

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

СКРОЦЬКА ОКСАНА ІГОРІВНА

УДК 577.245 + 578.24:578.76:578.825

**ПРОТИВІРУСНА ДІЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСУ
ДРІЖДЖОВА РНК-ТИЛОРОН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ
ВПГ-1-ІНФЕКЦІЇ**

03.00.06 – вірусологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України, м. Київ.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Карпов Олександр Вікторович**, Національний університет харчових технологій Міністерства освіти і науки України, професор кафедри біотехнології мікробного синтезу

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор **Бучацький Леонід Петрович**, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, провідний науковий співробітник кафедри біохімії

доктор медичних наук, старший науковий співробітник, **Рибалко Світлана Леонтіївна**, державна установа “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України”, завідувач лабораторії контролю якості імунобіологічних препаратів

Захист відбудеться 25 листопада 2008 року о 16 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, просп. акад. Глушкова, 2/12; біологічний факультет, ауд. 434.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий “ 23 ” жовтня 2008 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

О.В. Молчанець

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогоднішній день герпетичні інфекції належать до найбільш розповсюджених вірусних хвороб. Близько 90 % населення земної кулі інфіковані одним або кількома сероваріантами вірусів герпесу. Згідно даних ВООЗ смертність від герпетичної інфекції серед вірусних захворювань знаходиться на другому місці після гепатиту (Руденко, Муравська, 2001). У людей із здоровою імунною системою герпес-віруси можуть циркулювати в організмі безсимптомно, але у людей із імуносупресивним станом вони викликають важкі захворювання, що закінчуються летально (Ершов, Оспельникова, 2001).

Віруси герпесу є політропними агентами, особливо віруси простого герпесу I та II типів (ВПГ-1, ВПГ-2). Вони вражають центральну нервову систему, шкіру, слизові оболонки, статеві органи, печінку, тощо (Владимирова, 1997). Особливою важкістю відзначаються ураження герпесвірусами центральної нервової системи – менінгіти та енцефаліти, які характеризуються великим відсотком летальності та інвалідності. Потрапляючи до організму людини, ВПГ персистують в ньому протягом усього життя, періодично викликаючи рецидиви різного ступеню важкості. Тривалий хронічний процес призводить до негативної імунної перебудови організму. Розвивається вторинний імунодефіцит, пригнічуються реакції клітинного імунітету, знижується неспецифічний захист організму – падає рівень α - та γ -інтерферонпродукуючої здатності лейкоцитів, розвивається гіпоімуноглобулінемія та сенсibiliзація до антигенів ВГГ (Мавров, 1998).

Більшості препаратів, що нині використовуються для лікування герпетичних захворювань, притаманна досить низька ефективність та ряд небажаних побічних ефектів. Тому актуальним є пошук та розробка більш активних та безпечних антигерпетичних препаратів.

Раніше було встановлено, що молекулярні комплекси (МК), які утворюються при взаємодії дріжджової РНК з гідрохлоридом тилорону, здатні індукувати α/β -інтерферони (ІФН) як *in vivo*, так *in vitro* (Карпов, Жолобак, 1995; 1996). Доведена також противірусна дія МК на моделях ряду РНК-вмісних вірусів, включаючи ВІЛ (Карпов и др., 1997; Karпов et al., 2001). Однак питання щодо дії МК на ДНК-вмісні віруси залишалось відкритим. У зв'язку з цим обґрунтованим вважалося проведення експериментальної оцінки МК у якості протигерпетичного агента.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами. Дисертаційна робота виконана згідно проекту Міністерства науки і освіти України “Встановлення молекулярних механізмів індукції інтерферонів I типу (альфа/бета-інтерферонів) в умовах *in vitro*” (державний реєстраційний номер 0102U000557, 2002–2003 рр.).

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи була дослідна оцінка потенційної противірусної здатності інтерферогенного молекулярного комплексу дріжджової РНК з гідрохлоридом тилорону на моделі ДНК-вмісного вірусу – вірусу простого герпесу I типу (ВПГ-1).

У відповідності із вказаною метою були поставлені наступні завдання:

1. Оцінити протигерпетичну дію МК *in vivo*.
2. Дослідити вплив МК на цитокіновий статус експериментальних тварин при ВПГ-1-інфекції.
3. Вивчити дію МК на макрофагальну ланку імунітету при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті.
4. Дослідити вплив МК на герпетичну інфекцію *in vitro*.

Об'єкт дослідження – вірус простого герпесу I типу, молекулярний комплекс дріжджової РНК з гідрохлоридом тилорону.

Предмет дослідження – рівень реплікації вірусу простого герпесу I типу *in vivo* та його титр *in vitro* під дією досліджуваного комплексу дріжджової РНК з гідрохлоридом тилорону, показники життєздатності, а також стан цитокінової системи (інтерферони I та II типу, фактор некрозу пухлин) та поглинальної і метаболічної активності макрофагів лабораторних тварин, інфікованих вказаним вище вірусом.

Методи дослідження – для виконання поставлених в роботі завдань використовували вірусологічні, мікробіологічні та імунологічні методи дослідження.

Наукова новизна результатів досліджень. Вперше показана протівірусна дія молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон на ДНК-вмісний вірус на моделі ВПГ-1-інфекції в умовах *in vitro* та *in vivo*. Доведено, що вказаний комплекс впливає на життєздатність тварин інфікованих ВПГ-1. Продемонстрований загальний пригнічуючий вплив МК на перебіг ВПГ-1-інфекції і, зокрема, на репродукцію ВПГ-1 в мозковій тканині дослідних тварин. Встановлена здатність комплексу підтримувати на високому рівні показники цитокінового статусу тварин при експериментальній герпетичній інфекції. Виявлена властивість МК активувати всі сторони фагоцитарного процесу та метаболічної активності перитонеальних макрофагів при експериментальній ВПГ-1-інфекції. Вперше доведено, що протівірусна дія МК на ВПГ-інфекцію не обмежується лише стимулюванням неспецифічного захисту організму, але і проявляється у безпосередньому пригнічуючому впливі цієї сполуки на репродукцію ВПГ-1 в культурі клітин.

Практичне значення отриманих результатів. У практику Міністерства охорони здоров'я буде запропонований новий досить ефективний і водночас дешевий препарат – молекулярний комплекс дріжджова РНК-тилорон з комплексною дією (безпосередньо протигерпетичною та імуномодельюючою) з метою його подальшого застосування у клінічній практиці.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертації самостійно проаналізовано, відповідно до обраної теми, наукову літературу, проведено практичні дослідження та статистично оброблено отримані дані, проведено їх аналіз та узагальнення, сформульовано висновки.

Планування головних напрямків роботи, формулювання основних положень дисертації та підготовка до друку наукових статей проведено під керівництвом наукового керівника дисертаційної роботи д.б.н., проф. О.В.Карпова.

Автор роботи висловлює щирю подяку к.б.н. с.н.с. відділу проблем імунomodуляторів та інтерферонів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Н.М. Жолобак за допомогу при титруванні противірусної активності ІФН, к.б.н. с.н.с. лабораторії загальної вірусології Державної установи “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського АМН України” С.В. Антоненко за участь у створенні моделі герпетичного менінгоенцефаліту та визначенні рівнів реплікації вірусу простого герпесу.

