

УДК 576.826:615.37

**АНТИГЕРПЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ВИРУСА ГЕРПЕСА ПРОСТОГО 1 ТИПА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21**

*КУРКИНА О. В., ПОВНИЦА О. Ю., ЗАГОРОДНЯЯ С. Д.,  
БЕЛЯВСКАЯ Л. А., НЕСТЕРОВА Н. В.*

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины

Лечение вирусных инфекций - чрезвычайно важная и достаточно сложная задача. Ограниченное количество высокоэффективных специфических противовирусных средств и постоянные мутации вирусов, влияние на иммунную систему человека целого ряда экологических факторов приводят к увеличению заболеваемости с развитием тяжелых осложнений [1]. Проблема лечения герпетических инфекций остается актуальной в связи с появлением новых устойчивых штаммов вирусов, частыми рецидивами заболевания, развитием трансплантологии [1-3]. Сегодня герпетическая инфекция рассматривается не только как медицинская, но и серьезная социальная проблема, что определяется негативным влиянием на репродуктивную систему человека, риска внутриутробной инфекции, развития вторичного бесплодия [4]. Известно о положительной клинической практике применения внутримышечного препарата противогерпетического иммуноглобулина для лечения герпетического стоматита, герпеса гениталий и кожи, офтальмогерпеса, герпетического энцефалита у детей [5-9]. В тоже время, исследования противовирусной активности иммуноглобулина в культуре клеток не проводились.

Целью данной работы было изучение действия препарата иммуноглобулин человека против вируса герпеса простого 1 типа (ИГ), для внутримышечного введения, производства ЧАО «Биофарма», Украина, на репродукцию ВПГ-1 в культуре клеток ВНК-21.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Клетки и вирусы. ВНК-21 clone 13 – клетки почек сирийского хомячка (Банк клеток Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины) выращивали в среде ДМЕМ (БиоТестМед, Украина) с 10% сыворотки эмбриона телят (Sigma, США), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. В противовирусных исследованиях использовали поддерживающую среду с 5% сыворотки эмбриона телят.

Вирус герпеса простого типа 1 (ВПГ-1/УС), эталонный штамм, полученный из Института ан-

тивирусной химиотерапии центра клинической и теоретической медицины (Германия). Пулы вирусов получали на культуре клеток ВНК-21, после проявления цитопатического действия вируса материалы замораживали и хранили при -70°C. Инфекционный титр вируса определяли методом бляшек под агаровым покрытием [10].

Иммуноглобулин. Препарат является иммунологически активной белковой фракцией [8], выделенной из сыворотки или плазмы крови человека, очищенной и концентрированной методом фракционирования этиловым спиртом, прошедшей стадию вирусной инактивации сольвент-детергентным методом. Содержание белка в 1.0 мл препарата от 0.090 г до 0.11 г, в качестве стабилизатора используется глицин. Препарат содержит антитела к вирусу герпеса простого 1 типа, определяемые иммуноферментным анализом.

Имуноферментный анализ. Определение титра специфических антител к ВПГ-1 в исследуемом образце иммуноглобулина проводили с использованием коммерческой тест-системы «ВектоВПГ-IgG-стрип», индекс avidности с использованием тест-системы «ВектоВПГ1,2-IgG – avidность» (Новосибирск, Россия). Анализ проводили согласно инструкции фирмы-производителя.

Цитотоксичность. Жизнеспособность клеток определяли МТТ методом [11]. Клетки выращивали в 96 луночных планках в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C на протяжении 24 часов. Ростовую среду из лунок удаляли и вносили среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую двукратные разведения препарата. На каждую концентрацию препарата и контроль необработанных препаратом клеток использовали по 4 лунки планки. Через 72 часа инкубирования клеток с препаратом исследовали цитотоксическое действие препарата.

Иммунноинактивация. Для исследования использовали инфицирующую дозу ВПГ-1 в 100 ТЦД<sub>50</sub>/лунку. Нейтрализующую способность ИГ определяли [12], инкубируя до заражения клеток вирус с серийными двукратными разведениями ИГ при 37°C на протяжении 45 и 60 минут. Далее вирус вносили в культуру клеток ВНК-21

и через 48 ч определяли уровень его репродукции при помощи МТТ теста.

