

ЦИКЛОФЕРОН В ТЕРАПИИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ОБЕЗЬЯН

М. В. Мезенцева,¹ В. З. Агрба,² Д. Д. Карал-оглы,² А. А. Агумава²

Инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (ЦМВ), широко распространена среди людей и обезьян и ассоциирована с большим спектром патологических состояний. Разновидность патологии, вызываемой ЦМВ, закономерности его распространения, филогенез, сходство циркуляции у человека и макаков резус позволяют считать ЦМВ-инфекцию обезьян адекватной моделью для человека, на которой можно разрабатывать вопросы профилактики и лечения этой инфекции у людей. В работе приведены результаты изучения эффективности действия иммуномодулирующего и антивирусного препарата циклоферон при цитомегаловирусной инфекции макаков резус. Показано, что циклоферон вызывал повышение у обезьян продукции ИФН- α и способствовал продлению сроков ремиссии у животных, носителей ЦМВ.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция, интерферон, циклоферон

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции имеет большое значение в медицине в связи с широким распространением этого заболевания в человеческой популяции и его актуальностью в акушерстве, неонатологии, педиатрии, клинической вирусологии, трансфузиологии, трансплантологии. Усугубляется эпидемиологическая значимость распространения ЦМВ из-за бессимптомного носительства, которое наблюдается у 80 % населения [6]. Аналогичная ситуация наблюдается и среди обезьян, особенно макаков резус (RhCMV). В некоторых колониях носительство этого вируса отмечено у 100 % приматов [17]. Медленная репликация представителей этого семейства, относительно низкая вирулентность и цитопатогенность служат причиной перехода вируса в латентное состояние, вызывая хронические инфекции с постоянными рецидивами, частота которых с годами возрастает [6].

Согласно исследованиям, проведенным в Адлерском питомнике и литературным данным [4, 17] большинство взрослых обезьян и значительное количество обезьян до 1 года инфицировано этим вирусом. Наибольшую опасность ЦМВ-инфекция представляет для обезьян с иммунодефицитами, беременных самок и новорожденных [15, 16]. У обезьян наблюдается пожизненное носительство инфекции. Вывести вирус из организма невозможно. Показано, что такие препараты как ацикловир, ганцикловир, фоскарнет влияют на размножение вируса, однако не способны полностью его элиминировать. Исследования ЦМВ-инфекции обезьян (эпидемиологии, особенностей молекулярно-биологической структуры и филогенеза) [3] позволяют рассматривать ее как адекватную модель для изу-

чения этого заболевания людей с целью разработки специфической терапии и профилактики. Кроме того, на обезьянах Адлерского питомника отечественные ученые изучали препарат кипферон и показали его эффективность [5, 12].

Герпесвирусные инфекции, вызванные вирусами простого герпеса, цитомегаловирусом, вирусом Эпштейна-Барр и др. характеризуются стимуляцией образования интерферонов (ИФН) α , β , γ , а также продукцией ряда про- и противовоспалительных цитокинов (фактора некроза опухолей – ФНО- α , интерлейкинов – ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, гранулоцито-макрофагального колониестимулирующего фактора) и хемокинов, действие которых направлено на стимуляцию клеточного и гуморального иммунитета, а также на формирование специфического противовирусного иммунитета. ЦМВ обладает множественными механизмами иммуносупрессии и ускользания от иммунного ответа хозяина, свойственными другим вирусам [11, 13, 14]. Понимание механизмов иммуносупрессии, составляющих патогенетическую основу развития латентной ЦМВ инфекции, представляет особый интерес для определения средств лечения страдающих этим заболеванием.

Отечественные индукторы ИФН (циклоферон, амиксин, кагоцел, ридостин и др.) стали успешно применять в последние 8 – 10 лет [7, 8]. Установлено, что антивирусное действие этих препаратов опосредовано в основном индукцией в ИФН- α/β , γ и других цитокинов, обладающих широким спектром эффекторных и иммунорегулирующих функций, усиливающих иммунный ответ организма на внутреннюю инфекцию. Для исследования на ЦМВ-инфицированных обезьян нами был выбран препарат циклоферон. Терапия герпесвирусных инфекций представляет значительные трудности. В связи с появлением в последнее время новых штаммов, резистентных к ацикловиру, стал актуален поиск новых средств терапии, которыми и яви-

¹ ФГБУ НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16.

