

УДК: 615.277.3:615.36/37 00016

ВЛИЯНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ НА РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

З.Р.Тер-Погосян, Ж.К.Шерман, Л.Н.Мкртчян, Е.Дория

*/Онкологический научный центр им. В.А.Фанарджяна/
375052 Ереван, Канакер, ул. Фанарджяна, 76*

Ключевые слова: поливалентная эмбриональная вакцина (ПЭВ), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), обратная транскриптаза (ОТ), иммунодефицит, синцитий

Как известно, этиологическим агентом СПИДа является ВИЧ, выделенный впервые в 1983 г. ВИЧ — ретровирус, вызывающий медленно прогрессирующую летальную инфекцию, характеризующуюся нарастающим тяжелым иммунодефицитом, на фоне которого развиваются различные оппортунистические инфекции и неоплазмы. В течение последнего времени ученые достигли значительных успехов в изучении молекулярной биологии ВИЧ, раскрытии механизмов его прямого и опосредованного действия, в создании лимфобластных линий человека для репродукции ВИЧ, разработке методов скрининга этого фатального заболевания, а также в области лечения и профилактики СПИДа [2,5,6,8,10,11–14]. Как известно, главной мишенью вируса является одна из субпопуляций Т-клеток — CD4+, резкое уменьшение которых вследствие лизиса приводит к нарушению нормального соотношения CD4+/CD8+ клеток [1–9]. Поскольку опустошение запаса CD4+ клеток и есть основная причина иммунодефицита, приводящая к разрушению всех звеньев клеточного иммунитета, весьма важен поиск средств, способных защитить эти клетки *in vitro* и *in vivo*.

В лаборатории ИНСЕРМ322 «Ретровирусы и ассоциированные заболевания», руководимой проф. Ж.К.Шерманом (Марсель, Франция), впервые было исследовано влияние ПЭВ — оригинального препарата, полученного в ОНЦ МЗ Армении под руководством проф. Л.Н.Мкртчяна, на репродукцию ВИЧ.

ПЭВ представляет собой белковую фракцию, полученную из эмбрионального органа и содержащую пул различных онкофетальных антигенов (ОФА). Согласно нашим исследованиям [3,4,7], ПЭВ в эксперименте обладает противоопухолевым, интерферогенным, антивирус-

ным и антимутагенным действием, что послужило основой для изучения его влияния на ВИЧ.

Цель работы состоит в изучении действия ПЭВ на репликацию ВИЧ как в лимфоцитах крови, так и в лимфобластоидной линии клеток МТ4, зараженных вирусом.

Материал и методы

Лимфоциты гепаринизированной крови доноров выделяли на градиенте фиколл-верографина. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с 10% телячьей сыворотки, 5% интерлейкина-2 и 1% антибиотиков. Пересевы проводили каждые 3–4 дня в течение месяца.

Клетки лимфобластоидной линии МТ4 преинкубировались в течение 1 ч при 37°C с препаратом ПЭВ в трех концентрациях — 2,5; 1,0 и 0,5 мг/мл. Клетки культивировались в концентрации 3×10^5 /млн в микроплашках в присутствии вируса в разведении 5×10^{-5} . Пересевы клеток проводились каждые 3 дня в среде RPMI с добавлением 10% телячьей сыворотки, 1% глутамина, 2 мг/мл полибрена в присутствии ПЭВ в вышеуказанных концентрациях. О репродукции ВИЧ в культуре клеток судили по интенсивности образования синцитиев и степени синтеза вирусной обратной транскриптазы с помощью радиоактивной метки.

Лимфоциты здоровых доноров в количестве 5×10^6 кл/мл, стимулированные предварительно в течение трех дней фитогемагглютинином, преинкубировались с ПЭВ в дозе 2 мг/мл белка, затем добавляли вирус в двух разведениях — исходном и 10^{-1} . Клетки пересевали каждые 3–4 дня, добавляя ПЭВ в той же дозе. Продолжительность опыта — 17 дней. О результатах судили по синтезу вирусной обратной транскриптазы с помощью радиоактивной метки.

Для определения субпопуляций Т-клеток использовали методику, разработанную на основе биев — моноклональных АТ CD4 и CD8, насаженных на железные шарики (Dynabeads M-450, фирма Dynal A. S. N-0212 Oslo Norway).

Для выявления рецепторов к ПЭВ на Т-клетках использовали метод биотинизации, основанный на большой тропности молекулы биотина к стрептавидину. Биотин с помощью специального лигана связывали с ПЭВ и соединяли со стрептавидином, связанным с быстрорастворимым красителем. После инкубации в течение 1 часа с субпопуляциями Т-клеток CD4+, CD8+ клетки отмывали; результат реакции учитывали по интенсивности окрашивания проб в опыте (с ПЭВ) и в контроле. В опытах использовали ВИЧ-1, штамм ЛАВ. Лиофилизированный препарат ПЭВ разводили в дистиллированной воде непосредственно перед проведением опытов.