Апробація результатів дисертації. Результати проведеної роботи доповідались на міжнародному форумі “Основи молекулярно-генетичного оздоровлення людини і довкілля” (Київ, 2005), VI національному з’їзді фармацевтів України “Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України” (Харків, 2005), п’ятому конкурсі науково-технічних проєктів “Інтелектуальний потенціал молодих вчених – місту Києву” (Київ, 2005), конкурсі експериментальних робіт молодих дослідників ІМВ НАНУ (Київ, 2005), на II Міжнародній науковій конференції молодих вчених “Молодь і досягнення науки у вирішенні проблем сучасності” (Чернівці, 2005.), на 7 та 10-й Міжнародній Пушчинській школі-конференції молодих вчених “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2003, 2006), IV – V міжнародній конференції “Біоресурси і віруси” (Київ, 2004, 2007).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 11 робіт (з них 5 статей у фахових журналах і 6 тез доповідей).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 153 сторінках машинописного тексту і має такі розділи: “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали і методи досліджень”, “Результати та їх обговорення”, “Узагальнення отриманих результатів”, “Висновки”, “Список використаних джерел”. Робота містить 15 таблиць, 25 рисунків, 344 посилань (з яких 237 – іноземних авторів).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Огляд літератури

В літературному огляді висвітлені сучасні засоби лікування герпетичної інфекції, наводяться основні принципи їх класифікації та описується механізм дії, вказані переваги та недоліки їх застосування. Особливу увагу приділено індукторам ІФН, описаних в окремому розділі. Охарактеризовано стан системи ІФН та інших цитокінів при герпетичній інфекції.

Розділ 2. Матеріали і методи досліджень

Компонентами МК були комерційний препарат дріжджової РНК та синтетичний препарат – 2,7-біс[2-(диетиламіно-етокси)-флуорен]-9-он дигідрохлорид (тилорон). У якості препаратів порівняння використовували стандартний протигерпетичний препарат клінічного використання – віролекс та еталонний індуктор α/β -ІФН – *poly(I)-poly(C)*.

Визначення максимально переносимої концентрації досліджуваних препаратів *in vitro* проводили з використанням культури клітин *Vero*, яку інкубували в 96-лункових плоскодонних платах 48 год. На добре сформований

моношар клітин вносили досліджувані препарати у варіюючих концентраціях. Відсоток життєздатних клітин визначали за допомогою їх фарбування трипановим синім згідно стандартної методики. За величину максимально переносимої концентрації (МПК) препарату приймали найбільше його розведення, яке спричиняло морфологічні зміни у 50 % моношару клітин.

Дослідження протигерпетичної дії препаратів in vitro проводили на інфікованій ВПГ-1 культурі клітин *Vero* за вказаними нижче схемами. Препарати до моношару клітин вносили в діапазоні концентрацій від 0,0002 до 0,4 МПК. Інфекційний титр ВПГ-1 визначали, відбираючи з лунок культуральне середовище з наступним титруванням вірусу на культурі клітин *Vero*. Титр вірусу оцінювали за методом Ріда і Менча (Иммунологическая диагностика вирусных инфекций, 1985).

Визначення мінімально активної концентрації досліджуваних препаратів по відношенню до ВПГ-1 *in vitro* проводили за двома схемами внесення препаратів до моношару клітин *Vero*: профілактичною – внесення за 24 год. та лікувальною – внесення через 24 год. після додавання ВПГ-1. Мінімально активну концентрацію (МАК) сполуки визначали як найменше розведення препарату, що захищало 50 % клітин від ВПГ-1, за наявності 100 % ЦПД вірусу в контролі.

Визначення хіміотерапевтичного індексу досліджуваних препаратів для моделі ВПГ-інфекції встановлювали за відношенням МПК до МАК препарату (Щербинська та ін., 2001).

Вивчення протигерпетичної дії досліджуваних препаратів in vivo проводили на моделі герпетичного менінгоенцефаліту у білих безпородних мишей та мишей лінії *BALB/c*. ВПГ-1 вводили тваринам інтрацеребрально, в дозі 10 ІД₅₀ /0,025 мл., досліджувані препарати – внутрішньоочередно. Дослідження проводили поетапно: на першому етапі вивчали протигерпетичну дію МК за профілактичною та терапевтичною схемами; на другому етапі – протигерпетичну дію МК в порівнянні із тилороном, віролексом та *poly(I)-poly(C)* за лікувальною схемою. У процесі проведення досліду враховували летальність тварин, розраховували середню тривалість їх життя (Пшеничнов и др., 1974), кратність захисту (КЗ) та індекс ефективності (ІЕ) досліджуваних препаратів (Щербинська та ін., 2001).

Визначення рівня реплікації ВПГ-1 у мозковій суспензії тварин, хворих герпетичним менінгоенцефалітом проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням тест-системи „АмпліСенс HSV-430” (для виявлення ДНК вірусу простого герпесу 1, 2 типу). Облік результатів ПЛР-аналізу здійснювали за наявністю чи відсутністю на електрофореграмі специфічних смуг ампліфікованої ДНК.

Отримання клітин селезінки мишей проводили гомогенізуючи селезінку в охолодженому середовищі. Суспензію отриманих у такий спосіб клітин фільтрували через 4-шаровий капроновий фільтр. Від еритроцитів клітини селезінки відмивали 10 % розчином NH₄Cl, після чого клітини осаджували центрифугуванням протягом 10 хв. при 1000 об/хв. Надосадову рідину зливали, а клітини розводили у середовищі 199 до концентрації 5×10⁶ кл/мл.

Індукцію інтерферону клітинами гепаринізованої крові та селезінки мишей проводили в 96-лункових планшетах. Для індукції α -ІФН використовували ридостин, γ -ІФН – розчин фітогемаглютиніну (ФГА), спонтанного ІФН – середовище 199. Титр ІФН визначали шляхом мікротитрування зразків на культурі клітин L₉₂₉ проти 100 ТЦД₅₀ вірусу-індикатора (ВВС) в умовах постійного рівня CO₂ (5%).

Індукцію фактору некрозу пухлин (ФНП) клітинами гепаринізованої крові та селезінки мишей здійснювали, обробляючи їх ліпополісахаридом (ЛПС) *Escherichia coli* 026:B6 L-2654. Титр індукованого ФНП визначали у біологічному тесті з використанням культури L₉₂₉ (Voitenok et al., 1989).

Отримання макрофагів перитонеального ексудату проводили вводячи 3 мл середовища 199 внутрішньоочередно у тушку миші. Шприцом з товстою голкою відсмоктували введене в порожнину середовище і центрифугували при 1500 об/хв. протягом 5 хв. Осад клітин розводили у середовищі 199 до концентрації 5×10^6 кл/мл.

