

DOI: <https://doi.org/10.17816/C1698401>

EDN: QZIJXA



Противовирусная активность неомицина в отношении респираторно-синцитиального вируса у лабораторных животных: поисковое экспериментальное исследование

Е.А. Романовская-Романько, М.А. Плотникова, А.А. Пулькина, А.А. Мужикян, В.А. Олейник, М.А. Стукова

Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) является одним из основных клинически значимых респираторных патогенов, поражающих преимущественно детей первых месяцев жизни и пожилых людей. В связи с тем, что арсенал средств по борьбе с РСВ-инфекцией в настоящее время весьма ограничен, разработка новых эффективных противовирусных препаратов остаётся важным направлением научных исследований.

Цель исследования. Изучить противовирусную активность неомицина в отношении РСВ у лабораторных животных.

Методы. В работе использованы мыши BALB/c и морские свинки. Для оценки экспрессии паттерн-распознающих внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот и ключевых противовирусных интерферон-стимулируемых генов в респираторном тракте заражённых животных, получавших неомицин на начальных стадиях РСВ-инфекции, использовали молекулярно-генетические методы. Определение антигенной нагрузки заражающего вируса в респираторном тракте животных проводили методами вирусовыделения на культуре клеток, иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции. Для оценки выраженности патологических изменений в тканях респираторного тракта в процессе РСВ-инфекции использовали гистологический метод.

Результаты. Показано, что интраназальное введение неомицина в лечебно-профилактической схеме приводит к значительному увеличению экспрессии внутриклеточных рецепторов MDA5, TLR9 и RIG-I и интерферон-стимулируемых генов с противовирусным потенциалом (OAS1, IRF7 и Mx2) у мышей. На модели экспериментальной РСВ-инфекции у морских свинок использование неомицина приводило к снижению репликации вируса и уменьшало выраженность патологических изменений в нижних дыхательных путях заражённых животных.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют противовирусный потенциал неомицина в отношении РСВ. Интраназальное применение неомицина в лечебно-профилактической схеме приводило к усилению экспрессии внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот и ключевых интерферон-стимулируемых генов, активируя врождённую иммунную систему организма экспериментальных животных.

Ключевые слова: неомицин; противовирусная активность; респираторно-синцитиальный вирус, интерферон-стимулируемые гены; Toll-подобные рецепторы.

Как цитировать:

Романовская-Романько Е.А., Плотникова М.А., Пулькина А.А., Мужикян А.А., Олейник В.А., Стукова М.А. Противовирусная активность неомицина в отношении респираторно-синцитиального вируса у лабораторных животных: поисковое экспериментальное исследование // Цитокины и воспаление. 2025. Т. 22, № 4. С. 174–183. DOI: 10.17816/C1698401 EDN: QZIJXA

DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci698401>

EDN: QZIJXA

Antiviral Activity of Neomycin Against Respiratory Syncytial Virus in Laboratory Animals: An Exploratory Experimental Study

Ekaterina A. Romanovskaya–Romanko, Marina A. Plotnikova, Anastasia A. Pulkina, Arman A. Muzhikyan, Veronika A. Oleinik, Marina A. Stukova

Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Respiratory syncytial virus is a major, clinically relevant respiratory pathogen that primarily affects infants and older patients. The development of new, effective antiviral agents is an important research area because there are currently few tools available to control respiratory syncytial virus infection.

AIM: The study aimed to assess the antiviral activity of neomycin against respiratory syncytial virus in laboratory animals.

METHODS: The study involved BALB/c mice and guinea pigs. Molecular genetic techniques were used to evaluate the expression of intracellular nucleic acid sensors and key interferon-stimulated genes in the respiratory tracts of animals infected with respiratory syncytial virus and treated with neomycin at the early stages of infection. Viral load in animal respiratory tracts was determined using virus isolation in cell culture, enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. Pathological changes in the respiratory tract tissues were histologically assessed during respiratory syncytial virus infection.

RESULTS: Prophylactic and therapeutic administration of intranasal neomycin substantially upregulate the expression of intracellular receptors (MDA5, TLR9, and RIG-I) and antiviral interferon-stimulated genes (OAS1, IRF7, and Mx2) in mice. Neomycin treatment reduced viral replication and mitigated pathological changes in the lower respiratory tracts in a guinea pig model of respiratory syncytial virus infection.

CONCLUSION: These findings demonstrate the antiviral potential of neomycin against respiratory syncytial virus. Prophylactic and therapeutic administration of intranasal neomycin upregulated the expression of intracellular nucleic acid sensors and key interferon-stimulated genes, thereby activating the innate immune system of the experimental animals.

Keywords: neomycin; antiviral agents; respiratory syncytial virus, interferon-stimulated genes; Toll-like receptors.

To cite this article:

Romanovskaya–Romanko EA, Plotnikova MA, Pulkina AA, Muzhikyan AA, Oleinik VA, Stukova MA. Antiviral Activity of Neomycin Against Respiratory Syncytial Virus in Laboratory Animals: An Exploratory Experimental Study. *Cytokines and Inflammation*. 2025;22(4):174–183. DOI: 10.17816/Ci698401 EDN: QZIJXA

ОБОСНОВАНИЕ

Респираторные инфекции являются существенной проблемой здравоохранения, вызывая широкий спектр заболеваний со значительным уровнем заболеваемости и смертности. Несмотря на достижения в области диагностики, лечения и профилактики острых респираторных инфекций (ОРИ), имеется высокая потребность в простых и недорогих лекарственных препаратах местного действия, запускающих противовирусный врождённый иммунитет непосредственно в слизистой оболочке верхних дыхательных путей на ранних стадиях инфекции.

Экономически обоснованным подходом к поиску новых средств защиты от ОРИ является получение экспериментальных данных, дающих основание для расширения показаний к применению препаратов, которые уже широко используются в практике здравоохранения.

