

УДК: 57.084+578.76:578.825

### **Вирсингибирующее действие комплексного индуктора интерферонов I типа *in vivo* при экспериментальной герпетической инфекции**

Скроцкая О. И., Кистенюк Н. С., Жолобак Н. М.

На модели экспериментальной герпетической инфекции *in vivo* показано противовирусное действие молекулярной композиции (МК) на основе дрожжевой РНК и 2, 7-бис[2-(диэтиламино-этокси)-флуорен]-9-он дигидрохлорида (тилорона). В группе герпес-инфицированных животных, получавших МК, наблюдалось снижение летальности на 80 %, а средняя продолжительность жизни увеличилась в 1, 5 раза по сравнению с контролем. Выявлено снижение уровня репликации вируса простого герпеса в мозговой ткани инфицированных животных под действием МК. Показан наибольший противогерпетический эффект МК в сравнении с официальными препаратами — Виролексом и *poly(I)-poly(C)*.

Ключевые слова: вирус простого герпеса, молекулярная композиция дрожжевая РНК-тилорон, экспериментальный герпетический менингоэнцефалит.

### **Virus inhibitory effect of the complex interferon inducer of type I *in vivo* in experimental herpes infection**

Skrotskaya O. I., Kistenyuk N. S., Zholobak N. M.

Ativiral effect of the molecular composition (MC) yeast RNA-tilorone and 2, 7-bis[2-(diethylamino)ethoxy]-fluoren-9-on dihydrochloride (tilorone) was demonstrated on the experimental model of herpes infection *in vivo*. The reduction of mortality by 80 % was observed in the group of herpes-infected animals treated with the MC, and the average life expectancy increased by 1, 5 times compared to the control. A reduction of the level of herpes simplex virus replication in the infected animal brain tissue was identified as the result of MC activity. The molecular composition of the yeast RNA and tilorone showed the most significant anti-herpetic effect comparing to the officinal drugs — Virolex and *poly(I)-poly(C)*.

Keywords: herpes simplex virus, a molecular composition of the yeast RNA and tilorone, experimental herpetic meningoencephalitis.

## **Введение**

Вирусу простого герпеса (ВПГ) принадлежит этиологическая роль в возникновении таких тяжелых заболеваний, как гепатит, энцефалит, менингит и мененгоэнцефалит вирусной природы. Чаще всего к таким последствиям приводит инфицирование ВПГ новорожденных, среди которых при поражении центральной нервной системы наблюдается 50 % смертность, а генерализованная инфекция ВПГ приводит к 60 % смертей на первом году жизни [1]. Патология ВПГ-инфекции вызывается преимущественно прямым цитопатическим действием вируса, результатом которой является клеточный лизис и фокусный некроз инфицированной области. В тканях, способных к регенерации, цитопатическое действие ВПГ не является слишком опасным при условии, что вирусное повреждение не полностью уничтожает орган или приводит к функциональной неспособности инфицированных органов во время болезни. Однако в мозгу способность к регенерации поврежденных тканей низкая и обширные некрозы, индуцированные ВПГ, приводят к летальному исходу [2]. Таким образом, ранний контроль репликации ВПГ на начальных фазах инфицирования является решающим для больно-

го. Раннее ингибирование репликации ВПГ может предупредить распространение инфекции, а ранние неспецифические иммунные реакции создают потенциал для препятствования развития симптоматической инфекции. Поэтому достаточно актуальным является поиск и разработка эффективных противогерпетических препаратов.

Параллельно с использованием этиотропных противовирусных средств в терапии ВПГ-инфекций все большее распространение получают разнообразные иммунотерапевтические препараты. Патогенетическим обоснованием иммунотерапии в данном случае является принципиальная возможность управления формированием и уровнем напряженности иммунного ответа к антигенам ВПГ. Среди препаратов этого типа выделяют индукторы интерферонов (ИФН) [3]. Ранее нами была выявлена способность молекулярной композиции (МК) на основе дрожжевой РНК и 2, 7-бис[2-(диэтиламино-этоксид)-флуорен]-9-он дигидрохлорида (тилорона, субстанции лекарственных препаратов Амиксин, Левомакс), индуцировать  $\alpha/\beta$ -ИФН в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* [4, 5]. В условиях *in vitro* доказано противовирусное действие МК на моделях ряда РНК-содержащих вирусов, включая ВИЧ [6]. В связи с изложенным выше, задачей исследования было изучение противовирусной активности комплексного индуктора интерферонов I типа — МК в условиях *in vivo* на модели ДНК-содержащего вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1).