Дослідження поглинальної активності макрофагів здійснювали з використанням інактивованих бактерій *Staphylococcus aureus* шт. 8325. Суспензію макрофагів (5×10^6 кл/мл) у середовищі 199 і бактерій у 0,15 М NaCl наносили на покривні скельця по 0,1 мл (співвідношення макрофагів і стафілококів 1:100) і розміщували у термостаті при $t = 37^\circ\text{C}$ з постійним рівнем CO₂ (5 %) 45 хв. Після промивки та висушування макрофаги фіксували метиловим спиртом та фарбували азур-еозином. Шляхом мікроскопіювання проводили огляд 100 макрофагів та розраховували: фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток макрофагів, що містять поглинуті бактерії від загальної кількості проглянутих клітин, фагоцитарне число (ФЧ) – середню кількість бактерій, поглинутих одним макрофагом, фагоцитарну активність (ФА), що визначалась шляхом ділення кількості поглинутих бактерій на 100 підрахованих клітин (Бутенко та ін., 2001).

Дослідження кисень-залежної бактерицидної активності макрофагів здійснювали цитоморфологічним методом в спонтанному та стимульованому тестах відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-сп та НСТ-ст відповідно). Шляхом мікроскопіювання проводили огляд 100 макрофагів та підраховували відсоток клітин, що містять темно-сині гранули диформагану. Розраховували величину функціонального бактерицидного резерву (ФР) фагоцитів – різницю між результатами НСТ-ст та НСТ-сп тестів (Спивак и др., 2002).

Математичну обробку отриманих результатів проводили із використанням t-критерію Стьюдента (Лакин, 1980), для статистичної обробки дискретних даних (результати титрування ІФН, ФНП) використовували метод Кербера у модифікації Ашмаріна (Ашмарин, Воробьев, 1962). Підрахунки проводили за допомогою IBM PC з використанням пакету програмних засобів Microsoft Excel.

Розділ 3. Результати та їх обговорення

Протигерпетична дія МК *in vitro*. Дослідження були проведені на культурі клітин *Vero*. Дріжджова РНК (високомолекулярний компонент МК)

сама по собі у всіх досліджених концентраціях виявилася практично позбавленою токсичності. Інший компонент МК – тилорон – виявився досить токсичним: його МПК склала 25 мкг/мл. У той же час поєднання тилорону та РНК у складі комплексного препарату МК супроводжувалося зменшенням його токсичності у 2 рази: величина МПК для МК склала 550 мкг/мл, відповідно МПК тилорону в складі комплексу – 50 мкг/мл. Щодо препаратів порівняння – віролексу та *poly(I)-poly(C)*, то величини їх МПК у даних дослідних умовах були однаково високими – 1000 мкг/мл.

Таким чином, у даній клітинній моделі цитотоксичність молекулярного комплексу, утвореного при взаємодії одноланцюгової РНК дріжджів з тилороном, у порівнянні з віролексом та *poly(I)-poly(C)* виявилась у 2 рази більшою. Це пояснюється високою токсичністю тилорону, яка в складі МК зменшувалася у 2 рази.

Наступним етапом досліджень було вивчення протигерпетичної активності МК та препаратів порівняння за профілактичною та лікувальною схемами в культурі клітин *Vero*, яка є досить чутливою до дії ВПГ-1.

Репродукція ВПГ-1 в умовах *in vitro* супроводжувалась деградацією моношару клітин, утворенням характерних багатоядерних клітин, що є проявом характерного ЦПД вірусу (рис.1).

Рис. 1. Цитодеструктивна дія ВПГ-1 на культурі клітин *Vero*.

(А – інтактні клітини, Б – інфіковані ВПГ-1 клітини; фарбування за Романовським, $\times 25$).

В результаті проведених досліджень було виявлено, що застосування МК та препаратів порівняння супроводжувалося достовірним зниженням репродукції ВПГ-1, незалежно від використаної схеми їх внесення. Мінімально активна концентрація МК становила 1,7 мкг/мл, тоді як для тилорону вона відповідала 0,3 мкг/мл. Було відмічено, що зниження репродукції ВПГ-1 на 2 ТЦД₅₀ викликає майже вдвічі нижча концентрація тилорону (0,17 мкг/мл) у складі комплексу, ніж за умови його самотійного застосування. Протигерпетичною дією в системі *Vero*-ВПГ-1 володів також і препарат *poly(I)-*

poly(C): величина його МАК, що викликала зниження репродукції ВПГ-1 на $2 \lg TCD_{50}$, становила 3,1 мкг/мл. Величина МАК для віролексу знаходилася у тому ж діапазоні, що і тилорону, та становила 0,4 мкг/мл.

Як було встановлено раніше (Карпов, Жолобак, 1995), МК в умовах *in vitro* є ефективним інтерфероногеном, активність якого вища, ніж його складових – дріжджової РНК та тилорону, у концентраціях, що відповідають такій у складі комплексу. Отримані показники протигерпетичної ефективності як МК, так і тилорону, вивчені в аналогічних умовах, виявилися практично однаковими. Оскільки, як відомо, клітини культуральної лінії *Vero* нездатні до продукції ІФН (Семенов и др., 1982), у виявленій протигерпетичній дії досліджених речовин відсутній вклад можливої активації системи ІФН. З огляду на це можна припустити, що виявлена нами в системі *Vero* – ВПГ-1 противірусна дія МК вірогідно пов'язана з дією тилорону безпосередньо на репродукцію вірусу. Саме здатність тилорону до інтеркаляції між парами азотистих основ подвійної спіралі ДНК (зокрема, ДНК ВПГ-1) може у даному випадку обумовлювати зупинку вірусної транскрипції і, як наслідок, зниження рівня репродукції ВПГ-1.

Виходячи із отриманих величин мінімально активних та максимально переносимих концентрацій нами були визначені ХТІ досліджуваних препаратів. Найвища величина цього показника виявлена у віролексу – 2500. ХТІ МК та *poly(I)-poly(C)* в системі *Vero* – ВПГ-1 виявилися однаковими – 324. Через високу токсичність найнижчий ХТІ у тилорону – 83. Тоді як у складі молекулярного комплексу даний показник для тилорону виявився у 3,5 разів вищим і становив 294.

Таким чином, найефективнішою речовиною у вказаній вище системі виявився віролекс. Трохи менше, хоча однаково ефективно, пригнічували репродукцію ВПГ-1 МК та *poly(I)-poly(C)*. Але з огляду на комплексність дії МК (безпосередньо протигерпетичну та імуномодулюючу), а також на високу вартість як віролексу, так і *poly(I)-poly(C)*, перспективність МК у якості протигерпетичного засобу стає більш обґрунтованою. Виходячи з цієї обставини, що механізми противірусної дії МК та віролексу принципово різні, також відкриваються можливості поєднаного застосування цих агентів з метою підсилення протигерпетичного ефекту.

