



ІМУНОЛОГІЯ ТА АЛЕРГОЛОГІЯ

2' 2005

ПРОДУКЦІЯ ФАКТОРУ НЕКРОЗУ ПУХЛИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГЕРПЕТИЧНІЙ ІНФЕКЦІЇ НА ФОНІ ЗАСТОСУВАННЯ КОМПЛЕКСНОГО ІНДУКТОРА ІНТЕРФЕРОНУ МК

*Скроцька О.І., Жолобак Н.М., Олевінська З.М., Співак М.Я.,

*Карпов О.В., Лазаренко Л.Н.

*Український державний університет харчових технологій

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України

В попередніх дослідженнях показано, що запропонований нами інтерфероніндукуючий молекулярний комплекс (МК), справляє інгібуючу дію відносно ряду РНК-вмісних вірусів: вірусу везикулярного стоматиту, вірусу енцефаломіокардиту мишей, вірусу венесуельського енцефаломієліту коней [1]. Вірус простого герпесу (ВПГ-1) відіграє головну етіологічну роль у виникненні енцефаліту, менінгіту та менінгоенцефаліту вірусної природи [2]. У патогенезі цих захворювань важливе місце займають прозапальні цитокіни, насамперед - фактор некрозу пухлин (ФНП- α), який розглядається як їх патогенетичний фактор [3].

Визначення впливу МК на імунологічні показники, зокрема на продукцію прозапальних цитокінів, за умов експериментального менінгоенцефаліту, викликаного ВПГ-1, може бути обґрунтуванням його подальшого дослідження як противірусного препарату на моделях інфекцій, зумовлених іншими ДНК-вмісними вірусами.

Метою даної роботи було вивчення впливу МК на продукцію ФНП- α клітинами периферійної крові та спленоцитами при експериментальній герпетичній інфекції у мишей.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Гостру герпетичну інфекцію моделювали на мишах лінії Balb/c (вагою 10-12 г), яких інфікували внутрішньомозково ВПГ-1 у дозі 100 LD₅₀/0,025 мл (титр вірусу становив 5 lg LD₅₀). В контрольних тварин

спостерігалась 100% смертність. Тварини гинули протягом 6-9 діб після інфікування.

МК, що являє собою комплекс дріжджової РНК з синтетичним низькомолекулярним лігандом - 2,7-біс[2-(діетиламіно-етоксі)-флуорен]-9-он дигідрохлоридом (тилороном), готували як описано [4]. Препаратами порівняння були - стандартний протигерпетичний препарат віролекс ("KRKA", Slovenia) та еталонний індуктор інтерферону (ІФН) *poly(I)-poly(C)* ("Sigma", Germany). Тваринам вводили препарати за терапевтичною схемою двократно внутрішньоочеревно (через добу та через три доби після інфікування) в дозах, що за літературними даними та власними попередніми дослідженнями викликали максимальну продукцію ІФН в організмі мишей: МК - 1,46 мг/кг, *poly(I)-poly(C)* - 0,66 мг/кг, віролекс - 100 мг/кг. Контрольним інфікованим тваринам вводили дистильовану воду. Проби брали на 2-гу, 4-ту, 6-ту та 9-ту доби після інфікування ВПГ-1. Ефективність противірусної дії застосованих препаратів та схеми їх введення оцінювали за показниками смертності тварин, кратності захисту (КЗ) та індексу ефективності (ІЕ) препаратів [5].

Вивчення стимульованої ФНП- α продукуючої здатності клітин крові та спленоцитів проводили, інкубуючи їх у повному поживному середовищі 199 протягом 24 год., застосовуючи LPS у кінцевій концентрації 2 мкг/мл. Рівень ФНП- α визначали в біологічному тесті [6]. До сформованого моношару клітин-мішеней L₉₂₉ додавали 100 мкл досліджуваного супернатанту та актиноміцин Д в кінцевій

концентрації 2 мкг/мл. Через 18 год. після видалення надосадової рідини моношар живих клітин фарбували протягом 10 хв. 0,2% розчином кристал-фіолету. У відмитих водою та висушених платах на мультискані "DYNATECH" (Швейцарія) при $\lambda = 540$ нм визначали оптичну густину зафарбованого моношару. Кінцеве значення ФНП виражали через індекс цитотоксичності (ЦІ) [7].

Статистичну обробку результатів проводили, застосовуючи програму "Microsoft Excel". Розраховували показники середньої арифметичної (М), середньої квадратичної похибки середнього арифметичного (м) та t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На фоні 100% смертності контрольних тварин з герпетичним менингоенцефалітом, у мишей, які отримували індуктори ІФН за терапевтичною схемою на 1-у та 3-ю доби після інфікування ВПГ-1, для МК смертність складала 20%, тоді як poly(I)-poly(C) та віролексу - 40% ($p < 0,05$) (Табл.).

Таблиця.
ЗАХИСНА ДІЯ МК ТА ПРЕПАРАТІВ ПОРІВНЯННЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГЕРПЕС-ВІРУСНОМУ МЕНИНГОЕНЦЕФАЛІТІ

Препарат	Доза, мг/кг	Смертність тварин, %	КЗ	ІЕ
МК	1,46	20*	5	80
Віролекс	100	40*	2,5	60
Poly(I)-poly(C)	0,66	40*	2,5	60
- Контрольні інфіковані тварини	-	100	-	-

Примітка: * $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними інфікованими тваринами.