### Цель исследования

Целью данной работы была оценка влияния МК на среднюю продолжительность жизни инфицированных мышей, а также уровень репликации ВПГ-1 в мозговой ткани животных при экспериментальном герпетическом менингоэнцефалите.

### Материалы и методы

Для создания модели герпетического менингоэнцефалита использовали мышей линии BALB/c весом 10—12 г. В работе использовали здоровых животных, выдержанных на карантине, без признаков заболевания. Содержание и обращение с подопытными животными отвечали требованиям «Европейской конвенции по защите прав позвоночных, используемых для экспериментальных и других целей».

Приготовление композиции МК описано ранее [4, 5]. В качестве компонентов использован коммерческий препарат дрожжевой РНК («Биохимреактив», Латвия) и тилорон гидрохлорид («Sigma», США) в мольном соотношении 10:1 соответственно. Препаратами сравнения служили эталонный индуктор ИФН I типа — *poly(I)-poly(C)* («Sigma») и стандартный противогерпетический препарат — Виролекс («KRKA», Slovenia).

В работе использован вирус простого герпеса ВПГ-1 штамм Л2. С целью изучения влияния препарата МК на репликацию ВПГ-1 на модели герпетического менингоэнцефалита животных инфицировали интрацеребрально ВПГ-1 в дозе 100 ЛД<sub>50</sub>/0,025 мл (титр вируса составлял 5 lg ЛД<sub>50</sub>). Изучаемые препараты вводили по терапевтической схеме двукратно (через сутки и через трое суток после инфи-

цирования ВПГ-1) внутрибрюшинно в ранее определенных дозах, вызывающих максимальную продукцию ИФН: МК — 1, 46 мг/кг, *poly(I)-poly(C)* — 0, 66 мг/кг массы животных [5]; Виролекс вводили в дозе, используемой при лечении ВПГ-1-инфекции [7] — 100 мг/кг веса животных. Контрольным инфицированным животным вводили физраствор. В составе каждой группы было по 25 лабораторных животных.

Эффективность анти-ВПГ действия МК, препаратов сравнения, а также адекватность избранной схемы их введения оценивали динамическим методом оценки противовирусной активности веществ [8, 9]. С момента, когда смертность животных в контрольной группе превышала 50 % и до конца периода наблюдения (100% смертность животных контрольной группы), во всех опытных группах определяли уровень защиты препарата по формуле:

$$УЗ = \left( 1 - \frac{\% \text{ умерших животных в опыте}}{\% \text{ умерших животных в контроле}} \right) \cdot 100\%$$

Среднюю продолжительность жизни инфицированных мышей рассчитывали по Мейнеллу [10]. Подсчеты проводили с помощью IBM PC с использованием пакета программных средств Microsoft Excel [11].

Для оценки уровня репликации ВПГ-1 в мозговой ткани забивали инфицированных животных мышей (по 5 животных каждой группы) путем вскрытия шейной вены под легким эфирным наркозом. После вскрытия черепно-мозговой коробки извлекали мозговую ткань, объединяя в пул образцы животных каждой группы. Полученные образцы мозговой ткани растирали со стерильным песком до однородной массы, добавляя соответствующий объем физиологического раствора для получения 10 % суспензии. Указанную суспензию центрифугировали при 8 тыс. об/мин. В надосадочной жидкости определяли активность вируса. Для определения титра ВПГ-1 осуществляли ее десятикратные разведения. Уровень репликации ВПГ-1 оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в полуколичественной модификации с использованием тест-системы «АмплиСенс ВПГ I, П-430» (Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ, Москва). После выделения ДНК из мозговой суспензии инфицированных животных проводили ПЦР на амплификаторе «Perkin Elmer» (США) по программе (табл. 1).

Таблица 1 — Программа ПЦР для выявления ДНК ВПГ-1

Цикл	Температура	Время	Количество циклов
1	95 °С	2 мин	1
2	95 °С	10 с	42
	65 °С	10 с	

	72 °С	10 с	
3	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	Сохранение	

Учет продуктов ПЦР-амплификации проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле в УФ-свете ( $\lambda = 302$  нм), по наличию или отсутствию на электрофореграммах специфических полос амплифицированной ДНК. В качестве красителя использовали бромистый этидий. Длина амплифицированных специфических фрагментов ДНК для ВПГ-1 составляла 430 п.н. Положительными считали образцы, содержавшие специфическую полосу на уровне 430 п.н. большей или меньшей интенсивности. Отрицательными считали образцы, не содержавшие полосы на указанном уровне. Изображение геля в УФ-свете получали на мониторе компьютера с помощью видеосистемы «BIOTEST-A» («БИОКОМ», Россия).

### Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований были проанализированы летальность и средняя продолжительность жизни инфицированных ВПГ-1 мышей получавших МК или препараты сравнения. Полученные в этих опытах результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Летальность и средняя продолжительность жизни инфицированных ВПГ-1 мышей, получавших МК или препараты сравнения

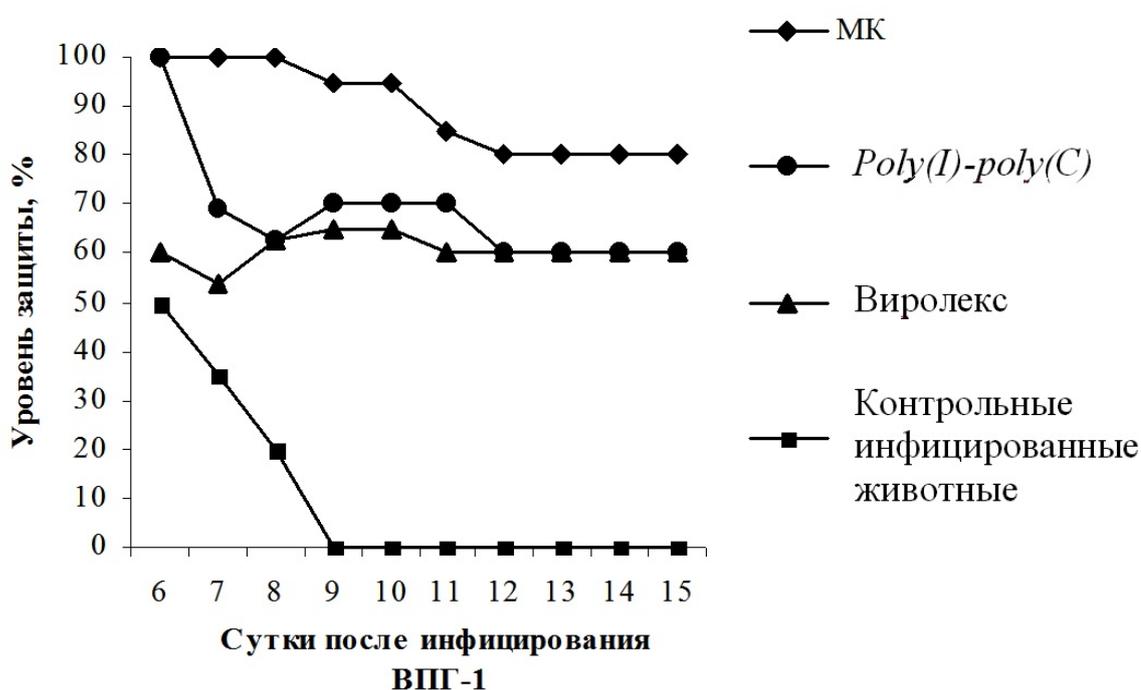
№ п/п	Препарат	Доза препарата, мг/кг	Летальность животных, %	Средняя продолжительность жизни животных, сутки
1	МК	1, 46	20, 0 ± 5, 6*	10, 63 ± 0, 73*
2	<i>Poly(I)-poly(C)</i>	0, 66	40, 0 ± 7, 1*	8, 10 ± 0, 85*
3	Виролекс	100, 00	40, 0 ± 7, 5*	6, 93 ± 0, 7**
4	Контроль (инфицированные животные)	—	100,0	6, 86 ± 0, 29

Примечания: численность каждой группы — 25 животных; \*  $p < 0, 001$ ; \*\*  $p > 0, 05$  к контролю.

