

**ПРОДУКЦІЯ ІНТЕРФЕРОНУ І та ІІ ТИПУ ПІД ВПЛИВОМ
МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСУ ДРІЖДЖОВА РНК-ТИЛОРОН ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГЕРПЕТИЧНІЙ ІНФЕКЦІЇ**

СКРОЦЬКА О.І.^{*}, ЖОЛОБАК Н.М., СПИВАК М.Я, ЛИЧ І.В.^{*}, КАРПОВ О.В.^{*}

^{*}Національний університет харчових технологій, м. Київ

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ

РЕЗЮМЕ

**ПРОДУКЦИЯ ИНТЕРФЕРОНА I и II ТИПА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА ДРОЖЖЕВАЯ РНК-ТИЛОРОН
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ**

СКРОЦКАЯ О.И.^{*}, ЖОЛОБАК Н.М., СПИВАК Н.Я, ЛЫЧ И.В.^{*}, КАРПОВ А.В.^{*}

^{*}Национальный университет пищевых технологий, г. Киев

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
г. Киев

Ключевые слова: герпетическая инфекция, вирус простого герпеса I типа, интерферон

Установлено, что молекулярный комплекс дрожжевая РНК-тилорон (МК) влияет на показатели цитокинового статуса животных, инфицированных вирусом простого герпеса I типа (ВПГ-1). Терапевтическое использование МК повышает уровни различных типов интерферонов (ИФН): сывороточного ИФН до 3200 ед. акт./мл, спонтанного ИФН до 320 ед. акт./мл, α-ИФН до 640 ед. акт./мл и γ-ИФН до 640 и 320 ед. акт./мл в крови и спленоцитах соответственно.

SUMMARY

**PRODUCTION OF INTERFERON TYPE I AND II UNDER THE
INFLUENCE OF MOLECULAR COMPLEX OF YEAST RNA-TILORONE AT
EXPERIMENTAL HERPETIC INFECTION**

SKROTSKA O.^{*}, ZHOLOBAK N., SPIVAK M., LYCH I.^{*}, KARPOV O.^{*}

^{*}National University of Food Technologies

Institute of Microbiology and Virology of D.K. Zabolotny, National Academy
of Sciences of Ukraine

Key words: herpetic infection, herpes simplex virus type 1, interferon.

The author has detected the molecular complex yeast RNA-tilorone (MC) ability to influence on the characteristics of cytokine status of infected by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) animals. The MC use led to the increase of levels of different types of interferons' (IFNs): serum IFN having been reached 3200 activity units/ml, spontaneous IFN – 320 activity units /ml, α-IFN – 640 activity units /ml, γ-IFN – 640 and 320 activity units /ml in blood and splenocytes, respectively.

Останнім часом значну увагу сучасної медичної наукової спільноти привертають препарати, що мають універсальний вплив на імунну систему людини та є безпечними і надійними у лікуванні та профілактиці вірусних захворювань. Герпетичні інфекції належать на найпоширеніших вірусних

хвороб. Це обумовлене різноманітними шляхами зараження та здатністю герпесвірусів до пожиттєвої персистенції в клітинах нервової тканини [1]. Вторинний імунodefіцит, що розвивається при герпетичній інфекції, характеризується змінами у цитокіновій системі організму. Віруси герпесу супресивно діють на систему інтерферону організму, що призводить до порушення інтерфероногенезу та сприяє реплікації вірусної ДНК [2].

Цитокіни, зокрема інтерферони (ІФН), відіграють головну роль у процесах патогенезу при вірусних інфекціях. Противірусна дія ІФН не обмежується впливом на репродукцію вірусів, вона також пов'язана із активацією факторів неспецифічної резистентності та специфічної імунної відповіді [3]. ІФН I типу беруть участь в обмеженні вірусного розповсюдження протягом перших днів інфікування. Цього часу вистачає для становлення сильної адаптивної імунної відповіді на інфекцію, за яку відповідає ІФН II типу – γ -ІФН [4].

Тому актуальною задачею є вивчення препаратів, які не лише безпосередньо впливають на репродукцію вірусів групи герпесу, а і відновлюють показники імунного статусу організму, зокрема інтерферонового статусу, при герпетичних захворюваннях.

Раніше було показано, що інтерфероніндукувальний молекулярний комплекс, який утворюється при взаємодії дріжджової РНК з дигідрохлоридом тилорону (МК) справляє інгібувальну дію по відношенню до ряду РНК-вмісних вірусів [5]. **Метою даної роботи** було дослідження дії МК на ДНК-вмісний вірус – ВПГ-1.