Антивирусное действие. Репликация вируса в присутствии препарата была изучена по проявлению цитопатического действия вируса в культуре клеток ВНК-21. Схемы обработки клеток препаратом были следующими: профилактические схемы: за 24 часа и 1 час до заражения; лечебная схема – после заражения. Множественность инфицирования составляла 0,1 БОЕ вируса на клетку, время адсорбции - 2 часа при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Исследуемый препарат использовали в 2-кратных разведениях, он находился в составе поддерживающей среды на протяжении всего времени эксперимента. На каждое разведение препарата, контроль необработанных клеток и контроль вируса использовали по 3-4 лунки плашки. Ингибирующее действие ИГ в культуре клеток определяли через 72 часа после заражения. Развитие вирусной инфекции оценивали по выраженности вирусиндуцированного ЦПД и детектировали с помощью МТТ-теста. Оптическую плотность образцов измеряли на ридере «Dynatech» (Швеция) при длине волны 540 нм. Тест на наличие вируса считали положительным, если оптическая плотность в лунке была в два и более раз меньше, чем в контрольных лунках без вируса. Процент ингибирования репродукции вируса определяли по формуле [13].

$$(ОПо-ОПкв)/(ОПкк-ОПкв) \times 100,$$

где ОПо – оптическая плотность исследуемого образца, ОПкв – контроля вируса, ОПкк – контроля клеток.

Определяли EC<sub>50</sub> – эффективную концентрацию препарата на 50% угнетающую репродукцию вируса, по сравнению с контролем вируса, принятым за 100%.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов (расчет средних значений и стандартных отклонений, расчет CC<sub>50</sub> и EC<sub>50</sub> при помощи линейной регрессии) проводили при помощи программы Microsoft Excel. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Титр специфических антител к ВПГ-1 в исследуемом образце иммуноглобулина был определен методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческой тест-системы «ВектоВПГ-IgG-стрип» (Новосибирск, Россия), диапазон разведений составлял 1:100 – 1:80000. Зависимость значений оптической плотности (ОП) образцов от содержания специфических антител к ВПГ-1 при соответствующих разведениях образца представлена на рисунке 1.

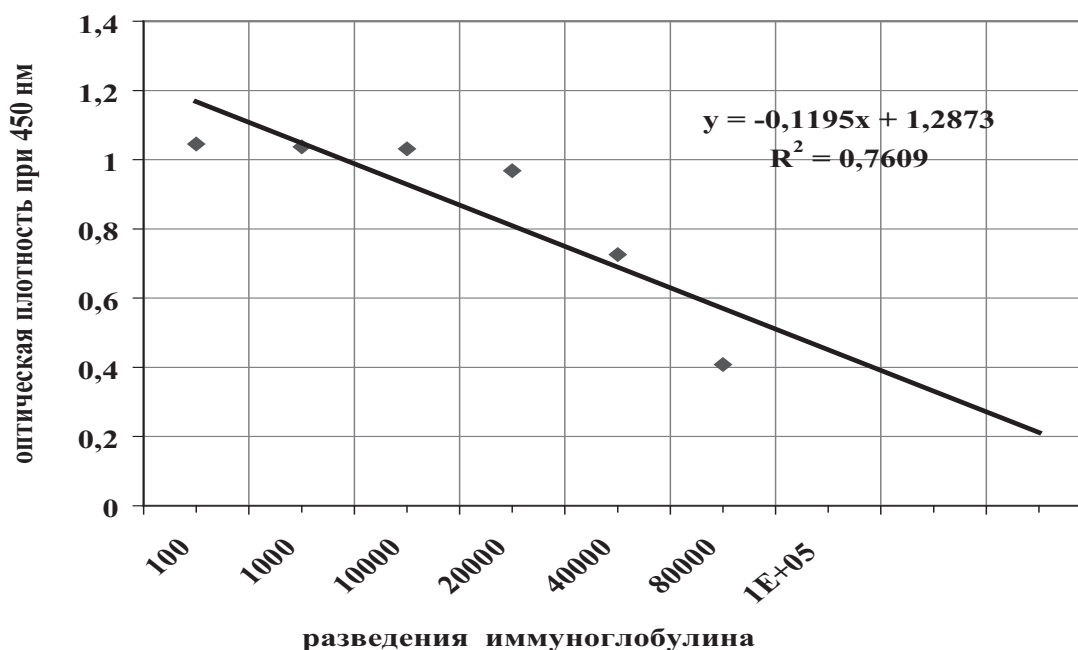


Рисунок 1. Определение титра антигерпетических антител в препарате иммуноглобулина методом линейной аппроксимации.