Неомицин, антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов, входит в состав зарегистрированных в РФ лекарственных препаратов для наружного применения, которые предназначены для лечения инфекционных воспалительных заболеваний слизистых оболочек, без уточнения этиологии. Антибиотики, как правило, считаются неэффективными в лечении и профилактике вирусных инфекций. Однако недавние исследования показали, что неомицин обладает противовирусным действием в отношении вируса герпеса II типа при терапевтическом применении, вируса Зика при профилактическом применении [1]. В 2024 году были опубликованы результаты доклинических исследований, показывающие снижение титра вируса гриппа А и SARS-CoV-2 в носгах и лёгких животных, которым интраназально вводили неомицин [2]. Кроме того, терапия неомицином значительно снижала передачу SARS-CoV-2 здоровым животным, находящимся в контакте с инфицированными. Защитное действие неомицина и механизм действия препарата в отношении респираторно-синциального вируса (РСВ) до настоящего времени не изучены.

Паттерн-распознающие рецепторы (PRRs), такие как NOD-подобные рецепторы, RIG-I-подобные рецепторы (RLR) и Toll-подобные рецепторы (TLR), распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) и запускают врождённый иммунный ответ, стимулируя выработку интерферонов. Механизм действия неомицина связан с модуляцией иммунного ответа организма-хозяина посредством активации интерферон-стимулируемых генов (ISGs) и привлечения в сайт инфекции антиген-презентирующих дендритных клеток и их активации по сигнальному пути TLR3–TRIF–IRF3/7 [1]. Программа согласованной транскрипционной индукции интерферон-стимулированных генов (ISGs) направлена на ограничение различных стадий жизненного цикла вирусов и способна обеспечить надёжную линию защиты от вторжения вирусов. У людей, инфицированных респираторными вирусами, неспособность вызвать своевременный и эффективный

ответ ISGs ассоциируется с задержкой клиренса вируса и развитием заболевания с более тяжёлым течением.

В работе проведена оценка эффективности интраназального применения неомицина в лечебно-профилактической схеме при экспериментальной РСВ-инфекции у лабораторных животных и влияния неомицина на активацию экспрессии внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот и ключевых интерферон-стимулируемых генов, продукты которых активируют врождённую иммунную систему организма.

ЦЕЛЬ

Изучить противовирусную активность неомицина в отношении РСВ у мышей и морских свинок при интраназальном введении.

МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Представленное поисковое экспериментальное исследование выполнено в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в период с июня по ноябрь 2025 г. Все эксперименты с участием лабораторных животных были одобрены комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева (протокол № 17 от 10 июля 2025 г.). Исследование выполняли в параллельных группах лабораторных животных (мышей линии BALB/c и морских свинок). Формирование групп проводили методом простой рандомизации. Подробные схемы исследования приведены в соответствующих пунктах раздела «Результаты».

Культура клеток и заражающий вирус

В работе использовали культуру клеток Hep-2 (ATCC #CCL-23), которую культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («Биолот», Россия). РСВ штамм A2 серотипа А (РСВ A2, IRR, #FR294) накапливали в клетках HEp-2. Инфекционную активность РСВ определяли методом образования бляшек под полужидким агарозным покрытием. Окрашивание проводили моноклональными мышинными антителами 4F2 (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России), специфичными к РСВ, и мечеными пероксидазой хрена конъюгатами [3].

Животные

Мыши BALB/c, самки, весом 16–18 г ($n=30$), были приобретены в Институте биоорганической химии им. Шемякина–Овчинникова Российской академии наук (Питомник лабораторных животных, Пушкино, Россия). Морские свинки, самки, весом 200–250 г ($n=18$), получены из ФГБУ «Питомник лабораторных животных “Рапполово”» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» с соответствующими ветеринарными свидетельствами. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с положениями Директивы 2010/63/ЕС,

федеральными руководящими принципами и институциональной политикой ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Заражение животных

Заражение мышей BALB/c и морских свинок выполняли под лёгкой эфирной анестезией с использованием механического дозатора. Мышам вводили интраназально 50 мкл заражающего вируса РСВ А2 в дозе 5,8 lg БОЕ. Морским свинкам вводили 300 мкл вируса РСВ А2 в дозе 7,0 lg БОЕ.

Введение неомицина

Неомицин сульфат («Агрофарм», Россия) растворяли в стерильной воде в концентрации 80 мг/мл и использовали немедленно, не храня. Неомицин вводили мышам под лёгким эфирным наркозом в дозе 2,0 мг, объёме 20 мкл. Морским свинкам вводили препарат без наркоза в дозе 5,0 мг, в объёме 100 мкл. В качестве контрольного вещества использовали PBS.

Определение инфекционных титров респираторно-синцитиального вируса

В тканях лёгких мышей BALB/c и носовых смывах морских свинок определяли инфекционные титры вируса методом образования бляшек на культуре клеток HEp-2 под полужидким агаровым покрытием. Для этого мышей умерщвляли на указанные сроки, цельные лёгкие помещали в пробирки с 1 мл PBS и гомогенизировали с помощью Tissue Lyser II (Qiagen), осветляли центрифугированием и титровали на культуре клеток. У морских свинок носовые смывы собирали в указанные сроки, промывая носовую полость 1 мл PBS; полученный смыв использовали для титрования на культуре клеток.

Оценка вирусной нагрузки методом иммуноферментного анализа

Уровень РСВ антигенов в гомогенатах лёгких мышей определяли на 1-е и 4-е сутки после заражения. Для этого на иммунологические планшеты высокой сорбции (Greiner) сорбировали РСВ-специфические антитела 11G4 (ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России), после чего в планшеты вносили гомогенаты лёгких мышей в разведении 1:10, связавшийся антиген выявляли биотинилированными 11G4 с последующей инкубацией с конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена и проявляли с использованием ТМБ. После проявления конъюгата ОП измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific) и вычисляли как разницу ОП₄₅₀₋₆₂₀.

Оценка вирусной нагрузки методом полимеразной цепной реакции

Оценку уровня вирусной РНК в гомогенатах лёгких на 1-е и 4-е сутки после заражения проводили методом

ПЦР с обратной транскрипцией с использованием набора БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (ООО «Биолабмикс», Россия), а также специфических праймеров и зонда:

- (q-RSV(a/b)-F AACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATC,
 - q-RSV(a/b)-R CGATTTTATTGGATGCTGTACATTT и
 - q-RSV(a/b)-P (FAM)-TGCCATAGCATGACACAATGGCTCCT-(BHQ1)),
- добавленных в реакционную смесь до конечной концентрации 0,5 мкМ. РНК, выделенную из гомогенатов лёгких, вносили в реакционную смесь в объёме 10 мкл. ПЦР проводили с использованием амплификатора IanLong (Китай) по следующему термальному профилю: 45 °C — 60 мин, 95 °C — 5 мин, далее 40 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 10 с, 72 °C — 20 с. Детекцию проводили при температуре отжига по каналу FAM.