Матеріали і методи досліджень.

Для створення експериментального герпетичного менінгоенцефаліту використовували тварин (мишей лінії *BALB/c* вагою 10 – 12 г), яких інфікували внутрішньомозково вірусом простого герпесу I типу (ВПГ-1), штам Л2, отриманий з музею ВНДХФІ ім. С. Орджонікідзе (Москва) в дозі 10 LD₅₀/0,025 мл (титр вірусу становив 5 lg LD₅₀).

Як препарати порівняння використовували стандартний протигерпетичний препарат – віролекс (“KRKA”, Slovenia), а також еталонний індуктор інтерферону (ІФН) – *poly(I)-poly(C)* (“Sigma”, Germany). Тваринам вводили препарати за терапевтичною схемою двократно внутрішньоочеревинно (через добу та через три доби після інфікування) в кількості: МК – 1,46 мг/кг, *poly(I)-poly(C)* – 0,66 мг/кг [6], віролекс – 100 мг/кг ваги тварини [7]. Контрольним інфікованим тваринам вводили фізіологічний розчин.

Оскільки більшість ІФН продукується клітинами крові та селезінки [8], вивчали продукцію ІФН I та II типу вказаними клітинами під дією досліджуваних препаратів у тварин, інфікованих ВПГ-1. Проби брали на 2-гу, 4-ту, 6-ту та 9-ту доби після інфікування ВПГ-1.

Для визначення рівня індукованого ІФН клітинами крові та селезінки використовували мікрометод індукції ІФН [9]. Для індукції α -ІФН використовували ридостин (НПО „Вектор”, Росія) в концентрації 100 мкг/мл,

для γ -ІФН – фітогемаглютинін (ФГА) (“Sigma”, Germany) з розрахунку 40 мкг/мл.

ІФН титрували в перевивній культурі клітин *L-929* проти 100 ТЦД₅₀ тест-вірусу (вірус везикулярного стоматиту штам Індіана, отриманий з музею НДІ епідеміології і мікробіології ім. Н.Ф. Гамалєї, Москва) за прийнятою методикою [10]. За титр ІФН приймали число, зворотне його найбільшому розведенню, яке викликало затримку ЦПД вірусу в моношарі клітин *L-929* на 50 %.

Результати та їх обговорення.

У групі контрольних ВПГ-1-інфікованих тварин спостерігали зменшення титрів сироваткового ІФН від 400 од. акт./мл на 2 добу після інфікування до 100 од. акт./мл на 9 добу (рис. 1).

При дворазовому введенні тваринам МК відбувалось достовірне підвищення рівня сироваткового ІФН від 1600 од. акт./мл на 2 добу після інфікування до 3200 од. акт./мл ($p < 0,05$) на 4 та 6 добу відповідно.

Динаміка продукції сироваткового ІФН під дією стандартного індуктора ІФН *poly(I)-poly(C)* була подібною до тієї, що спостерігалася при дії МК, але титри ІФН були нижчими: 1200 од. акт./мл та 1600 од. акт./мл ($p < 0,05$) на 2 та 4 добу після інфікування тварин відповідно. На 6 та 9 добу спостереження в даній групі тварин рівень сироваткового ІФН зменшився до 800 од. акт./мл ($p < 0,05$).

У тварин, що отримували віролекс, рівень сироваткового ІФН протягом всього періоду спостереження достовірно не відрізнявся від груп контрольних тварин і знаходився в межах 200 – 400 од. акт./мл ($p > 0,05$).

Аналогічною була динаміка рівнів спонтанного ІФН в гепаринізованій крові та спленоцитах досліджуваних тварин, інфікованих ВПГ-1 (рис. 2).

У контрольних інфікованих тварин рівень спонтанного ІФН знаходився на досить низькому рівні вже на 2 добу після зараження ВПГ-1: 40 та 20 од. акт./мл в крові та спленоцитах відповідно. На 9 добу спостереження рівень спонтанного ІФН у досліджуваних зразках знизився до 10 од. акт./мл.

У групі тварин, яким вводили МК, титр спонтанного ІФН достовірно зростав від 160 до 320 од. акт./мл ($p < 0,05$) на 4 добу спостереження у крові та спленоцитах відповідно та знизився до 160 од. акт./мл на 9 добу ($p < 0,05$).

