

Мальдов Д.Г.¹, Андропова В.Л.², Григорян С.С.², Исаева Е.И.², Балакина А.А.³, Терентьев А.А.³, Ильичёв А.В.¹, Галегов Г.А.²

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СТИМФОРТЕ НА ГЕРПЕСВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ

¹ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва;

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

³ФГБУ «Институт проблем химической физики» РАН, 142432, Московская область

При острой герпесвирусной инфекции в пораженных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) органах мышей при введении Стимфорте (100 или 250 мкг/мышь) наблюдается усиление протеазной активности и появляются значительные количества гранзима В, следовательно, действие препарата направлено на активацию клеток-киллеров, играющих чрезвычайно важную роль в подавлении инфекции ВПГ-1. Несмотря на то что введение Стимфорте (100 мкг/мышь) интактным мышам индуцирует продукцию интерферона β (ИФН-β) и не влияет на продукцию ИФН-λ, у зараженных ВПГ-1 животных после введения Стимфорте продукция ИФН-β в сыворотке крови, головном мозге и лёгких падает, а продукция ИФН-λ при введении 100 мкг/мышь Стимфорте достоверно растёт.

Ключевые слова: вирус герпеса простого; Стимфорте; иммуностимулятор; интерферон; натуральные клетки-киллеры; врождённый иммунитет.

Для цитирования: Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Григорян С.С., Исаева Е.И., Балакина А.А., Терентьев А.А., Ильичёв А.В., Галегов Г.А. Механизм действия стимфорте на герпесвирусную инфекцию. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5): 218-223. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-218-223>

Maldov D.G.¹, Andronova V.L.², Grigorian S.S.², Isaeva E.I.², Balakina A.A.³, Terentyev A.A.³, Ilyichev A.V.¹, Galegov G.A.²

THE MECHANISM OF STIMFORTE ACTION ON HERPESVIRUS INFECTION

¹SKY LTD, Moscow, 129301, Russian Federation;

²National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

³Institute of Problems of Chemical Physics, 142432, Moscow Region, Russian Federation

Increased protease activity and a significant amount of granzyme B were observed in in organs of mice infected with acute herpes simplex virus HSV-1 with the introduction of Stimforte (100 or 250 µg/mouse). Thus, this drug activates killer cells, which play an extremely important role in the suppression of HSV-1 infection.

Although the administration of Stimforte (100 µg/mouse) to intact mice results in the activation of IFN-β production and does not activate the production of IFN-λ, Stimforte administration to animals infected with HSV-1 reduces production of IFN-β in serum, brain and lungs, whereas the production of IFN-λ considerably increases as the result of administration of 100 µg/mouse of Stimforte.

Keywords: herpes simplex virus; Stimforte; immunostimulatory; interferon; natural killer cells; natural immunity.

For citation: Maldov D.G., Andronova V.L., Grigorian S.S., Isaeva E.I., Balakina A.A., Terentyev A.A., Ilyichev A.V., Galegov G.A. The mechanism of stimforte action on herpesvirus infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 218-223. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-218-223>

For correspondence: Dmitriy G. Maldov, Ph.D., Head of the Laboratory of pharmacology, SKY LTD, Moscow, 129301, Russian Federation. E-mail: maldov-dg@yandex.ru

Information about authors:

Maldov D.G., <http://orcid.org/0000-0002-8214-0538>
Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0288>
Grigorian S.S., <http://orcid.org/0000-0002-2178-0451>
Ilyichev A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4675-0766>

Isaeva E.I., <http://orcid.org/0000-0002-2523-0692>
Balakina A.A., <http://orcid.org/0000-0002-5952-9211>
Terentyev A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2259-8184>
Galegov G.A., <http://orcid.org/0000-0001-6162-1650>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 17 October 2017
Accepted 12 December 2017

Введение

Инфекции, вызываемые вирусами простого герпеса (ВПГ), чрезвычайно широко распространены во всем мире. Первичное инфицирование может осуществляться различными путями (контактным, половым, воздушно-

капельным, трансплацентарным, трансцервикальным, трансфузионным, а также при трансплантации органов, через инструменты при оперативных вмешательствах и т. д.), после чего ВПГ пожизненно сохраняется в организме и периодически вызывает рецидивы, частота и

Для корреспонденции: Мальдов Дмитрий Григорьевич, канд. биол. наук, заведующий лабораторией фармакологии ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва. E-mail: maldov-dg@yandex.ru

тяжесть протекания которых зависят от состояния иммунной системы.