Результаты и обсуждение

Изучение влияния ПЭВ на число и жизнеспособность периферических лимфоцитов здоровых доноров показало, что ни одна из трех испытанных доз препарата не обладала токсичностью, более того, в дозе 2,5 мг/мл препарат оказывал некоторое митогенное действие на лимфоциты.

Влияние ПЭВ на репродукцию ВИЧ изучалось в клеточной культуре МТ4. Исследовано действие трех концентраций ПЭВ на образование синцитиев под действием вируса. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Тест ингибции синцитиев в клеточной линии МТ4

ПЭВ мг/мл	Дни					Активн. вирусн. ОТ (Д8)
	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	
2,5	-	-	-	-	(+)	720*
1,0	-	-	(+)	+	++	567326
0,5	-	(+)	+	++	++	323660
МТ4 не инфици.	-	-	-	-	-	690
МТ4 /ВИЧ	+	++	++	++	++/Т	242822

Примечание.

- — нет синцитиев;
- (+) — появление синцитиев;
- +
- ++ — малочисленные синцитии;
- +++ — многочисленные синцитии;
- ++/ — Т — клеточная смерть.
- * — достоверно по сравнению с контролем.

Согласно данным таблицы, образование синцитиев в линии МТ4, зараженной соответствующей дозой вируса, начинается с 3—4-го дня, и к 8-у дню большинство клеток погибает. Предварительная инкубация клеток с ПЭВ в концентрации 2,5 мг/мл подавляет формирование синцитиев вплоть до 8-го дня, в то время как две меньшие дозы ПЭВ вызывают лишь незначительную задержку образования синцитиев. Активность обратной вирусной транскриптазы ВИЧ в обработанных дозой 2,5 мг/мл ПЭВ клетках была более чем в 40 раз ниже контроля.

В следующей серии опытов исследовалось влияние ПЭВ (в дозе 2 мг/мл) на лимфоциты здоровых доноров, инфицированных ВИЧ в двух дозах. Результаты представлены в табл. 2.

Действие ПЭВ на репликацию вируса в лимфоцитах, зараженных ВИЧ

Активн. вирусу. ОТ	Исходное колич. клеток	Дни				
		3-й	7-й	10-й	14-й	17-й
ПЭВ 2мг/мл ВИЧ	5x10 ⁶	1210	698	386	1186	1286
ПЭВ 2мг/мл ВИЧ ⁻¹	5x10 ⁶	650	1144	458	876	2106
ВИЧ	5x10 ⁶	4960	13468	30628	10259	83454
ВИЧ ⁻¹	5x10 ⁶	962	5875	10166	43398	63118
Контр.	5x10 ⁶	436	1234	300	1480	1348

Примечание. С 5000 импульсов считается заражение клеток вирусом.

Судя по данным таблицы, число импульсов в контроле (отражающее синтез вирусной ОТ) нарастало, достигая максимума к 14-му дню. В лимфоцитах, обработанных ПЭВ, синтез ОТ был значительно ниже в течение всего срока наблюдения.

Учитывая ингибирующее влияние ПЭВ на репродукцию вируса в лимфоцитах, была сделана попытка выявить наличие на лимфоцитах рецепторов к ПЭВ. Препарат был биотинизирован по вышеописанной методике, после чего лимфоциты здорового донора, разделенные на субпопуляции Т-хелперов и Т-супрессоров, преинкубировались с ПЭВ в течение 1 часа. Как в пробирках, так и в приготовленных клеточных препаратах на фильтровальной бумаге обнаружено слабое окрашивание, недостоверное по сравнению с положительным контролем.

Итак, как в культивируемых *in vitro* лимфоцитах, так и в клетках лимфобластоидной линии МТ-4 введение ПЭВ до заражения клеток вирусом подавляет репликацию ВИЧ-1. Антивирусное действие ПЭВ *in vitro* дополняет наши ранее полученные данные о защитном действии ПЭВ *in vivo* у мышей, зараженных вирусом гриппа А (штамм А/Aichi) и вирусом энцефаломиокардита мышей [7], которое мы объясняем способностью ПЭВ к продукции сывороточного интерферона у мышей. В планируемых нами дальнейших исследованиях будет изучена способность ПЭВ к индукции интерферона *in vitro*, что может пролить свет на механизм непосредственного ингибирующего действия препарата на репликацию ВИЧ.

Другим возможным механизмом действия ПЭВ может быть блокада рецепторов, препятствующая проникновению ВИЧ в клетки-мишени. Хотя вопрос о наличии на лимфоцитах рецепторов к ОФА остается пока нерешенным, есть убедительные данные о синтезе ОФА (gr 44 кД) в лимфомах Т-клеточного происхождения, а также о синтезе другого

ОФА — Люис Х антигена в лимфомах Ходжкина и в клетках Лангерганса, выделенных из лимфоузлов больных с ВИЧ-ассоциированной аденопатией. Работы, свидетельствующие о наличии синтеза ОФА в лимфоцитах, являются косвенным доказательством наличия рецепторов к ОФА на этих клетках [17–19].