В наших экспериментальных условиях развитие герпетического менингоэнцефалита у контрольных инфицированных ВПГ-1 животных сопровождалось 100 % летальностью на протяжении 6—9 дней после инфицирования. При этом средняя продолжительность жизни в данной группе животных составляла 6, 86 суток (табл. 2). В то же время в группе животных, получавших МК, летальность за весь период наблюдения (21 сутки) оказалась в 5 раз ниже, а средняя продолжительность жизни увеличилась в 1, 5 раза по сравнению с контролем. Терапевтическая эффективность препаратов сравнения — *poly(I)-poly(C)* и Виролекса — в этих опытах оказалась практически одинаковой для обеих групп: смертность живот-

ных составила 40 %. При этом средняя продолжительность жизни животных, получавших Виролекс, статистически не отличалась от контрольной группы и составляла 6, 93 суток, а у животных, получавших *poly(I)-poly(C)* была несколько выше: 8, 1 суток. Таким образом, примененная схема введения исследуемых препаратов обеспечивала уменьшение смертности инфицированных ВПГ животных на 50—80 %. При этом, в сравнении с официальными препаратами, МК выявил наибольший анти-ВПГ эффект: жизнеспособность животных, получавших МК была в 5 раз большей, чем в контроле, в то время как Виролекс и *poly(I)-poly(C)* имели данный показатель практически в 2 раза ниже.

Для более углубленного изучения противовирусного действия исследуемых препаратов проводилась оценка их противовирусной активности в динамике, начиная со дня гибели 50 % животных в контрольной инфицированной группе (6-й день). Определение проводилось по методу оценки динамики противовирусной активности препаратов, предложенном С.В. Грибенча [8]. Метод базируется на сопоставлении данных о гибели животных в контрольной и опытных группах, а соответственно, и на определении процента защиты животных в течение различных дней постановки эксперимента. На рисунке 1 приведена динамика изменения уровня защиты инфицированных мышей под действием взятых в исследование препаратов.



**Рисунок 1** — Динамика противовирусной активности исследуемых препаратов на модели экспериментального герпетического менингоэнцефалита у мышей

Как видно из рисунка 1, наибольший уровень защиты (100 %) от ВПГ-1-инфекции, зафиксирован на 6—9 сутки после инфицирования в группе животных, получавших МК. В контрольной группе инфицированных животных, с увеличением срока со дня их инфицирования, повышался процент смертности мышей и соответственно уменьшался процент защиты: на 9 сутки наблюдалась 100 % летальность животных.

В группе животных, получавших *poly(I)-poly(C)*, наибольший процент защиты (70 %) наблюдался на 9—11 сутки после инфицирования животных ВПГ-1. Животные, получавшие Виролекс, имели наибольший процент защиты (65 %) на 9—10 сутки от момента инфицирования.

На 12 сутки после инфицирования животных ВПГ-1 уровень защиты во всех исследуемых группах стабилизировался и оставался постоянным до конца эксперимента: в группе животных, получавших МК он составил 80 %, *poly(I)-poly(C)* и Виролекс — 60 %, в контрольной группе инфицированных животных — 0 %.

Таким образом, применение МК обеспечивает максимальный уровень защиты как в начальный период (100% выживших животных), так и на 10—15 сутки после инфицирования (конечный срок эксперимента), что свидетельствует об эффективности и существенном пролонгированном действии комплексного индуктора интерферонов I типа — МК — в условиях герпетического менингоэнцефалита.

Уровень репликации ВПГ-1 в мозговой ткани исследуемых животных определяли с помощью полимеразной цепной реакции. Пробы отбирались на 6 сутки после инфицирования животных ВПГ-1, поскольку в это время наблюдалась 50 % смертность подопытных животных. Из мозговой ткани инфицированных животных готовились последовательные десятикратные разведения мозговой суспензии для относительного количественного определения ВПГ-1. Результаты ПЦР представлены на рисунке 2.

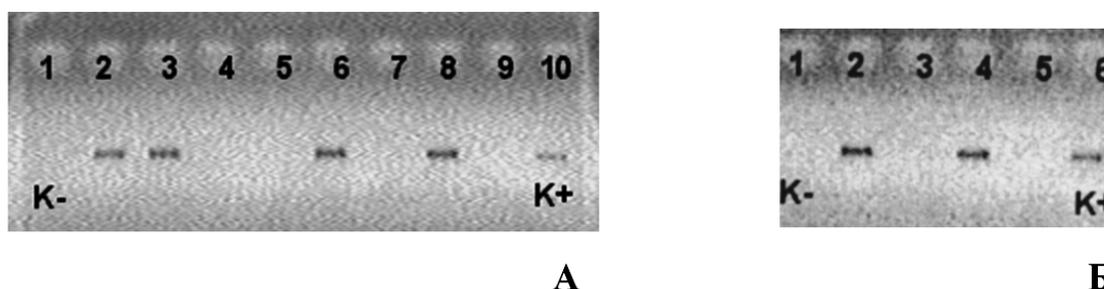


Рисунок 2 — ПЦР-анализ уровня репликации ВПГ-1 в пулированных образцах мозговой ткани мышей при экспериментальном герпетическом менингоэнцефалите на 6 сутки после инфици-