² НИИ медицинской приматологии РАН, Сочи-А, Веселое-1.

Таблица 1. Наличие латентных вирусов приматов у макаков резус

№ обезьян	Возраст (лет)	SIV	STLV	HB	ЦМВ
32411 к	8	–	–	–	+
33969 к	4	–	–	–	+
32794	7	–	–	–	+
32344	8	–	–	–	+
33999	4	–	–	–	+

Примечание. к – контроль – животные, не принимавшие циклоферон.

лись индукторы интерферонов, обладающие антивирусными свойствами. Так, у больных герпетическими инфекциями, леченных циклофероном, наблюдалось увеличение CD3 Т-лимфоцитов, CD4 хелперов, CD8 супрессоров, а также естественных киллеров, усиление продукции ИФН- α и ИФН- γ [8].

Ранее нами показано [1, 9, 10], что макаки резус и макаки яванские обладают более высокой способностью к продукции ИФН по сравнению с другими приматами (зеленые мартышки, павианы гамадрилы, макаки лапундер).

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования явилось изучение эффективности отечественного иммуномодулирующего и противовирусного препарата циклоферон при цитомегаловирусной инфекции макаков резус.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отобранных в эксперимент животных содержали в индивидуальных жилых клетках, оборудованных автоматическими поилками, при температуре в помещениях 18 – 22 °С. Животные были адаптированы к условиям содержания и персоналу в течение 1 месяца. Кормление животных – брикетированными кормами, сбалансированными по всем показателям с добавлением зеленых кормов, фруктов и сладостей. Все исследования на животных проводили в строгом соответствии с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом РФ о защите животных от жестокого обращения.

Было проведено обследование 5 макаков резус (4 – 8 лет) на наличие латентных вирусов приматов. Эти исследования проводили методом ИФА на SIV (вирус иммунодефицита обезьян), STLV (Т-лимфотропный ретровирус обезьян), HB (Herpes B – вирус

простого герпеса обезьян) и ЦМВ, но обнаружены у них были лишь антитела к ЦМВ (табл.1). Для определения антител класса IgG и IgM к ЦМВ использовали тест-системы НПО “Диагностические системы”, Россия, Нижний Новгород. Для выявления антител (АТ) к вирусу герпеса использовали планшеты, сорбированные антигеном вируса простого герпеса человека I и II типа производства “Meridian Diagnostics inc.”, США. Для выявления антител к STLV использовали BIO-RAD, Франция. Для определения антител к SIV использовали тест-систему для выявления антител к ВИЧ I и II типа “Диагностические системы”, Россия. Измерения результатов иммуноферментного анализа проводили на анализаторе АИФР-01 Униплан производства ЗАО “ПИКОН”.

Изучение показателей ИФН статуса проводили у всех обезьян по методике, описанной нами ранее [1, 2, 9] Способность лимфоцитов обезьян отвечать интерфероновой реакцией *in vitro* на адекватное воздействие определяли как интерфероновый статус (ИФН – статус), в понятие которого входило тестирование содержания ИФН- α , ИФН- γ , спонтанной продукции интерферона и определение его в сыворотке крови (циркулирующий ИФН). В качестве индуктора ИФН- γ был использован вирус болезни Ньюкасла (ВБН) в титре 10^9 – 10^{11} ЦПД 50/0,1 мл. В качестве индуктора ИФН- γ был использован митоген Кон А (20 мкг/мл, фирма “ПанЭко”). Титровали образцы на клеточной культуре Vero (почка зеленой мартышки) против 100 ЦПД (цитопатических доз) вируса энцефаломиокардита мышей (ВЭМК), оттитрованного на клетках культуры Vero. За титр ИФН принимали величину, обратно пропорциональную максимальному разведению образца, при котором наблюдалось 50 %-ное снижение специфической деструкции монослоя клеток культуры Vero.