При этом, значение положительного контроля составляло 1.041 ОЕ, отрицательного – 0,021, соответственно граничное значение 0,121 ОЕ. Исходя из полученных данных, титр специфических антител в исследуемом образце превышает максимальное разведение 1:80000, так как титром считается то разведение, при котором значение ОП находится на уровне граничного значения. Нами был использован метод линейной регрессии для определения титра специфических антител к вирусу простого герпеса 1 типа в исследуемом препарате, который составил 1: 100000.

Известно, что активность иммуноглобулина зависит от уровня avidности специфических антител. Тестирование avidности исследуемого образца ИГ с использованием коммерческой тест-системы Д-2156 «ВектоВПГ1,2-IgG – avidность» (Новосибирск, Россия) показало, что ин-

декс avidности специфических антител к вирусу герпеса простого составляет 90.

Таким образом, охарактеризовано показатели специфической активности исследуемого препарата иммуноглобулина. Определено, что титр специфических антител к вирусу простого герпеса составляет 1:100000, индекс их avidности 90.

Изучение цитотоксичности препарата иммуноглобулина в культуре клеток ВНК-21 выявило его низкую цитотоксичность для клеток ВНК-21. В максимальной использованной нами концентрации 45-55 мг/мл при 3 дневной экспозиции ИГ не был токсичен.

Проведены исследования вируснейтрализующей активности препарата ИГ в отношении ВПГ-1. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Иммуоиннактивация вируса герпеса простого 1 типа препаратом ИГ**

Разведение ИГ	Концентрация ИГ (мкг/мл)	Время инкубации (мин) при 37°С	Нейтрализация инфекционности (%)
1:16	6-7	45	100
1:32	3-4	45	100
1:64	2	45	91
1:128	0,7-0,9	45	52
1:256	0,4-0,5	60	100
1:512	0,21-0,18	60	51
1:1024	0,1	60	28
1:2048	0,05	60	24

Определено, что исследуемый препарат на 100% нейтрализует инфекционность вируса простого герпеса 1-го типа в разведениях 1:16, 1:32 при 45 минутной экспозиции, а в разведении 1:256 при 60 мин инкубации. Вируснейтрализующая активность ниже 30 % на-

блюдается при разведении препарата более чем в 1000 раз.

Обобщенные результаты изучения антивирусного действия препарата ИГ при использовании различных схем обработки клеток представлены в таблице 2.

Таблица 2.

**Активность препарата иммуноглобулина человека против вируса герпеса простого 1 типа в культуре клеток ВНК-21**

Разведение препарата	Концентрация (мкг/мл)	Оптическая плотность (1000хОП <sub>540</sub> )*		
		Обработка за 24 ч до заражения	Обработка за 1 ч до заражения	Обработка после заражения
1:16	6-7	252±36	266±47	300±26
1:32	3-4	294±18	154±26	262±31
1:64	2	199±16	117±22	201±27
1:128	0,7-0,9	135±29	117±10	218±11
1:256	0,4-0,5	199±29	114±5	195±32
1:512	0,2	185±36	128±7	156±28
1:1024	0,1	169±30	116±9	147±25
1:2048	0,05	167±21	118±8	136±18
1:4096	0,025	137±2	116±9	136±17
КВ**	-	124±17	124±5	149±18
КК***	-	258±11	255±18	292±22

Примечание. \* - приведены средние значения, вычисленные из трех-четырёх повторов.\*\* КВ – контроль вируса, \*\*\* КК – контроль клеток

С использованием метода регрессионного анализа программы Microsoft Excel были вычислены эффективные концентрации препарата на

50% ингибирующие репродукцию вируса герпеса простого типа 1 (рис.2).

