

Исследование антивирусной активности Глутоксима при инфицировании клеточной линии фибробластов вирусом везикулярного стоматита

С.В. Ожерелков¹, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаб. противовирусных лекарственных средств (ozherelkov@yandex.ru), **Т.Н. Кожевникова²**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаб. клеточного иммунитета (tatiana@micro-plus.ru), **А.В. Санин²**, доктор биологических наук, профессор, зав. лаб. клеточного иммунитета (saninalex@inbox.ru), **О.И. Конюшко¹**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаб. противовирусных лекарственных средств (polcells@yandex.ru), **М.Ф. Ворович¹**, кандидат биологических наук, заместитель директора по производству (vorovich_mf@chumakovs.su), **А.Л. Иванова¹**, кандидат химических наук, микробиолог (ivanovaalla1967@mail.ru)

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (108819, Москва, пос. Московский, посёлок Института полиомиелита, дом. 8, корп. 1).
²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18).

Основой новой стратегии лечения инфекционных заболеваний животных является модуляция иммунного ответа организма хозяина для усиления клиренса инфекционных агентов и уменьшения повреждающего действия процессов, связанных с воспалением в тканях. Современный подход к применению иммуномодуляторов (ИМД) в ветеринарной практике основан на использовании таких препаратов, которые помимо собственно иммуномодулирующей активности обладают, в частности, противовирусными, антиоксидантными, противовоспалительными, гемостимулирующими и/или иными важными свойствами. В связи с этим, актуальной задачей представляется поиск возможной противовирусной активности у ряда известных ИМД.

Цель исследования: выявить возможную противовирусную активность известного ИМД глутоксима (ГЛТ) при инфицировании линий диплоидных клеток фибробластов человека (ЛДКФЧ) М-8 и М-22 вирусом везикулярного стоматита (ВВС).

Материалы и методы: использовали ВВС (штамм Индиана). Антивирусную активность ГЛТ исследовали: 1) в дозах, рекомендованных для опытов *in vitro* — 1, 4 и 8 мкг/мл; 2) в низких дозах — 0,1, 0,25 и 0,5 мкг/мл. ГЛТ в исследуемых концентрациях вносили в клеточный монослой по профилактической (за 24 ч до заражения вирусом клеток) и лечебной (одновременно с инфицированием ВВС ЛДКФЧ) схемам. Противовирусную активность ГЛТ оценивали по следующим критериям: способность препарата предотвращать развитие вирусного цитопатогенного действия (ЦПД), ингибировать репродукцию ВВС в ЛДКФЧ, наличие вирулицидного действия.

Результаты: показано, что ГЛТ в концентрациях 1, 4, 8 мкг/мл, рекомендованных для опытов *in vitro*, не задерживал развитие специфического вирус-индуцированного ЦПД в клетках. При этом титры вируса в инфицированных клетках в присутствии ГЛТ не отличались от таковых в контрольных ЛДКФЧ, инфицированных ВВС без добавления препарата на всем протяжении эксперимента. Препарат не обладал вирулицидным действием в отношении ВВС. Обработка ЛДКФЧ ГЛТ в концентрациях 0,1, 0,25 и 0,5 мг/мл приводит к значительному (более, чем в 100 раз) подавлению репликации ВВС в ЛДКФЧ М-22 через 24 ч после инфицирования клеток вирусом. Через 40 и 48 ч противовирусный эффект ГЛТ во всех использованных дозах не выявляется. Таким образом, впервые установлено, что ГЛТ обладает противовирусным действием *in vitro*, проявляющимся через 24 ч после заражения.

Ключевые слова: глутоксим, вирус везикулярного стоматита, иммуномодулятор, антивирусное действие, клеточная линия фибробластов, фоспренил, интерферон
Сокращения: ВВС — вирус везикулярного стоматита, ГЛТ — глутоксим, ИЛ — интерлейкин, ИМД — иммуномодулятор, ИФН — интерферон, ЛДКФЧ — линии диплоидных клеток фибробластов человека, ТЦД — тканевая цитопатогенная доза, ФНО — фактор некроза опухоли, ФП — фоспренил, ЦПД — цитопатогенное действие, ЦТ — цитокины.