Гистологический анализ

Состояние лёгких животных после заражения РСВ оценивали по результатам гистологического анализа срезов, окрашенных гематоксилином и эозином по стандартной методике. Образцы тканей были исследованы с помощью светового микроскопа Zeiss AxioScope 2 plus при увеличении $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$ раз. Полуколичественный анализ проводили визуально, оценивая степень поражения ткани лёгких на срезе, а также поражения отдельных функциональных элементов ткани. По шкале от 0 до 5 оценивали повреждение основных морфологических структур, острое воспаление и лимфоцитарную инфильтрацию в бронхиолах, сосудах, интерстиции и альвеолах. Наличие и выраженность характерных патологических изменений ткани лёгких оценивали также по шкале от 0 до 5, учитывая такие показатели, как гипертрофия и гиперплазия эпителия, наличие псевдоплоскоклеточного эпителия и эпителиального некроза. Воспалительную реакцию оценивали по степени развития бронхита, бронхиолита, перибронхита, перибронхиолита, интерстициальной инфильтрации, альвеолита, васкулита и периваскулита.

Оценка экспрессии

Выделение РНК. Общая РНК из тканей лёгких мышей была выделена с использованием реагента ExtractRNA (Evrogen, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Сразу после эвтаназии образцы тканей лёгких помещали в пробирки с раствором для фиксации интактной РНК (Evrogen, Россия), инкубировали в течение 1-го часа при комнатной температуре и хранили при температуре -20 °C не более недели до извлечения РНК. Выделение РНК проводили в соответствии с инструкциями производителя, а затем анализировали концентрацию и целостность РНК с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США). Образцы РНК хранили при температуре -80 °C.

Обратная транскрипция. РНК, выделенную из тканей мыши, предварительно обрабатывали ДНКазой, не содержащей РНКазы RQ1 (Promega, США).

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 1 мкг РНК, 0,5 мкг праймеров oligo-dT16 (DNA synthesis, Россия) и набора RNAscribe RT (BioLabMix, Россия). Комплементарный синтез ДНК проводили при 50 °С в течение 50 мин. Фермент инактивировали при 80 °С в течение 5 мин. Продукты комплементарной ДНК (кДНК) разводили (1:2) и хранили при –20 °С до дальнейшего использования в ПЦР.

ПЦР-анализ. ПЦР-анализы в режиме реального времени проводили с использованием ПЦР-цикла GenTier 96E (IanLong, Китай). Мультиплексный ПЦР-анализ проводили в конечных реакционных объёмах 25 мкл, содержащих 12,5 мкл смеси 2× BioMaster HS-ПЦР (BioLabMix, Россия) и 5 мкл кДНК. Реакционная смесь содержала 300 нМ каждого праймера и 200 нМ зонда TaqMan (конечные концентрации). Условия проведения ПЦР составляли 95 °С в течение 5 мин, за которыми следовало 40 циклов амплификации (95 °С в течение 10 с, 58 °С в течение 10 с и 72 °С в течение 10 с). Использованы следующие последовательности праймеров и зондов, разработанных нами ранее для оценки экспрессии: TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5, Mx2, IRF7 и OAS1 [4, 5].

Значения Ct нормализованы по отношению к нескольким генам «домашнего хозяйства» у мышей (среднее значение Hprt1, GAPDH, Ubc и Rplp0) или GAPDH в клетках человека, а затем сравнивали с биологическим контролем (необработанные мыши или клетки) с использованием метода $\Delta\Delta Ct$. Кратное выражение было рассчитано в предположении удвоения эффективности (2) за цикл (кратное выражение = $2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Этическая экспертиза

Все эксперименты с участием лабораторных животных были одобрены комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева (протокол № 17 от 10 июля 2025 г.).

Статистический анализ

Для статистического анализа использовали программное обеспечение GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения (SD) или стандартной ошибки среднего значения (SEM), как указано. Группы сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста множественного сравнения Тьюки или непараметрического теста Краскела–Уоллиса, как указано в подписях к рисункам. Различия считали значимыми при уровне $p < 0,05$. В каждом конкретном случае в разделе «Результаты» указывали фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Противовирусная активность неомидина при интраназальном введении мышам BALB/c в ходе экспериментальной инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом

На 1-м этапе мы оценили влияние интраназального введения неомидина на экспрессию внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот у незаражённых и заражённых мышей. Мышам линии BALB/c интраназально вводили 2,0 мг неомидина в лечебно-профилактической схеме двукратно: за 24 ч до и через 4 ч после экспериментального заражения РСВ штаммом A2. Через 1, 4 и 6 дней после последнего введения препарата у животных оценивали экспрессию в тканях лёгких Toll-подобных рецепторов (TLRs), расположенных на эндосомальных мембранах клеток TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, и внутриклеточных сенсоров RIG-I и MDA5, играющих ключевую роль в индукции врождённого иммунного ответа на вирусные патогены, и экспрессию интерферон-стимулируемых генов *Mx2*, *IRF7* и *OAS1* (рис. 1, а).

Показано, что интраназальное введение неомидина РСВ-инфицированным мышам приводило к увеличению экспрессии паттерн-распознающих внутриклеточных рецепторов TLR3, TLR7, TLR9, MDA5 и RIG-I, участвующих в активации системы врождённого иммунитета в лёгочной ткани. Повышение значений относительной экспрессии этих генов в группе заражённых животных, получавших неомидин, по сравнению с заражёнными животными, получавшими PBS, наблюдали на 1-й день после заражения. Статистически значимое увеличение экспрессии показано для TLR9 и MDA5. К 4-му дню уровень экспрессии TLR3, TLR7, TLR9, MDA5 и RIG-I во всех экспериментальных группах снижался до базовых значений (рис. 1, б).

Анализ активации экспрессии основных противовирусных ISGs в тканях лёгких заражённых мышей, показал, что РСВ ожидаемо активировал экспрессию таких интерферон-стимулируемых генов, как *Mx2*, *IRF7* и *OAS1*. Активация экспрессии носила кратковременный характер, максимальные значения экспрессии этих генов наблюдали через 1 день после заражения с последующим снижением к 4-му дню инфекции. В группе мышей, получивших неомидин, отмечали повышенный уровень относительной экспрессии интерферон-стимулируемых генов по сравнению с заражёнными животными, не получавшими неомидин (рис. 1, с).