КЗ для віролексу та poly(I)-poly(C) виявилась у 2 рази меншою, ніж для МК. Достовірним показником противірусної активності препарату є ІЕ ≥ 60 [8]. ІЕ для МК при застосованій схемі введення склав 80, що повністю відповідає вимогам до ефективних противірусних препаратів, тоді як для віролексу та poly(I)-poly(C) цей показник не перевищував 60, що є нижнім гранично допустимим значенням.

Результати дослідження впливу МК на ЛПС-стимульовану продукцію ФНП- α клітинами моноцитарно-макрофагального ряду інфікованих ВПГ-1 тварин наведені на Рис. 1.

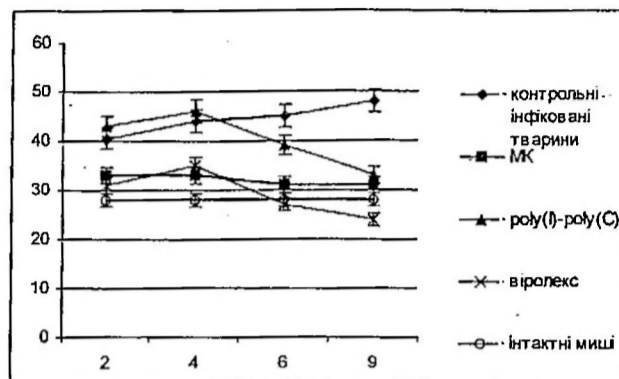
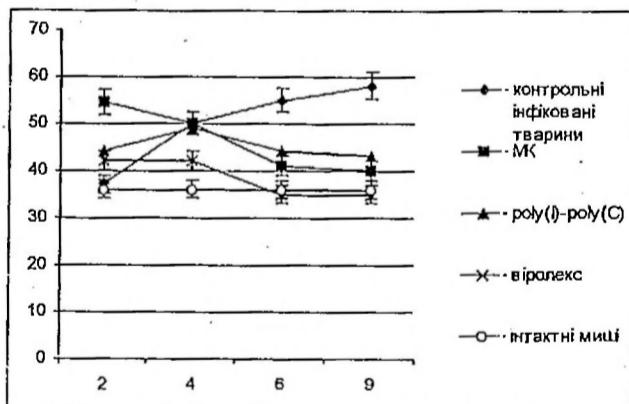


Рис. 1 ЛПС-індукована продукція ФНП- α клітинами цільної крові (А) та спленоцитами (В) мишей лінії Balb/c при герпесвірусному менингоенцефаліті. По осі абсцис - дні спостереження, по осі ординат - індекс цитотоксичності.

Встановлено, що перебіг гострого герпетичного менингоенцефаліту призводив до підвищення ЛПС-стимульованої продукції ФНП- α клітинами периферійної крові та селезінки на 4-9 доби після інфікування ВПГ-1 порівняно з інтактними мишами. Вказане явище може свідчити про загострення запального процесу, відображенням чого є ріст смертності тварин цієї групи. Введення МК інфікованим ВПГ-1 тваринам викликало збільшення ЛПС-стимульованої продукції ФНП- α клітинами периферійної крові та селезінки на 2 добу, тоді як в інфікованих тварин, які не отримували МК, рівень продукції цього цитокіну не змінювався у порівнянні з показниками для інтактних мишей. В інфікованих мишей, які отримували МК, на 4-у добу спостерігалась тенденція до зниження ЛПС-стимульованої продукції ФНП- α . На 9 добу після інфікування під впливом МК здатність клітин периферійної крові та селезінки до продукції ФНП- α достовірно знижувалась порівняно з інфікованими мишами, які не отримували МК. В інфікованих ВПГ-1 тварин, яким вводили poly(I)-poly(C) ЛПС-стимульована продукція ФНП- α клітинами периферійної крові на початкових етапах інфекції вірогідно не зростала, а спленоцитами підвищувалась порівняно з показниками для інтактних мишей. На 6-9 добу після інфікування під впливом poly(I)-poly(C) продукція ФНП- α клітинами периферійної крові та селезінки зменшувалась порівняно з показниками для інфікованих тварин, не оброблених цим препаратом. Віролекс, на відміну від МК, не впливав на продукцію ФНП- α клітинами периферійної крові та селезінки на 2-у добу після інфікування. Однак, подібно до препаратів МК та poly(I)-poly(C), під впливом віролексу спостерігалось зменшення ЛПС-стимульованої продукції ФНП- α на 6-9 доби після інфікування.