Две макаки резус использовались в качестве контроля, им вводился физраствор 7 дней в количестве 0,5 мл в/в (внутривенно). Трем обезьянам вводили 7 дней 12,5 % раствор циклоферона в количестве 0,5 мл внутривенно (табл. 2).

По окончании введения циклоферона или физраствора забор крови у животных проводили дважды с интервалом в месяц (через 15 и 45 дней после окончания приема препарата). Таким образом, исходно, через 15 и 45 дней после окончания введения препаратов у животных исследовали показатели ИФН статуса и клинический анализ крови, включающий тестирование следующих показателей: количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, базофилов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, гемоглобина, цвет. показатель, СОЭ.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили общепринятыми статистическими методами с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 2. Схема введения препаратов

№	№ обезьяны	Дни введения препарата	Вводимый препарат	Количество вводимого препарата (в вену)
1	32411(к)	1, 2, 3, 4, 8,	Физраствор	0,5 мл
2	33969(к)	9, 10		
3	32344	1, 2, 3, 4, 8,	Циклоферон	0,15 %
4	32794	9, 10		раствор
5	33999			0,5 мл

Таблица 3. Интерфероновый статус обезьян до и на 15 и 45 день после введения препаратов

№ обезьяны	До/после введения	Возраст, лет	Титры интерферона (Ед/мл)			
			ИФН-α	ИФН-γ	Спонт. выаб. ИФН	Сывороточный ИФН
32411(к)	До	8	64	16	8	<4
	15 день		64	16	4	<4
	45 день		64	32	4	16
33969 (к)	До	4	256	32	<4	<4
	15 день		64	32	8	8
	45 день		64	32	4	8
33999	До	4	32	32	8	4
	15 день		256*	64	4	<4
	45 день		256*	64	4	8
32794	До	7	128	128	32	4
	15 день		256	128	<4*	8
	45 день		256	128	32	16
32344	До	8	64	64	32	8
	15 день		64	64	16	4
	45 день		256*	64	<4*	8
Макаки резус (<i>Macaca mulatta</i>) – норма		3 – 8	146,58 ± 19,27	60,8 ± 5,11	5,42 ± 0,57	5,55 ± 0,57

Примечание. * – значение статистически отличается от исходного $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перед началом введения циклоферона макаки резус были обследованы на интерфероновый статус для последующего сравнения с показателями интерферонового статуса после проведенной терапии. Результаты обследования до и после введения препаратов приведены в табл. 3. У 4 из 5 обезьян в начале наблюдения наблюдалось угнетение продукции ИФН-α (32 – 64 Ед/мл) и ИФН-γ (16 – 32 Ед/мл) и у 2 животных – повышение спонтанной продукции интерферона (32 Ед/мл).

Из приведенных в табл. 3 данных следует, что проводимая терапия у всех 3-х обезьян оказала влияние на продукцию ИФН-α, обладающего противовирусным эффектом. Так, значительно повысился уровень ИФН-α на 45 день после введения иммуномодуляторов у обезьян № 33999, 32344 в 4 – 8 раз (статистически достоверно) и в 2 раза – у обезьяны № 32794. Отмечено, что после циклоферона снижался спонтанно продуцируемый ИФН у обезьян к 15 или 45 дню наблюдения, что также свидетельствовало о нормализации системы ИФН. При этом АТ к ЦМВ в сыворотке животных оставались и на 40 день наблюдения. Но если у контрольных обезьян, не принимавших циклоферон, в осеннее-зимний период было отмечено обострение ЦМВ-инфекции, сопровождающееся повышением АТ класса IgM к ЦМВ, то обезьяны, принимавшие циклоферон, оставались в ремиссии.

При исследовании в динамике клинического анализа крови у обследуемых обезьян не было обнаружено изменений ни одного из гематологических показателей.