Введение

Основой новой стратегии лечения инфекционных заболеваний животных является модуляция иммунного ответа организма хозяина для усиления клиренса инфекционных агентов и уменьшения повреждающего действия процессов, связанных с воспалением в тканях. Современный подход к применению ИМД в ветеринарной практике предполагает преимущественное использование таких препаратов, которые помимо собственно иммуномодулирующей активности

обладают, в частности, противовирусными, антиоксидантными, противовоспалительными, гемостимулирующими и/или иными важными свойствами. В связи с этим, актуальной задачей представляется поиск возможной противовирусной активности у ряда известных ИМД.

Цель исследования

Изучить противовирусное действие такого ИМД, как ГЛТ, разрешенного к клиническому применению в качестве противоиного лекарственного средства [1, 2]. В качестве препарата сравнения использовали ФП, который представляет собой ИМД с противовирусным и противовоспалительным действием, широко используемый в ветеринарной практике [9, 11].

Материалы и методы

Вирус. Использовали ВВС, штамм Индиана, полученный из банка вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ВВС пассировали и титровали в ЛДКЧФ М-22 и М-8 и выражали в \lg ТЦД₅₀ [7].

ЛДКЧФ. Опыты проводили на ЛДКЧФ М-22 и М-8 из коллекции клеточных культур ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН».

ИМД. Препарат ГЛТ в виде стерильного, лиофилизированного порошка (ЗАО «Фарма ВАМ», Государственный завод медицинских препаратов ФГУП, Россия). Перед употреблением содержимое флакона растворяли в среде поддержки. Препарат ФП (ЗАО «Микро-плюс», серия №1213) разводили средой №199 на растворе Эрла pH=7,6 до концентрации 100 мкг/мл и наносили на монослой клеток. В качестве положительного контроля использовали коммерческий человеческий лейкоцитарный интерферон (производитель: «Биомед», Пермь, Россия) в дозе 100 МЕ/мл.

Испытание цитотоксического действия и противовирусной активности препаратов проводили на монослойной культуре клеток М-22 и М-8 с использованием 96-луночных планшет (фирмы «Costar», GB), которые инкубировали при 37° С и 5 % CO₂.

Цитотоксическое действие препаратов на клетки определяли однократным внесением в культуру клеток М-22 и М-8: а) формирующую монослой, б) достигшую монослоя (24 ч). Токсичность определяли посредством световой микроскопии по степени изменения морфологии клеточного монослоя и контролировали в течение 96 ч.

Противовирусную активность ГЛТ оценивали по следующим критериям: предотвращение развития вирусного ЦПД, подавление репродукции ВВС в ЛДКЧФ, вирулицидное действие. Статистическую обработку проводили по Фишеру [6].

Результаты

Изучение токсичности ГЛТ в отношении клеток М-22 и М-8. Проведенные исследования показали, что в концентрациях 1, 4 и 8 мкг/мл препарат ГЛТ не замедляет клеточного роста и не вызывает видимых цитопатических изменений монослоя клеток М-22 и М-8. По данным теста с трипановым синим, процент жизнеспособных клеток, инкубированных в течение

96 ч в присутствии различных концентраций препарата ГЛТ, практически не отличался от такового у контрольных клеток. Полученные результаты полностью согласуются с данными о нетоксичности препарата ГЛТ в исследованных концентрациях для культур клеток [12].

Изучение вирулицидного действия ГЛТ. Независимо от использованной в опытах концентрации, после совместной инкубации с тест-вирусом при 37 °С в течение 1 ч в соотношении 1:1, препарат не влиял на внеклеточные вирионы и не снижал титр вируса, по сравнению с аналогичным показателем в контроле у вируса, находившегося в тех же условиях, но не обработанного ГЛТ.

