть 2. С. 30-32.

23. Valenta R., Karaulov A., Niederberger V., **Zhernov Y.**, Elisyutina O., Campana R., Focke-Tejkl M., Curin M., Namazova-Baranova L., Wang J.Y., Pawankar R., Khaitov M. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2018. №6 (6): P. 1845-1855.

24. Karamov E., Epremyan K., Siniavin A., **Zhernov Y.**, Cuevas M.T., Delgado E., Sánchez-Martínez M., Carrera C., Kornilaeva G., Turgiev A., Bacqué J., Pérez-Alvarez L., Thomson M.M. HIV-1 genetic diversity in recently diagnosed infections in Moscow: predominance of A<sub>FSU</sub>, frequent branching in clusters, and circulation of the Iberian subtype G variant. AIDS Research and Human Retroviruses. 2018. №34 (7). P. 629-634.

25. Аввакумова Н.П., Камилов Ф.Х., Жданова А.В., Жернов Ю.В., Кривопалова М.А., Глубокова М.Н., Катунина Е.Е. Влияние гумусовых кислот пелоидов и их компонентов на свободнорадикальные процессы. Биомедицинская химия. 2018. Т. 64(5), 429-432.

### **Патенты**

26. **Жернов Ю.В.**, Смирнов В.В., Шиловский И.П., Чернохаева Л.Л., Мартынов А.И., Хаитов М.Р. Способ очистки лекарственного средства пролонгированного действия на основе рекомбинантного аналога интерферона

альфа-17 для лечения вирусного гепатита С. Патент РФ на изобретение, регистрационный №2650755 от 17.04.2018 г.

27. **Жернов Ю.В.**, Смирнов В.В., Шиловский И.П., Чернохаева Л.Л., Мартынов А.И., Хаитов М.Р. Способ очистки лекарственного средства пролонгированного действия на основе рекомбинантного аналога интерферона бета 1b для лечения рассеянного склероза. Патент РФ на изобретение, регистрационный № 2661088 от 11.07.2018 г.

28. Аввакумова Н.П., Кривопалова М.А., **Жернов Ю.В.**, Глубокова М.А., Жданова А.В., Катунина Е.Е. Способ получения низкоминерализованного препарата на основе фульвовых кислот пелоидов. Патент РФ на изобретение, регистрационный № 2663570 от 07.08.2018 г.