

Иммуномодулятор «Гепон» подавляет репликацию вируса гепатита С в клетках человека *in vitro*

Р. И. Атауллаханов, Р.Д.Холмс, А. В. Катлинский, П.Г.Дерябин, А. Н. Наровлянский, М.
В. Мезенцева, Ф. И. Ершов

ООО Иммафарма, ГНЦ-Институт иммунологии МЗ РФ, Immutic Group,

Московская медицинская академия им. Сеченова,

НИИ вирусологии им Д.И. Ивановского РАМН,

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН

Immunomodulator "Hepon" inhibits a replication of Hepatitis C virus in the human cells *in vitro*

Ataullakhanov R. I., Holms R. D., Katlinsk A. V., Deryabin P. G., Narovlyansky A. N.,

Mesentseva M. V., Ershov F. I.

*ООО Immapharma, National Research Centre - Institute of Immunology, Immutic Group,
Sechenov 's Moscow Medical Academy. Ivanovsky' Research Institute of Virology, Gamaleya 's
Research Institute of Epidemiology and Microbiology*

Имеются сообщения об успешном применении иммуномодулятора «Гепон» при вирусных инфекциях и, в частности, при респираторных вирусных заболеваниях [1,2] и герпес-вирусной инфекции [3,4]. Установлено, что лечебное действие препарата основано не только на повышении эффективности иммунных реакций, специфичных к инфекционным антигенам [5,7]. Гепон может непосредственно ингибировать развитие вируса в инфицированных клетках. Так, гепон тормозил развитие вируса энцефаломиокардита в инфицированной культуре клеток человека *in vitro* [8,9].

В настоящей работе описано противовирусное действие гепона в культуре клеток человека, инфицированных вирусом гепатита С.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали цитопатогенный вариант вируса гепатита С (ВГС), штамм С-13, относящийся к генотипу 1b [10]. Штамм был выделен из сыворотки крови больной хроническим вирусным гепатитом С, идентифицирован как вирус гепатита С в тесте нейтрализации антителами, специфичными к ВГС, а также в реакциях торможения гемагглютинации, иммуноферментного анализа, иммунофлюоресценции и диффузионной преципитации в агаре. РНК вируса идентифицирована как геном ВГС в RT-PCR с использованием праймеров к 5'-NTR и к области ВГС, кодирующей нуклеокапсидный белок, а также методом секвенирования фрагмента генома ВГС, кодирующего область нуклеокапсидного белка ВГС [10-12].

Была использована высоко чувствительная к цитопатогенному действию ВГС культура клеток аденокарциномы надпочечника человека (SW-13), полученная из Национальной американской коллекции клеточных культур. Культура клеток SW-13 выращивалась на двойной среде Игла с 10% сыворотки эмбрионов телят, с добавлением глутамина и антибиотиков (100 ЕД/мл).

Для заражения ВГС использовали однодневный монослой клеток SW-13, выращенный в 24-луночных пластиковых панелях. Культуру клеток SW-13 заражали ВГС в дозе 10 ТЦД₅₀/мл. Инфекционную активность ВГС учитывали по результатам титрования на 6-й день после заражения, когда развивалось максимальное цитопатогенное действие вируса.

Исследование противовирусного действия препаратов. В работе использовали стерильный лиофилизированный препарат «Гепон-0,002» производства ООО Иммафарма (Москва). Препарат растворяли перед употреблением, вносили в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкг/мл в культуры клеток SW-13 в момент заражения и через 24 часа после заражения клеток вирусом. В качестве контрольного препарата с известной противовирусной активностью в отношении инфекции ВГС в культуре клеток использовали Реаферон (НПО «Вектор», Новосибирск) в концентрации 5000 ЕД/мл. Противовирусное действие препаратов оценивали по снижению или отмене цитопатогенного действия ВГС, а также по снижению титра ВГС в культуральной жидкости культур клеток SW-13, инфицированных ВГС в дозе 10 ТЦД₅₀/мл.

Титрование ВГС в культуральной жидкости. Пробы культуральной жидкости, собранные на 3-й день после заражения клеток, использовали в виде 10-кратных разведений для заражения перевиваемых культур клеток, чувствительных к репродукции ВГС. С этой целью использовали 48-луночные пластиковые панели, в которых делали разведения исследуемых проб в объеме 200 мкл, после чего добавляли суспензию клеток на двойной

среде Игла, содержащей 4% сыворотки эмбрионов телят в объеме 500 мкл. После инкубации при комнатной температуре в течение 20 минут инфицированные культуры помещали в термостат для последующего культивирования при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Результаты титрования учитывали в период между 3-м и 7-м днями после инфицирования, когда появлялись отчетливые цитопатические изменения в монослое клеток инфицированных культур при отсутствии цитопатических явлений в контрольных неинфицированных культурах. Для подсчета титра ВГС использовали формулу Рида и Менча [13].