Первинне введення інфікованим ВПГ-1 тваринам *poly(I)-poly(C)* підвищувало рівні спонтанного ІФН до 80 та 160 од. акт./мл ($p < 0,05$), а повторне введення – до 160 та 320 од. акт./мл ($p < 0,05$) в спленоцитах та крові відповідно. У наступні дні спостереження рівень спонтанного ІФН для даної групи тварин поступово знижувався.

У групі тварин, які отримували віролекс рівень спонтанного ІФН у досліджуваних зразках достовірно не відрізнявся від груп контрольних тварин і знаходився в межах 20 – 40 од. акт./мл ($p > 0,05$).

Дослідження динаміки індукowanego α -ІФН у крові та в спленоцитах контрольних ВПГ-інфікованих тварин (рис. 3), показало, що рівень даного

ІФН у крові знизився від 80 до 10 од. акт./мл, а у спленоцитах – від 40 до 10 од. акт./мл на 9 добу спостереження.

При введенні ВПГ-інфікованим тваринам МК рівень α -ІФН в крові та спленоцитах був у 2 рази вищим, ніж у випадку спонтанного ІФН. На наступну добу після введення препарату рівень індукованого α -ІФН достовірно збільшився до 320 од. акт./мл ($p < 0,05$). Повторне введення МК підвищило даний показник до 640 од. акт./мл ($p < 0,05$) та призвело до його збереження на даному рівні до 6 доби. На 9 добу після інфікування у даній групі тварин рівень α -ІФН знизився до 320 од. акт./мл ($p < 0,05$). Продукування клітинами крові відносно високих титрів спонтанного та індукованого α -ІФН може бути результатом підсилення препаратом МК первинної реакції організму дослідних тварин на появу в ньому інфекційного агента (ВПГ-1). При цьому до вказаного процесу, вірогідно, залучаються всі основні популяції клітин крові: моноцити, В-клітини та Т-хелпери 1 і 2 типу (Th1, Th2).

Продукція індукованого α -ІФН у крові та спленоцитах під дією *poly(I)-poly(C)* була подібною до МК, але показники рівнів ІФН були в 2 рази нижчими за аналогічні показники у групі тварин, яким вводили МК.

У тварин, що отримували віролекс результати були аналогічні попередньому дослідженню, тобто показники індукції α -ІФН достовірно не змінювались протягом всіх днів спостереження і знаходились в межах 20 – 40 од. акт./мл ($p > 0,05$).

Контроль над вірусною інфекцією у значній мірі залежить від синтезу γ -ІФН, що бере участь у активації макрофагів, цитотоксичних Т-лімфоцитів і сприяє більш ефективній презентації антигенів у складі головного комплексу гістосумісності II типу [11]. Також відомо, що γ -ІФН протягом довгого часу присутній в гангліях ВПГ-інфікованих тварин [12] і використовується CD8⁺ Т-клітинами для пригнічення реактивації ВПГ-1 [13].

Результати дослідження рівнів індукованого γ -ІФН у крові та в спленоцитах ВПГ-інфікованих тварин наведені на рис 4.

В групі контрольних ВПГ-1-інфікованих тварин виявлено низькі показники рівнів γ -ІФН протягом всіх днів спостереження: титр γ -ІФН зменшився від 80 од. акт./мл на 2 добу після зараження вірусом до 40 од. акт./мл на 4 – 9 доби у крові; у спленоцитах титр індукованого γ -ІФН був на рівні 20 од. акт./мл протягом всіх днів спостереження.

Введення тваринам МК призвело до підвищеної індукції γ -ІФН на 2 та 4 добу після інфікування ВПГ до рівня 640 од. акт./мл в крові та до рівня 160 та 320 од. акт./мл ($p < 0,05$) в спленоцитах відповідно. На 6 та 9 добу рівень даного ІФН у крові знизився до 320 од. акт./мл ($p < 0,05$). У спленоцитах рівень γ -ІФН був на рівні 320 од. акт./мл ($p < 0,05$) на 6 добу, а на 9 добу спостереження знизився до 160 од. акт./мл ($p < 0,05$). Високі титри індукованого γ -ІФН, після введення МК у даній групі тварин свідчать про ефективну регуляцію балансу Th1/Th2 і його відновлення.

При введенні ВПГ-1-інфікованим тваринам *poly(I)-poly(C)* спостерігалась подібна закономірність зміни рівня індукованого γ -ІФН. Але

числові значення титрів виявилися у 2 рази нижчими, ніж у групі тварин, які отримували МК.

