

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДУКТОРОВ АПОПТОЗА В ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРЕДОТВРАЩЕНИИ ХРОНИЧЕСКИХ ПОСТГРИППОЗНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ЛЕГКИХ

© В. В. Зарубаев,¹ В. Г. Трибулович,¹ С. В. Беляевская,¹ Н. А. Барлев,² О. И. Киселев

¹ Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ
и ² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: zarubaev@influenza.spb.ru

Грипп представляет собой широко распространенную во всем мире респираторную инфекцию. Осложнения гриппа разнообразны и во многих случаях включают как фактор патогенеза избыточную пролиферацию клеток в респираторном тракте. В настоящей работе изучена эффективность использования индуктора апоптоза 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталенкарболовой кислоты (АНРП) для профилактики хронических поражений легких на стадии постгриппозной пневмонии. Мышей инфицировали вирусом гриппа A/mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2), после чего изучали уровень репродукции вируса в легких, специфическую смертность животных и морфологическую структуру очагов постгриппозной пневмонии на 15-е сут после инфицирования. Показали, что АНРП снижает инфекционную активность вируса в ткани легких на 1.2—1.5 lgЭИД₅₀/0.2 мл в зависимости от использованной дозы по сравнению с контрольной группой и приводит к слабому снижению смертности животных (индекс защиты составил 12.5—37.5 %). Применение АНРП ограничивало как пролиферативный, так и инфильтративный компоненты хронических очагов постгриппозной пневмонии. Наиболее выраженное влияние на морфологию ткани легких он оказывал при применении на 4—7-е сут после заражения, т. е. в период наибольшей активации процессов воспалительной инфильтрации ткани и регенерации бронхиолярного эпителия. Таким образом, использование индукторов апоптоза может предотвращать развитие постгриппозных осложнений с пролиферативным компонентом.

Ключевые слова: грипп, постгриппозная пневмония, апоптоз, индукторы апоптоза, АНРП, химиотерапия.

Принятые сокращения: СПЖ — средняя продолжительность жизни, ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких, ЭИД₅₀ — 50 % экспериментальной инфекционной дозы, LD₅₀ — 50 % летальной дозы.

Грипп представляет собой широко распространенную во всем мире респираторную инфекцию. Он вызывает ежегодные эпидемии, быстро распространяющиеся из страны в страну, вовлекая в тяжелых случаях (пандемии) значительную часть человеческой популяции. Он также является причиной 20—40 тыс. смертельных исходов в год в США (Ghendon, 1992). Несмотря на успехи, достигнутые в области химиотерапии, вакцинопрофилактики и иммунологии гриппа, он остается трудно контролируемой инфекцией вследствие высокой генетической изменчивости и различных долговременных осложнений после острой стадии. Осложнения приводят к «скрытой», или вторичной, смертности, вызванной не самим вирусом гриппа, но вирусиндуцированными вторичными процессами (Zambon, 1999).

Факторы патогенеза гриппозной инфекции включают в себя как вирусспецифические, так и реактивные процессы. При тяжелых формах гриппа именно последние выступают в роли ведущих факторов, определяющих тяжесть и исход заболевания. К числу таких факторов относятся воспалительные реакции, направляемые провос-

палительными цитокинами. Кроме того, по завершении острой стадии гриппа клетки регенерирующего бронхиолярного эпителия, подвергаясь метапластическим изменениям, формируют участки хронических разрастаний. Эти разрастания препятствуют нормальному газообмену и нередко приводят к развитию хронического воспаления, присоединению бактериальных суперинфекций и дыхательной недостаточности.

Среди отдаленных осложнений гриппа отмечены инфекционный миозит (Attarian, Azulay, 2001), бактериальная и сочетанная вирусно-бактериальная пневмония (Venstra et al., 2000), миокардит (Nolte et al., 2000; Vilchez et al., 2000), хронический облитерирующий бронхолит (Schlesinger et al., 1998), острая почечная недостаточность (Asaka et al., 2000), энцефалопатия нескольких типов (Okabe et al., 2000; Ekstrand et al., 2012) и аутоиммунные расстройства (Rott et al., 1994). Кроме того, продемонстрировано, что гриппозная инфекция приводит к хроническим фиброгенным процессам в легких (Conway et al., 1992; Jakab, Hemenway, 1992; Quiao et al., 2009). Более того, ряд авторов рассматривают грипп как фактор

риска для развития таких легочных патологий, как чешуйчатая метаплазия бронхиального эпителия и карцинома легкого (Baky et al., 1980).