Результаты и обсуждение

Защита клеток SW-13 от цитопатогенного действия ВГС

В контрольных культурах клеток, инфицированных ВГС, наблюдалось цитопатогенное действие вируса. В частности, 25% монослоя клеток SW-13 подвергалось деструкции уже через 3 дня после заражения культур 10 ТЦД₅₀/мл ВГС.

В предварительных экспериментах было показано, что гепон в исследуемых концентрациях от 0,1 мкг/мл до 10 мкг/мл не оказывают цитотоксического действия на клетки SW-13 в культуре *in vitro*. Это позволило использовать указанные концентрации препаратов для изучения противовирусной активности.

Внесение гепона в культуры клеток, инфицированные ВГС, защищало клетки SW-13 от цитопатогенного действия вируса. С помощью гепона можно было сохранить жизнеспособность 100% клеток SW-13 в течение 3 дней после их заражения 10 ТЦД₅₀/мл ВГС (табл. 1). К этому сроку в контрольных культурах клеток, инфицированных ВГС, развивались цитопатогенные явления, которые поражали 25% монослоя. В то же время в культурах, содержащих гепон, явления цитодеструкции были менее выражены или вообще отсутствовали.

Максимальное противовирусное действие, позволяющее сохранить культуры клеток жизнеспособными в течение 3 дней после заражения ВГС, имело место в присутствии 1 мкг/мл гепона (табл.1).

При внесении гепона в культуры клеток одновременно с вирусом имел место более выраженный противовирусный эффект, чем при внесении препарата через 24 часа после заражения культур ВГС (табл. 1). Внесение гепона (1 мкг/мл или 10 мкг/мл) в культуру клеток через 24 часа после заражения, повышало жизнеспособность инфицированных ВГС клеток SW-13 на 15-25% по сравнению с контрольной инфицированной культурой клеток (3-й день после инфекции).

Важно отметить, что в более поздние сроки после заражения цитопатогенное действие ВГС все же развивалось, несмотря на противовирусное действие гепона. Так, через 6 дней после заражения ВГС клетки SW-13 погибали как в контрольных культурах, так и в культурах, содержащих гепон.

Контрольный противовирусный препарат реаферон обладал более выраженной способностью сохранять жизнеспособные свойства клеток SW-13. В культурах, содержащих реаферон в концентрации 5000 БД/мл, наблюдалась 100% жизнеспособность клеток как через 3 дня, так и через 6 дней после заражения 10 ТЦД₅₀/мл ВГС (табл. 1).

Снижение титров вируса в культуре клеток

Защита клеток от цитопатогенного действия ВГС не является прямым доказательством противовирусных свойств гепона. Отсутствие цитопатогенного действия вируса не означает, что в клетках остановлена активная продукция инфекционного вируса. Это особенно характерно для ВГС, которому свойственно формирование хронической или персистентной инфекции в различных типах клеток.

Для прямой оценки противовирусного действия гепона определяли титр ВГС в культурах клеток SW-13, инфицированных ВГС. Для этого на 3-й день после заражения культур отбирали пробы культуральной жидкости, которые титровали во вторичных культурах клеток SW-13. В таблице 2 представлены результаты титрования. В контрольных культурах через 3 дня после заражения титр ВГС достиг значения 3,2 lg ТЦД₅₀. Присутствие гепона снижало титры ВГС в инфицированных культурах. Через 3 дня после заражения в культуральной жидкости культур, содержащих гепон, минимальные титры ВГС составили 2 lg ТЦД₅₀/мл (табл. 2). Препарат подавлял репликацию ВГС в концентрациях от 0,1 до 10 мкг/мл, при этом титр ВГС снижался на 0,7 - 1,2 lg ТЦД₅₀/мл. Более эффективное противовирусное действие гепона наблюдалось при его внесении в культуры клеток в момент заражения, а не спустя 24 часа.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что гепон тормозит репликацию ВГС и эффективно защищает клетки человека *in vitro* от цитопатогенного действия ВГС (табл.1,2). Эти данные хорошо согласуются с описанным ранее противовирусным действием гепона в культурах J-96 и L-41 клеток человека, инфицированных вирусом энцефаломиокардита [8,9].

Ранее мы сообщали, что гепон индуцирует значительное изменение спектра мРНК интерферонов и цитокинов, синтезируемых клетками J-96 [8]. Скорее всего, изменение

спектра синтезируемых интерферонов и цитокинов является основой повышения устойчивости клеток к вирусной инфекции. Однотипные изменения, индуцированные гепоном в разных типах клеток (SW-13, J-96, L-41), могут лежать в основе однотипных биологических эффектов таких, как торможение репликации вирусов и защита клеток от цитопатогенного действия вирусов. Поскольку гепон изменяет спектр клеточных цитокинов и интерферонов, его противовирусное действие должно быть эффективным в отношении разных вирусов и, в частности, вирусов энцефаломиокардита, герпеса и гепатита С.