Дія МК при герпетичній інфекції *in vivo*. Були проведені дослідження впливу МК на перебіг експериментальної герпетичної інфекції *in vivo*, що створювалась різними способами (внутрішньомозкове та внутрішньоочеревне введення вірусу). В результаті було встановлено, що МК за умов розвитку як енцефаліту, так і системної інфекції, виявив досить суттєву антигерпетичну дію (рис. 2). При внутрішньоочеревному введенні ВПГ-1 спостерігалась 45 % смертність тварин контрольної групи, при цьому у групі тварин, що отримували МК за профілактичною схемою смертність була на рівні 35 % ($p > 0,05$), а у групі тварин, що отримували МК за терапевтичною схемою – на рівні 5 % ($p < 0,05$). Внутрішньомозкове введення вірусу призводило до 90 % смертності тварин. Введення МК як за профілактичною, так і терапевтичною схемами понизило смертність тварин (летальність 60%, $p < 0,05$ %; летальність – 20%, p

< 0,05 відповідно). Отримані дані свідчать щодо більш ефективної противірусної дії МК при терапевтичному застосуванні препарату.

Рис 2. Летальність білих безпородних мишей при експериментальній герпетичній інфекції (тваринам ВПГ-1 вводили: 1 – інтрацеребрально; 2 – інтраперитоніально).

Як відомо ВПГ пригнічує здатність клітин до індукції ІФН в організмі (Ершов, Новохатский, 1980). Це ж спостерігалось і в наших дослідженнях як при розвитку менінгоенцефаліту, так і системної герпетичної інфекції (рис. 3).

Рис. 3. Вплив МК на рівень сироваткового ІФН при внутрішньомозковому (А) та внутрішньочеревному (Б) способах інфікування тварин ВПГ-1: рівні сироваткового ІФН: 1 – інтактних мишей, 2 – контрольних інфікованих тварин, 3– тварин, що отримували МК за добу до інфікування; 4 – тварин, що отримували МК через добу після інфікування.

Введення мишам МК за профілактичною схемою при обох способах моделювання герпетичної інфекції викликало суттєве короткочасне підвищення рівня ІФН в крові з максимумом на четверту добу (480 МО/мл) після чого титр ІФН повільно знижувався. На відміну від цього, введення МК за терапевтичною схемою супроводжувалося прогресивним підвищенням рівня сироваткового ІФН, яке досягало максимуму на 5-7 добу інфекції (максимальний титр ІФН становив 680 МО/мл).

Судячи з динаміки рівнів сироваткового ІФН в крові інфікованих мишей, у противірусній дії МК досить суттєву роль відіграє система ІФН. Як і у випадку РНК-вмісних вірусів, МК, індукуючи утворення ІФН в організмі (Карпов и др., 1997; Карпов et al., 2001), може в такий спосіб здійснювати інгібіцію продукції ВПГ-1. Саме внаслідок описаного явища може, головним

чином, відбуватися зменшення смертності інфікованих тварин, яке спостерігалось у дослідах

Таким чином, МК за умов розвитку як енцефаліту, так і системної герпетичної інфекції, виявив досить суттєву противірусну дію, причому вона спостерігалася переважно при терапевтичному застосуванні препарату.

Противірусна дія МК на моделі герпетичного менінгоенцефаліту. У попередніх експериментах МК показав найсуттєвіший протигерпетичний ефект при терапевтичній схемі введення, а ВПГ-1 призводив до 100% загибелі мишей при інтрацеребральному введенні вірусу. Тому мету подальшого дослідження склало вивчення противірусної дії МК на моделі герпетичного менінгоенцефаліту у порівнянні із тилороном, який є складовою частиною МК, віролексом (стандартний протигерпетичний препарат) та *poly(I)-poly(C)* (еталонний індуктор $\alpha\beta$ -ІФН).

У групі тварин, які отримували МК відмічалась у 5 разів нижча смертність, ніж у групі контрольних інфікованих тварин (100%) (табл. 1). У групі мишей, яким вводили тилорон у дозі, що відповідала його вмісту в МК, смертність тварин була в 2,5 разів вищою і становила 50%. Терапевтична ефективність препаратів порівняння (віролекс, *poly(I)-poly(C)*) у цих дослідах виявилася практично однаковою: смертність тварин склала 40%.

Таблиця 1

Захисна дія досліджуваних препаратів при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті

№ п/п	Препарат	Доза, мг/кг	Летальність тварин, %	p	КЗ	ІЕ, %
1	МК	1,46	20	<0,001	5,0	80
2	Тилорон*	0,13	50	<0,001	2,0	50
3	Віролекс	100,00	40	<0,001	2,5	60
4	<i>Poly(I)-poly(C)</i>	0,66	40	<0,001	2,5	60
5	Контрольні інфіковані тварини	–	100	–	–	–

*Доза тилорону відповідала його вмісту в МК

Дослідження прямої захисної дії МК на основі розрахунку КЗ підтвердило його високу ефективність при герпетичному менінгоенцефаліті (КЗ = 5,0). У той же час КЗ тилорону, що застосовувався у концентрації, яка відповідала його вмісту в МК була у 2,5 разів меншою. Для препаратів *poly(I)-poly(C)* та віролексу КЗ виявилась у 2 рази меншою, ніж для МК.

Величина показника ІЕ у випадку МК досягала величини 80, у той час, як для препаратів порівняння (віролекс, *poly(I)-poly(C)*) даний показник відповідав гранично допустимим значенням (ІЕ = 60). ІЕ тилорону (ІЕ = 50) не відповідав вимогам щодо достовірності противірусної активності препарату.

Середня тривалість життя контрольних інфікованих мишей при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті складала 6,86 доби. У той же час у тварин, які отримували МК, середня тривалість життя була значно

більшою (10,63 доби, $p < 0,001$). Трохи нижчим цей показник виявився в групі тварин, які отримували тилорон – 8,69 доби ($p < 0,001$) та *poly(I)-poly(C)* – 8,11 доби ($p < 0,001$). Середня тривалість життя тварин, яким вводили віролекс, достовірно не відрізнялась від контрольної групи тварин і склала 6,93 доби ($p > 0,05$).

Для більш поглибленого вивчення протівірусної дії досліджуваних препаратів нами була проведена оцінка їх протівірусної активності в динаміці, починаючи з дня загибелі 50 % тварин в контрольній інфікованій групі (6-й день) (рис.4).

Найбільший рівень захисту від ВПГ-1 (100 %) був зафіксований протягом 6-9-тої доби після інфікування у групі тварин, які отримували МК. Тварини, яким вводили тилорон у дозі, що відповідала його вмісту в МК, найбільший рівень захисту (81 %) мали на 8 добу після інфікування ВПГ-1. У групі тварин, які отримували *poly(I)-poly(C)*, найбільший рівень захисту (70%) спостерігався на 9-11 добу після інфікування тварин ВПГ-1. Тварини, що отримували віролекс мали найбільший рівень захисту (65%) протягом 9-10 доби від дня інфікування.

Рис. 4. Динаміка зміни рівня захисту тварин при експериментальному гер-петичному менінго-енцефаліті під дією досліджуваних сполук.

В контрольній групі інфікованих тварин відсоток захисту прогресивно зменшувався і на 9-ту добу спостерігалась 100 % летальність мишей. На 12 добу з моменту інфікування тварин відсоток захисту у всіх досліджуваних групах стабілізувався і залишався постійним до кінця експерименту: у групі тварин, що отримували МК – 80%, тилорон – 50%, *poly(I)-poly(C)* та віролекс – 60%, група контрольний інфікованих тварин – 0%.

