
ВИРУСОЛОГИЯ

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭРГОФЕРОНА В ОТНОШЕНИИ РОТАВИРУСА ГРУППЫ А

А.Г.Емельянова, И.П.Шиловский*, М.С.Сундукова*, М.Р.Хаитов*, О.И.Эпштейн

*Лаборатория физиологически активных веществ отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, РФ; *ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, РФ*

Изучали противовирусную активность препарата “Эргоферон” на экспериментальной модели ротавирусной инфекции клеток линии MA-104 *in vitro*. Было показано снижение титра ротавируса в инфицированных клетках под действием эргоферона на 83 и 90% по сравнению с группой растворителя, используемого для приготовления препарата ($p < 0.05$), и дистиллированной воды ($p < 0.05$) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о наличии выраженного противовирусного действия препарата “Эргоферон” в отношении ротавирусной инфекции.

Ключевые слова: эргоферон, релиз-активность, ротавирус

Ротавирус (РВ) — наиболее частая причина острых гастроэнтеритов у детей. Ежегодно по всему миру в результате диареи и связанных с ней тяжелых нарушений кислотно-щелочного равновесия и дегидратации погибают не менее 600 000 детей в возрасте младше 5 лет [6]. Согласно данным ВОЗ, в настоящее время не существует лекарственных препаратов для лечения ротавирусной инфекции помимо двух вакцин [3]. Однако финансово-экономические факторы, а также большое разнообразие персистирующих штаммов по всему миру ограничивает их эффективное применение и требует постоянного мониторинга молекулярных характеристик возбудителя [5]. Все это делает актуальными поиски дополнительных эффективных средств для лечения и профилактики РВ-инфекции.

Эргоферон — препарат на основе смеси поликлональных антител к ИФН- γ , рецептору CD4 и гистамину в релиз-активной форме. В ходе одного из последних проведенных исследований *in vitro* была показана противовирусная активность эргоферона в отношении респираторно-синцициального вируса (РСВ). На модели инфекции культуры клеток почки эмбриона макаки-резус (MA-104) эргоферон снижал цитопатогенный эф-

фект вируса РСВ штамма А2 при преинкубации с препаратом до заражения [1]. Показанная высокая эффективность эргоферона на данной модели легла в основу исследования активности эргоферона в отношении РВ. Стандартной клеточной культурой, на которой принято исследовать РВ-инфекцию, также является культура клеток MA-104 [4,7].

Целью данного исследования являлось изучение противовирусного действия эргоферона в отношении РВ группы А.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием культуры клеток MA-104. Клетки засеивали в 96-луночный планшет в количестве 12.5 тыс. клеток/луночку в объеме 100 мкл/луночку полной среды Игла MEM. Инкубировали в течение 3 сут в CO₂-инкубаторе при 37°C в 5% атмосфере CO₂.

Использованный в исследовании РВ группы А, штамм 568, получен из НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ. Для активации инфекционной способности РВ вирус с исходным титром 10⁷ ТЦИД₅₀/мл (50% тканевая инфицирующая доза/мл) смешивали с бессывороточной средой Игла MEM (объемное соотношение 1:7) с трипсином, инкубировали в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при

37°C и получали активированный вирус с титром 0.125×10^7 ТЦИД₅₀/мл.

Препараты были зашифрованы и тестировались в виде водных растворов, готовых к использованию. В экспериментах по изучению противовирусной активности тестируемых образцов на культуре клеток МА-104 были сформированы 3 опытные группы клеток: клетки, в среду для инкубации которых вносили эргоферон, воду очищенную, прошедшую технологическую обработку, аналогичную эргоферону (контроль 2) или воду, очищенную без какой-либо технологической обработки (контроль 1). В качестве рабочей дозы тестируемых образцов было выбрано разведение 1:4 как максимальное для данной клеточной культуры, не оказывающее негативного влияния на рост клеток. Для мониторинга валидности экспериментальной модели использовали клетки, зараженные РВ, без добавления экспериментальных образцов (контроль вируса), в качестве отрицательного контроля — интактные клетки (контроль клеток). Эксперимент был поставлен в 16 независимых повторах.

Перед инфицированием клеток проводили предварительную инкубацию тестируемых образцов с РВ в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C в 5% атмосфере CO₂ в объемном соотношении 1:3. Затем предварительно отмытые клетки МА-104 инфицировали смесью препарата и вируса в дозе 50 000 ТЦИД₅₀/мл и инкубировали в течение 48 ч. Для лизиса клеток добавляли 4.5% раствор Тритона X-100 в количестве 10 мкл/лунку. Планшет выдерживали в морозильной камере при -70°C в течение 1 ч, перед проведением обратнo-транскриптазной (ОТ) ПЦР обработанный планшет размораживали и доводили до комнатной температуры. Затем к разведенным водой лизатам добавляли 40 мкл реакционной смеси для ОТ-ПЦР, состоявшей из смеси прямого и обратного праймера (10 пкмоль), зонда (5 пкмоль), 20 мкл смеси для ПЦР (“Синтол”), 0.2 мкл фермента ревертазы вируса мышинного лейкоза Молони (MMLV) (50 Ед/мкл; “Синтол”), воды. Реакцию амплификации в реальном времени проводили в автоматическом режиме в амплификаторе IQ5 (“Bio-Rad”). Активность препаратов определяли методом корреляционных кривых при сравнении со стандартной кривой и выражали в ТЦИД₅₀/мл, используя программу обсчета, разработанную на базе “Microsoft Excel”.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью критерия Крускала—Уоллиса и апостериорного критерия Данна, реализованных в программной среде для статистической обработки R 3.2.1 с использованием функции