Иммунный ответ организма на герпетическую инфекцию включает неспецифические иммунные реакции, реализующие естественную резистентность организма к патогену (врождённый иммунитет, в том числе продукция комплемента и интерферонов (ИФН)), а также воздействие цитотоксических Т-лимфоцитов (англ. cytolytic T-lymphocytes, CTL) и натуральных киллеров (англ. natural killer cells, NK) на инфицированные ВПГ клетки, и приобретённый иммунитет (выработка специфических антител) [1]. Для связывания со специфическими к ВПГ нейтрализующими антителами доступен только внеклеточный вирус. Однако при развитии герпетической инфекции большая часть новой генерации вирусных частиц не попадает в кровяное русло, распространяясь из клетки в клетку по цитоплазматическим мостикам, и остаётся недоступной для антител. Поэтому гуморальный ответ на герпетическую инфекцию имеет значение для контроля распространения вируса и локализации очага инфекции, протекающей по литическому типу. Одна из ведущих ролей в купировании острой фазы инфекции принадлежит цитокинам (в том числе семейству ИФН), повышающим активность макрофагов, полиморфно-ядерных лейкоцитов, NK-клеток и инициирующим включение механизмов противовирусного адаптивного иммунитета.

Однако герпесвирусы способны супрессировать большинство реакций врождённого иммунитета, в том числе продукцию ИФН- α , - β и - γ [2–5]. Показано, что у лиц, страдающих хронической герпетической инфекцией, наблюдаются различные нарушения ИФН-статуса и иммунной системы: снижение продукции ИФН- α и ИФН- γ и активности NK-клеток, нарушения Т-клеточного и гуморального звеньев иммунной системы (нейтропения, снижение количества CD3⁺, и/или CD3⁺CD4⁺, и/или CD3⁺CD8⁺, и/или CD3⁺CD56⁺, повышение количества CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов). Важно подчеркнуть, что в большинстве случаев отмечаются комбинированные нарушения иммунного статуса [6, 7]. Кроме того, у этой группы пациентов развивается вторичный (приобретённый) иммунодефицит, что связано с выработкой в процессе репродукции герпесвирусов белков, нарушающих функционирование главного комплекса гистосовместимости (англ. major histocompatibility complex, MHC) классов I и II путём блокирования рецепторов MHC (системы HLA (англ. human leucocyte antigens)) или связывания транспортёра клеточных антигенов TAP1, предотвращая перенос молекул MHC на поверхность инфицированных клеток [8], в результате чего нарушается каскад передачи сигналов пролиферации и дифференцировки в системе специфического иммунного ответа, взаимодействие CTL с клетками-мишенями, Т-киллеров с антигенпрезентирующими клетками. Вследствие развития вторичного иммунодефицита ВПГ ускользает от обнаружения клетками иммунной системы, что приводит к развитию персистирующей хронической герпесвирусной инфекции [7, 9].

Таким образом, состояние иммунной системы играет существенную роль в реактивации ВПГ, тяжести течения рецидива и продолжительности проведения необходимой противовирусной терапии. Поэтому представляется необходимым включение в комплексную терапию хронических герпетических инфекций препаратов, корректирующих иммунный ответ организма.

Как было показано нами ранее, препарат Стимфорте (лиофилизат хроматографически очищенной водной вытяжки из тушек ужей) в условиях *in vivo* супрессирует репродукцию как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, стимулируя различные звенья как врождённого, так и адаптивного иммунного ответа организма на вирусную инфекцию, т. е. оказывает комплексное воздействие на иммунную систему [10–15]. Вероятно, основным действующим компонентом препарата являются фрагменты гликозаминогликанов, прежде всего нейтральные фрагменты глюкуроновой кислоты. Однако механизм воздействия Стимфорте на иммунную систему сложен и до конца не изучен.

Целью данного комплексного исследования явилось продолжение ранее начатого детального изучения изменений механизмов противовирусного иммунитета под влиянием иммуностимулирующего препарата Стимфорте на фоне генерализованной герпетической инфекции.

Материал и методы

Препарат. Препарат Стимфорте (лиофилизированный порошок) произведён на опытно-биотехнологическом производстве Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (разработан ЗАО «СКАЙ ЛТД»).

Вирусы и клетки. Культуру клеток почек зелёной мартышки Vero E6 выращивали в ростовой питательной среде (среда Игла производства ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова») РАМН, соединённая с эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС, 5%) производства «ПанЭко» (Россия), с добавлением бензилпенициллина 100 ЕД/мл). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 ч. Полученную монослойную культуру клеток использовали для работ с ВПГ.

Эталонный штамм ВПГ 1-го типа L₂ (ВПГ-1/L₂(ТК⁺)) получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Животные. В исследовании использовали самцов белых линейных мышей BALB/c массой 12 г, полученных из питомника ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, филиал «Столбовая» (Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Все процедуры проводились строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977». В опытных и контрольных группах было по 15 животных. Инфекционный материал с титром вируса 1,5 · 10⁵ БОЕ/мл (5,18 lg БОЕ/мл) вводили внутривентриально (в/б). Доза вируса 3 · 10⁴ БОЕ/0,2 мл на мышью обеспечивала 50% гибель животных в контроле.