Щоб дослідити рівень реплікації ВПГ-1 у мозковій тканині інфікованих тварин застосовували метод ПЛР. В результаті проведених досліджень було виявлено, що під дією МК рівень реплікації ВПГ-1 в тканинах мозку тварин істотно знижувався (рис. 5).

У групі контрольних інфікованих тварин рівень ВПГ-1 в мозковій тканині становив 5 lg LD₅₀, тоді як введення МК знижувало рівень реплікації даного вірусу на 4 lg; тилорон, віролекс та *poly(I)-poly(C)* призводили до пониження рівнів реплікації ВПГ-1 на 2 lg.

А	Б
---	---

Рис. 5. ПЛР-аналіз рівнів ВПГ-1 у мозковій тканині тварин на 6-ту добу після інфікування.

(А: 1 – негативний контроль ПЛР; 2-9 – розведення мозкової суспензії (МС) мишей інфікованих ВПГ-1: 2, 4, 6, 8 – розведення – 10^{-3} ; 3, 5, 7, 9 – розведення 10^{-4} ; 2, 3 – МС контрольної інфікованої групи тварин; 4, 5 – МС групи тварин, яким вводили МК; 6, 7 – МС групи тварин, яким вводили *poly(I)-poly(C)*; 8, 9 – МС групи тварин, яким вводили віролекс; 10 – позитивний контроль ПЛР (430 п.н.).

Б: 1 – негативний контроль ПЛР; 2-5 – розведення МС мишей інфікованих ВПГ-1: 2, 3 – розведення – 10^{-5} , 10^{-6} відповідно; 4, 5 – розведення 10^{-1} , 10^{-2} відповідно; 2, 3 – МС контрольної інфікованої групи тварин; 4, 5 – МС групи тварин, яким вводили МК; 6 – позитивний контроль ПЛР (430 п.н.).

Підсумовуючи дані, отримані у цій серії експериментів, слід зазначити, що найвищу протигерпетичну ефективність серед досліджуваних препаратів виявив МК. У групі тварин, які отримували МК спостерігалась найбільша середня тривалість життя, найвищий відсоток захисту, найнижча смертність та найменший рівень реплікації ВПГ-1 протягом всього періоду проведення експерименту.

Цитокіновий статус тварин при експериментальній герпетичній інфекції. Наступним етапом наших досліджень було вивчення динаміки рівнів ІФН у сироватці крові та продукції ІФН та ФНП клітинами крові та селезінки мишей, інфікованих ВПГ-1.

Введення тваринам МК призводило до підвищення рівня як сироваткового (рис. 6), так і спонтанного та α -ІФН в досліджуваних зразках. Після дворазового введення МК рівень сироваткового ІФН герпес-інфікованих тварин становив 3200 од. акт./мл, рівень спонтанного ІФН в крові та спленоцитах склав 320 од. акт./мл, а рівень α -ІФН – 640 од. акт./мл. Дані показники у групі контрольних інфікованих тварин були на досить низькому рівні навіть на 2 добу після зараження ВПГ-1 і до кінця експерименту постійно понижувались. Зокрема на 9 добу, після інфікування титр сироваткового ІФН в контрольній групі інфікованих тварин складав 100 од. акт./мл, рівень спонтанного та α -ІФН в крові та спленоцитах був на рівні 10 од. акт./мл.

Динаміка продукції вказаних ІФН під дією тилорону та стандартного індуктора ІФН *poly(I)-poly(C)* була подібною з МК, але титри ІФН були у 2 рази нижчими. У тварин, яким вводили віролекс, рівень ІФН достовірно не відрізнявся від контрольної групи інтактних тварин.

Рис. 6 Динаміка продукції ІФН в сироватці крові мишей лінії *BALB/c* при герпесвірусному менінгоенцефаліті

Відомо, що контроль над вірусною інфекцією у значній мірі залежить від синтезу γ -ІФН, який протягом довгого часу присутній у гангліях ВПГ-інфікованих тварин і використовується $CD8^+$ Т-клітинами для пригнічення реактивації ВПГ-1 (Desman et al., 2005). Гама-ІФН регулює та відновлює баланс між Т-хелперами I та II типу, а також пригнічує продукцію ІЛ-10, який у свою чергу пригнічує синтез α -ФНП і тим самим сприяє зменшенню гострої запальної реакції, що здійснює руйнівну дію на організм (Cottrez et al., 2000).

Інфекція, викликана ВПГ-1, супроводжувалась зниженням продукції γ -ІФН клітинами крові та спленоцитами (рис. 7).

Рис. 7. Вплив досліджуваних сполук на рівень індукованого γ -ІФН у крові (А) та спленоцитах (Б) ВПГ-1-інфікованих тварин (позначення ті ж, що і на рис. 6).

На 9 добу після зараження вірусом у групі контрольних інфікованих тварин рівень γ -ІФН становив 40 та 20 од. акт./мл у крові та спленоцитах відповідно. Таке зниження продукції γ -ІФН можна розглядати як результат дії ВПГ-1, спрямований на пригнічення антивірусних клітинних механізмів.

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. Високі титри індукованого γ -ІФН, після введення МК у даній групі тварин свідчать про ефективну регуляцію балансу Th1/Th2 і його відновлення.

При введенні тилорону та *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 не спостерігалось статистично достовірної індукції ІФН у крові та у спленоцитах в порівнянні з групами контрольних тварин.

Таким чином, розвиток експериментальної герпетичної інфекції супроводжувався зменшенням рівня сироваткового ІФН, який є показником його кумулятивної продукції в організмі. Також відбувалось зниження спонтанного ІФН, що продукується лейкоцитами крові. Клітин крові та селезінки ВПГ-1-інфікованих мишей мали меншу здатність до продукції індукованого α - та γ -ІФН. 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. Можливо, саме через індукцію ІФН МК, головним чином, здійснює інгібіцію продукції ВПГ-1, що приводить до відповідного зменшення смертності інфікованих тварин, показаної вище.

В патогенезі захворювань центральної нервової системи, викликаних вірусами групи герпесу, значну роль відіграє ФНП, від рівня якого залежить завершення або загострення запального процесу. Тому наступним етапом нашої роботи було визначення динаміки рівня ФНП в крові та його індукції спленоцитами у перебігу герпесвірусного менінгоенцефаліту при введенні тваринам МК та препаратів порівняння (рис.8).

Рис. 8. Рівень індукованого ФНП у крові (А) та спленоцитах (Б) ВПГ-1-інфікованих тварин (позначення ті ж, що і на рис. 6).