Не исключен и другой механизм действия ПЭВ. Как известно, ВИЧ при почковании захватывает с собой клеточные белки. Имеются данные [14], что очищенные препараты ВИЧ содержат больше микроглобулина β_2 и HLA D хозяина, чем собственно оболочечного gp 120. Следовательно, возможно соединение клеточных белков вируса с ПЭВ, защищающее чувствительные к ВИЧ-1 клетки.

Полученные данные свидетельствуют о непосредственном ингибирующем действии ПЭВ на ВИЧ и целесообразности продолжения исследований в этой области.

Поступила 15.06.97

ԲԱԶՄԱՐԺՈՒՅԹ ՍԱՂՄՆԱՅԻՆ ՊԱՏՎԱՍՏԱՆՅՈՒԹԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԱՐԴՈՒ ԻՄՈՒՆՈԴԵՖԻՑԻՏԻ ՎԻՐՈՒՍԻ ՎՐԱ

Զ.Ռ.Տեր-Պողոսյան, Ժ.Կ.Շերման, Լ.Ն.Մկրտչյան, Է.Դորիա

Արտահայտված հակառուսացային, ինտերֆերոնոգեն, հակամոտագեն հատկություններով օժտված բազմարժույթ սաղմնային պատվաստանյութը /ԲՄՊ/ փորձարկվել է *in vitro* պայմաններում բջջային կուլտուրաներում մարդու ձեռքերով իմունային դեֆիցիտի վիրուսի հանդեպ:

Բջջային նախնական ինկուբացիան ԲՄՊ-ի հետ դանդաղեցրել է սինգիտաների առաջացումը մարդու իմունային դեֆիցիտի վիրուսի ազդեցության տակ լիմֆոբլաստոիդ MT4 կուլտուրայում եւ *in vitro* պայմաններում ընկճել է վիրուսի վերարտադրումը առողջ դոնորների կուլտիվացվող ծայրամասային արյան լիմֆոցիտներում:

THE INFLUENCE OF POLYVALENT EMBRYONIC VACCINE ON THE REPLICATION OF HIV IN VITRO

Z.R.Ter-Pogossian, J.C.Chermann, L.N.Mkrtchian, E.Doria

The influence of polyvalent embryonic vaccine (PEV), possessing antitumorogenic, interferonogenic and antimitogenic effects on the replication of HIV in the human blood lymphocytes and in the cells of lymphoblastoid line MT4, was studied.

According to the obtained data, preliminary incubation of PEV with the cells inhibited the synthicya formation and the synthesis of viral reverse transcriptase in the infected lymphocytes and MT4 cell line.

Thus, PEV is able to prevent the replication of HIV *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грибкова Н.В., Еремин В.Ф., Вотяков В.И. и др. Ж. Микробиол., 1996, с. 27.
2. Малакина Ю.А. Ж. Неврол. и психиатр., 1991, с. 122.
3. Мкртчян Л.Н., Нерсисян А.К. В кн.: Генетика. М., 1993, с. 866.
4. Мкртчян Л.Н., Тер-Погосян З.Р., Нерсисян А.К. и др. Вопр. онкол., 1990, 36, с.956.
5. Покровский В.И. Тер. архив, 1987; 7, с.3.
6. Савченко И.Г., Покровский В.В. Мед. помощь, 1993, с.19.
7. Тер-Погосян З.Р., Карамян З.А., Камалян Л.А. I съезд онкологов стран СНГ. М., 1996, с. 181.
8. Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F. et al. Science, 1983, 220, p. 868.
9. Chermann J.C. JAMA, 1994, 19, p. 278.
10. Chermann J.C., Fantini J., Calenda V. et al. AIDS Research and Human Retroviruses, 8, 5, p. 711.
11. Chin J., Mann J. Бюл. ВОЗ, 1989, 67, p. 1.
12. Ezzel C. Science, 1992, 258, p. 1881.
13. Ezzel C. J. NIH. Res., 1992, 4, p. 1.
14. Larri A. Science, 1992, 258, 5090, p.1935.
15. Mano H., Chermann J. C. AIDS Research and Human Retroviruses, 1997, p. 7.
16. McGregor A. Lancet, 1993, 341, 8856, p. 1526.
17. Ree H.J., Teplitz C., Khan A. Cancer, 1991, 1, 67 (50) p.1338.
18. Rohrer C. D., Sarli R. H., Barsoum A. L. et al. J. of the National Cancer Institute, 1992, 84, 8, p. 602.
19. Rohrer C. D., Culpepper C., Barsoum A. L. et al. J. Immunol., 1995, 154 (5), p. 2266.