Схема введения препарата инфицированным животным. Стимфорте растворяли *ex tempore* в стерильном физиологическом растворе и вводили животным в/б в объёме 0,2 мл в разовых дозах 100, 150, 200 или 250 мкг/мышь (3,3, 5, 6,6 или 8,3 мг на 1 кг массы соответственно, по 3 мыши в каждой группе) двукратно по схеме: через 24 ч после заражения, затем вторично через 48 ч.

Для определения влияния препарата на репродукцию ВПГ в органном материале животных забивали через 4 сут после заражения, органнй материал (головной мозг, лёгкие) гомогенизировали при 4°C и готовили 10%

Таблица 1

Протеазная активность гомогенатов органов заражённых ВПГ-1 мышей, получавших разные дозы Стимфорте

Исследуемый материал	Доза Стимфорте, мкг/мышь			
	0 (контроль)	50	100	250
	протеазная активность, нг протеаз/мг белка			
Гомогенат мозга	94,6 ± 17,6	398,7 ± 13,8	972,3 ± 125,1	1411,2 ± 177,4
Гомогенат лёгких	116,3 ± 6,8	67,4 ± 21,3	176,0 ± 32,0	655,4 ± 35,4

Примечание. Здесь и в табл. 2: приведены результаты двух независимых опытов.

суспензию в физиологическом растворе. Суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Полученный таким образом супернатант хранили при -25°C. Инфекционный титр вируса в супернатанте определяли путём титрования в культуре клеток, как описано ниже.

Инфекционный титр ВПГ определяли методом бляшкообразования. Для этого монослойные культуры клеток Vero E6, выращенные в 24-луночных пластиковых планшетах («Costar», США), заражали 10-кратными разведениями вируса. Через 1 ч клеточный монослой отмывали от неадсорбировавшегося вируса физиологическим раствором, вносили среду покрытия по 2 мл/лунку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Среда покрытия состояла из сред Игла и 199 (производство ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН), соединённых в соотношении 1:1, 5% ЭТС, 0,4% агарозы («SIGMA», США). Через 48 ч среду покрытия удаляли, инфицированные культуры фиксировали 10% нейтральным формалином, окрашивали 0,5% раствором генцианвиолета и подсчитывали бляшки [12].

Вестернблот проводили по описанной ранее методике [16]. Для определения гранзима В использовали антитела фирмы «BioVision» (кат. № 3073R-100), для контроля – антитела к В-актину производства «R&D Systems». Вестернблот для определения ИФН-γ проводили по той же описанной ранее методике с первичными антителами фирмы «PBL Interferon Source», США.

Протеазную активность определяли по гидролизу меченного ФИТЦ-казеина фирмы «Sigma» (кат. № SIC0528) в соответствии с рекомендацией этой фирмы (модифицированный метод Twining).

Иммуноферментный анализ для определения ИФН-β и ИФН-λ проводили с использованием наборов фирмы «PBL Interferon Source», США.

Результаты

Как видно на рис. 1, двукратное введение Стимфорте мышам, инфицированным ВПГ-1, приводит к снижению инфекционного титра вируса в головном мозге и лёгких. Эффект, оказываемый препаратом, носит выраженный дозозависимый характер.

С целью выявления механизмов, с помощью которых Стимфорте супрессирует репродукцию вируса, мы изучили влияние препарата на протеазную активность в тканях мозга и лёгких инфицированных животных, а также на продукцию ИФН-β и ИФН-λ в условиях экспериментальной острой генерализованной ВПГ-1-инфекции у мышей.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, в головном мозге мышей, инфицированных ВПГ-1, протеазная активность снижается в 2 раза по сравнению с таковой

в мозге интактных животных – с 195,23 до 94,6 нг условного трипсина (1U). Однако у инфицированных животных, получивших Стимфорте в дозе 50 мкг, соответствующий показатель значительно выше – 398,7 нг, а при увеличении дозы препарата в 2 и 5 раз (100 или 250 мкг) – повышается до 972,3 и 1411,2 нг соответственно. Аналогичные результаты были получены при изучении уровня протеазной активности в лёгких под действием Стимфорте – эффект также носит дозозависимый характер. Методом вестернблота с использованием видоспецифичных антител мы показали, что количество гранзима В в поражённых органах мышей увеличивается пропорционально количеству введённого Стимфорте (рис. 2).