Хронические осложнения после острой стадии гриппа смоделированы на животных. Было показано, что по прошествии острой стадии гриппа в легких возникают хронические поражения. Эти поражения представляют собой очаги, или узелки, гиперпролиферации низкодифференцированных клеток респираторного эпителия, заполняющих просветы бронхов и альвеолярные пространства. Это ведет к неспособности альвеолоцитов II типа продуцировать сурфактант, что снижает объем газообмена и формирует условия для вторичных инфекций и легочной недостаточности (Lemercier et al., 1976). Было установлено, что клетки, образующие постгриппозные узелки, происходят от регенерирующих клеток выстилки бронхов (Loosli et al., 1975). Показано длительное (до 120 сут после инфицирования) присутствие вирусного антигена в легких мышей, тогда как инфекционный вирус определялся лишь в течение 10 сут (Jakab et al., 1983). До настоящего времени природа персистирующего вирусного антигена, его локализация и механизмы его поддержания не выяснены. Недостаточно изучены также причины появления таких осложнений, регуляция клеточной дифференцировки в очагах разрастаний и пути их обратного развития и ремоделирования легких. Данные ряда авторов, изучавших постгриппозные хронические поражения легких, свидетельствуют о том, что в их развитии принимает участие также микоплазменная суперинфекция (Безуглова и др., 1991), и этот факт еще более осложняет механизм формирования хронической гриппозной инфекции. В поддержании низкодифференцированного состояния бронхиолярных клеток могут также быть вовлечены механизмы неспецифического ответа на патоген (Leigh et al., 2002).

Таким образом, избыточная пролиферация клеток на поздних стадиях гриппозной инфекции представляет собой важный фактор патогенности гриппа и играет ведущую роль в хронизации инфекции и развитии ее осложнений. Данные ряда работ свидетельствуют о том, что препараты, замедляющие пролиферацию клеток, играют роль супрессоров гриппозной инфекции (Mazur et al., 2007; Planz, 2013). Более того, применение химиопрепаратов, ограничивающих клеточную пролиферацию, может оказаться перспективным средством снижения тяжести заболевания и профилактики хронических осложнений при гриппе. В организме снижение уровня клеточной пролиферации может быть достигнуто как за счет остановки клеточного цикла, так и при помощи активации механизма апоптоза. В обоих механизмах ключевую роль играет белок p53, который является важнейшим транскрипционным фактором-онкосупрессором у человека (Barlev et al., 2010) и также участвует в ответе организма на вирусную инфекцию (Munoz-Fontela et al., 2011).

Апоптоз представляет собой генетически контролируемую гибель клетки. В ходе этого процесса умирающая клетка сохраняет целостность мембраны, и лишь по завершении программы апоптоза разрушение клеточной оболочки служит сигналом для расположенных вблизи фагоцитов к поглощению оставшихся фрагментов. Благодаря этому удаление умирающих клеток происходит без развития воспаления. Апоптоз происходит в 2 стадии. Первая стадия — стадия обратимых изменений, во время которой процесс апоптоза может быть остановлен и клеточные структуры будут репарированы. Этот этап

длится от инициации апоптоза до начала фрагментации ДНК. Вторая стадия апоптоза, во время которой клеточные структуры разрушаются и клетка образует апоптотические тельца, является необратимой.

В настоящей работе изучена роль индуктора апоптоза 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталенкарболовой кислоты (АНРП) в предотвращении хронических поражений легких на стадии постгриппозной пневмонии. Показано, что его использование в период инициации репаративных процессов в легких (4—7 сут после инфицирования) приводит к снижению площади очагов поражения и угнетению воспалительной инфильтрации ткани. При этом не отмечено существенного влияния АНРП ни на инфекционный титр вируса, ни на специфическую смертность животных.

Материал и методика

Исследовали 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталенкарболовую кислоту (АНРП), синтезированную при помощи оптимизированного метода синтеза адамантилзамещенных арилборных кислот (Трибулович, 2010).

Вирусы и клетки. Для оценки противовирусной активности испытуемого препарата использовали вирус гриппа A/mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2) из коллекции вирусных штаммов НИИ гриппа (Санкт-Петербург). Вирус накапливали в течение 48 ч в аллантоисной полости 10—12-суточных куриных эмбрионов.

Экспериментальная гриппозная инфекция. Для заражения животных использовали гомогенат легочной ткани мышей, предварительно зараженных вирусом, на 3-и сут после инфицирования. Из него готовили серию 10-кратных разведений на физиологическом растворе, после чего инфекционную активность вируса в заражающем материале определяли в отдельном эксперименте при помощи титрования по летальности на животных. Титр вируса рассчитывали по описанному методу (Reed, Muench, 1938).

Исследуемый препарат в необходимых концентрациях вводили животным внутривентриально в объеме 0.2 мл 1 раз в сутки в течение следующих сроков: первая группа животных получала препарат в 1—4-е сут после инфицирования животных, вторая — на 4—7-е сут, третья — на 7—10-е сут, четвертая — в 1—10-е сут. В качестве плацебо контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буферный раствор. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которых содержали в тех же условиях, что и опытные группы.

Вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 10 (эксперименты по летальности) или 0.1 (морфологические исследования) от LD₅₀. При изучении летальности животных в каждую группу наблюдения брали по 25 мышей. На 3-и сут после заражения 5 животных из каждой группы эвтаназировали, вскрывали и изолировали легкие, которые использовали для определения инфекционной активности вируса (замораживали и хранили при -20 °С до постановки соответствующих экспериментов — см. ниже).