Таким образом, были определены показатели интерферонового статуса у группы макаков резус с наличием антител к ЦМВ до и после введения им иммуномодулятора циклоферона. Существует прямая связь между показателями ИФН статуса и тяжестью заболевания обезьян, а нарушение этих показателей указывает на целесообразность иммунотерапии. Определение интерферонового статуса в динамике может выступать как объективный критерий эффективности терапии обезьян. В нашем случае проведенные исследования показали, что выбранная схема терапии животных способствовала повышению у них титров ИФН-α, обладающего выраженным антивирусным эффектом. Этот факт объясняет некоторые механизмы лечебного действия циклоферона при вирусных инфекциях.

ВЫВОД

Полученные результаты показали, что иммуномодулятор отечественного производства циклоферон вызывает повышение у обезьян продукции ИФН-α и способствует продлению сроков ремиссии у животных, носителей цитомегаловирусной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. З. Агрба, Б. А. Лапин, М. В. Мезенцева и др., *Бюл. экпер. мед.*, № 8, 223 – 225 (2009).
2. В. З. Агрба, М. В. Мезенцева, И. М. Сургучева и др., *Материалы международной научной конференции*, Сочи-Адлер (2007), сс. 111 – 118.
3. А. А. Агумава, М. Г. Чикобава, Б. А. Лапин, *Мол. генетика, микробиол. и вирусол.*, № 3, 36 – 39 (2010).
4. А. А. Агумава, М. Г. Чикобава, Б. А. Лапин и др., *Вопр. вирусол.*, № 2, 28 – 32 (2011).

5. В. А. Алешкин, Б. А. Лапин, С. С. Афанасьев и др., *Материалы Всероссийской научной конференции*, Сочи-Адлер (2006), сс. 49 – 54.
6. Р. М. Балабанова, Т. Н. Рыбалкина, Н. В. Каражас и др., *ЖМЭИ*, № 1, 79 – 80 (2009).
7. Ф. И. Ершов, *Материалы второй международной конференции*, Сочи-Адлер (2011), сс. 179 – 183.
8. Ф. И. Ершов, О. И. Киселев, *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*, Москва (2005).
9. Д. Д. Карал-оглы, *Автореферат дис. канд. биол. наук*, Сочи (2006).
10. Д. Д. Карал-оглы, В. З. Агрба, Н. М. Медведева и др., *Вестн. РАМН*, № 9, 17 – 20 (2005).
11. Л. В. Кравченко, А. А. Афонин, *Педиатрия*, **90**(1), 39 – 43 (2011).
12. Б. А. Лапин, В. А. Алешкин, В. Ю. Давыдкин и др., *Журн. микробиол.*, № 3, 57 – 62 (2003).
13. Н. О. Моллаева, Г. М. Насруллаева, Н. Д. Гулиев, *Медицинские новости*, № 2, 98–100 (2011).
14. В. А. Шаркова, А. В. Гордеец, О. Г. Савина, *Современные наукоемкие технологии*, № 3, 94 – 94 (2008).
15. A. N. Kaur, C. L. Kassis, Hale, et al., *J. Virol.*, **77**(10), 5749 – 5758 (2003).
16. G. Sequar, W. J. Britt, F. D. Jakeman, et al., *J. Virol.*, **76**(15), 7661 – 7671 (2002).
17. A. F. Voevodin, P. A. Marx, *Simian virology*, Wiley-Blackwell (2009), pp. 309 – 322.

Поступила 06.03.12

CYCLOFERON THERAPY OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN MONKEYS

M. V. Mezentseva¹, V. Z. Agrba², D. D. Karal-ogly², and A. A. Agumava²

¹ Ivanovskii Institute of Virology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Gamalei 16, Moscow, 123098, Russia;

² Institute of Medical Primatology, Veseloe-1, Sochi, 354376, Russia

Cytomegalovirus (CMV) infection is a wide-spread disease throw humans and monkeys, which and associated with various diseases. The development of this infection in human organism is much like that in rhesus macaque, which makes CMV-infected monkeys adequate model for studying and elaborating prophylactic and therapeutic measures against this disease in humans. This article presents data on the efficiency of cycloferon action on animals with the *M. mulatta* CMV infection. Cycloferon stimulated an increase in the IFN- α production and promoted the period of remission in CMV-infected animals.

Key words: Cytomegalovirus infection; interferon; cycloferon