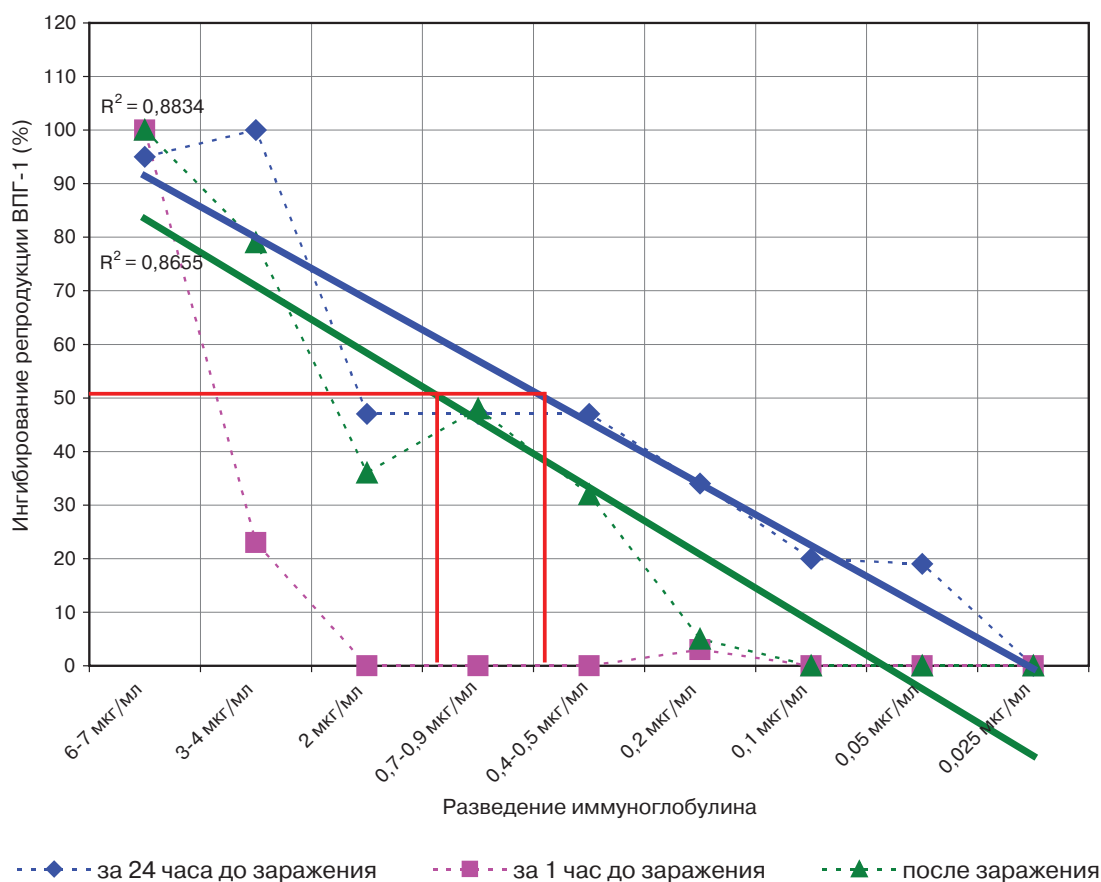


Рисунок 2. Выраженность антигерпетического действия иммуноглобулина человека против вируса герпеса простого 1 типа по результатам статистической обработки

В высоких концентрациях (90 – 7 мкг/мл) препарат ИГ полностью блокировал репродукцию вируса в клетках, независимо от схемы обработки. Снижение используемых концентраций препарата ИГ позволило обнаружить зависимость антивирусного действия от схемы внесения (рис.2). Анализ результатов антивирусного действия ИГ, полученных при внесении препарата за 24 часа до заражения клеток или после заражения вирусом, показал, что зависимость величины ингибирования от концентрации препарата ИГ имеет линейный характер. Антивирусная активность обнаружена для широкого диапазона концентраций (90-0,05 мкг/мл). Величина достоверности аппроксимации составляла 0.8655, что свидетельствует о близости значения линии тренда к фактическим данным. Как видно из результатов регрессионного анализа, эффективная концентрация препарата на 50% ингибирующая репродукцию

вируса ( $EC_{50}$ ) составляла около 0,9-0,7 мкг/мл. Обработка клеток ИГ за 1 час до заражения вирусом не оказывала существенного влияния на репродукцию вируса при использовании разведений препарата ниже 7- 6 мкг/мл.

В лечебной схеме обработки препарат ИГ был активен в диапазоне концентраций 90-0,2 мкг/мл. Эффективная концентрация препарата на 50% ингибирующая репродукцию вируса ( $EC_{50}$ ) при этом составляла > 0,9-0,7 мкг/мл.