У заражённых животных, получавших неомидин или эквивалентный объём буферного раствора, через 1 и 4 дня после экспериментального заражения была определена вирусная нагрузка в лёгких методами иммуноферментного анализа, ПЦР и вирусовыделения (рис. 1, д). Показано, что, несмотря на выраженную активацию внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот и экспрессию интерферон-стимулируемых генов, неомидин

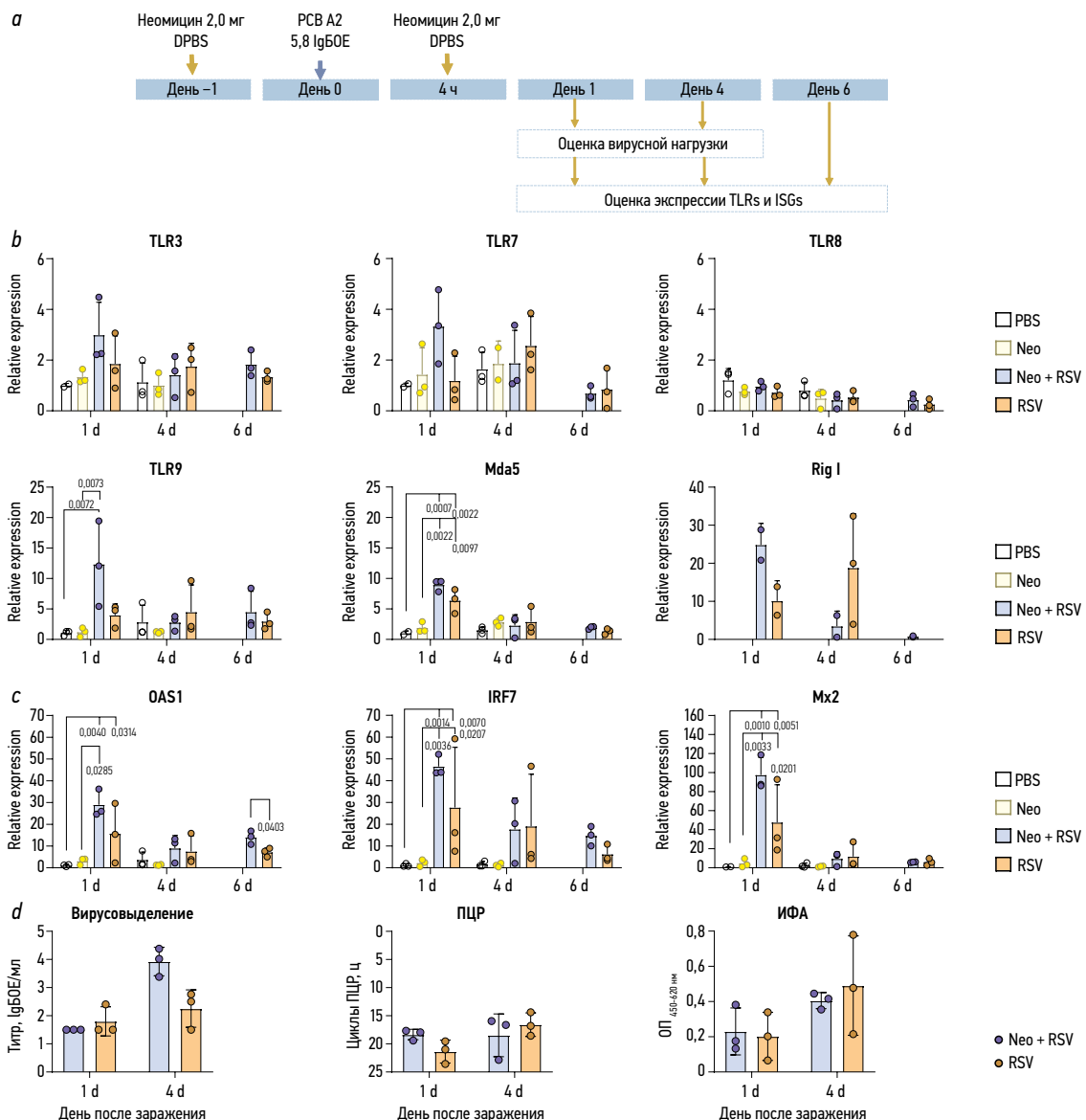


Рис. 1. Противовирусная активность неомидина при интраназальном введении мышам BALB/c в ходе экспериментальной респираторно-синцитиальной вирусной инфекции. *a* — дизайн эксперимента. Мыши линии BALB/c получали интраназально неомидин ($n=9$) (Neo + RSV) в дозе 2,0 мг/особь в объёме 25 мкл двукратно: за 24 ч до экспериментального заражения респираторно-синцитиальным вирусным штаммом A2 (5,5 lgBOE) и через 4 ч после заражения. Контрольная группа заражённых животных (RSV) получала эквивалентный объём PBS. Две группы незаражённых животных получали либо неомидин (Neo), либо буферный раствор (PBS). Через 1, 4 и 6 дней после заражения у трёх животных из каждой группы были собраны ткани лёгких для оценки экспрессии анализируемых генов; *b* — экспрессия внутриклеточных сенсоров нуклеиновых кислот у мышей, получавших неомидин интраназально в лечебно-профилактической схеме; *c* — экспрессия ISGs: Mx2, IRF7 и OAS1 в лёгких заражённых респираторно-синцитиальным вирусом мышей, получавших интраназально неомидин. Относительная экспрессия матричной РНК (мРНК) представлена в виде средних значений для группы (столбики) и индивидуальных значений для каждого животного (точки). Для оценки статистической значимости различий в нормализованных значениях ΔCt использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Тьюки — для множественных сравнений; *d* — оценка вирусной нагрузки в тканях лёгких заражённых мышей, получавших неомидин интраназально, методами вирусыведения, полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа. Столбики обозначают среднее значение показателя для группы \pm SD, точки — индивидуальные значения показателя для каждого животного. Для оценки статистической значимости различий среднegrупповых значений использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса. ПЦР — полимеразная цепная реакция; ИФА — иммуноферментный анализ.