У групі тварин, яким вводили віролекс, як і у попередніх дослідах, не спостерігалось статистично достовірної індукції ІФН у крові та у спленоцитах в порівнянні з групами контрольних тварин.

Таким чином розвиток експериментальної герпетичної інфекції супроводжується зміною продукції досліджуваних типів ІФН. У контрольній групі інфікованих тварин виявлено значне зменшення здатності клітин крові та селезінки до продукції індукованого α -ІФН, який є інтегративним показником стану противірусного захисту організму, а також індукованого γ -ІФН – показника функціональної активності Т-лімфоцитів і здатності до активації імунної системи [14]. Таке зниження продукції γ -ІФН можна розглядати як результат дії ВПГ-1, спрямованої на пригнічення антивірусних клітинних механізмів. Загалом це сприяє уникненню патогеном противірусної дії імунної системи хворого. Цим механізмом можна пояснити відсутність у контрольній групі інфікованих тварин або низьку продукцію клітинами крові та спленоцитами α -ІФН та γ -ІФН, що забезпечують реалізацію клітинної та гуморальної ланок імунітету у відповідь на інфекцію.

У групі тварин, які отримували МК зростали рівні як спонтанного, так і індукованого α - та γ -ІФН, що свідчить про ефективну активацію гуморального та клітинного імунітету. У тварин, яким вводили *poly(I)-poly(C)* також спостерігали зростання рівнів досліджуваних ІФН, але їх значення були нижчими, ніж у МК. Протигерпетичний препарат віролекс достовірно не впливав на динаміку вказаних вище ІФН.

Таким чином, при експериментальній герпетичній інфекції лише індуктори ІФН (МК та *poly(I)-poly(C)*) були здатними до активації як спонтанного, так і індукованого α - та γ -ІФН. Можливо, саме через індукцію ІФН МК може здійснювати інгібування продукції ВПГ-1, що приводить до відповідного зменшення смертності інфікованих тварин, показаної раніше [15, 16].

ВИСНОВКИ:

1. Показано, що розвиток герпетичної інфекції призводить до зменшення продукції ІФН I та II типу.

2. Встановлено, що в організмі ВПГ-інфікованих тварин молекулярний комплекс збільшує рівні сироваткового ІФН (до 3200 од. акт./мл), спонтанного ІФН (до 320 од. акт./мл в крові та спленоцитах), α -ІФН (до 640 од. акт./мл в крові та спленоцитах) та γ -ІФН (до 640 та 320 од. акт./мл в крові та спленоцитах відповідно).

3. Оскільки введення *poly(I)-poly(C)*, на відміну від віролексу, також призводило до підвищення рівнів ІФН в досліджуваних зразках можна зробити припущення, що протигерпетична дія МК пов'язана саме з активацією даної ланки цитокінової системи організму.

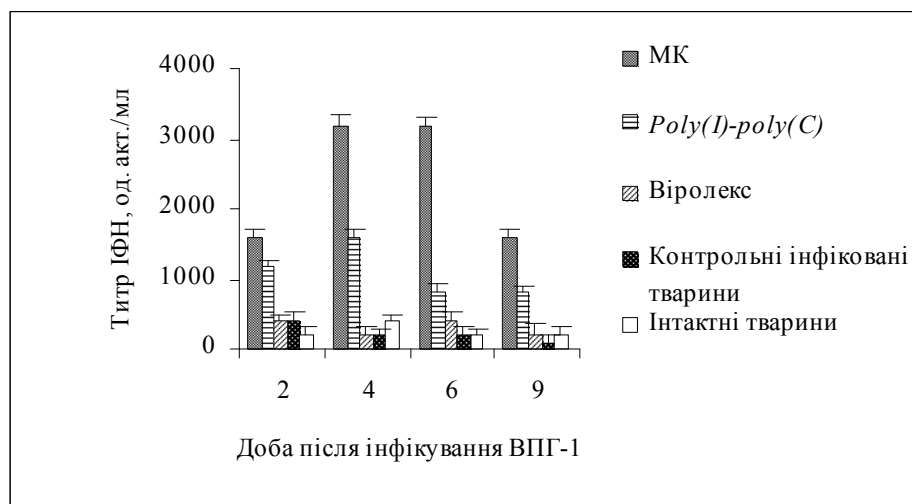


Рис. 1. Динаміка продукції ІФН у сироватці крові мишей лінії *BALB/c* при герпесвірусному менінгоенцефаліті під дією досліджуваних сполук.