цирования. А — полосы: 1 (К-) — отрицательный контроль амплификации; 2, 3 — разведение мозговой суспензии (МС) контрольной инфицированной группы животных —  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$  соответственно; 4, 5 — разведение МС группы инфицированных животных, которым вводили МК —  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$  соответственно; 6, 7 — разведение МС группы инфицированных животных, которым вводили *poly(I)-poly(C)* —  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$  соответственно; 8, 9 — разведение МС группы инфицированных животных, которым вводили Виролекс —  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$  соответственно; 10 (К+) — положительный контроль амплификации (430 п.н.). Б — полосы: 1 (К-) — отрицательный контроль амплификации; 2, 3 — разведение МС контрольной инфицированной группы животных —  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  соответственно; 4, 5 — разведение МС группы инфицированных животных, которым вводили МК —  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  соответственно; 6 (К+) — положительный контроль амплификации (430 п.н.).

Таким образом, показано, что двукратное внутрибрюшинное введение МК после инфицирования ВПГ-1 обеспечивает существенное снижение уровня репликации вируса в тканях мозга подопытных животных. В группе контрольных инфицированных животных уровень ВПГ-1 в ткани составлял 5 lg LD<sub>50</sub>, тогда как введение МК обеспечивало снижение уровня репликации этого вируса на 4 lg; применение Виролекса и *poly(I)-poly(C)* обеспечивало снижение уровней репликации ВПГ-1 на 2 lg.

Следовательно, исходя из полученных данных определения уровней репликации ВПГ-1 в пулированных образцах мозговой ткани инфицированных животных можно заключить, что наибольший вирус ингибирующий эффект среди исследуемых препаратов обнаружен у молекулярной композиции — МК — на основе дрожжевой РНК и 2, 7-бис[2-(диэтиламино-этокси)-флуорен]-9-он дигидрохлорида (тилорона). При этом препараты сравнения — Виролекс и *poly(I)-poly(C)* имели соответствующий показатель на 2 lg ниже МК.

## Выводы

Таким образом, по результатам как изучения продолжительности жизни инфицированных мышей, так и определения интенсивности репродукции ВПГ-1 в мозговой ткани животных, существенная противогерпетическая активность показана для молекулярной композиции дрожжевой РНК и тилорона. Ее двукратное введение животным на первые и третьи сутки после инфицирования ВПГ-1 обеспечивает, в сравнении с известными противовирусными препаратами Виролексом и *poly(I)-poly(C)*, наибольшую среднюю продолжительность жизни, максимальный процент защиты на протяжении всего эксперимента, а также минимальный падеж инфицированных животных.

Как показано ранее, в анти-ВПГ эффекте МК существенную роль может играть ее интерферон индуцирующая активность в организме [12]. При этом нельзя исключать и непосредственного влияния на общий анти-ВПГ эффект низкомолеку-

лярного компонента МК — тилорона, который сам по себе способен ингибировать репродукцию вирусов [13], хотя и в значительно более высоких концентрациях, чем использовались в наших опытах. Для объяснения механизма обнаруженной высокой эффективности дрожжевой РНК и 2, 7-бис[2-(диэтиламиноэтокси)-флуорен]-9-он дигидрохлорида (тилорона) в составе МК необходимы более углубленные молекулярно-биологического исследования.

Полученные результаты вирус ингибирующей активности МК позволяют рассматривать ее как перспективное противогерпетическое средство, характеризующееся большей эффективностью в сравнении с взятыми в исследование официальными препаратами.