В противовирусной терапии применяются как этиотропные средства, действующие непосредственно на вирусы или отдельные этапы их репродукции, так и иммуномодуляторы, корректирующие нарушения иммунитета вследствие развития вирусной инфекции. Использование иммунотропных средств является наиболее физиологичным путём лечебного воздействия,

кроме того, это позволяет снизить потребность больных в химиотерапевтических препаратах, усиливая действие последних. Рекомендуется иммунотерапия и при иммунодефицитах, поскольку в этом случае увеличен риск развития осложнений [7, 8]. Современный клинический опыт показывает наилучшие результаты при использовании лечебных препаратов с разными мишенями действия [9, 14-17]. В таком комплексном лечении большой интерес вызывает применение специфических иммуноглобулинов. Иммуноглобулинотерапия является одним из подходов лечения разнообразных инфекционных заболеваний человека, эффективность которого признана во всем мире ввиду накопления обширной доказательной базы [8]. Коммерческие препараты иммуноглобулинов содержат широкий спектр антител к ряду патогенных для человека вирусов: кори, краснухи, гепатитов А и В, аденовирусу, герпесвирусам, вирусу клещевого энцефалита, ротавирусу, вирусу ветряной оспы и др. Пробразом современных иммуноглобулинов были специфические антисыворотки. Развитие биотехнологий позволило применить пассивную иммунизацию в виде очищенных и концентрированных иммуноглобулинов для внутримышечного или внутривенного введения. Эффективность препаратов иммуноглобулинов долгое время объяснялась исключительно за счет пассивного переноса антител, которые, связываясь с соответствующими антигенами, нейтрализуют их, переводят в нерастворимую форму, в результате чего запускаются механизмы фагоцитоза, комплемент-зависимого лизиса с последующей элиминацией антигенов из организма [8]. Иммуноглобулины обеспечивают клеточную цитотоксичность, осуществляя при этом противовирусную и противобактериальную иммунную защиту [6, 16]. Функции ИГ связаны с Fc-фрагментом, который, связываясь с клетками ретикулоэндотелиальной системы, компонентами комплемента способствует опсонизации возбудителя, активации фагоцитоза, лизиса, стимуляции функции полиморфноядерных клеток. Известна способность ИГ изменять продукцию интерлейкинов и уровень экспрессии рецепторов к ИЛ-2, воздействовать на различные субпопуляции Т-лимфоцитов, стимулировать процесс фагоцитоза [2, 6, 8].

В результате проведенных исследований определены показатели специфической активности *in vitro* препарата иммуноглобулина человека против вируса простого герпеса 1-го типа для внутримышечного введения. Титр специфических IgG антител к вирусу простого герпеса в препарате составляет 1:100000, индекс их авидности равняется 90. Исследовано вируснейтрализующее действие препарата и выявлена зависимость его активности от титра

антител и времени инкубации. Показано анти-вирусное действие препарата на репродукцию вируса герпеса простого типа 1, штамм УС в культуре перmissive клеток ВНК-21 при внесении его как по профилактической, так и по лечебной схеме обработки. По нашему мнению, действие препарата при внесении его за 24 часа, скорей всего, обусловлено тем, что иммуноглобулин может выступать индуктором -интерферона, который и ингибирует репродукцию вируса. В подтверждение этой гипотезы препарат ИГ при внесении его за 1 час до заражения клеток проявил активность только в высоких концентрациях. Активность его в этом случае возможно связана с блокированием рецепторов вируса на клеточных мембранах, что препятствует адсорбции вируса и дальнейшей его репродукции. Наибольший интерес представляет эффект ингибирования репродукции вируса при внесении препарата ИГ после заражения клеток. Вирус уже адсорбирован на поверхности клеток и, следовательно, ИГ не должен препятствовать его адсорбции. Возможно, он препятствует дальнейшему проникновению вируса в клетку, раздеванию или выходу вируса из клетки. Представляет интерес более детальное изучение механизма действия специфического иммуноглобулина на репродукцию вируса в чувствительной клетке, что позволит получить новые знания и может дать новые векторы совершенствования иммуноглобулинотерапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Герпетическая инфекция: вопросы патогенеза, методические подходы к терапии / Ф.И. Ершов, А.Л. Коваленко, М.Г. Романцов, С.Ю. Голубев, С.Г. Вишнев; Под ред. М.Г. Романцова, С.Ю. Голубева. - М., 1997. - 97 с.
2. Посібник з хіміотерапії вірусних інфекцій: Навчально-методичний посібник для лікарів /за ред. І.В. Дзюблик. - К., 2004. - 176 с.
3. *Jenkins F.J., Rowe D.T., Rinaldo C.R.* Herpesvirus infections in organ transplant recipients//Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.-2003.-10, N1.- P. 1-7.
4. *Тюриков Ю.М.* На новый уровень безопасности//Медицина и экономика сегодня.- 2007, № 6.- С. 91-92.
5. *Резниченко Н.А., Чурилов А.В., Федорова Н.А.* Использование современных противовирусных и пробиотических препаратов в комплексной терапии женщин и девушек с обострениями хронической рецидивирующей герпетической инфекции I, II, VI типов//Імунологія та алергологія.-2010.-1.- С. 69-74.