Наблюдение за оставшимися животными осуществляли в течение 15 сут — срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается смертность животных. Ежедневно фиксировали смертность живот-

ных в контрольных и опытных группах. На основании полученных показателей смертности в каждой группе определяли смертность (M), индекс защиты (IP) и среднюю продолжительность жизни животных (MDD) за 14 сут наблюдения в соответствии со следующими формулами: $MDD = (\sum ND)/Nt$, где N — число животных, проживших D дней, Nt — общее число животных в группе; $M = M/Nt$, где M — число животных в группе, павших в течение 14 сут после заражения; $IP = [(Mc - Me)/Mc] \cdot 100\%$, где Mc и Me — смертность (%) в контрольной и опытной группах соответственно.

Для морфологических исследований в каждую экспериментальную группу брали по 5 животных, которых инфицировали вирусом в дозе 0.1 LD₅₀, забивали на 15-е сут после заражения и изучали легкие при помощи морфологического анализа (см. ниже).

Для определения инфекционного титра вируса гриппа в легочной ткани животных легкие мышей, извлеченные на 3-и сут после инфицирования, гомогенизировали в 10-кратном объеме стерильного физиологического фосфатного буфера и готовили из гомогенатов серию 10-кратных разведений на том же буфере. При определении титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных панелях на среде MEM. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями легочного гомогената от 10⁰ до 10⁻⁶ и инкубировали в термостате в течение 48 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем физиологического раствора, содержащего 1 % куриных эритроцитов.

Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации (ГА) эритроцитов. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали в логарифмах 50%-ной экспериментальной инфекционной дозы вируса (lgЭИД₅₀).

Гистологический анализ. В легких животных, зараженных дозой вируса 0.1 LD₅₀, на 15-е сут после инфицирования макроскопически оценивали площадь хронических очагов постгриппозной пневмонии. Общую площадь поверхности легких принимали за 100 % и оце-

нивали суммарную площадь поверхности, занятую видимыми патологическими изменениями (изменение цвета легких и нарушение нормальной структуры поверхности). Площадь очагов поражения выражали в % от общей площади поверхности легких.

Для морфологического исследования легкие фиксировали 10%-ным формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, проводили через хлороформ, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилин-эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, проводили через две смены ксилола и заключали в бальзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах пневмонии, а также степень дегенеративных и пролиферативных процессов в ткани легких.

Результаты

Действие ингибитора апоптоза оценивали при летальной гриппозной пневмонии у белых мышей, вызванной адаптированным вирусом A/mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2). Как было показано в ходе предварительных экспериментов по изучению острой токсичности, 50%-ная летальная доза АНРН для животных составила 45 мг на 1 кг массы животного. Исходя из этого в работе использовали концентрации препарата 5 и 15 мг/кг. Данные по протективной активности АНРН суммированы в табл. 1.

Как следует из представленных данных, практически во всех изученных дозах и режимах применения АНРН приводил к снижению специфической смертности в группах эксперимента по сравнению с контролем и увеличению средней продолжительности жизни животных. Исключение составила группа, получавшая максимальную дозу препарата на протяжении всего периода экспери-

Таблица 1

Влияние АНРН на показатели смертности белых мышей, инфицированных вирусом гриппа A/mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2)

Время введения АНРН после заражения, сут	Суточная доза АНРН, мг/кг	Показатели активности				
		смертность, % (n = 10)	СПЖ, ^a сут	Индекс защиты, %	ΔСПЖ, ^b сут	ТВЛ на 3-и сут, lgЭИД ₅₀ /0.2мл
1—4	5	60	13.2	25.0	+1.3	4.3 ± 0.2
	15	70	12.7	12.5	+0.8	4.0 ± 0.1
4—7	5	50	13.6	37.5	+1.7	Не определяли
	15	60	12.9	25.0	+1.0	
7—10	5	70	12.8	12.5	+0.9	» »
	15	70	12.9	12.5	+1.0	» »
0—10	5	80	12.7	0.0	+0.8	» »
	15	100	11.6	-25.0	-0.3	» »
Контроль вируса		80	11.9	0	0	5.5 ± 0.2

Примечание. ^aСредняя продолжительность жизни. ^bИзменение по сравнению с контролем. ТВЛ — титр вируса в легких.

Таблица 2

**Влияние АНПН на развитие очагов хронического воспаления
в легких белых мышей, инфицированных вирусом гриппа
A/mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2)**

Время применения АНПН после заражения, сут	Средний размер очагов пневмонии (доля площади легких, %) при дозе препарата, мг/кг		
	5	15	0 (контроль вируса)
1—4	19 ± 2 (n = 5)	27 ± 4 (n = 5)	45 ± 4 (n = 5)
4—7	14 ± 2 (n = 5)	26 ± 7 (n = 5)	
7—10	33 ± 4 (n = 5)	18 ± 2 (n = 5)	
0—10	20 ± 4 (n = 5)	—	

мента (0—10 сут). Этот факт, как и меньшую эффективность дозы 15 мг/кг по сравнению с 5 мг/кг, можно объяснить кумулятивной токсичностью препарата, учитывая небольшую разницу между дозой 15 мг/кг и его LD₅₀ (45 мг/кг).