Профилактическая схема применения ГЛТ на модели инфекции, вызванной ВВС in vitro. ГЛТ, внесенный в концентрациях 1, 4 и 8 мкг/мл за 24 ч до заражения не приводил к задержке развития вирусного ЦПД в лунках с множественностью заражения 0,1 – 0,01 – 0,001 ЦПД₅₀/клетку и не снижал титра вируса (табл. 1). Таким образом, ГЛТ не обладал противовирусным действием при его использовании по профилактической схеме.

Выявление противовирусной активности ГЛТ, использованного по лечебной схеме. ЛДКЧФ М-22 или М-8 инокулировали ГЛТ в концентрациях 1, 4, 8 мкг/мл в составе поддерживающей среды одновременно с заражением ВВС. Данные, представленные в таблице 1, показывают, что ГЛТ в данных дозах не подавляет размножение ВВС. Напротив, ФП снижал титр ВВС на 1,75 \lg ТЦД₅₀ по сравнению с контролем. Ежедневное (в течение 3-х суток) визуальное наблюдение за клетками, зараженными ВВС и обработанными ГЛТ, показало, что ГЛТ в указанных дозах не задерживал развитие вирус-индуцированного ЦПД в клетках. При этом титры вируса в инфицированных клетках в присутствии ГЛТ не отличались от таковых в контрольных ЛДКЧФ, инфицированных ВВС без добавления препарата.

1. Противовирусная активность препаратов ГЛТ и ФП в отношении вируса везикулярного стоматита в ЛДКЧФ М-22 и М-8

1. Antiviral activity of GLT and Phosprenyl against vesicular stomatitis virus in M-22 and M-8 cell lines

| Препарат | Профилактическая схема | Лечебная схема |
|--|--|----------------|
| | Титр / снижение титра, \lg ТЦД ₅₀ | |
| ГЛТ, 1 мкг/мл | 4,5 / – | 4,75 / – |
| ГЛТ, 4 мкг/мл | 4,5 / – | 5,00 / – |
| ГЛТ, 8 мкг/мл | 4,5 / – | 4,75 / – |
| ФП, 100 мкг/мл | 3,5 / 1,0 | 3,00 / 1,75 |
| Интерферон, 100 МЕ | 0,00 / 4,5 | 0,00 / 4,75 |
| Контроль вируса, \lg ТЦД ₅₀ | 4,5 | 4,75 |

Выявление антивирусного действия ГЛТ в низких концентрациях. Нас заинтересовал вопрос о возможном противовирусном эффекте ГЛТ при обработке клеток дозами препарата ниже рекомендованных для опытов in vitro [1, 4]. В следующей серии экспериментов клетки

линии М-22 были обработаны ГЛТ в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/мл в составе поддерживающей среды с последующим заражением ВВС (по лечебной схеме). Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что ГЛТ значительно подавляет развитие ЦПД ВВС в ЛДКФЧ: через 24 ч титры ВВС в контроле достигают 3,5 lg ТЦД₅₀, а в клетках, обработанных ГЛТ в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/мл — 1 lg ТЦД₅₀, 1,75 lg ТЦД₅₀ и 1,75 lg ТЦД₅₀, соответственно. Таким образом, ГЛТ в минимальной дозе (0,1 мкг/мл) обладает способностью подавлять размножение ВВС в ЛДКФЧ более чем в 100 раз. Через 40 и 48 ч противовирусный эффект ГЛТ во всех использованных дозах не выявляется (см. табл. 2).

2. Влияние ГЛТ в низких концентрациях на размножение вируса везикулярного стоматита в клетках М-22
2. Effect of GLT in low doses on reproduction of vesicular stomatitis virus in M-22 cells

| Доза ГЛТ, мкг/мл | Титр после заражения / снижение титра, lg ТЦД ₅₀ | | |
|---------------------------------------|---|-------------|------------|
| | через 24 ч | через 40 ч | через 48 ч |
| 0,1 | 1,00 / 2,5 | 4,5 / - | 5,0 / - |
| 0,25 | 1,75 / 1,75 | 4,0 / - | 4,75 / - |
| 0,5 | 1,75 / 1,75 | 3,75 / 0,25 | 4,75 / - |
| Контроль вируса, lg ТЦД ₅₀ | 3,5 | 4,0 | 4,75 |