Fig. 1. Antiviral activity of intranasal neomycin in BALB/c mice during experimental respiratory syncytial virus infection. *a*, Experimental design. BALB/c mice (Neo + RSV; $n = 9$) received intranasal neomycin at 2.0 mg per mouse (25 μ L) twice: 24 hours before and 4 hours after experimental challenge with respiratory syncytial virus strain A2 (5.5 log PFU). The control group of infected animals received an equivalent volume of phosphate-buffered saline (PBS). Two groups of uninfected animals received either neomycin (Neo) or phosphate-buffered saline (PBS). Lung tissues were collected from three animals per group on days 1, 4, and 6 post-challenge to assess the expression of the target genes; *b*, expression of intracellular nucleic acid sensors in mice receiving intranasal neomycin in a prophylactic and therapeutic regimen; *c*, expression of ISGs (Mx2, IRF7, and OAS1) in the lungs of respiratory syncytial virus-infected mice receiving intranasal neomycin. The relative messenger ribonucleic acid (mRNA) expression is shown as group means (bars) and individual values for each animal (dots). Significance of differences in normalized ΔCt values was assessed using one-way analysis of variance followed by the Tukey Test for multiple comparisons; *d*, Assessment of viral load in the lung tissues of infected mice receiving intranasal neomycin via virus isolation, polymerase chain reaction, and enzyme-linked immunosorbent assay. The bars represent group means \pm standard deviation; the dots represent individual values for each animal. The non-parametric Kruskal–Wallis test was used to assess the significance of differences in mean group values.

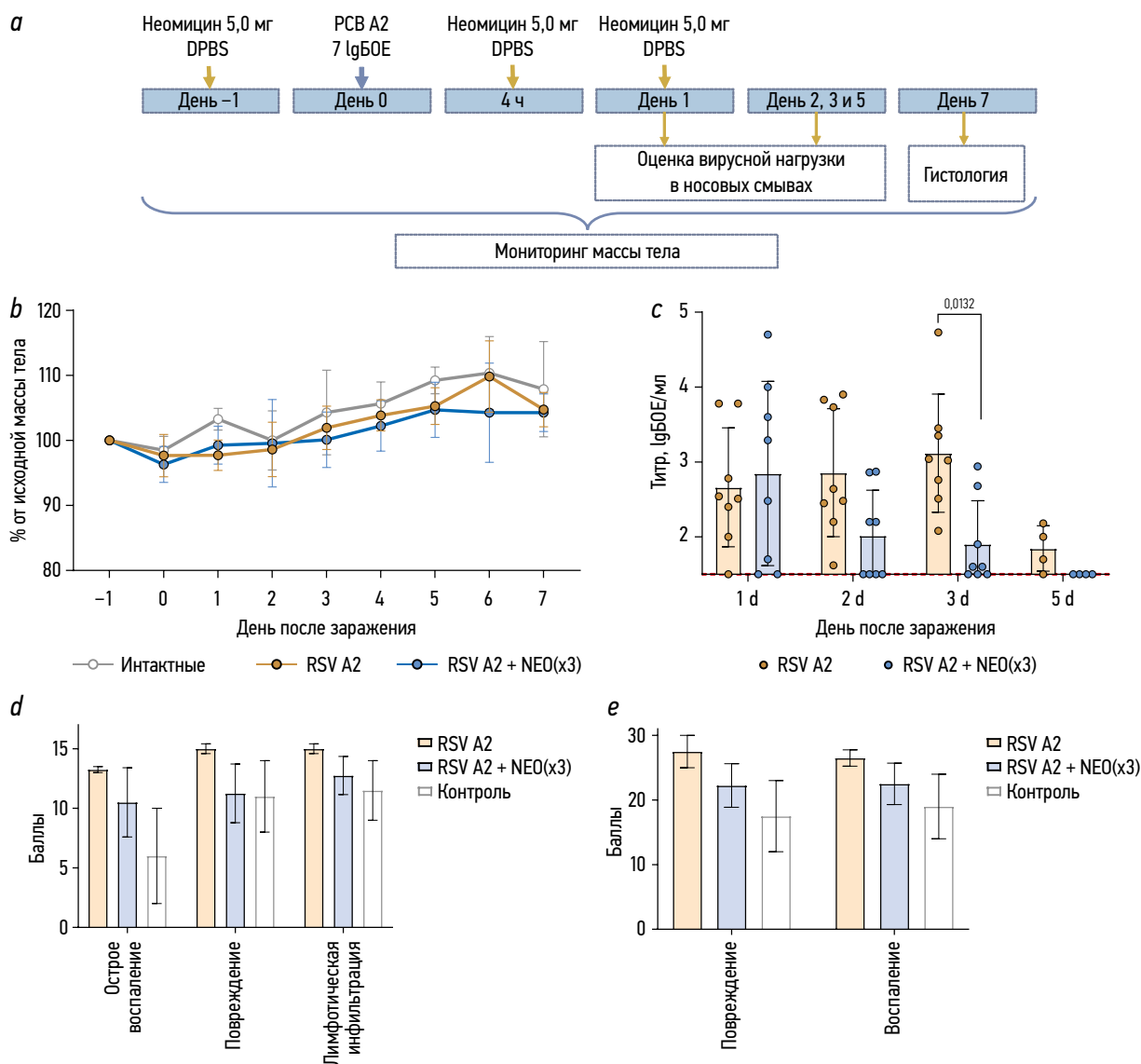


Рис. 2. Влияние интраназального введения неомицина на течение респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у морских свинок. *a* — схема эксперимента. Морские свинки получали интраназально неомицин ($n=8$) (или PBS, $n=8$) в дозе 5,0 мг/особь в объёме 100 мкл трёхкратно: за 24 ч до экспериментального заражения респираторно-синцитиальным вирусным штаммом А2 (7,0 lgБОЕ), а также через 4 и 24 ч после заражения. Носовые смывы для определения вирусной нагрузки у экспериментальных животных собирали на 1–3-й и 5-й дни. В течение 7 дней у животных оценивали массу тела; *b* — динамика массы тела экспериментальных животных; *c* — вирусыведение респираторно-синцитиального вируса из носовых смывов экспериментальных животных. Столбики обозначают среднее значение показателя для группы \pm SD, точки — индивидуальные значения показателя для каждого животного. Статистический анализ выполнен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, тест Шидака применяли для множественного сравнения; *d* — выраженность патологии по показателям: поражение основных морфологических структур тканей лёгкого, острого воспаления и инфильтрации лимфоцитов; *e* — полуколичественная оценка степени выраженности поражения лёгочного эпителия и воспалительной реакции в лёгких морских свинок, получавших неомицин на фоне экспериментального заражения респираторно-синцитиальным вирусом, по результатам гистологического исследования. Столбики обозначают среднее значение показателя для группы \pm SEM. Статистический анализ выполнен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, тест Тьюки применяли для множественного сравнения. RSV A2 — животные, заражённые респираторно-синцитиальным вирусом, не получавшие неомицин; RSV A2 + NEO(x3) — животные, заражённые респираторно-синцитиальным вирусом, получавшие неомицин трёхкратно. Контроль ($n=2$) — животные, получавшие DPBS, были использованы для регистрации фоновых показателей.