Если в гомогенате мозга инфицированных животных, получавших препарат в дозе 50 мкг/мышь, количество гранзима В составляло 1,67 мг/кг, при использовании препарата в дозе 250 мкг/мышь в тех же экспериментальных условиях количество гранзима В в мозге возросло до 8,3 мг/кг. В гомогенате лёгких данная закономерность выражена слабее.

Известно, что контроль герпесвирусной инфекции в ранней стадии осуществляется почти исключительно системой ИФН. J. Melchjorsen и соавт. [17] установили, что ВПГ-1 индуцирует экспрессию ИФН-α, -β и -λ (интерлейкинов 28 и 29 (ИЛ-28, ИЛ-29)), а также фактора некроза опухоли α и хемокинов CCL5 и CXCL10 в человеческих макрофагах моноцитарного происхождения дендритных клетках (ДК). Ранее нами было показано, что под действием Стимфорте происходит активация макрофагов, а также моноцитов [15] и нейтрофилов [11], причем на все эти виды клеток крови препарат оказывает прямое действие. Поэтому нам представлялось целесообразным исследовать влияние Стимфорте на состояние ИФН-статуса у инфицированных ВПГ-1 мышей в условиях генерализованной инфекции.

Как показывают данные, приведенные в табл. 2, у интактных мышей через 24 ч после введения Стимфорте наблюдается значительное усиление продукции ИФН-β – его вырабатывается в 1,6 раза больше, чем ИФН-α, и

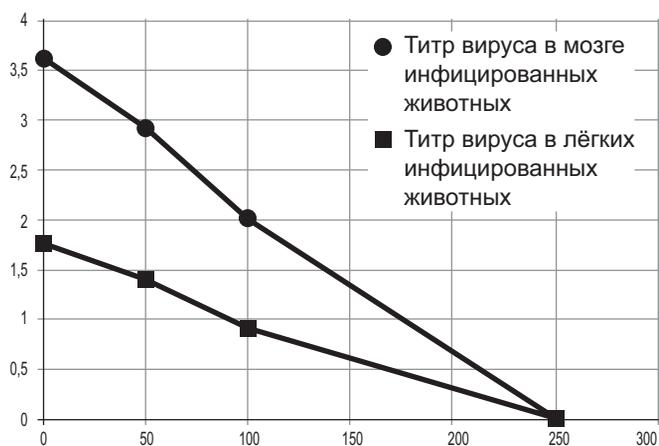


Рис. 1. Ингибирование репродукции ВПГ-1 Стимфорте в мозге и лёгких заражённых мышей.

По оси абсцисс – доза Стимфорте (в мкг/мышь); по оси ординат – инфекционный титр вируса (в lg БОЕ/мл). Кривые построены на основании данных, полученных в двух независимых опытах.

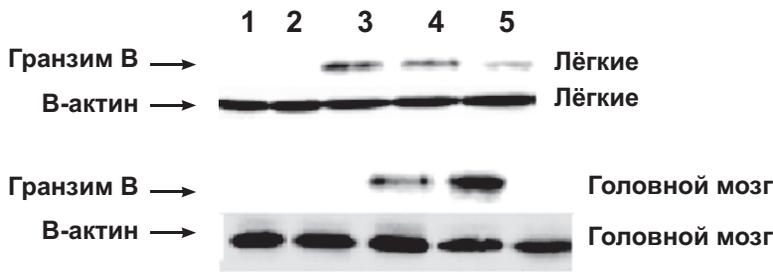


Рис. 2. Индукция гранзима В в поражённых органах заражённых ВПГ-1 мышей.

1 – органнй материал, полученный от контрольных инфицированных животных; 2 – органнй материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 50 мкг/мышь; 3 – органнй материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 100 мкг/мышь; 4 – органнй материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 250 мкг/мышь; 5 – органнй материал, полученный от контрольных интактных животных.

почти в 4 раза больше, чем ИФН-γ. Через 72 ч в сыворотке в значительных количествах обнаруживается только ИФН-γ. Продукция ИФН-λ у интактных мышей данным препаратом не стимулируется.

После заражения ВПГ-1 у мышей, не получавших Стимфорте (контрольная группа), в крови, головном мозге и лёгких увеличивается продукция не только ИФН-β (в 2,5 – 3 раза), но и ИФН-λ – в 10 раз (рис. 3). В отличие от контрольных групп животных при введении препарата Стимфорте зараженным ВПГ-1 мышам наблюдается падение содержания ИФН-β в сыворотке крови, тканях мозга и лёгких.