Обсуждение

ГЛТ является фармакологическим аналогом естественного метаболита — окисленного глутатиона. Это химически синтезированный гексапептид (бис-(гамма-L-глутамил)-L-цистеинил-бис-глицин динатриевая соль), в котором искусственная стабилизация дисульфидной связи позволяет многократно усилить физиологические эффекты, присущие предшественнику — естественному окисленному глутатиону. ГЛТ стимулирует каскадные механизмы фосфатной модификации основных белков сигнал-передающих систем, способствует синтезу цитокинов: ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО, ИФН, индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 [2]. Подобно ФП, ГЛТ оказывает иммуномодулирующее, гемостимулирующее, детоксицирующее, гепатопротекторное и антиоксидантное действие [2, 10, 12]. Препарат также стимулирует кальциевый сигнал в макрофагах [5, 8]. Иммуномодулирующие свойства ГЛТ и способность стимулировать продукцию эндогенных ИФН и других ключевых ЦТ обосновывают проведение исследований по выявлению его возможной антивирусной активности. Однако сведений о его противовирусном эффекте не имеется. Отсутствуют также данные о способности препарата усиливать действие средств противовирусной терапии.

Адекватной моделью для выявления антивирусной активности ИМД и изучения механизмов их действия являются ЛДКФЧ. Фибробласты рассматриваются как потенциально иммунорегуляторные клетки, функционально эквивалентные мезенхимальным стволовым клеткам [13]. ЛДКФЧ и первичные фибробласты широко используются для изучения молекулярных

механизмов иммунопатогенеза вирусных инфекций и противовирусной активности ИМД [14]. ЛДКФЧ обладают способностью продуцировать ИФНы I типа и другие ЦТ; ВВС — ИФН-чувствительный вирус, поэтому использование ВВС-инфекции ЛДКФЧ в качестве модели для выявления возможной антивирусной активности ГЛТ представляется адекватным. Данная модель была успешно использована нами при исследовании противовирусной и интерфероногенной активности различных ИМД, в том числе ФП [3].

В настоящей работе представлены данные о выявлении противовирусной активности ГЛТ при инфицировании ЛДКФЧ М-8 и М-22 вирусом везикулярного стоматита. В серии экспериментов с использованием ГЛТ в дозах 1, 4 и 8 мкг/мл нам не удалось выявить антивирусную активность препарата, использованного как по лечебной, так и по профилактической схеме. Иная картина наблюдается при обработке ЛДКФЧ ГЛТ в концентрациях 0,1; 0,25 и 0,5 мкг/мл. Через 24 ч после инфицирования ЛДКФЧ М-22 ВВС регистрируется значительное (более чем в 100 раз) подавление репликации вируса под воздействием ГЛТ (см. табл. 2).

Обращает на себя внимание тот факт, что в работах по исследованию действия ГЛТ *in vitro* положительные результаты достигались при использовании достаточно высоких доз препарата: 1, 4, 8, 16, 32, 64 мкг/мл и выше [1, 4]. При этом не наблюдалось токсического эффекта ГЛТ при обработке препаратом макрофагов или нейтрофилов [4]. Напротив, мы показали, что ГЛТ в концентрациях 16 мкг/мл и выше проявлял токсичность в отношении ЛДКФЧ, что, по-видимому, объясняется различиями в чувствительности к препарату клеток разного происхождения. В нашей работе впервые показано, что ГЛТ обладает способностью подавлять размножение ВВС в ЛДКФЧ через 24 ч после заражения. Впервые установлено также, что на более поздних сроках (через 40 и 48 ч) после заражения клеток вирусом препарат ГЛТ не только не проявляет антивирусной активности, но и способствует усилению репродукции ВВС в культуре клеток. Поскольку ГЛТ обладает свойствами ИМД, в том числе стимулирует продукцию эндогенных ИФН, логично предположить, что противовирусный эффект препарата в отношении репродукции ВВС в ЛДКФЧ связан с его интерфероногенной активностью. Для проверки данного предположения мы проводим дальнейшие исследования иммуномодулирующих свойств ГЛТ в ЛДКФЧ.