Вивчення рівня стимульованої продукції α -ФНП клітинами крові інфікованих тварин показало, що одноразове введення МК викликало збільшення рівня вказаного цитокіну на 2 добу після зараження ВПГ-1 на 15 % ($p < 0,05$), що є свідченням прозапальної дії α -ФНП, яка спрямована на елімінацію патогену і завершення інфекційного процесу. У групі контрольних інфікованих тварин здатність клітин крові до стимульованої продукції α -ФНП на 2 добу після зараження ВПГ-1 була на рівні інтактних мишей. У тварин, що отримували тилорон, *poly(I)-poly(C)* та віролекс, на початкових етапах інфекції спостерігалось незначне зростання ФНП-продукуючої активності клітин

моноцитарно-макрофагального ряду з поступовим зниженням цього показника на 6 – 9 добу після інфікування ВПГ-1 до рівня інтактних тварин.

В організмі контрольних інфікованих мишей продукція ФНП протягом всіх днів спостереження зростала: від 41 до 61% в крові та від 45 до 51% в спленоцитах. Ці факти можуть свідчити про розвиток гострої запальної реакції, результатом чого є ріст смертності тварин цієї групи.

Отже, у групі контрольних інфікованих тварин рівень індукованого α -ФНП клітинами крові та селезінки прогресивно зростав протягом усього періоду спостереження, віддзеркалюючи тим самим інтенсивність розвитку запального процесу та його переходу у незворотну стадію. Введення тваринам МК викликало різке зростання рівня стимульованого α -ФНП у перші дні розвитку експериментального герпетичного менінгоенцефаліту та наступне поступове зниження його показників до рівня інтактних тварин. Ці дані, у свою чергу, можуть свідчити щодо ефективності прозапальної дії ФНП, індукованого під впливом МК, на початкових стадіях розвитку герпетичної інфекції та її завершення.

Макрофагальна ланка імунітету при герпетичному менінгоенцефаліті. На даному етапі роботи вивчали вплив МК та препаратів порівняння на показники активності макрофагів перитонеального ексудату (МФПЕ) при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті.

Розвиток герпетичної інфекції викликав прогресуюче зниження кількості фагоцитуючих макрофагів, їх поглинальної здатності та загальної фагоцитарної активності (рис. 9).

Рис. 9. Фагоцитарний індекс (А) та фагоцитарне число (Б) перитонеальних макрофагів тварин, хворих на герпетичний менінгоенцефаліт (позначення ті ж, що і на рис. 6).

На 9 добу після інфікування ВПГ-1 МФПЕ тварин контрольної групи мали такі показники поглинальної активності: ФІ = 14 %, ФЧ = 1,43, ФА = 0,2. Після дворазового введення мишам МК спостерігали достовірне зростання величин ФІ, ФЧ та ФА макрофагів. На 9 добу розвитку герпетичного менінгоенцефаліту ФІ МФПЕ тварин даної групи був у 6 разів більшим, ФЧ – у 12, а ФА – у 76 разів більшою, порівняно з контрольною групою інфікованих тварин.

Застосування тилорону та *poly(I)-poly(C)* за ефективністю було близьким до МК, але числові значення досліджуваних показників поглинальної

активності МФПЕ були дещо нижчими у тварин, які отримували віролекс, ФІ, ФЧ і ФА МФПЕ статистично не відрізнялись від інтактних тварин.

Отже, виявлене пригнічення поглинальної здатності макрофагів на фоні розвитку герпетичного менінгоенцефаліту у мишей компенсувалося як МК, так і тилороном, віролексом та *poly(I)-poly(C)*. Але, у той час, як стандартний протигерпетичний препарат віролекс істотно не впливав на досліджені вище показники, індуктори ІФН – МК, тилорон та *poly(I)-poly(C)* активували всі сторони фагоцитарного процесу, викликаючи суттєве зростання кількості фагоцитуючих макрофагів, їх поглинальної здатності та загальної фагоцитарної активності.

Важливою характеристикою функціональної здатності клітин фагоцитарної системи є їх бактерицидна активність, обумовлена процесами регуляції респіраторного вибуху і синтезу реактогенних метаболітів кисню в результаті активації НАДФН-оксидази. Для характеристики метаболічної активності макрофагів використовували показники НСТ-сп та НСТ-ст тестів та розраховували показник функціонального резерву макрофагів.

В результаті проведених досліджень було виявлено, що розвиток ВПГ-інфекції пригнічував процеси респіраторного вибуху та синтезу реактогенних метаболітів кисню у перитонеальних макрофагах експериментальних тварин (табл. 2).

Таблиця 2

Кисеньзалежна бактерицидна активність перитонеальних макрофагів при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті

№ п/п	Препарат	Доба після інфікування ВПГ-1			
		2	4	6	9
		Показники окислювальної активності, %			
		НСТ-сп (верхній ряд)		НСТ-ст (нижній ряд)	
1	МК	60,33±0,36	61,67±0,36	64,33±0,30	64,33±0,22
		75,00±0,28	80,67±0,30	79,66±0,22	82,00±0,43
2	Тилорон	51,66±0,22	52,67±0,43	54,00±0,36	54,67±0,42
		60,00±0,33	63,34±0,28	68,33±0,14	71,00±0,30
3	<i>Poly(I)-poly(C)</i>	61,00±0,38	61,00±0,28	61,67±0,36	64,00±0,14
		74,00±0,38	77,67±0,08	80,00±0,43	80,67±0,57
4	Віролекс	21,00±0,14	20,33±0,30	22,67±0,50	17,67±0,36
		28,00±0,14	27,66±0,36	27,67±0,36	25,34±0,22
5	Контрольні інфіковані тварини	16,33±0,22	13,33±0,22	8,00±0,14	5,00±0,28
		16,67±0,08	14,33±0,30	8,33±0,08	5,67±0,30
6	Інтактні тварини	20,00±0,28	20,67±0,50	21,67±0,50	19,67±0,36
		27,33±0,08	25,34±0,22	27,67±0,22	25,00±0,38

Введення тваринам МК та *poly(I)-poly(C)* достовірно підвищувало ефекторний потенціал системи фагоцитів: на 2 добу після інфікування ВПГ-1

показники спонтанного НСТ-тесту вказаних груп дослідних тварин достовірно збільшились на 44% ($p < 0,05$), а стимульованого НСТ-тесту – на 58 % ($p < 0,05$) порівняно з контрольною ВПГ-1-інфікованою групою.

Тилорон, який вводили тваринам у дозі, що відповідала його вмісту в МК також призводив до зростання вказаних вище показників, але вони були на 10 % нижчі, ніж у групі тварин, які отримували МК.

Віролекс компенсував пригнічуючу дію ВПГ-1-інфекції на досліджувані показники фагоцитарної системи до рівня інтактних тварин. Протягом всього періоду спостереження в даній групі тварин показники НСТ-сп та НСТ-ст тестів в середньому були на рівні 20 та 27% ($p > 0,05$) відповідно, що достовірно не відрізнялось від аналогічних показників у групі інтактних тварин.

Таким чином, виявлене пригнічення макрофагальної ланки імунітету на фоні розвитку герпетичного менінгоенцефаліту у мишей компенсувалося як МК, так і препаратами порівняння – тилороном, віролексом та *poly(I)-poly(C)*. Введення тваринам МК призводило до істотного стійкого підвищення поглинальної здатності перитонеальних макрофагів та їх метаболічної активності. Можливо саме тривала і значна активація функціональної активності та кисеньзалежних процесів у перитонеальних макрофагах тварин, що отримували МК, зумовила показаний раніше високий рівень їх виживання.