Литература

1. Кладова О.В., Ф.С.Харламова, А.А.Щербакова, Т.П.Легкова, Л.И.Фильдфикс, А.А.Знаменская, Г.С.Овчинникова, В.Ф.Учайкин. Первый опыт интраназального применения гепона у детей с респираторными заболеваниями. - Педиатрия, 2002, №2, 86-88.
2. Кладова О.В., Ф.С.Харламова, А.А.Щербакова, Т.П.Легкова, Л.И.Фильдфикс, В.Ф.Учайкин. Эффективное лечение синдрома крупа с помощью иммуномодулятора Гепон. - Русский медицинский журнал, 2002, том 10, №3, 138-141.
3. Бибичева Т.В., Силина Л.В. Иммуномодулятор Гепон для местной терапии герпес-вирусной инфекции. - В кн.: Тезисы докладов IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2002, с. 55.
4. Бибичева Т.В., Силина Л.В. Лечение рецидивирующего генитального герпеса иммуномодулятором Гепон. - В кн.: Тезисы докладов IX Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2002, с. 56.
5. Атауллаханов Р.И., А.В.Катлинский, Р.Д.Холмс, Т.Б.Мастернак, А.С.Ларин, Е.Ю.Малкина, Н.М.Шишкова. Усиление образования антител под влиянием иммуномодулятора «Гепон». - Иммунология, 2002.
6. Хаитов Р.М., Р.Д.Холмс, Р.И.Атауллаханов, А.В.Катлинский, М.Н.Папуа-швили, А.В.Пичугин. Усиление синтеза антител к антигенам ВИЧ при лечении больных ВИЧ-инфекцией иммуномодулятором «Гепон». - Иммунология, 2002.
7. Хаитов Р.М., Р.И.Атауллаханов, Р.Д.Холмс, А.В.Катлинский, А.В. Пичугин, М.Н.Папуашвили, Н.М.Шишкова. Повышение эффективности иммунного контроля оппортунистических инфекций при лечении больных ВИЧ-инфекцией иммуномодулятором «Гепон». - Иммунология, 2002.
8. Атауллаханов Р.И., Р.Д.Холмс, А.Н.Наровлянский, А.В.Катлинский, М.В.Мезенцева, В.Э.Щербенко, В.С.Фарфаровский, Ф.И.Ершов. Механизмы противовирусного действия препарата «Гепон»: изменение транскрипции генов цитокинов в перевиваемых клетках человека. - Иммунология, 2002.
9. Холмс Р.Д., А.В.Катлинский, Р.И.Атауллаханов, А.Н.Наровлянский, М.В.Мезенцева, В.Э.Щербенко, Ф.И.Ершов. Противовирусное действие синтетических пептидов шарнирной области эзрина в культуре клеток человека, инфицированных вирусом энцефаломиокардита, - Иммунология, 2002.
10. Дерябин П.Г., Д.К.Львов, Е.И.Исаева, С.О.Вязов. Штамм *Virus hepatitis C*, Д-1 для приготовления диагностических и профилактических препаратов. - Российский патент на изобретение № 2130967, 1999 (приоритет от 07.10.97).
11. Дерябин П.Г., Е.И.Исаева, С.О.Вязов. Хроническая инфекция культур клеток почки эмбриона свиньи, вызванная вирусом гепатита С, - Вопр. вирусол., 1997, 6, 259-263.
12. Дерябин П.Г., Д.К.Львов. Высокопродуктивный вариант вируса гепатита С. Выделение, характеристика, идентификация. - Доклады Российской Академии наук, 1998, 358, №5, 688-691
13. Пшеничнов В.А., Б.Ф.Семенов, Е.Г.Зезеров. В кн.: Стандартизация методов вирусологических исследований, М., Медицина, 1974, 123-128.

Примечание: работа спонсировалась Immutic Group

Таблица 1. Влияние гепона на жизнеспособность культур клеток SW-13, инфицированных 10 ТЦД₅₀ ВГС (3-й день после заражения).

Препарат	Время введения препарата	Жизнеспособность (%) клеток SW-13*			
		Концентрация гепона <i>in vitro</i>			
		0	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл
Гепон	В момент заражения	75*	80	100	90
	Через 24 часа после заражения	75	75	100	90
Реаферон 5000 ЕД/мл	В момент заражения	100	-	-	-
	Через 24 часа после заражения	100	-	-	-

Примечание:

*) содержание живых клеток (%) на 3-й день после заражения ВГС и обработки препаратом.

Таблица 2. Влияние гепона на репликацию ВГС в культурах клеток SW-13, инфицированных 10 ТЦД₅₀ ВГС.

Препарат	Время введения препарата	Титры ВГС (lg ТЦД ₅₀ /мл) в супернатантах культур, содержащих указанные препараты			
		Концентрация гепона <i>in vitro</i>			
		0	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл
Гепон	В момент заражения	3,2*	2,5	2,3	2,0
	Через 24 часа после заражения	3,2	3,2	3,3	3,1
Реаферон 5000 ЕД/мл	В момент заражения	0	-	-	-
	Через 24 часа после заражения	0	-	-	-

Примечание:

*) титр ВГС (lg ТЦД₅₀/мл) через 3 дня после заражения культур клеток SW-13.