Вывод

Впервые установлено, что ГЛТ обладает противовирусным действием *in vitro*, проявляющимся через 24 ч после заражения.

Конфликт интересов

Авторский коллектив не получал спонсорской помощи от производителей или поставщиков оборудования и расходных материалов, указанных в данной работе.

Библиография

1. Васильева, С.Н. Экспериментальное обоснование использования Глутоксима в качестве средства сопровождения этиотропной терапии генерализованного туберкулеза / С.Н. Васильева: автореф. дис. ... канд. мед. наук (защита 14.03.2007). — СПб.: НИИ фтизиопульмонологии, 2007. — С.22.

- Инструкция по медицинскому применению препарата Глутоксим; Патент RU N 2 498 821 C1. Режим доступа: <http://www.glutoxim.ru>.
- Конюшко, О.И., Экспрессия генов интерферонов в культуре фибробластов человека при воздействии иммуномодуляторов и при вирусной инфекции / О.И. Конюшко, С.В. Ожерелков, Е.В. Хитрина, А.В. Саличев, Т.Н. Кожевникова, А.В. Санин // Молекулярная медицина. — 2016. — Т. 14. — № 5. — С. 43–49.
- Куничан, А.Д. Влияние глутоксима на рост лекарственно-стойчивых микобактерий туберкулеза при его сочетании с противотуберкулезными препаратами второго ряда в культуре легочной ткани мышей / А.Д. Куничан, Г.Б. Соколова, М.И. Перельман // Антибиотики и Химиотерапия. — 2002. — Т. 47. — № 6. — С. 18–21.
- Курилова, Л.С. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата Глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах / Л.С. Курилова, Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г. // Цитология. — 2008. — Т. 50. — №5. — С. 452–461.
- Лакин, Г.Ф. Биометрия. — М: Высшая школа, 1990. — 352 с.
- Леннет, Э.Н. Лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний / Э.Н. Леннет, Н. Шмидт. — М.: Медицина, 1974. — С. 42–46.
- Naumova, A.A. Sigma-1 receptors are involved in modulation of Ca^{2+} responses induced by glutoxim and molixan in macrophages / A.A. Naumova, Z.I. Krutetskaya, L.S. Milenina, A.V. Melnitskaya, N.I. Krutetskaya, S.N. Butov, V.G. Antonov // The FEBS Journal. — 2017. — Vol. 284. — suppl. 1. — pp. 228–229.
- Санин, А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных / А.В. Санин, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин // Ветеринария и кормление. — 2017. — № 3. — С. 95–97.
- Санин, А.В. Изучение антиоксидантных свойств Фоспренила в различных биологических тест-системах / А.В. Санин, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, Т.Н. Кожевникова, В.Ю. Санина, А.Д. Агафонова // Российский ветеринарный журнал. — 2017 — № 10 — С. 28–31.
- Санин, А.В. Исследование противовоспалительной активности фоспренила в эксперименте / А.В. Санин, С.А. Суханова, О.В. Проскурина, Н.М. Митрохин, И.В. Ганшина, Г.Ф. Судьина, В.Ю. Санина, А.А. Виденина, Т.Н. Кожевникова, А.А. Санин, С.В. Ожерелков, А.В. Саличев, А.В. Пронин, А.Н. Наровлянский // Российский ветеринарный журнал, МДЖ. — 2011. — № 4. — С. 17–20.