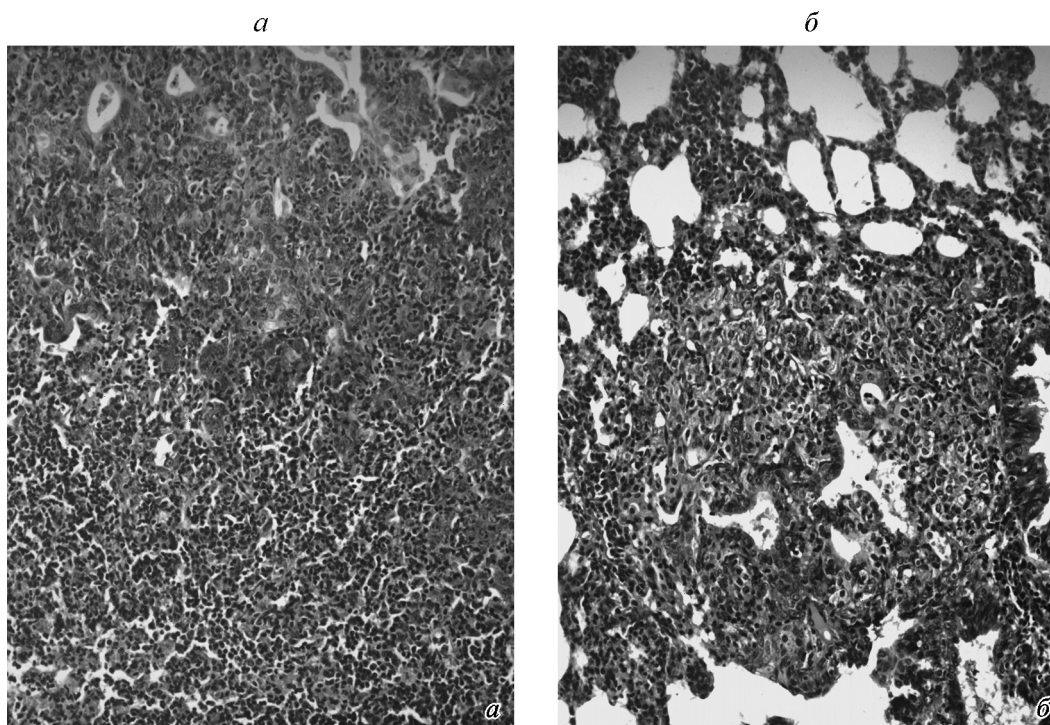
Легкие животных, выживших к 15-м сут после инфицирования, изучали макроскопически, после чего при помощи гистологического анализа оценивали структуру легочной ткани в очагах хронической постгриппозной пневмонии. Данные по оценке средней площади хронических поражений при гриппе суммированы в табл. 2.

Как следует из представленных результатов, применение АНПН снижало площадь хронических поражений легких при постгриппозной пневмонии практически при всех дозах и режимах применения. Ни в одном случае, однако, эти различия не достигали статистической достоверности вследствие малой выборки и поэтому большого разброса исходных данных. Наибольшая эффективность

была выявлена в группе животных, получавших АНПН в малой дозе (5 мг/кг) с 3-х по 6-е сут после инфицирования. Эти данные находятся в соответствии с результатами анализа выживаемости животных, где наибольший индекс защиты был также достигнут в этой же группе.

На следующем этапе исследований были изучены особенности морфогенеза гриппозной инфекции в организме животных в условиях применения исследуемых препаратов.

Легкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, клетки его выглядели интактными — в них не было признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических включений. В просветах бронхов не отмечали экссудата и клеточного детрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели воздушными, альвеоляр-



Очаги хронической постгриппозной пневмонии на 15-е сут после инфицирования вирусом гриппа A/mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2) без применения (а) и в условиях лечебного применения препарата АНПН (3—6 сут).

а — интенсивный клеточный инфильтрат и избыточная пролиферация бронхиолярного эпителиа; б — клетки метаплазированного эпителиа вакуолизируются, воспалительная инфильтрация незначительна. Окраска гематоксилин-эозином. Об. 20×.

ные стенки не были утолщены, из клеток инфильтрата в легочной паренхиме отмечали отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаружили.

У зараженных животных, не получавших лечения, морфологические изменения легочной ткани на 3-и сут после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусоспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением пораженных клеток в просвет бронха, интенсивного серозного интерстициального отека, очагов геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширением сосудов и спадением альвеол. Значительная часть нейтрофилов при этом находилась в стадии распада.