При введении Стимфорте в дозах 100 и 250 мкг/мышь количество ИФН-β в крови и мозге снижается примерно одинаково (в лёгких снижение продукции ИФН-β под влиянием дозы 250 мкг/мышь незначительно). Наоборот, количество ИФН-λ в сыворотке крови инфицированных животных после двукратного введения 100 мкг Стимфорте резко увеличивается до $852,5 \pm 9,19$ пг/мл, но при введении 250 мг препарата по той же схеме количество ИФН-λ падает до $400 \pm 43,84$ пг/мл (см. рис. 3). Следовательно, индукция ИФН-λ может играть существенную роль в подавлении герпесвирусной инфекции препаратом Стимфорте, а ИФН-β, вероятно, не является важным звеном в подавлении ВПГ-1-инфекции.

Обсуждение

Ранее нами было показано, что Стимфорте повышает активность как НК-, так и CTL-клеток [14]. Активность НК-клеток является одним из важнейших показателей

эффективности иммунного ответа на вирусную инфекцию. Так, при изучении иммунного статуса организма пациентов, страдающих хроническим орофациальным герпесом упорно-рецидивирующего течения, было показано, что более чем в 47% случаев наблюдался дефицит НК-клеток [6].

Изменение протеазной активности гомогенатов органов является критерием, позволяющим оценить влияние препарата на активность НК и CTL. Так как их цитотоксическая активность определяется экспрессией сериновых протеаз, среди которых наибольшей активностью обладает гранзим В, синтезирующийся исключительно в НК- и CTL-клетках, увеличение в этих клетках количества гранзима В также позволяет оценить влияние препарата на активность этих клеток.

Нами показано, что введение Стимфорте приводит к существенному дозозависимому повышению протеазной активности и увеличению количества гранзима В в тканях мозга и лёгких инфицированных животных. Полученный результат позволяет заключить, что одним из ключевых механизмов, позволяющих Стимфорте супрессировать репродукцию ВПГ-1, является активация НК-клеток.

Для подавления острой фазы герпесвирусной инфекции большое значение имеет интерфероновый статус организма. В ранней стадии инфекции распространение вируса контролируется ИФН: они оказывают не только выраженное противовирусное, но и иммуномодулирующее действие [18]. Следует принять во внимание, что при острой герпесвирусной инфекции продукция ИФН возрастает, но она может привести к транзиторной супрессии (истощению системы ИФН); герпесвирусы способны ингибировать продукцию ИФН-α, -β и -γ, поэтому при вирусных инфекциях с тяжёлым хроническим течением система ИФН находится в функционально-дефицитном состоянии [2–5, 19].

Мы установили, что после введения Стимфорте у интактных мышей в течение первых суток продукция ИФН-β повышается и к 24 ч количество ИФН-β в сыворотке достигает максимальных значений, а затем снижается, достигая через 48 ч практически нулевых значений, и через 72 ч в значительных количествах обнаруживается только ИФН-γ. Продукция ИФН-λ у интактных мышей данным препаратом не стимулируется. Поэтому мы предположили, что под воздействием Стимфорте в первые 2 сут после его введения зараженным ВПГ-1 мышам ведущую роль в ограничении репродукции вируса в органах и тканях животных играет ИФН-β, а в более поздних стадиях инфекции – ИФН-γ.

Однако при сравнительном изучении действия Стимфорте на интерфероногенез у заражённых и интактных мышей было установлено, что стимулирующее действие препарата на продукцию ИФН у этих групп животных кардинально отличается.

Если в условиях ВПГ-1-инфекции у мышей контрольной группы (нелеченных) продукция ИФН-β, и ИФН-λ растёт, при введении зараженным животным Стимфорте на фоне достоверного ингибирующего действия препарата на репродукцию вируса в мозге (см. рис. 1) наблюдается супрессия продук-

Таблица 2

Динамика изменения продукции ИФН в сыворотке незаражённых мышей после введения 100 мкг/мышь Стимфорте

Вид ИФН	Время после введения Стимфорте, ч				
	6	24	48	72	96
Количество ИФН, пг/мл					
Концентрация ИФН-α	22 ± 1,0	250 ± 47	н.и.	31,5 ± 21	н.и.
Концентрация ИФН-β	27,5 ± 1,5	405 ± 42,5	н.и.	29 ± 19,5	н.и.
Концентрация ИФН-γ	12,0 ± 0,5	106,5 ± 11	н.и.	175,5 ± 16,8	н.и.
ИФН-λ2/3	1,5 ± 0,5	3,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Примечание. н.и. – не исследовали.