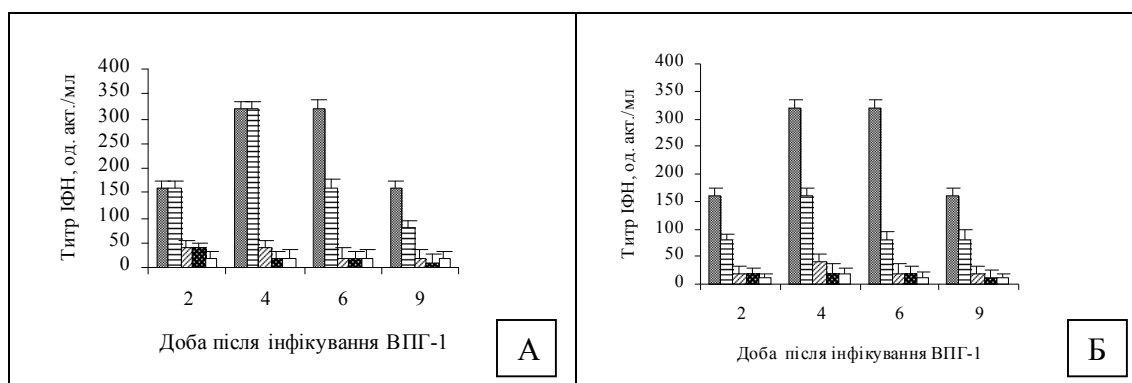


Рис. 2. Вплив досліджуваних сполук на рівень спонтанного ІФН у крові (А) та спленоцитах (Б) мишей лінії *BALB/c* при герпесвірусному менінгоенцефаліті (Позначення ті ж, що і на рис .1).

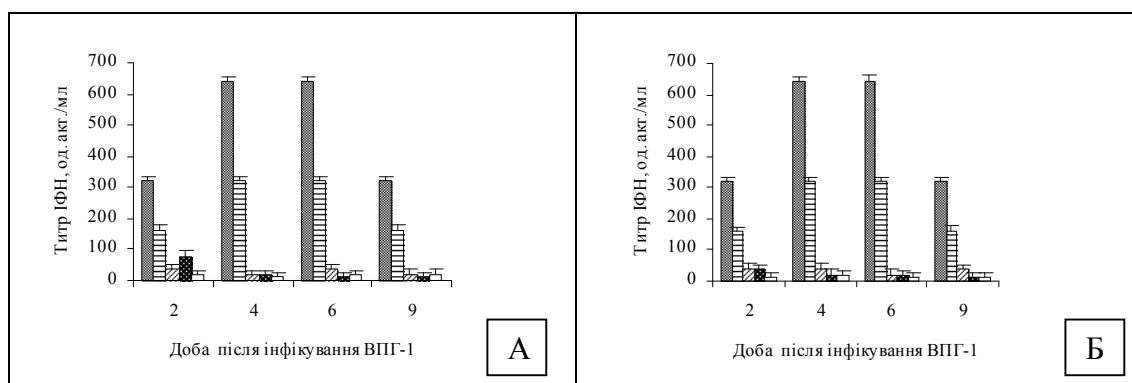


Рис. 3. Вплив досліджуваних сполук на рівень індукованого α -ІФН у крові (А) та спленоцитах (Б) мишей лінії *BALB/c* при герпесвірусному менінгоенцефаліті (Позначення ті ж, що і на рис .1).