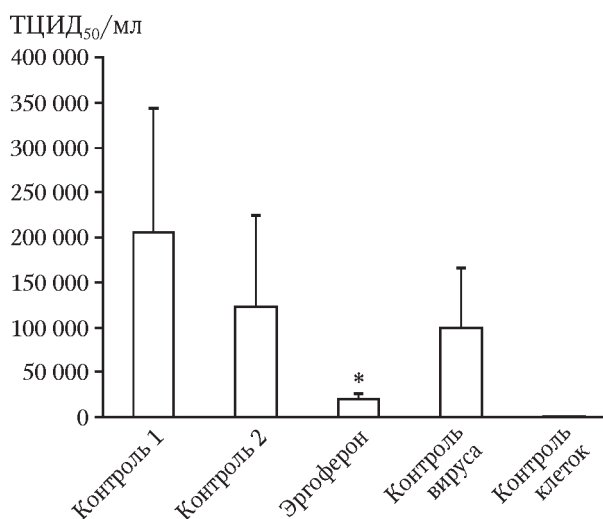
dunn.test с поправкой Бенджамини—Хохберга на множественность сравнений. Результаты представлены в виде среднего значения титра вируса после обработки соответствующими образцами и стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Противовирусная активность эргоферона проявлялась в снижении вирусной нагрузки в исследованной культуре клеток по сравнению с контролями при предварительной инкубации эргоферона с вирусом до инфицирования ($p < 0.05$; рисунок).

В состав препарата эргоферон входят релиз-активные антитела к ИФН- γ , CD4 и гистамину. Показано, что с переводом в релиз-активную форму характер действия антител меняется и релиз-активные формы антител приобретают способность модифицировать конформационные характеристики исходной молекулы и ее фармакологические мишеней, что сопровождается изменением их физико-химических и биологических свойств [2]. В частности, релиз-активные формы антител к ИФН- γ могут увеличивать продукцию ИФН- γ и ИФН- α/β , а также оказывать другие сонаправленные ИФН- γ эффекты, влиять на систему эндогенных регуляторов, вовлеченных в механизм реализации противовирусной активности [2], приводя к нормализации функциональной активности естественных факторов иммунной защиты и усилению противовирусного действия.

Дизайн проведенного исследования был составлен таким образом, что изучаемые препараты инкубировали с РВ в течение 48 ч до заражения экспериментальной клеточной линии. Это дает



Противовирусная активность исследуемых образцов. * $p < 0.05$ по сравнению с контролями.

основание предположить, что препарат может влиять на ранние этапы взаимодействия вируса с клеткой, а именно на проникновение вирусной частицы в цитоплазму. Тем не менее в рамках проведенного исследования установить конкретный механизм действия препарата “Эргоферон” не представляется возможным, в связи с чем данный вопрос может быть предметом последующих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шиловский И.П., Прозорова М.С., Хаитов М.Р. Способность препарата эргоферон подавлять инфицирующую активность респираторно-синцитиального вируса *in vitro* // Иммунология. 2015. Т. 36, № 4. С. 216-219.
2. Эпштейн О.И. Феномен релиз-активности и гипотеза “пространственного” гомеостаза // Успехи физиол. наук. 2013. Т. 44, № 3. С. 54-76.
3. *Immunization, Vaccines and Biologicals*. Rotavirus. Last updated: 12 April 2010. [<http://www.who.int/immunization/topics/rotavirus/en/>].
4. Glass R.I., Parashar U., Patel M., Gentsch J., Jiang B. Rotavirus vaccines: successes and challenges // *J. Infect.* 2014. Vol. 68, Suppl. 1. P. S9-S18.
5. Gong W., Zhang G.M., Liu Y., Lei Z., Li D., Yuan Y., Huang B., Feng Z.H. IFN-gamma withdrawal after immunotherapy potentiates B16 melanoma invasion and metastasis by intensifying tumor integrin $\alpha v \beta 3$ signaling // *Int. J. Cancer*. 2008. Vol. 123, N3. P. 702-708.
6. Stefanelli C.C., Castilho J.G., Botelho M.V., Linhares R.E., Nozawa C.M. Effect of actinomycin D on simian rotavirus (SA11) replication in cell culture // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002. Vol. 35, N 4. P. 445-449.
7. Taherkhani R., Farshadpour F., Makvandi M. In Vitro Antirotaviral Activity of *Achillea kellarensis* // *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 2013. Vol. 8, N 3. P. 138-143.

Получено 23.03.15

ISSN 0365-9615
Электронная версия
ISSN 2413-1008

**БЮЛЛЕТЕНЬ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНЫ**

6

2016