Fig. 2. Effects of intranasal neomycin on respiratory syncytial virus infection in guinea pigs. *a*, Design of the experiment. Guinea pigs received intranasal neomycin ($n = 8$) or phosphate-buffered saline ($n = 8$) at a dose of 5.0 mg per animal (100 μ L) three times: 24 hours before, and 4 hours and 24 hours after experimental challenge with respiratory syncytial virus strain A2 (7.0 log PFU). Nasal swabs were collected on days 1–3 and day 5 to measure the viral load of experimental animals. Body weight was monitored for 7 days; *b*, Body weight changes in the experimental animals; *c*, Isolation of respiratory syncytial virus from the nasal swabs of experimental animals. The bars represent group means \pm standard deviation; the dots represent individual values for each animal. A two-way analysis of variance was performed, and the Šidák test was used for multiple comparisons; *d*, Severity of changes based on the involvement of lung morphology, acute inflammation, and lymphocyte infiltration; *e*, Semi-quantitative assessment of the severity of pulmonary epithelial involvement and inflammatory reactions in the lungs of guinea pigs treated with neomycin after an experimental challenge with respiratory syncytial virus, based on histological examination. The bars represent group means \pm standard error of mean. A two-way analysis of variance was used for the statistical analysis, and the Tukey test was used for the multiple comparisons. RSV A2: Respiratory syncytial virus-infected animals that did not receive neomycin; RSV A2 + NEO(x3): Respiratory syncytial virus-infected animals that received neomycin three times. Control ($n = 2$): Animals treated with Dulbecco's phosphate-buffered saline were used to record baseline parameters.

при интраназальном введении не оказывал отчётливого влияния на способность РСВ реплицироваться в респираторном тракте заражённых животных. Значимого отличия в вирусной нагрузке в тканях респираторного тракта у заражённых животных, получавших и не получавших неомидин, выявлено не было ($p > 0,05$).

Противовирусная активность неомидина при интраназальном введении в защите от респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у морских свинок

Известно, что большинство лабораторных линий мышей являются дефектными по некоторым ISGs, продукты которых обладают прямым противовирусным действием, в том числе Mx1. Отсутствие противовирусного эффекта неомидина у мышей линии BALB/c может быть обусловлено неадекватной реакцией иммунной системы, связанной с генетическими дефектами врождённой противовирусной защиты. Поэтому на следующем этапе было изучено влияние интраназального введения неомидина на течение экспериментальной РСВ-инфекции у иммунокомпетентных животных, таких как морские свинки. Для этого морским свинкам вводили неомидин трёхкратно в дозе 5,0 мг за 24 ч до заражения РСВ штамм A2 и через 4 и 24 ч после заражения. У животных ежедневно оценивали массу тела и забирали носовые смывы на 1, 2, 3 и 5-й дни после заражения (рис. 2, a).

Во всех экспериментальных группах снижения массы тела заражённых животных по сравнению с интактными животными отмечено не было (рис. 2, b). При этом в лёгких заражённых морских свинок детектировали выделение инфекционного вируса. Важно отметить, что вирусовыделение в группе животных, получавших неомидин на фоне инфекции, начиная со 2-го дня после заражения было ниже, чем у контрольных животных. На 3-й день уровень инфекционного РСВ в тканях лёгких заражённых животных, которым вводили неомидин (средний титр для группы $10^{1,9}$ БОЕ/мл) был ниже в 80 раз ($p=0,0132$), чем у животных, не получавших неомидин (средний титр для группы $10^{3,1}$ БОЕ/мл). На 5-й день после заражения у животных, получавших неомидин, выделение инфекционного вируса не наблюдали ни у одного из четырёх животных, в то время как в контрольной группе вирусная нагрузка в низких титрах была определена у 3 из 4 животных (рис. 2, c).

На 7-й день после экспериментального заражения морских свинок были получены образцы тканей лёгких и выполнено гистологическое исследование с целью оценки степени выраженности патологии, обусловленной РСВ, в случае применения неомидина и без использования препарата. У всех заражённых животных наблюдали поражения ткани лёгких с вовлечением в патологический процесс воздухоносного и респираторного отделов разной степени выраженности. В бронхах и бронхиолах в группе без неомидина выявляли гипертрофию и гиперплазию эпителия с участками плоскоклеточной дифференцировки. В стенке бронхов и бронхиол

отмечалась клеточная воспалительная инфильтрация смешанного типа, нередко с признаками обструктивного поражения бронхиол. Вокруг бронхов и бронхиол и кровеносных сосудов зафиксирована умеренная лимфоцитарная инфильтрация; в стенке кровеносных сосудов — признаки васкулита, характеризовавшиеся воспалительной инфильтрацией и пролиферацией эндотелиальных клеток.

У животных, получавших неомидин, в воздухоносном и респираторном отделах отмечали менее выраженную воспалительную инфильтрацию, сравнительно реже выявляли повреждения эпителия бронхов и бронхиол, а также воспалительные поражения стенок кровеносных сосудов. При оценке патологических изменений в опытной группе отмечена меньшая степень выраженности выявленных поражений (рис. 2, d, e).

ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективное сдерживание ОРИ препаратами местного действия при проведении сезонных противозидемических мероприятий путём усиления противовирусной защиты слизистой оболочки верхних дыхательных путей открывает возможности как для снижения бремени ОРИ, так и негативных последствий передачи вируса здоровым людям.