Таким чином, в інфікованих ВПГ-1 тварин у період маніфестації клінічних проявів герпетичного менингоенцефаліту (100% смертність) спостерігалось порушення продукції ФНП- α клітинами периферійної крові та селезінки. При цьому гіперстимуляція продукції ФНП- α , яка залучається у процесі імунопатогенезу цього захворювання, є відображенням подальшої активізації запального процесу та переходу його у незворотню стадію. Результати проведених досліджень показали, що під впливом МК, а також інших препаратів групи порівняння - poly(I)-poly(C) та віролексу при герпетичному менингоенцефаліті нормалізувалась продукція ФНП- α , що супроводжувалось захистом інфікованих ВПГ-1 тварин від загибелі. Однак препарат МК за показниками КЗ та ІЕ виявився більш ефективним, що, імовірно, пов'язано з активацією продукції ФНП- α на початкових етапах інфекційного процесу, який в свою чергу стимулюючи продукцію ІФН [9], може пригнічувати репродукцію ВПГ-1.

ВИСНОВКИ

1. Введення препарату МК мишам при гострій герпетичній інфекції на початкових етапах інфекційного процесу призводило до зростання рівня ЛПС-стимульованого синтезу ФНО- α , що поєднувалось з наступною нормалізацією продукції цього цитокіну, яка прогресивно зростала у контрольних інфікованих тварин внаслідок наростання тяжкості перебігу хвороби, відображаючи тим самим інтенсивність розвитку запального процесу.

2. Застосування МК та інших індукторів ІФН групи порівняння - poli(I)-poly(C) та віролексу при гострій герпетичній інфекції забезпечувало 60-80% виживання мишей, порівняно із групою контрольних інфікованих тварин, де смертність склала 100%.

3. На відміну від індукторів ІФН групи порівняння МК здійснював більш ефективний захист інфікованих ВПГ-1 тварин від загибелі, що пов'язано з підвищенням продукції ФНО- α на початкових етапах інфекційного процесу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Karpov A.V., Zholobak N.M., Spivak N.Ya., Rybalko S.L., Antonenko S.V., Krivokhatskaya L.D. Virus-inhibitory effect of a yeast RNA-tilorone molecular complex in cell cultures // Acta Virologica. - 2001. - Vol. 45 - P. 181-184.
2. Владимірова Е.В. Герпетическая инфекция кожи и слизистых оболочек // Вестн. дерматологии и венерологии. - 1997. - №2. - С. 45-51.
3. Palladino M.A. et. al. Anti-TNF- α therapies: the next generation // Nat.Rev.Drug.Discov. - 2003. - Vol.2. - P. 736-746.
4. Карпов А.В., Жолобак Н.М. Изучение интерферогенных свойств комплексов дрожжевая РНК-тилорон в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия. - Т.40. - №5, 1995. - С.20-23.
5. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа. Метод. указания. Сост. проф. В.И.Ильченко - Л. - 1977. - 35 с.
6. Voitenok N.N., Misuno N.I., Panyutich A.V. Induction of tumor necrosis factor synthesis in human monocytes treated by transcriptional // Immunol. letters. - 1989. - V.20, №2. - P.77-82.
7. Лисяный Н.И., Бельская Л.Н., Маркова О.В. Изучение ФНО - продуцирующей способности иммунокомпетентных клеток ЦНС после коррекции экспериментального аллергического энцефаломиелимита крыс клетками аллогенного головного мозга новорожденных

животных // Иммунология и аллергология. - 2004. - №2. - С.60-63.

8. Щербинская А.М., Дяченко Н.С., Рыбалко С.Л. и др. Изучение антивирусного действия потенциальных лекарственных средств. В кн. Доклинические исследования лекарственных средств. К. - 2002. - С. 394-420.

9. Shemer-Avni Y., Walach D., Sarov I. Reversion of the antichlamidial effect of tumor necrosis factor by tryptophan and antibodies to beta interferon // Infect. Immun. - 1989. - Vol.57. - P.3483-3490.

РЕЗЮМЕ

ПРОДУКЦИЯ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА - МК

Скроская О., Жолобак Н.М., Олевинская З.М., Спивак Н.Я., Карпов А.В.

На фоне острой герпетической инфекции изучена динамика продукции ФНО- α клетками крови и спленоцитами мышей, обработанных препаратом МК, представляющим собой комплекс дрожжевой РНК с тилоронем, а также препаратами группы сравнения poli(I)-poly(C) и виролексом. Продукции ФНО- α , которая увеличивалась при развитии острой герпетической инфекции, снижалась на фоне введения исследованных препаратов. Это сопровождалось снижением показателей смертности экспериментальных животных, наиболее выраженном при применении препарата МК.

SUMMARY

TUMOR NECROSIS FACTOR PRODUCTION AT EXPERIMENTAL HERPES VIRUS INFECTION ON A BACKGROUND OF USE OF A COMPLEX INTERFERON INDUCTOR - MC

Skrotskaya O.I., Zholobak N.M., Olewinskaya Z.M., Spivak N.Ya., Karpov A.V.

Dynamics of TNF- α production on a background of an acute herpes infection by immunocompetent cells of the blood and spleen of mice processed by a preparation MC (a complex of the yeast RNA with tilorone), poli(I)-poly(C) and virolex is investigated. Production of the TNF- α which was enlarged at development acute herpes infection, was reduced on a background of introduction of the investigated preparations. It was accompanied by drop of parameters of a mortality of experimental animals most expressed at application of a preparation MC.