У выживших животных, не получавших лечения, к 15-м сут развития инфекции серозный экссудат замещался клеточным, состоящим из нейтрофилов, лимфоцитов и макрофагов. Структура легочной ткани претерпевала качественные изменения по сравнению с острой стадией инфекции и по сравнению с тканью легких интактных животных. Пораженный слой бронхиального эпителия восстанавливался, образуя характерные структуры гиперплазированных клеток. Избыточные пролиферативные и репаративные процессы в ткани легких приводили к бронхиолярной метаплазии альвеолярного эпителия, образующего аденоматозные структуры, окруженные массивными инфильтратами лимфоидно-макрофагальных элементов, что приводило к карнификации обширных отделов легких. Эпителий крупных бронхов был гиперплазирован. Просветы бронхов были заполнены экссудатом, состоящим из нейтрофилов, круглоклеточных элементов и клеточного детрита. В просветах ателектазированных альвеол в респираторных отделах отметили мощную клеточную воспалительную реакцию и большое количество клеточного детрита. Перечисленные явления типичны для вирусной пневмонии, и степень их выраженности может служить критерием для оценки тяжести процесса.

Сравнительный анализ легких мышей в контрольной группе и в группе, получавшей АНРН, показал, что в целом структура очагов хронической постгриппозной пневмонии является сходной во всех группах опыта. Максимальные различия между контролем и экспериментом по применению АНРН были на 3—6-е сут после инфицирования. Эти различия заключались в снижении количества клеток воспалительного инфильтрата по сравнению с контрольными показателями. Клетки метаплазированной эпителия выглядели светлее и характеризовались несколько более выраженной вакуолизацией по сравнению с контролем (см. рисунок).

Обсуждение

В результате проведенных исследований показано, что использование индуктора апоптоза АНРН при летальной гриппозной инфекции ограничивает и пролиферативный, и инфильтративный компоненты хронических очагов постгриппозной пневмонии. Наиболее выраженное влияние на морфологию ткани легких он оказывает, когда применяется на 4—7-е сут после заражения, т. е. в период наибольшей активации процессов воспалительной инфильтрации ткани и регенерации бронхиолярного

эпителия. При этом, несмотря на снижение титра вируса в легких, он приводит к слабому протективному эффекту (индекс защиты 12.5—37.5 %).

Ряд патологий легких человека имеет сходство с моделью постгриппозных осложнений у животных, описанной выше. В этом отношении хронические неспецифические заболевания легких с воспалительным компонентом и доброкачественные опухоли легких, такие как многофокусная альвеолярная гиперплазия (Lantuejoul et al., 1997), атипичная альвеолярная гиперплазия (Kerr et al., 1994) и микроузловая гиперплазия пневмоцитов (Rorper et al., 1991), более близки к постгриппозным разрастаниям у мышей, чем другие неоплазии человека (аденокарцинома легких, бронхиолоальвеолярноклеточная аденома, чешуеклеточная карцинома и др.), поскольку для них проникновение пролиферирующих клеток через базальную мембрану альвеол нетипично. Гиперпролиферация альвеолоцитов II типа характерна и для идиопатического фиброза легких (Mori et al., 2004).

Таким образом, предпосылки к проведению описанных исследований заключались в том, что развитие гриппозной инфекции включает в себя ряд процессов, на ход которых могут влиять химические соединения — индукторы апоптоза. 1. Апоптоз в вирусинфицированных клетках. Размножение вируса в клетках-мишенях само по себе индуцирует апоптотические процессы, однако их дополнительная стимуляция может еще более ограничивать число циклов репликации, снижая титр вируса и уменьшая степень проявления реактивных процессов в организме.

2. Проллиферация клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины. Известно, что помимо собственно вирусиндуцированных процессов повреждение тканевой вызывается местными воспалительными реакциями, стимулируемыми провоспалительными цитокинами. Последние в свою очередь продуцируются активированными клетками лимфоидной системы, и ограничение их пролиферации может играть иммуносупрессивную роль, снижая уровень дегенеративных процессов в ткани.

3. Избыточная пролиферация клеток бронхиолярного эпителия при регенерации слоя, разрушенного в ходе острой инфекции. Базальные клетки эпителия, сохранившиеся после острой стадии гриппа, в ходе репаративных процессов формируют обширные очаги метапластических разрастаний, которые заполняют просветы бронхов и альвеолярные полости, снижая уровень газообмена, приводя к дыхательной недостаточности и как одно из следствий — к вторичным суперинфекциям и хроническому воспалению. Применение индукторов апоптоза на этой стадии позволит ограничить уровень пролиферации этих клеток и уменьшить степень развития хронических последствий при гриппе. Учитывая, что ряд индукторов апоптоза избирательно воздействует на низкодифференцированные клетки и что именно такие клетки формируют зоны хронических разрастаний, можно ожидать селективной дегенерации пораженной ткани легкого на стадии хронической постгриппозной пневмонии.