В настоящем исследовании оценивали противовирусный потенциал неомидина — антибиотика широкого спектра действия группы аминогликозидов — в модели экспериментальной РСВ-инфекции. Мыши BALB/c и морские свинки являются релевантной моделью для изучения патогенеза и формирования противовирусного иммунитета к данному патогену [6–8]. При интраназальном введении неомидина в лечебно-профилактической схеме оценивали тяжесть течения заболевания, уровень вирусной репликации и степень выраженности патологических повреждений, ассоциированных с РСВИ.

Врождённая иммунная система является 1-й линией защиты организма от патогенов и чужеродных веществ. Хотя врождённые иммунные реакции могут выявлять и ограничивать РСВ-инфекцию, вирус выработал различные механизмы, позволяющие уклоняться от защитных реакций организма. Например, белок G РСВ снижает экспрессию интерферона путём регуляции экспрессии белка-супрессора цитокиновой сигнализации (SOCS) [9]. Неструктурный белок NS1 РСВ, взаимодействуя с доменом RIG-I CARD, способен снижать продукцию ISG и усиливать репродукцию вируса [10].

В нашем исследовании на мышах было показано, что интраназальное использование неомидина на фоне экспериментальной РСВ-инфекции приводит к значительному увеличению экспрессии внутриклеточных рецепторов нуклеиновых кислот, таких как MDA5, TLR9 и RIG-I.

Сигнальный путь, опосредованный RIG-I, играет ключевую роль в запуске врождённого иммунного ответа. Активация RIG-I/MAVS приводит к секреции интерферонов I типа, которые могут индуцировать экспрессию нижестоящих противовирусных сигнальных белков, таких как ISG,

включая Mx1 и Mx2, OAS, ISG15, PKR, TRIM и IP-10 [11]. Однако PCB может различными способами подавлять сигнальный путь RIG-I/MAVS. Так, белок PCB NS2 ингибирует взаимодействие между RIG-I и MAVS путём взаимодействия с MAVS, тем самым подавляя противовирусные сигналы. Также было доказано, что белки NS PCB вызывают деградацию факторов, индуцирующих интерферон, таких как RIG-I, IRF, TBB и STAT [12]. Наши результаты свидетельствуют о том, что неомицин дополнительно увеличивает активацию RIG-I/MAVS и вызывает повышение уровня экспрессии противовирусных факторов OAS1, Mx2 и IRF7. Данные ISG играют важную роль в борьбе с PCB и снижают вирус-ассоциированные воспалительные реакции, обуславливающие тяжесть заболевания. Известно, что белки OAS обладают противовирусными свойствами в отношении различных вирусов, включая SARS-CoV-2, вирус африканской чумы свиней, вирус гепатита В и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней [13], и способствуют развитию врождённых противовирусных реакций [14]. Для факторов IRF7 и Mx2 также показана важная роль в формировании противовирусного иммунитета за счёт усиления выработки интерферонов I типа, а генетические дефекты этих генов могут обуславливать тяжёлое течение вирусной инфекции [15].

Однако, несмотря на усиление экспрессии ISGs у мышей, снижения вирусной репликации в респираторном тракте показано не было. Известно, что большинство линий лабораторных мышей имеют нарушения в системе интерферонового сигналинга. В частности, у большинства линий лабораторных мышей, в том числе BALB/c, отсутствует полноценная система противовирусной защиты, поскольку они являются носителями дефектных аллелей гена *Mx1*. В связи с этим для оценки противовирусного эффекта неомицина на уровень вирусывыделения и степени выраженности патологического процесса в тканях респираторного тракта мы использовали морских свинок, которые восприимчивы к PCB, имеют функциональный ген *Mx1* — важный противовирусный эффектор интерферонов I типа — и подходят для изучения интерферон-зависимых реакций на инфекцию [16]. На модели морских свинок нами показано, что интраназальное использование неомицина на ранних стадиях инфекции приводило к снижению уровня репликации вируса и уменьшало выраженность патологических изменений в тканях респираторного тракта.

В целом полученные данные свидетельствуют о потенциальных противовирусных свойствах неомицина в отношении PCB-инфекции, реализация которых связана с активацией врождённого иммунного ответа на ранних стадиях инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют противовирусный потенциал неомицина в отношении PCB. Интраназальное применение неомицина в лечебно-профилактической схеме приводило к усилению экспрессии внутриклеточных

сенсоров нуклеиновых кислот и ключевых интерферон-стимулируемых генов, активируя врождённую иммунную систему организма экспериментальных животных.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Е.А. Романовская-Романько — проведение исследования, работа с данными, анализ данных, визуализация, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; М.А. Плотникова — проведение исследования, работа с данными, анализ данных, визуализация, написание черновика рукописи; А.А. Пулькина — проведение исследования, работа с данными, анализ данных; А.А. Мужикян — проведение исследования, работа с данными, анализ данных; В.А. Олейник — проведение исследования; М.А. Стукова — определение концепции, администрирование проекта, обеспечение исследования, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Все эксперименты с участием лабораторных животных были одобрены комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института гриппа им. А.А. Смородинцева (протокол № 17 от 10 июля 2025 г.).

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (регистрационный номер НИОКТР в ЕГИСУ НИОКТР 125040704919-6).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе неприменима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по протоколу Fast-Track. В рецензировании участвовал один внешний рецензент и один член редакционного совета.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: E.A. Romanovskaya-Romanko: conceptualization, investigation, data curation, visualization, writing—original draft, writing—review & editing; M.A. Plotnikova: conceptualization, investigation, data curation, visualization, writing—original draft; A.A. Pulkina: investigation, data curation, visualization; A.A. Muzhikyan: investigation, data curation, V.A. Oleinik: investigation; M.A. Stukova: conceptualization, writing—review & editing. All the authors approved the manuscript and also agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring appropriate consideration and resolution of questions related to the accuracy and integrity of any part of it.

Ethics approval: All experiments involving laboratory animals were approved by the Bioethics Committee of the Smorodintsev Research Institute of Influenza (Minutes No. 17, dated July 10, 2025).

Funding source: This work was part of State Assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (R&D Registration No. 125040704919-6 in the Unified State Information System for Accounting of Research, Development, and Technological Work (EGISU NIOKTR)).