6. *Нестерова Н. В., Курищук К. В., Загородня С. Д.* Герпетические инфекции и специфические иммуноглобулины //Журнал практического лікаря.– 2004.– 5-6.– С. 83-86.
7. *Писарева С. П., Дяченко Н. С.* Отечественные специфические иммуноглобулины на страже здоровья//Здоровье женщины.– 2003.– 3.– С. 137-141.
8. *Казимчук В.Е., Мальцев Д.В.* Иммуноглобулины и иммуноглобулинотерапия. Монография, Киев, Феникс, 2010.– 208 с
9. *Лыскина Г.А., Трофимова В.В.* Применение препаратов внутривенных иммуноглобулинов в комплексном лечении системных заболеваний соединительной ткани у детей// Педиатрия.– 2000.– 2.– С. 62-67.
10. *Fucuchi K., Sakagami H., Okuda T., et al.* Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds//Antiviral Research.–1989.–11.– P. 285-298.
11. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays//J Immunol. Methods.– 1983.–65.–P. 55-63.
12. *Ashley R.L., Dalessio J., Dragavon J., et al.,* Underestimation of HSV-2 seroprevalence in high-risk population by microneutralization assay//Sexually Transmitted Diseases. – 1993. – 20, N4. – P. 230-235
13. *da Silva A. C., Kratz J.M., Farias F.M. et al.* In vitro antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian coast//Biol. Farm. Bull.– 2006.–29.– P.135-140.
14. *Чувиров Г.Н, Маркова Т.П.* Актуальные вопросы противовирусной терапии//РМЖ.– 2002.–10, №3.– С.115-120.
15. *Казимчук В. Е., Мальцев Д. В.* Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. Монография. Киев, Феникс, 2009.–250 с.
16. *Кострова О.М., Алешкин В.А.* Иммуноглобулины для профилактики и лечения вирусных инфекций.// Иммунология. – 1995. – 6. – С. 6 -11.
17. *Jagadeesh Bayry, Sebastien Lacroix-Desmazes, Michel D. Kazatchkine, Srinivasa Kaveri.* Intravenous immunoglobulin for infectious diseases: tailor-made or universal?//J Infect Dis.– 2003.– 188.– P. 1610.

**РЕЗЮМЕ**

**АНТИГЕРПЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ІМУНОГЛОБУЛІНУ ЛЮДИНИ ПРОТИ ВІРУСУ ГЕРПЕСУ ПРОСТОГО 1 ТИПУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ВНК-21**

*Куркіна О. В., Повниця О. Ю., Загородня С. Д., Білявська Л. О., Нестерова Н. В.*

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

Проведені дослідження віруснейтралізуючої і антигерпетичної дії препарату імуноглобулін людини (ІГ) проти вірусу простого герпесу 1 типу в культурі клітин ВНК-21. Показано, що досліджуваний препарат, рівень специфічних антитіл котрого складав біля 1:100000, а індекс авидності дорівнював 90, мав виражену віруснейтралізуючу та антивірусну активність. Ефективна концентрація препарату (EC50), яка на 50% інгібувала репродукцію вірусу, складає 0,7 - 0,9 мкг/мл.

**Ключові слова:** вірус герпесу простого 1 типу, гомологічні імуноглобуліни, культура клітин ВНК-21.

**SUMMARY**

**ANTIVIRUS ACTIVITY OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 IN CELL CULTURE BHK-21**

*Kurkina O. V., Povnitsa O. Y., Zagorodnyaya S. D., Belyavskaya L. A., Nesterova N. V.*

*D.K. Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine*

The studied virus neutralization and anti-herpes virus activity of human immunoglobulin (IG) against herpes simplex virus type 1 in cell culture BHK-21. It is shown that the IG, which analyzed the level of specific antibody, is around 1: 100000 at avidity 90, has expressed antiviral and virus neutralization activity. The effective concentration (EC50) on 50% inhibition of HSV-1 reproduction is 0.7-0.9 µg/ml.

**Keywords:** Herpes simplex virus type 1, specific immunoglobulin, culture cells BHK-21.