В настоящее время применение индукторов апоптоза в подавляющем большинстве случаев ограничено противоопухолевой терапией. Однако некоторые препараты используются для коррекции иммунных патологий, связанных с избыточной пролиферацией клеток. К этой группе относятся такие препараты, как Ремикад и Этанерцепт, представляющие собой рекомбинантные антитела к TNF и индуцирующие апоптоз в иммунных клетках (Machet et al., 2013). Наиболее исследованным соедине-

нием класса синтетических ретиноидов, проявляющих проапоптотическую активность, является адапален, широко применяемый при лечении *acne vulgaris*. Однако соединения, содержащие деметилированную оксигруппу в фенильном фрагменте молекулы, имеют более выраженную активность в качестве индукторов апоптоза. Из них наиболее исследованным является АНРН (CD437) (Kadara et al., 2006; Pan et al., 2009). Помимо индукции апоптоза упомянутые соединения являются синтетическими лигандами рецепторов ретиноидов, стимулирующих дифференцировку клеток (Costa et al., 2001). Можно ожидать, что их применение будет стимулировать помимо индукции апоптоза процессы дифференцировки метастазированных клеток в очагах хронических разрастаний.

В связи с этим весьма актуальным является вопрос участия онкосупрессорного белка p53 в контроле за процессами постинфекционной неоплазии. Целый ряд работ последнего времени показал, что в ответ на вирусную инфекцию p53 активируется (Shen et al., 2009) и запускает интерфероновый ответ организма, вызывая тем самым воспалительный процесс в легких (Turpin et al., 2005). Кроме того, было показано, что активация белка p53 происходит за счет репрессии его специфической E3-убиквитинлигазы Mdm2 (Wang et al., 2012), которая вызывает убиквитинирование белка p53 и приводит к его протеосомной деградации (Mittenberg et al., 2008). Поэтому ингибирование протеолитической и неканонических активностей протеасом (Kulichkova et al., 2010) положительно сказывается на течении инфекции, предотвращая распространение вируса (Dudek et al., 2010).

Недостатком изученного соединения является его высокая токсичность. Известно, что индукторы апоптоза, применяемые в онкологической практике, проявляют широкий спектр побочных эффектов. Эти эффекты в первую очередь обусловлены низкой избирательностью действия химиопрепаратов. Их цитотоксическое действие проявляется как в отношении клеток опухоли, так и в отношении других интенсивно делящихся клеток. Это приводит к поражению эпителиальных клеток (кожи, кишечника и др.), а также к иммуносупрессии, вызванной подавлением системы кроветворения (Postow et al., 2012; Belum et al., 2013).

То же можно сказать о результатах проведенного исследования. Невысокая селективность индукторов апоптоза, в частности АНРН, делает эти препараты токсичными, а их использование — рискованным из-за высокой вероятности развития побочных эффектов. Действительно, смертность животных, получавших АНРН на протяжении 10 сут, превысила смертность в контрольной группе. Иными словами, положительный эффект препарата был с избытком нивелирован его негативным влиянием. Таким образом, отдельным направлением исследований должны быть эксперименты по повышению избирательности действия и направленной доставки препарата, что, возможно, приведет к снижению токсичности и позволит добиться уменьшения его дозы. При этом условии возможно более детальное обоснование целесообразности использования индукторов апоптоза при лечении хронической гриппозной инфекции и (или) других вирусных заболеваний, включающих пролиферацию клеток в качестве фактора патогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (контракт № 14.740.11.0920) и СПбГУ за 2012—2013 гг., мероприятие 3 (12.39.1050.2012).