- Easton, D.M. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives / D.M. Easton, A. Nijnik, M.L. Mayer, R.E.W. Hancock // Trends in Biotechnology. — 2009. — Vol. 27. — No. 10. — pp. 582–590.
- Haniffa, M. Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells / M. Haniffa, AXiao-nong Wang, U. Holtick, R. Michelle, J.D. Isaacs, A.M. Dickinson, M.U.C. Hilkens, M.P. Collin // The Journal of Immunology. — 2007. — No. 179. — pp. 1595–1604.
- Fang Li. Antiviral Effect of IDO in Mouse Fibroblast Cells During Influenza Virus Infection / Fang Li Håkan Karlsson // Viral Immunology. — 2017. — No. 30 (7) — pp. 542–544.
- Kunichan A.D., Sokolova G.B., Perel'man M.I. Vliyanie glutoksima na rost lekarstvennoustoichivyh mikobakterij tuberkulyoza pri ego sochetanii s protivotuberkuleznymi preparatami vtorogo ryada v kul'ture lyogochnoj tkani myshej, *Antibiotiki i Himioterapiya*, 2002, Vol. 47, No. 6, pp. 18–21.
- Kurilova L.S., Kruteckaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G., Vliyanie oksislennogo glutatiона i ego farmakologicheskogo analoga preparata Glutoksim na vnutrikletochnyu koncentraciyu Ca^{2+} v makrofagah, *Citologiya*, 2008, Vol. 50, No. 5, pp. 452–461.
- Lakin G.F., *Biometriya*, Moscow, 1990, 352 pp.
- Lennet E.H., Shmidt N., *Laboratornaya diagnostika virusnyh i rickettsioznyh zabolevanij (Laboratory diagnostics of the virus and rickettsial diseases)*, Moscow, Medicina, 1974, pp. 42–46.
- Naumova A.A., Z.I. Krutetskaya, L.S. Milenina, A.V. Melnitskaya, N.I. Krutetskaya, S.N. Butov, V.G. Antonov, Sigma-1 receptors are involved in modulation of Ca^{2+} responses induced by glutoxim and molixan in macrophages, *The FEBS Journal*, 2017, Vol. 284, suppl. 1, pp. 228–229.
- Sanin A.V., Narovlyanskij A.N., Pronin A.V., Primenenie immunomodulyatorov pri virusnyh zabolevaniyah melkih domashnih zhivotnyh, *Veterinariya i kormlenie*, 2017, No. 3, pp. 95–97.
- Sanin A.V., Narovlyanskij A.N., Pronin A.V., Kozhevnikova T.N., Sanina V.Yu., Agafonova A.D., Izuchenie antioksidantnyh svoystv Fosprenila v razlichnyh biologicheskikh test-sistemah, *Russian veterinary journal*, 2017, No. 10, pp. 28–31.
- Sanin A.V., S.A. Suhanova, O.V. Proskurina, N.M. Mitrohin, Ganshina I.V., Sud'ina G.F., Sanina V.Yu., Videnina A.A., Kozhevnikova T.N., Sanin A.A., Ozherelkov S.V., Salichev A.V., Pronin A.V., Narovlyanskij A.N., Issledovanie protivovospalitel'noj aktivnosti fosprenila v ehksperimente, *Russian veterinary journal*, MDZH, 2011, No. 4, pp. 17–20.
- Easton D.M., Nijnik A., Mayer M.L., Hancock R.E.W., Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives, *Trends in Biotechnology*, 2009, Vol. 27, No. 10, pp. 582–590.
- Haniffa Muzlifan, Wang AXiao-nong, Holtick U., Michelle R., Isaacs J.D., Dickinson A.M., Hilkens M.U.C., Collin M.P., Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells, *The Journal of Immunology*, 2007, No. 179, pp. 1595–1604.
- Fang Li, Håkan Karlsson, Antiviral Effect of IDO in Mouse Fibroblast Cells During Influenza Virus Infection, *Viral Immunology*, 2017, No. 30 (7), pp. 542–544.