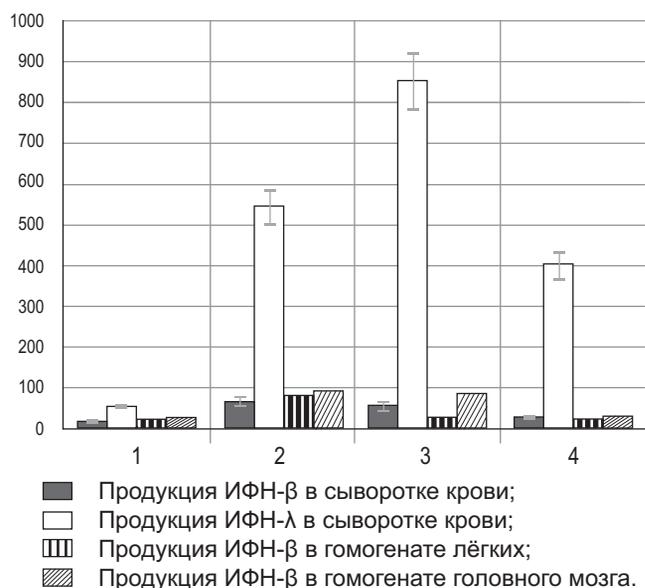


Рис. 3. Влияние Стимфорте на индукцию ИФН-β и ИФН-λ в органах и тканях заражённых ВПГ-1 мышей.

По оси абсцисс: 1 – органный материал, полученный от интактных мышей;

2 – органный материал, полученный от заражённых мышей; 3 – органный материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 100 мкг/мышь; 4 – органный материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 250 мкг/мышь. По оси ординат – концентрация ИФН (в пг/г).

ции ИФН-β, а количество ИФН-λ, наоборот, резко увеличивается после двукратного введения 100 мкг Стимфорте (см. рис. 3). Следовательно, индукция ИФН-λ может играть существенную роль в подавлении герпесвирусной инфекции препаратом Стимфорте, а ИФН-β, вероятно, не является важным звеном в подавлении ВПГ-1-инфекции.

Отсутствие стимулирующего действия Стимфорте на продукцию ИФН-β можно объяснить следующим образом. ВПГ-1 в ранней стадии вызывает активацию производства ИФН-β [20]. Однако позже вирусные белки блокируют его продукцию и действие. Как показали G. Melgoc и соавт. [21], сверххранний белок ICP0 ВПГ-1 ингибирует транскрипцию генов ИФН-β хозяина, хотя точный механизм этого процесса неясен. Методом иммунопреципитации инфицированных клеточных лизатов было установлено, что ICP0 образует комплекс, включающий ИФН-регулирующий фактор-3 (IRF-3) и транскрипционные коактиваторы p300 и CBP (англ. CREB-binding protein, белок, связывающий трикарбонные кислоты). Однако в отличие от некоторых других вирусных белков, которые ингибируют активность IRF-3 путем его фосфорилирования и димеризации, ICP0 не оказывает прямого действия на IRF-3. Авторы предполагают, что ICP0 активирует связывание IRF-3 и CBP/p300 с ядерными структурами, следствием чего является инактивация и ускоренная деградация IRF-3, что в свою очередь приводит к снижению продукции ИФН-β. M. Zhang и соавт. [22] показали, что ВПГ-2 также ингибирует транскрипцию генов, способствующих индукции IRF-3, в том числе ИФН-β. Кроме того, продуктивная инфекция ВПГ-2 подавляет продукцию ИФН-β,

индуцированную вирусом Сендай или полиинозитил-полицитидиловой кислотой, путем блокирования связи IRF-3 с IRF-чувствительным промотором. Видимо, Стимфорте не оказывает влияния на процесс блокирования белками ВПГ продукции ИФН-β, поэтому его введение не приводит к стимуляции продукции и действия этого ИФН.

Как описано выше, Стимфорте повышает продукцию ИФН-λ, который, вероятно, является одним из факторов, позволяющих купировать герпетическую инфекцию. Из данных литературы следует, что ИФН-λ ингибирует репродукцию ВПГ-1 и ВПГ-2 в первичных культурах астроцитов и нейронов человека [23], а также в культуре клеток Vero [24]. Кроме того, на модели экспериментальной генерализованной герпетической инфекции мышей показано, что в/б введение животным ИФН-λ перед заражением ВПГ-2 обеспечивает 10-кратное снижение вирусной нагрузки. ИФН-λ является важным медиатором антивирусного ответа в эпителиальных тканях и слизистых оболочках: предварительное введение ИФН-λ во влагалище полностью защищало экспериментальных животных в течение 20 дней после интравагинального заражения ВПГ-2. У мышей, получавших ИФН-α, данного защитного эффекта не наблюдалось. Таким образом, на модели вагинальной инфекции противовирусный эффект ИФН-λ намного превосходит эффект ИФН-α.

Показано, что обработка макрофагов и ДК человека ИФН-λ (ИЛ-29) перед инфицированием ВПГ-1 обеспечивает снижение транскрипции гена сверххранного вирусного белка ICP27 (одного из ключевых белков, блокирующих развитие раннего врождённого иммунного ответа), значительно повышает экспрессию мРНК цитокинов и их продукцию. Аналогичный эффект наблюдается при заражении макрофагов и ДК ВПГ-1, синтезирующим функционально неактивный ICP27, что коррелирует со значительным повышением активации факторов транскрипции IRF-3 и NF-κappa B и ингибированием репродукции вируса [17].