Список литературы

- Безуглова Т. В., Казанцева И. А., Ланге А., Ретиг В. 1991. Патоморфология хронизации и исхода экспериментальной микопlasма-вирусной пневмонии. Архив патол. 53 (11) : 33—37. (Bezuglova T. V., Kazantseva I. A., Lange A., Retig V. 1991. Pathomorphology of chronization and outcomes of experimental mycoplasma-viral pneumonia. Arkh. Patol. 53 (11) : 33—73.)
- Трибулович В. Г. 2010. Разработка методов образования C—C связи в синтезе адамантилзамещенных ретиноидов: Автореф. канд. дис. СПб. 20 с. (Tribulovich V. G. 2010. Development of methods of formation of C—C bond in the synthesis of adamantly-substituted retinoids. PhD Thesis. St. Petersburg. 20 p.)
- Asaka M., Ishikawa I., Nakazawa T., Tomosugi N., Yuri T., Suzuki K. 2000. Hemolytic uremic syndrome associated with influenza A virus infection in an adult renal allograft recipient: case report and review of the literature. Nephron. 84 : 258—266.
- Attarian S., Azulay J. P. 2001. Infectious myopathies. Rev. Prat. 51 : 284—288.
- Baky A. A., Winkler D. G., Hunter N. R., Subach J. A., Greenberg S. D., Spjut H. J., Estrada R., Kimzey S. L. 1980. Atypia status index of respiratory cells: a measurement for the detection and monitoring of neoplastic changes in squamous cell carcinogenesis. Anal. Quant. Cytol. 2 : 175—185.
- Barlev N. A., Sayan B. S., Candi E., Okorokov A. L. 2010. The microRNA and p53 families join forces against cancer. Cell Death Differ. 17 : 373—375.
- Belum V. R., Fontanilla Patel H., Lacouture M. E., Rodeck U. 2013. Skin toxicity of targeted cancer agents: mechanisms and intervention. Future Oncol. 9 : 1161—1170.
- Conway S. P., Simmonds E. J., Littlewood J. M. 1992. Acute severe deterioration in cystic fibrosis associated with influenza A virus infection. Thorax. 47 : 112—114.
- Costa S. L., Paillaud E., Fages C., Rochette-Egly C., Plasset J. L., Jouault H., Perzelova A., Tardy M. 2001. Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma *in vitro*: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. Eur. J. Cancer. 37 : 520—530.
- Dudek S. E., Luig C., Pauli E. K., Schubert U., Ludwig S. 2010. The clinically approved proteasome inhibitor PS-341 efficiently blocks influenza A virus and vesicular stomatitis virus propagation by establishing an antiviral state. J. Virol. 84 : 9439—9451.
- Ekstrand J. J. 2012. Neurologic complications of influenza. Semin. Pediatr. Neurol. 19 : 96—100.
- Ghendon Y. 1992. Influenza — its impact and control. World Health Statistic Q. 45 : 306—311.
- Jakab G. J., Astry C. L., Warr G. 1983. Alveolitis induced by influenza virus. Amer. Rev. Respir. Dis. 128 : 730—739.
- Jakab G. J., Hemenway D. R. 1992. Experimental influenza virus infection, silicon dioxide polymorphs, and pulmonary fibrogenesis. J. Toxicol. Environ. Health. 37 : 11—24.
- Kadara H., Schroeder C. P., Lotan D., Pisano C., Lotan R. 2006. Induction of GDF-15/NAG-1/MIC-1 in human lung carcinoma cells by retinoid-related molecules and assessment of its role in apoptosis. Cancer Biol. Ther. 5 : 518—522.
- Kerr K. M., Carey F. A., King G., Lamb D. 1994. Atypical alveolar hyperplasia: relationship with pulmonary adenocarcinoma, p53 and *c-erbB-2* expression. J. Pathol. 174 : 249—256.
- Kulichkova V. A., Tsimokha A. S., Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Bottril A., Lezina L., Gauze L. N., Konstantinova I. M., Mittenberg A. G., Barlev N. A. 2010. 26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli. Cell Cycle. 9 : 840—849.
- Lantuejoul S., Ferretti G., Negoescu A., Parent B., Brambilla E. 1997. Multifocal alveolar hyperplasia associated with lymphangioleiomyomatosis in tuberous sclerosis. Histopathology. 30 : 570—575.
- Leigh R., Ellis R., Wattie J., Southam D., de Hoogh M., Gauldie J., O'Byrne P. M., Inman M. 2002. Dysfunction and remodeling of the mouse airway persists after resolution of acute allergen-induced airway inflammation. Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 27 : 526—535.