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: The editorial policy regarding data sharing does not apply to this work, and no new data was collected or created.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer-review: This article was submitted unsolicited and reviewed following the Fast-Track procedure. The peer-review process involved one external reviewer and one member of the Editorial Board.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Gopinath S, Kim MV, Rakib T, et al. Topical application of aminoglycoside antibiotics enhances host resistance to viral infections in a microbiota-independent manner. *Nat Microbiol.* 2018;3(5):611–621. doi: 10.1038/s41564-018-0138-2
- Mao T, Kim J, Peña-Hernández MA, et al. Intranasal neomycin evokes broad-spectrum antiviral immunity in the upper respiratory tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2024;121(18):e2319566121. doi: 10.1073/pnas.2319566121 EDN: ATDKNV
- Krivitskaya VZ, Petrova ER, Sorokin EV, et al. Design and characteristics of monoclonal antibodies specific to respiratory syncytial virus. *Biotechnologiya.* 2016;32(1):65–75. doi: 10.21519/0234-2758-2016-1-65-75 EDN: VVZKST
- Oleynik VA, Plotnikova MA, Yolshin ND, et al. Development and approbation of a quantitative PCR system for studying the expression of endosomal receptors and cytosolic nucleic acid sensors in mice. *Medical Academic Journal.* 2025;25(1):90–100. doi: 10.17816/MAJ637237 EDN: PCBNIB
- Patent RUS № 2841955 C1/ 18.06.2025. Elshin ND, Klotchenko SA, Oleinik VA, Plotnikova MA. *Test system for assessing level of expression of mice TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5 genes.* EDN: XYMZPE
- Streckert HJ, Philippou S, Riedel F. Detection of respiratory syncytial virus (RSV) antigen in the lungs of guinea pigs 6 weeks after experimental infection and despite of the production of neutralizing antibodies. *Arch Virol.* 1996;141(3–4):401–410. doi: 10.1007/BF01718305
- Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine.* 2017;35(3):469–480. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.054
- Hegele RG, Robinson PJ, Gonzalez S, Hogg JC. Production of acute bronchiolitis in guinea-pigs by human respiratory syncytial virus. *Eur Respir J.* 1993;6(9):1324–1331.
- Hijano DR, Vu LD, Kauvar LM, et al. Role of type I interferon (IFN) in the respiratory syncytial virus (RSV) immune response and disease severity. *Front Immunol.* 2019;10:566. doi: 10.3389/fimmu.2019.00566 EDN: BUPGXX
- Spann KM, Tran KC, Chi B, et al. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol.* 2004;78(8):4363–4369. doi: 10.1128/jvi.78.8.4363-4369.2004
- Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: what do they all do? *Annu Rev Virol.* 2019;6(1):567–584. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015756 EDN: TWUJMK
- Jobe F, Simpson J, Hawes P, et al. Respiratory syncytial virus sequesters NF-κB subunit p65 to cytoplasmic inclusion bodies to inhibit innate immune signaling. *J Virol.* 2020;94(22):e01380–e01320. doi: 10.1128/JVI.01380-20 EDN: OEFBWD
- Sun YL, Guo Y, Yu Wang X, et al. Elimination of gut microbiota hinders the therapeutic effect of amentoflavone on respiratory syncytial virus-induced lung inflammation injury by regulating innate immunity. *Phytomedicine.* 2025;145:157033. doi: 10.1016/j.phymed.2025.157033
- Hariouh MK, Perez J, Chong Z, et al. Oligoadenylate synthetase 1 displays dual antiviral mechanisms in driving translational shutdown and protecting interferon production. *Immunity.* 2024;57(3):446–461.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2024.02.002 EDN: FTPERE
- Ciancanelli MJ, Abel L, Zhang SY, Casanova JL. Host genetics of severe influenza: from mouse Mx1 to human IRF7. *Curr Opin Immunol.* 2016;38:109–120. doi: 10.1016/j.coi.2015.12.002
- Sakamoto R, Jiang S, Tsukada Y, et al. IFN-Alpha1 antisense RNA represses human influenza A virus growth in a guinea pig system. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2019;24(4):798–818. doi: 10.2741/4752

ОБ АВТОРАХ

* **Романовская–Романько Екатерина Андреевна**, канд. биол. наук; адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17; ORCID: 0000-0001-7560-398X; eLibrary SPIN: 1012-8043; e-mail: romromka@yandex.ru

Плотникова Марина Александровна, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0001-8196-3156; eLibrary SPIN: 2986-9850; e-mail: biomalinka@mail.ru

Пулькина Анастасия Александровна, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0001-8609-8093; eLibrary SPIN: 1077-9160; e-mail: pureshka@yandex.ru

Музыкян Арман Артушович, канд. ветеринар. наук; ORCID: 0000-0002-7093-0014; eLibrary SPIN: 6177-6467; e-mail: vetdiagnostics.spb@gmail.com

Олейник Вероника Андреевна; ORCID: 0009-0005-3081-0463; eLibrary SPIN: 1299-6388; e-mail: working.lyutik@gmail.com

Стукова Марина Анатольевна, канд. мед. наук; ORCID: 0000-0002-2127-3820; eLibrary SPIN: 5748-9310; e-mail: marina.stukova@influenza.spb.ru

AUTHORS' INFO

* **Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko**, Cand. Sci. (Biology); address: 15/17 Prof. Popova st, Saint Petersburg, Russia, 197022; ORCID: 0000-0001-7560-398X; eLibrary SPIN: 1012-8043; e-mail: romromka@yandex.ru

Marina A. Plotnikova, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0001-8196-3156; eLibrary SPIN: 2986-9850; e-mail: biomalinka@mail.ru

Anastasia A. Pulkina, Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0001-8609-8093; eLibrary SPIN: 1077-9160; e-mail: pureshka@yandex.ru

Arman A. Muzhikyan, Cand. Sci. (Veterinary); ORCID: 0000-0002-7093-0014; eLibrary SPIN: 6177-6467; e-mail: vetdiagnostics.spb@gmail.com

Veronika A. Oleinik; ORCID: 0009-0005-3081-0463; eLibrary SPIN: 1299-6388; e-mail: working.lyutik@gmail.com

Marina A. Stukova, MD, Cand. Sci. (Medicine); ORCID: 0000-0002-2127-3820; eLibrary SPIN: 5748-9310; e-mail: marina.stukova@influenza.spb.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author