## Литература

1. Kimberlin D.W. Neonatal herpes simplex infection // *Clin. Microbiol Rev.* — 2004. — Vol. 17. — P. 1 — 13.
2. Whitley R.J. Herpes simplex virus infections of women and their offspring: implications for a developed society // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — Vol. 91. — P. 2441 — 2447.
3. Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б. Индукторы интерферона — новое поколение иммуномодуляторов // *Вестн. Рос. АМН.* — 1999. — № 4. — С. 52 — 56.
4. Карпов А.В., Жолобак Н.М. Изучение интерфероногенных свойств комплексов дрожжевая РНК-тилорон в культуре клеток // *Антибиотики и химиотерапия.* — 1995. — № 5. — С. 20 — 23.
5. Карпов А.В., Жолобак Н.М. Продукция интерферонов I типа в организме под действием молекулярных комплексов дрожжевая РНК-тилорон // *Вопр. вирусол.* — 1996. — № 1. — С. 13 — 16.
6. 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.
7. Haruhiko M., Takao I., Noriyuki A. Comparison of antiviral efficacies of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil (bromovir) and acyclovir against herpes simplex virus type 1 infections in mice // *Antiviral Res.* — 1990 — Vol. 14 — P. 99 — 108.
8. Грибенча С.В., Холмс Р.Д., Атауллаханов Р.И., Баринский И.Ф. Противовирусная активность пептидного иммуномодулятора «Гепон» в экспериментах на модели уличного вируса бешенства // *Вопр. вирусол.* — 2003. — № 4 — С. 40 — 44.
9. Щербинська А.М., Дяченко Н.С., Рибалко С.Л., Носач Л.М., Дядюн С.Т., Вричану Н.О. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів. В кн. Доклінічні дослідження лікарських засобів. К. — 2001. — С. 371 — 395.

10. Пшеничнов В.А., Семенов Б.В., Зезеров Е.Г. Стандартизация методов вирусологических исследований. — М.: Медицина, 1974. — 168 с.

11. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с применением «Excel». — К.: Морион, 2000. — 320 с.

12. Скροцкая О.И., Жолобак Н.М., Карпов А.В., Антоненко С.В., Спивак Н.Я. Вплив комплексного індуктора інтерферону на експериментальну герпетичну інфекцію // Докл. НАН України — 2005 — № 5 — С. 164 — 166.

13. Чижов Н.П., Борисова М.А. Структура и биологическая активность низкомолекулярных индукторов интерферона // Антибиотики и мед. Биотехнология — 1987 — Т. 32, № 9 — С. 706 — 715.

## Literature

1. Kimberlin D.W. Neonatal herpes simplex infection // Clin. Microbiol Rev. — 2004. — Vol. 17. — P. 1 — 13.

2. Whitley R.J. Herpes simplex virus infections of women and their offspring: implications for a developed society // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 2441 — 2447.

3. Ershov F.I., Tazulaxova E.B. Induktory interferona — novoe pokolenie immunomodulyatorov // Vestn. Ros. AMN. — 1999. — № 4. — P. 52 — 56.

4. Karpov A.V., Zholobak N.M. Izuchenie interferonogennykh svoystv kompleksov drozhzhevaya RNK-tiloron v kul'ture kletok // Antibiotiki i himioterapiya. — 1995. — № 5. — P. 20 — 23.

5. Karpov A.V., Zholobak N.M. Produkciya interferonov I tipa v organizme pod dejstviem molekulyarnykh kompleksov drozhzhevaya RNK-tiloron // Vopr. virusol. — 1996. — № 1. — P. 13 — 16.

6. 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.

7. Haruhiko M., Takao I., Noriyuki A. Comparison of antiviral efficacies of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil (brovavir) and acyclovir against herpes simplex virus type 1 infections in mice // Antiviral Res. — 1990 — Vol. 14 — P. 99 — 108.

8. Gribencha S.V., Xolms R.D., Ataulloxanov R.I., Barinskij I.F. Protivovirusnaya aktivnost' peptidnogo immunomodulyatora «Gepon» v e'ksperimentax na modeli ulichnogo virusa beshenstva // Vopr. virusol. — 2003. — № 4 — P. 40 — 44.

9. Shherbins'ka A.M., Dyachenko N.S., Ribalko S.L., Nosach L.M., Dyadyun S.T., Vrichanu N.O. Vivchennya antivirusnoї diї potencijnix likars'kix zasobiv. V kn. Doklinichni doslidzhennya likars'kix zasobiv. K. — 2001. — P. 371 — 395.

10. Pshenichnov V.A., Semenov B.V., Zezerov E.G. Standartizaciya metodov virusologicheskix issledovaniy. — M.: Medicina, 1974. — 168 p.

11. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskix issledovaniyax s primeneniem «Excel». — K.: Morion, 2000. — 320 p.

12. Skrockaya O.I., Zholobak N.M., Karpov A.V., Antonenko S.V., Spivak N.Ya. Vpliv kompleksnogo induktora interferonu na eksperimental'nu gerpetichnu infekciyu // Dokl. NAN Ukrainy — 2005 — № 5 — P. 164 — 166.

13. Chizhov N.P., Borisova M.A. Struktura i biologicheskaya aktivnost' nizkomolekulyarnyx induktorov interferona // Antibiotiki i med. Biotexnologiya — 1987 — T. 32, № 9 — P. 706 — 715.