References

- Vasil'eva S.N., *Ehksperimental'noe obosnovanie ispol'zovaniya Glutoksima v kachestve sredstva soprovozhdeniya ehliotropnoj terapii generalizovannogo tuberkulyoza (Experimental substantiation of the use of Glutoksim as the means of tracking the etiotropic therapy of general tuberculosis)*, Extended abstract of candidate's thesis in Med. Sc. (defended 14.03.2007), S-Peterburg, NII ftziopul'manologii, 2007, 22 p.
- Instrukciya po medicinskomu primeneniyu preparata Glutoksim (Instruction on the medical application of preparation Glutoksim)*; Patent RU N 2 498 821 C1, available at <http://www.glutoxim.ru>.
- Konyushko O.I., Ozherelkov S.V., Hitrina E.V., Salichev A.V., Kozhevnikova T.N., Sanin A.V., Ehkspressiya genov interferonov v kul'ture fibroblastov cheloveka pri vozdeystvii immunomodulyatorov i pri virusnoj infekcii, *Molekulyarnaya medicina*, 2016, Vol. 14, No. 5, pp. 43–49.

ABSTRACT

S.V. Ozherelkov¹, D.Sc. in Biology, leading researcher of the antiviral medicines lab., **T.N. Kozhevnikova**², Ph.D. in Medicine, researcher of the cellular immunity lab., **A.V. Sanin**², D.Sc. in biology, head of the cellular immunity lab., **O.I. Konyushko**¹, Ph.D. in Biology, leading researcher of the antiviral medicines lab., **M.F. Vorovich**¹, Ph.D. in Biology, deputy director for the production, **A.L. Ivanova**¹, Ph.D. in Chemistry, the microbiologist.

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune- and Biological products of RAS F (8/1, village of Institute of poliomyelitis, Moscow settlement, Moscow, 108819). oSciences

²Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (18, Gamaleya str., Moscow, 123098)

Study of Glutoxim antiviral activity in the fibroblast cell line infected with vesicular stomatitis virus. New strategy for the treatment of animal infectious diseases is based upon the modulation of the host immune response in order to enhance the clearance of infectious agents and reduce the damaging effects of inflammation in the tissues. The modern approach to the use of immunomodulators (IMD) in veterinary practice consists in the usage of such drugs, which are not only immunomodulating, but also have antiviral, antioxidant, anti-inflammatory, hemostimulating and/or other important properties. **The aim of the study** was to identify possible antiviral activity of known IMD Glutoxim (GLT) during infection of diploid fibroblast cell lines M-8 and M-22 with vesicular stomatitis virus (VSV).

Materials and methods: VSV, strain Indiana, was used. Antiviral activity of GLT investigated: 1) at doses recommended for experiments in vitro: 1, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$; 2) at low doses: 0, 1; 0,25 and 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Исследование антивирусной активности Глутоксима при инфицировании клеточной линии фибробластов вирусом везикулярного стоматита

GLT was added to the cell monolayer according to preventive (for 24 hours prior to VSV infection of cells) and treatment (unanimous with VSV infection) protocols. The antiviral activity of GLT was assessed by the following criteria: ability of the drug to prevent the development of virus cytopathic action, to inhibit the reproduction of VSV, and by expressing virucidal action.

Results: GLT in doses recommended for in vitro experiments (1, 4, 8 µg/ml) did not delay the development of a specific virus-induced cytopathic action. The VSV titers in infected cells in the presence of GLT did not differ from those in the control cell lines infected with VSV without the addition of GLT. The latter had no virucidal effect against

the VSV. Inoculation of GLT into the cell culture at low doses of 0.1, 0.25 and 0.5 mg/ml led to a significant (more than 100-fold) inhibition of VSV replication 24 hours after infection of cells. At later stages, 40 and 48 hours following infection, the antiviral effect of GLT was not detected. Thus, we established that GLT possesses antiviral effect in vitro, which is manifested 24 hours following infection of diploid fibroblast cell lines with VSV.





Keywords: Glutoxim, vesicular stomatitis virus, immunomodulator, antiviral effect, fibroblast cell line, phosprenyl, interferon.

DOI:10.32416/article_5c050ac0894b34.21127720

ГАМАПРЕН



Лечение и профилактика вирусных инфекций!

-  Эффективен на любой стадии заболевания
-  Обладает прямой противовирусной активностью
-  Подтвержденная безопасность
-  Удобство применения. Возможно выпаивание

GAMAPREN.RU



Одобрено учеными ФГБУ
"НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России



ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