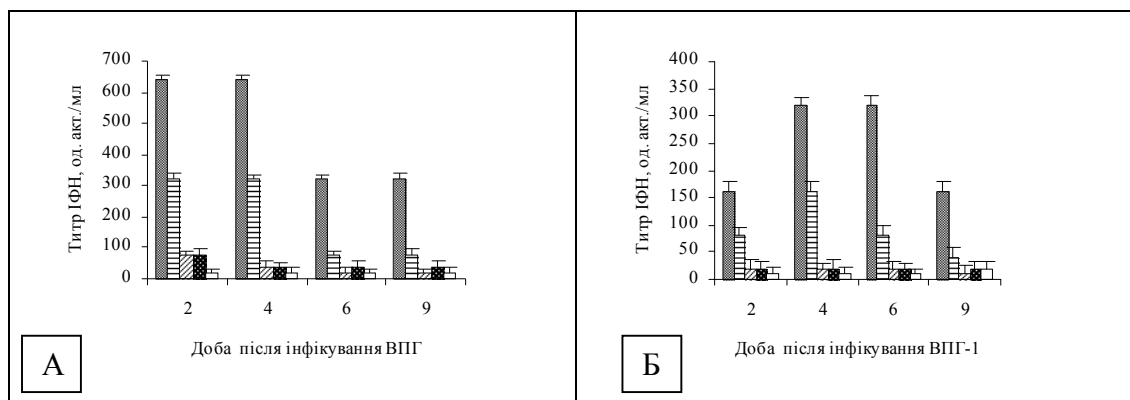


Рис. 4. Вплив досліджуваних сполук на рівень індукованого γ -ІФН у крові (А) та спленоцитах (Б) мишей лінії *BALB/c* при герпесвірусному менінгоенцефаліті (Позначення ті ж, що і на рис. 1).

ЛІТЕРАТУРА:

1. Руденко А.О. Герпесвірусні інфекції людини – світова проблема / А.О. Руденко, А.В. Муравська // Інфекційні хвороби. – 2001. – № 2. – С. 5 – 11.
2. Носик Н.Н. Цитокини при вирусных инфекциях / Н.Н. Носик // Вопросы вирусологии – 2000. – № 1. – С. 4 – 10.
3. Biron C.A. Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection / C.A. Biron // Current Opinion in Immunology. – 1994. – Vol. 6. – P. 530 – 538.
4. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense / [U. Muller, U. Steinhoff, L.F. Reis et al.] // Science. – 1994. – Vol. 264. – P. 1918 – 1921.
5. Virus-inhibitory effect of a yeast RNA-tilorone molecular complex in cell cultures / [A.V. Karpov, N.M. Zholobak, N.Ya. Spivak et al.] // Acta Virologica. – 2001. – Vol. 45 – P. 181 – 184.
6. Карпов О.В. Интерфероногенні властивості комплексів дріжджова РНК-тилорон / О.В. Карпов, Н.М. Жолобак // Доповіді НАН України. – 1996. – № 3. – С. 128 – 131.
7. Haruhiko M. Comparison of antiviral efficacies of 1- β -D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil (bromovir) and acyclovir against herpes simplex virus type 1 infections in mice / M. Haruhiko, I. Takao, A. Noriyuki // Antiviral Research. – 1990. – Vol. 14. – P. 99 – 108.
8. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways / [H. Hochrein, B. Schlatter, M. O’Keeffe et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – Vol. 101. – P. 11416 – 11421.
9. Дзюблик І.В. Мікрометод визначення інтерферонового статусу людини у пробах цільної крові / І.В. Дзюблик, Л.Д. Кривохатська, О.П. Трохименко, О.В. Ковалюк // Лабораторна діагностика. – 2001. – №1. – С. 34 – 37.
10. Кремерман И.Б. Экспериментальное изучение интерфероногенной и противовирусной активности некоторых биологически активных веществ / И.Б. Кремерман, Л.С. Приймаги, Ф.И. Ершов // Вопросы вирусологии. – 1984. – Т. 29, № 5. – С. 549 – 553.

11. Ramshaw I.A. Cytokines and immunity to viral infections / I.A. Ramshaw // *Nature Reviews Immunology*. – 1997. – Vol. 159. – P. 119 – 132.
12. Cantin E.M. Gamma interferon expression during acute and latent nervous system infection by herpes simplex virus type 1 / E.M. Cantin, D.R. Hinton, J. Chen, H. Openshaw // *Journal of Virology*. – 1995. – Vol. 69. – P. 4898 – 4905.
13. Decman V. Gamma interferon can block herpes simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression / V. Decman, P.R. Kinchington, S.A.K. Harvey, R.L. Hendricks // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – P. 10339 – 10347.
14. Role of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in herpes simplex virus type 1 infection / [M. Minami, M. Kita, X.Q. Yan et al.] // *Journal of interferon and cytokine research*. – 2002. – Vol. 22. – P. 671 – 676.
15. Вплив комплексного індуктора інтерферону на експериментальну герпетичну інфекцію / [О.І. Скроцька, Н.М. Жолобак, О.В. Карпов та ін.] // *Доповіді НАН України*. – 2005. – № 5. – С. 164 – 166.
16. Ефективність комплексу дріжджова РНК – тилорон при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті / [О.І. Скроцька, Н.М. Жолобак, С.В. Антоненко та ін.] // *Доповіді НАН України*. – 2006. – №3. – С.181 – 184.