ВИСНОВКИ

1. Доведено, що молекулярний комплекс дріжджова РНК-тилорон має суттєву антигерпетичну дію в умовах його використання *in vivo* при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті. Ця дія, виходячи з показників виживання інфікованих тварин (80%), перевищує показники тилорону, який використовувався у дозі, що відповідала його вмісту в МК (50%), стандартного антигерпетичного засобу віролексу (60%) і стандартного індуктора ІФН *poly(I)-poly(C)* (60%). При цьому в групі контрольних інфікованих тварин летальність була на рівні 100%.

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). При застосуванні тилорону у концентрації, що відповідала його вмісту в МК дані показники були у 2 рази меншими.

3. Виявлено, що введення молекулярного комплексу ВПГ-інфікованим тваринам приводить до зменшення рівнів ФНП у крові та спленоцитах до рівня інтактних тварин (38 та 29 % у крові та спленоцитах відповідно), що говорить про ефективну прозапальну дію даного цитокіну на початкових стадіях розвитку герпетичної інфекції та її завершення.

4. Показано, що в умовах експериментальної ВПГ-1 інфекції молекулярний комплекс активує неспецифічну ланку імунітету, викликаючи зростання кількості фагоцитуючих макрофагів (ФІ = 87%), їх поглинальної здатності (ФЧ = 18), загальної фагоцитарної активності (ФА = 15), а також

підвищує бактерицидні функції макрофагів (НСТ-сп – 64%, НСТ-ст – 82%, ФР – 18%).

5. Доведено, що в умовах *in vitro* молекулярний комплекс пригнічує репродукцію ВПГ-1 в інфікованій культурі клітин *Vero* (МАК МК становила 1,7 мкг/мл). Тилорон, який є складовою частиною МК також пригнічував репродукцію ВПГ-1 *in vitro*, але його ефективність була у 2 рази меншою (МАК тилорону – 0,3 мкг/мл, МАК тилорону у складі МК – 0,15).

6. В дослідях *in vitro* на культурі клітин *Vero*, інфікованій ВПГ-1 хіміотерапевтичний індекс МК склав величину 324, що дозволяє розглядати цей комплекс як перспективний протигерпетичний препарат. Хіміотерапевтичний індекс тилорону, який є складовою частиною МК виявився у 4 рази нижчим і склав величину 83.

СПИСОК РОБИТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив комплексного індуктора інтерферону на експериментальну герпетичну інфекцію / О.І. Скроцька, Н.М. Жолобак, О.В. Карпов [та ін.] // Доп. НАН України. – 2005. – № 5. – С.164-166. (Здобувачем самостійно проведено аналіз літератури, виконана експериментальна частина роботи з вивчення впливу МК на смертність інфікованих тварин).
2. Продукція фактору некрозу пухлин при експериментальній герпетичній інфекції на фоні застосування комплексного індуктора інтерферону МК / О.І. Скроцька, Н.М. Жолобак, З.М. Олевінська [та ін.] // Імунологія та алергологія. – 2005. – № 2. – С.45-47. (Здобувачем самостійно виконана експериментальна частина роботи по створенню герпетичної інфекції, визначено індекс цитотоксичності препаратів, проведено статистичний аналіз результатів).
3. Ефективність комплексу дріжджова РНК-тилорон при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті / О.І. Скроцька, Н.М. Жолобак, С.В. Антоненко [та ін.] // Доп. НАН України. – 2006. – № 3. – С.181-184. (Здобувачем самостійно проведено аналіз літератури, визначено показники тривалості життя інфікованих тварин, кратності захисту та індексу ефективності препаратів, проведено статистичний аналіз результатів).
4. Макрофагальна ланка імунітету при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті / О.І. Скроцька, Н.М. Жолобак, М.Я. Співак, О.В. Карпов // Науковий вісник Чернівецького університету: Збірник наукових праць. – 2006. – Вип. 297: Біологія. – С.127-131. (Здобувачем самостійно виконано експериментальну частину роботи з вивчення впливу МК на поглинальну та кисень-залежну бактерицидну активність перитонеальних макрофагів, підготовлено матеріали статті до друку).
5. Протигерпетична дія молекулярного комплексу РНК-тилорон у культурі клітин / О.І. Скроцька, Н.М. Жолобак, С.В. Антоненко [та ін.] // Мікробіологічний журнал. – 2007. – Т.69, № 3. – С.62-68. (Здобувачем самостійно проведена експериментальна частина роботи по визначенню протигерпетичної активності досліджуваних препаратів *in vitro*).

6. Шевчук О.И. Действие комплексного индуктора интерферона на организм при герпесвирусной инфекции / О.И Шевчук, Н.О. Марченко, А.В. Карпов // Биология – наука XXI века: 7-я Пущинская школа-конференция молодых ученых, 14-18 апреля, 2003 г.: сб. тезисов. – Пушино, 2003. – С.49.
7. Шевчук О.И. Дія молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон на організм при експериментальній герпетичній інфекції / О.И. Шевчук, О.В. Карпов, С.В. Антоненко // Біоресурси і віруси: IV міжнародна конференція, 27-30 вересня 2004 р.: зб. Тез. – К., 2004. – С. 27.
8. Вивчення дії комплексного індуктора інтерферону при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті / О.И. Скроцька, Н.М. Жолобак, С.В. Антоненко, О.В. Карпов // Основи молекулярно-генетичного оздоровлення людини і довкілля: міжнародний форум, 31 травня – 1 червня 2005 р.: матеріали форуму. – К., 2005. – С. 188-190.
9. Скроцька О.И. Вплив молекулярного комплексу дріжджова РНК-тилорон на цитокіновий профіль експериментальних тварин при герпетичній інфекції / О.И. Скроцька, О.В. Карпов, Н.М. Жолобак // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: VI Національний з'їзд фармацевтів України, 28-30 вересня 2005 р.: матеріали з'їзду. – Х., 2005. – С. 363-364.
10. Противовирусная активность молекулярного комплекса дрожжевая РНК-тилорон на модели герпесвирусной инфекции *in vitro* / О.И. Скроцкая, Н.М. Жолобак, Н.Я. Спивак, А.В. Карпов // Биология – наука XXI века: 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН, 17-21 апреля 2006 г.: сб. тезисов. – Пушино, 2006. – С.396.
11. Вірусінгібуюча дія комплексного індуктору інтерферонів I типу *in vivo* при експериментальній герпетичній інфекції / О.И. Скроцька, Н.М. Жолобак, С.В. Антоненко [та ін.] // Біоресурси і віруси: V міжнародна конференція, 10-13 вересня 2007 р.: зб. Тез. – К., 2007. – С. 134.

АНОТАЦІЯ

Скроцька О.И. Противірусна дія молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон при експериментальній ВПГ-1-інфекції. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2008.