- Lemercier G., Burchart M. F., Fontanges R. 1976. Bronchioloalveolar metaplasia during experimental influenza in mice—histological and ultrastructural study. *Tohoku J. Exp. Med.* 118 : 59—79.
- Loosli C. G., Stinson S. F., Ryan D. P., Hardy D. P., Serebrin R. 1975. The destruction of type 2 pneumocytes by airborne influenza PR8-A virus; its effect on surfactant and lecithin content of the pneumonic lesions of mice. *Chest.* 67 : 2 (Suppl.). 7S—14S.
- Machet L., Samimi M., Delage M., Paintaud G., Maruani A. 2013. Systematic review of the efficacy and adverse events associated with infliximab treatment of hidradenitis suppurativa in patients with coexistent inflammatory diseases. *J. Amer. Acad. Dermatol.* 69 : 649—650.
- Mazur I., Wurzer W. J., Ehrhardt C., Pleschka S., Puthavathana P., Silberzahn T., Wolff T., Planz O., Ludwig S. 2007. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell. Microbiol.* 9 : 1683—1694.
- Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Barlev N. A. 2008. Role of proteasomes in transcription and their regulation by covalent modifications. *Front. Biosci.* 13 : 7184—7192.
- Mori M., Morishita H., Nakamura H., Matsuoka H., Yoshida K., Kishima Y., Zhou Z., Kida H., Funakoshi T., Goya S., Yoshida M., Kumagai T., Tachibana I., Yamamoto Y., Kawase I., Hayaishi S. 2004. Hepatoma-derived growth factor is involved in lung remodeling by stimulating epithelial growth. *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 30 : 459—469.
- Muñoz-Fontela C., Pazos M., Delgado I., Murk W., Mungamuri S. K., Lee S. W., Garcia-Sastre A., Moran T. M., Aaronson S. A. 2011. p53 serves as a host antiviral factor that enhances innate and adaptive immune responses to influenza A virus. *J. Immunol.* 187 : 6428—6436.
- Nolte K. B., Alakija P., Oty G., Shaw M. W., Subbarao K., Garner J., Shieh W. J., Dawson J. E., Morken T., Cox N. J., Zaki S. R. 2000. Influenza A virus infection complicated by fatal myocarditis. *Amer. J. Forensic Med. Pathol.* 21 : 375—379.
- Okabe N., Yamashita K., Taniguchi K., Inouye S. 2000. Influenza surveillance system of Japan and acute encephalitis and encephalopathy in the influenza season. *Pediatr. Int.* 42:187—191.
- Pan M., Geng S., Xiao S., Ren J., Liu Y., Li X., Li Z., Peng Z. 2009. Apoptosis induced by synthetic retinoic acid CD437 on human melanoma A375 cells involves RIG-I pathway. *Arch. Dermatol. Res.* 301 : 15—20.
- Planz O. 2013. Development of cellular signaling pathway inhibitors as new antivirals against influenza. *Antiviral Res.* 98 : 457—468.
- Popper H. H., Juettner-Smolle F. M., Pongratz M. G. 1991. Micronodular hyperplasia of type II pneumocytes — a new lung lesion associated with tuberous sclerosis. *Histopathology.* 18 : 347—354.
- Postow M. A., Harding J., Wolchok J. D. 2012. Targeting immune checkpoints: releasing the restraints on anti-tumor immunity for patients with melanoma. *Cancer J.* 18 : 153—159.
- Qiao J., Zhang M., Bi J., Wang X., Deng G., He G., Luan Z., Lv N., Xu T., Zhao L. 2009. Pulmonary fibrosis induced by H5N1 viral infection in mice. *Respir. Res.* 10 : 107.
- Reed L. J., Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27 : 493—497.
- Rott O., Herzog S., Cash E. 1994. Autoimmunity caused by host cell protein-containing viruses. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*. 183 : 195—204.
- Schlesinger C., Veeraraghavan S., Koss M. N. 1998. Constructive (obliterative) bronchiolitis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 4 : 288—293.
- Shen Y., Wang X., Guo L., Qiu Y., Li X., Yu H., Xiang H., Tong G., Ma Z. 2009. Influenza A virus induces p53 accumulation in a biphasic pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382 : 331—335.
- Turpin E., Luke K., Jones J., Tumpey T., Konan K., Schultz-Cherry S. 2005. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *J. Virol.* 79 : 8802—8811.
- Veenstra R. P., Boelen C. C., Zijlstra J. G., Bos A. P., Ligtenberg J. J. 2000. Influenza A pneumonia. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 144 : 1937—1941.
- Vilchez R. A., Fung J. J., Kusne S. 2000. Influenza A myocarditis developing in an adult liver transplant recipient despite vaccination: a case report and review of the literature. *Transplantation.* 70 : 543—545.
- Wang X., Deng X., Yan W., Zhu Z., Shen Y., Qiu Y., Shi Z., Shao D., Wei J., Xia X., Ma Z. 2012. Stabilization of p53 in influenza A virus-infected cells is associated with compromised MDM2-mediated ubiquitination of p53. *J. Biol. Chem.* 287 : 18 366—18 375.
- Zambon M. 1999. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J. Antimicrob. Chemother.* 44 : B3—B9.

Поступила 4 IX 2013

THE USE OF APOPTOSIS INDUCERS IN THE THERAPY OF EXPERIMENTAL INFLUENZA INFECTION AND PREVENTING OF CHRONIC POST-INFLUENZA LUNG DAMAGE

V. V. Zarubaev,¹ V. G. Tribulovich,¹ S. V. Belyaevskaya,¹ N. A. Barlev,² O. I. Kiselev¹

¹ Influenza Research Institute, Ministry of Health Care of Russian Federation,
and ² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru

Influenza is a respiratory infection widely spread around the world. Influenza complications are various in nature and in most cases involve the excessive proliferation of cells in respiratory tract as a factor of pathogenesis. In the present work the efficacy of the use of apoptosis inducer 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalenecarboxylic acid (AHPN) for prophylaxis of chronic damage on the stage of post-influenza pneumonia has been studied. Mice were infected with influenza virus A/mallard/Pennsylvania/10218/84(H5N2) with further study of the level of influenza virus reproduction in the lungs, specific mortality of animals and morphology of the foci of post-influenza pneumonia on the 15th day post inoculation. AHPN was shown to decrease the infectious activity of the virus in the lungs by 1.2—1.5 log₁₀ EID₅₀/0.2 mL depending on the dose as compared to the control group, in a weak decrease in mortality of animals (protection index was 12.5—37.5 %). The application of AHPN restricted both the proliferative and infiltrative component in chronic post-influenza lesions. It demonstrated the most pronounced effect on the lung morphology when applied on days 4 to 7 post inoculation, i. e. in the period of maximal activation of inflammatory tissue infiltration and regeneration of bronchiolar epithelium. In conclusion, the use of apoptosis inducers can partially prevent the development of chronic post-influenza lesions with proliferative component.

Key words: influenza, post-influenza pneumonia, apoptosis, apoptosis inducers, AHPN, chemotherapy.