Так как ИФН-λ проявляет низкую активность против ВПГ-2 в ряде клеточных линий (гепатомы человека HepG2, аденокарциномы лёгкого человека A549, лейкоцитарной моноцитарной лимфомы U937, лимфоидных клеток Raji, эпителиоидных клеток рака шейки матки HeLa) [25], можно предположить, что его противовирусное действие *in vivo* реализуется путём стимуляции иммунной системы, а не через индукцию медиаторов антивирусного состояния в клетках-мишенях. Эти данные согласуются с полученными нами результатами – в присутствии Стимфорте количество зараженных клеток Vero снижается не более чем на 15% [14], но *in vivo* в условиях генерализованной ВПГ-1-инфекции мышей наблюдается корреляция повышения продукции ИФН-λ (см. рис. 3) и ингибирования репродукции вируса в головном мозге мышей, получавших Стимфорте (см. рис. 1). Таким образом, можно заключить, что усиление продукции ИФН-λ препаратом Стимфорте является значимым фактором в подавлении ВПГ-инфекции.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. Во-первых, в условиях экспериментальной ВПГ-1-инфекции мышей и у интактных животных Стимфорте стимулирует различные звенья интерфероногенеза. Во-вторых, ИФН-β, по-видимому, не играет существенной роли в подавлении ВПГ-1-инфекции препаратом Стимфорте, а продукция ИФН-λ у инфицированных ВПГ-1 животных и активация NK-клеток в зна-

чительной степени стимулируются Стимфорте и могут участвовать в подавлении ВПГ-1-инфекции этим препаратом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2-5, 8, 17-25 см. REFERENCES)