Дисертація присвячена дослідженню дії молекулярного комплексу дріжджова РНК – тилорон (МК) на перебіг інфекції, викликаной вірусом простого герпесу I типу (ВПГ-1) в умовах *in vitro* та *in vivo*.

В умовах *in vitro* на культурі клітин *Vero* виявлена протигерпетична дія МК, не пов'язана із активацією системи ІФН. Хіміотерапевтичний індекс МК на культурі клітин *Vero*, інфікованій ВПГ-1, склав величину 324, що дозволяє розглядати цей комплекс як перспективний протигерпетичний препарат.

При дослідженні молекулярного комплексу в умовах *in vivo* при експериментальному герпетичному менінгоенцефаліті виявлений суттєвий протівірусний ефект вказаної сполуки. Встановлено, що при терапевтичному застосуванні МК знижувався рівень летальності інфікованих тварин на 80 % порівняно з контролем. Величина кратності захисту МК при експериментальному герпесвірусному менінгоенцефаліті склала 5, а індекс ефективності досяг величини 80.

Виявлена здатність МК впливати на показники цитокінового статусу тварин, інфікованих ВПГ-1. Використання МК призводило до підвищення рівнів різних типів інтерферонів: сироваткового ІФН до 3200 од. акт./мл, спонтанного ІФН до 320 од. акт./мл, α -ІФН до 640 од. акт./мл, Величини рівнів γ -ІФН збільшувалися до 640 та 320 од. акт./мл в крові та спленоцитах, відповідно. При цьому рівні фактору некрозу пухлин зменшувались до рівня інтактних тварин (38 та 29 % у крові та спленоцитах відповідно).

Показано, що при застосуванні МК в умовах експериментального герпетичного менінгоенцефаліту відбувається активація макрофагальної ланки імунітету: зростає кількість фагоцитуючих макрофагів ($\Phi I = 87 \%$), їх поглинальна здатність ($\Phi Ч = 18$), загальна фагоцитарна активність ($\Phi А = 15$), а також підвищуються бактерицидні функції макрофагів (НСТ-спонтанний – 64%, НСТ-стимульований – 82 %, $\Phi Р = 18 \%$).

Ключові слова: дріжджова РНК, тилорон, протівірусна дія, вірус простого герпесу I типу, герпетичний менінгоенцефаліт, цитокіни, інтерферон, фактор некрозу пухлин, цитотоксичність.

АНОТАЦІЯ

Скροцкая О.И. Противовирусное действие молекулярного комплекса дрожжевая РНК – тилорон при экспериментальной ВПГ-1-инфекции. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2008.

Диссертация посвящена исследованию действия молекулярного комплекса дрожжевая РНК – тилорон на ход инфекции, вызванной вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Установлено, что в составе комплекса с дрожжевой РНК токсичность тилорона *in vitro* снижается в 2 раза. Максимально переносимая концентрация (МПК) тилорона, бравшегося отдельно, для культуры клеток *Vero* составила 25 мкг/мл, в то же время объединение молекул РНК и тилорона в молекулярный комплекс приводило к повышению величины МПК тилорона в 2 раза.

В условиях *in vitro* на модели культуры клеток *Vero* доказано наличие противогерпетического действия МК, не связанного прямо с активацией системы ИФН, поскольку данная культура клеток не способна к индукции ИФН. Минимально активная концентрация МК в отношении ВПГ-1 *in vitro* составляла 1,7 мкг/мл. Химиотерапевтический индекс МК на культуре клеток *Vero*, инфицированной ВПГ-1, составил величину 324, что позволяет

рассматривать данный комплекс как перспективный противогерпетический препарат.

Изучено влияние молекулярного комплекса *in vivo* на ход экспериментального герпетического менингоэнцефалита. Установлено, что терапевтическое применение МК в 5 раз снижает летальность инфицированных экспериментальных животных в сравнении с контролем. Средняя продолжительность жизни инфицированных животных составила 6,86 суток. В то же время у животных, получавших МК, средняя продолжительность жизни была в 1,5 раза больше. Величина кратности защиты МК при экспериментальном герпетическом менингоэнцефалите составила 5, а индекс эффективности достигал уровня 80.

Установлено, что МК влияет на показатели цитокинового статуса животных, инфицированных ВПГ-1. Терапевтическое использование МК повышало 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. При этом уровни провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли – на протяжении всего срока наблюдения за инфицированными животными уменьшались от 53 до 38 % и от 32 до 29 % в крови и спленоцитах соответственно.

Показано, что при использовании МК в условиях экспериментального герпетического менингоэнцефалита происходит активация макрофагального звена иммунитета. Увеличивается количество фагоцитирующих макрофагов (ФИ = 87 %), их поглотительная способность (ФЧ = 18), общая фагоцитарная активность (ФА = 15), а также повышаются бактерицидные функции макрофагов (НСТ - спонтанный – 64%, НСТ - стимулированный – 82%, ФР – 18 %).

Ключевые слова: дрожжевая РНК, тилорон, противовирусное действие, вирус простого герпеса I типа, герпетический менингоэнцефалит, цитокины, интерферон, фактор некроза опухолей, цитотоксичность.

ABSTRACT

Skrots'ka O.I. Antiviral activity of a molecular complex containing RNA and tilorone against experimental herpes simplex virus infection. – Manuscript.

The candidate degree thesis by speciality 03.00.06 – virology. Taras Shevchenko' Kyiv National University, Kyiv, 2008.

Dissertation deals with investigations concerning the effect of a molecular complex containing RNA and tilorone (MC) on the course of the infection caused by herpes simplex virus type I in *in vitro* and *in vivo*.

Antiherpetic MC activity non-dependent on the IFN system effect has been demonstrated in *in vitro* conditions in *Vero* cell culture. The MC chemiotherapeutic index in HSV-1 infected *Vero* cell culture is 324 – a fact permitting to research this complex as a promising antiherpetic drug.

This compound demonstrate a marked antiviral activity *in vivo* on a model of experimental murine herpetic encephalomyelitis. The MC is shown to decrease the

lethality level of infected animals by 80 %. The defense coefficient of the MC for experimental herpetic meningoencephalomyelitis is 5, the affectivity index having been reached up to 80.

The author has detected the MC ability to influence on the characteristics of cytokine status of infected animals. The MC used led to the increase of different types of interferons (IFNs) levels, serum IFN having been reached 3200 u/ml, concentrations of spontaneous IFN and α -IFN having become 320 and 640 u/ml, respectively. γ -IFN having become 640 and 320 in blade and splenocytes, respectively. In this case the tumor necrosis factor levels have decrease up to intact animal levels (38 and 29 % in blade and splenocytes, respectively).

The MC use in experimental herpetic meningoencephalomyelitis has led to the activation of macrophagal immunity link: phagocytic macrophages quantity increases (PhI = 87%), their absorbing ability becomes higher (PhA = 15), bactericide macrophage functions increase (NTTs spontaneous – 64%, NTTs stimulated – 82%).

Key words: yeast RNA, tilorone, antiviral activity, herpes simplex virus type I, herpetic meningoencephalomyelitis, cytokines, interferon, tumor necrosis factor, cytotoxycity.