1. Борисова А.М., Алкеева А.Б., Саидов М.З. Роль системы естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинико-иммунологический статус. *Иммунология*. 1991; 12(6): 60-3.
6. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Кокова Л.Н. Интерферон альфа-2 в комплексной иммунотерапии хронического упорно рецидивирующего орофациального герпеса. *Лечащий врач*. 2011; (4): 22-5.
7. Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Кулаков В.И. *Иммунитет и генитальный герпес*. Нижний Новгород, 1997.
9. Хахалин Л.Н. *Герпес: неизвестная эпидемия (патогенез, диагностика, клиника, лечение)*. Смоленск: Фармаграфикс; 1997.
10. Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Пинегин Б.В. Применение препарата «Стимфорте» в комплексной терапии рецидивирующей герпес-вирусной инфекции. *Герпес*. 2009; (2): 30-6.
11. Ильичев А.В., Бельков А.П., Мальдов Д.Г., Асташкин Е.И. Секрция гранул нейтрофилов человека под действием формилпептида и препарата «Стимфорте». *Иммунология*. 2009; 30(3): 159-61.
12. Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Балакина А.А., Ильичев А.В., Галегов Г.А. Влияние иммуномодулирующего препарата Стимфорте на гуморальный иммунный ответ при экспериментальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 172-5.
13. Мальдов Д.Г., Бельков А.П., Ильичев А.В., Асташкин Е.И. Влияние комплексного гидрофильного низкомолекулярного препарата «Стимфорте» на функциональную активность фагоцитов крови человека. *Иммунология*. 2009; 30(2): 95-7.
14. Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Лебединская Е.А., Фадеева Е.В., Лебединская О.В., Ахматова Н.К. и др. Действие Стимфорте на мононуклеарные лейкоциты и лимфоидные органы мышей на фоне введения циклофосфана. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(2-3): 133-8.
15. Мальдов Д.Г., Чирвон Е.А., Ильичев А.В., Бабаян С.С. Активация препаратом «Стимфорте» моноцитов и макрофагов. *Иммунология*. 2011; 32(4): 195-200.
16. Ступина Т.С., Пархоменко И.И., Балалаева И.В., Костюк Г.В., Санина Н.А., Терентьев А.А. Цитотоксические свойства нитрозильного комплекса железа сфенилтиилом. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2011; 60(7): 1464-9.
17. Борисова А.М., Алкеева А.Б., Саидов М.З. The role of the natural cytotoxicity system in the immunopathogenesis of recurrent herpetic infection and the influence of immunomodulators on the clinical and immunological status. *Immunologiya*. 1991; 12(6): 60-3. (in Russian)
7. Sukhikh G.T., Van'ko L.V., Kulakov V.I. *Immunity and Genital Herpes. [Immunitet i genital'nyy herpes]*. Nizhnyy Novgorod; 1997. (in Russian)
8. Ritz U., Seliger B. The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance. *Mol. Med*. 2001; 7(3): 149-58.
9. Khakhalin L.N. *Herpes: an Unknown Epidemic (Pathogenesis, Diagnosis, Clinic, Treatment) [Gerpes: neizvestnaya epidemiya (patogenez, diagnostika, klinika, lechenie)]*. Smolensk: Farmagrafik; 1997. (in Russian)
10. Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E., Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Pinenin B.V. Use of the drug "Stimforte" in the combined treatment of recurrent herpes infections. *Gerpes*. 2009; (2): 30-6. (in Russian)
11. Il'ichev A.V., Bel'kov A.P., Mal'dov D.G., Astashkin E.I. Secretion of human neutrophil granules under effect of formyl peptide and Stimforte. *Immunologiya*. 2009; 30(3): 159-61. (in Russian)
12. Mal'dov D.G., Andronova V.L., Balakina A.A., Il'ichev A.V., Galegov G.A. Influence of the immunomodulatory drug Stimforte on the humoral immune response in the experimental Herpes Simplex Virus infection. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 172-5. (in Russian)
13. Mal'dov D.G., Bel'kov A.P., Il'ichev A.V., Astashkin E.I. Effect of complex hydrophilous low-molecular weight Stimforte on the functional activity of human blood phagocytes. *Immunologiya*. 2009; 30(2): 95-7. (in Russian)
14. Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Lebedinskaya E.A., Fadeeva E.V., Lebedinskaya O.V., Akhmatova N.K., et al. Effect of Stimforte upon murine mononuclear leukocytes and lymphoid organs during Cyclophosphan treatment. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(2-3): 133-8. (in Russian)
15. Mal'dov D.G., Chirvon E.A., Il'ichev A.V., Babayan S.S. Activation of monocytes and macrophages by Stimforte. *Immunologiya*. 2011; 32(4): 195-200. (in Russian)
16. Stupina T.S., Parkhomenko I.I., Balalaeva I.V., Kostyuk G.V., Sanina N.A., Terent'ev A.A. Cytotoxic properties of the nitrosyl iron complex with phenylthiyl. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2011; 60(7): 1464-9. (in Russian)
17. Melchjorsen J., Sirén J., Julkunen I., Paludan S.R., Matikainen S. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *J. Gen. Virol*. 2006; 87(Pt. 5): 1099-108.
18. Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J. Interferon Cytokine Res*. 2004; 24(8): 439-54.
19. Levin S., Hahn T. Evaluation of the human interferon system in viral disease. *Clin. Exp. Immunol*. 1981; 46(3): 475-83.
20. Zhang X., Ye Z., Pei Y., Qiu G., Wang Q., Xu Y., et al. Neddylation is required for herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced early phase interferon-beta production. *Cell. Mol. Immunol*. 2016; 13(5): 578-83.
21. Melroe G.T., Silva L., Schaffer P.A., Knipe D.M. Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology*. 2007; 360(2): 305-21.
22. Zhang M., Liu Y., Wang P., Guan X., He S., Luo S., et al. HSV-2 immediate-early protein US1 inhibits IFN-β production by suppressing association of IRF-3 with IFN-β promoter. *J. Immunol*. 2015; 194(7): 3102-15.
23. Li J., Hu Sh., Zhou L., Ye L., Wang X., Ho J., et al. Interferon Lambda Inhibits Herpes Simplex Virus Type I Infection of Human Astrocytes and Neurons. *Glia*. 2011; 59(1): 58-67.
24. Lopusná K., Režuchová I., Kabát P., Kúdelová M. Interferon lambda induces antiviral response to herpes simplex virus 1 infection. *Acta Virol*. 2014; 58(4): 325-32.
25. Ank N., West H., Bartholdy C., Eriksson K., Thomsen A.R., Paludan S.R. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol*. 2006; 80(9): 4501-9.

REFERENCES

1. Borisova A.M., Alkeeva A.B., Saidov M.Z. The role of the natural cytotoxicity system in the immunopathogenesis of recurrent herpetic infection and the influence of immunomodulators on the clinical and immunological status. *Immunologiya*. 1991; 12(6): 60-3. (in Russian)
2. Melchjorsen J., Matikainen S., Paludan S.R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses*. 2009; 1(3): 737-59.
3. Mossman K.L., Ashkar A.A. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral. Immunol*. 2005; 18(2): 267-81.
4. Paladino P., Mossman K.L. Mechanisms Employed by Herpes Simplex Virus 1 to Inhibit the Interferon Response. *J. Interferon Cytokine Res*. 2009; 29(9): 599-608.
5. Su C., Zhan G., Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Virology*. 2016; 13(1): 38.
6. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kokova L.N. Inter-