

## Влияние Гамапрена на продукцию регуляторных цитокинов при экспериментальной флавивирусной инфекции у мышей

**А.В. Санин<sup>1</sup>**, доктор биологических наук, профессор, зав. лаб. клеточного иммунитета ([saninalex@inbox.ru](mailto:saninalex@inbox.ru)),  
**А.Н. Наровлянский<sup>1</sup>**, доктор биологических наук, профессор, зав. лаб. цитокинов ([narovl@yandex.ru](mailto:narovl@yandex.ru)),  
**А.В. Пронин<sup>1</sup>**, доктор биологических наук, профессор, зам. директора по научной работе ([proninalexander@yandex.ru](mailto:proninalexander@yandex.ru)),  
**С.В. Ожерелков<sup>2</sup>**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаб. противовирусных лекарственных средств ([ozherelkov@yandex.ru](mailto:ozherelkov@yandex.ru)),  
**Т.Н. Кожевникова<sup>1</sup>**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаб. клеточного иммунитета ([tatiana@micro-plus.ru](mailto:tatiana@micro-plus.ru)).

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18).

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН(108819, Москва, пос. Московский, поселок Института полиомиелита, д. 8, кор. 1).

Известно, препараты на основе фосфорилированных полипептидов подавляют репродукцию вирусов *in vitro*, а также проявляют терапевтические свойства при экспериментальных вирусных инфекциях и вирусных заболеваниях мелких домашних животных.

**Цель исследования:** изучить влияние Гамапрена (ГП), действующим веществом которого являются фосфорилированные полипептиды, выделенные из листьев шелковицы, на продукцию ключевых регуляторных цитокинов (ЦТ) — интерферона-гамма (ИФН-γ), интерлейкина-10 (ИЛ-10) и интерлейкина-12 (ИЛ-12) при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) у мышей.

Для заражения мышей использовали ВКЭ (штамм Абсеттаров), полученный из коллекции штаммов ФГБНУ «ФНЦИРИП» им. М.П. Чумакова РАН.

Динамику продукции ЦТ в сыворотке крови мышей определяли методом ИФА с помощью коммерческих наборов фирм «Genzyme» и «BioSource» (США) согласно инструкциям по применению, и выражали в пкг/мл.

Инфицирование мышей ВКЭ приводило к развитию острой летальной инфекции. В контроле СПЖ составила 8,4 суток. Под действием ГП, который вводили за 3 и 2 суток до инфицирования мышей ВКЭ, СПЖ возросла до 10,9 суток, а в том случае, когда ГП вводили за 3 суток и одновременно с ВКЭ, СПЖ возросла до 12,5 суток.

У мышей, зараженных ВКЭ, увеличение содержания в сыворотке крови ИФН-γ регистрировали на 4-е и 7-е сутки. Напротив, ГП стимулировал продукцию ИФН-γ в сыворотке крови мышей уже через 48 ч. В тех же случаях, когда ГП вводили мышам одновременно с ВКЭ, уровень ИФН-γ в сыворотке крови повышался на 3-и и 7-е сутки.

При изучении содержания ИЛ-10 и ИЛ-12 в сыворотке крови мышей было показано, что у интактных мышей ГП стимулировал содержание ИЛ-12 на всех этапах опыта, кроме 4-х и 10-х суток. При этом на всем протяжении опыта уровень ИЛ-10 не изменялся, не превышая контрольного. Иную картину наблюдали при заражении мышей ВКЭ без введения ГП: стимуляцию продукции ИЛ-12 выявляли на 5-е (во второй половине инкубационного периода), 9-е и 10-е сутки (в период проявления клинических признаков КЭ) после заражения. Уровень ИЛ-10 возрастал на 1-е (в 12,6 раз), 7-е и 8-е сутки после заражения ВКЭ (в 5,6 и 7,2 раза, соответственно). При введении мышам ГП одновременно с ВКЭ, наиболее значительную стимуляцию выработки ИЛ-12 наблюдали на 4-е, 5-е, 9-е и 10-е сутки. Выработку ИЛ-10 регистрировали только на 3-и сутки после введения ВКЭ и ГП. На всех остальных этапах исследования уровни ИЛ-10 не превышали контрольного показателя.

Таким образом, ГП после введения мышам при вирусной инфекции стимулирует раннюю продукцию ИФН-γ и ИЛ-12 в сыворотке, что, по-видимому, является одним из ключевых механизмов противовирусной активности ГП при его использовании в качестве профилактического средства или на самых ранних стадиях инфекционного процесса.

Вирусы обладают способностью нарушать сбалансированное развитие Th1/Th2 иммунного ответа, необходимое для формирования эффективного противовирусного иммунитета, а ГП, благодаря стимуляции продукции ключевых цитокинов, обеспечивающих сбалансированное формирование Th1 и Th2 иммунного ответа при вирусном инфекционном процессе, способен восстанавливать этот необходимый баланс. Это свойство ГП в сочетании с прямым противовирусным действием, по-видимому, и обеспечивает защиту от вирусной инфекции.

**Ключевые слова:** Гамапрен, полипептидфосфат натрия, цитокины, интерферон-гамма, интерлейкин-10, интерлейкин-12, вирусная инфекция, клеточный иммунитет.  
**Сокращения:** БОЕ — бляшкообразующие единицы, ВКЭ — вирус клещевого энцефалита, ГМ-КСФ — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ГП — Гамапрен, ЕКК — естественные киллерные клетки, ИЛ — интерлейкин, ИФА —

иммуноферментный анализ, ИФН — интерферон, КЭ (ТВЕ) — клещевой энцефалит (tick-borne encephalitis), ЛД — летальная доза, СПЖ — средняя продолжительность жизни, ФНО — фактор некроза опухоли, ФП — фосфорилированные полипептиды, ЦНС — центральная нервная система, ЦТ — цитокины, МНС (ГКГС) — major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

## Введение

В предыдущих исследованиях было показано, что иммуномодулирующие препараты на основе ФП — Фоспренил и ГП — подавляют размножение ряда вирусов в чувствительных культурах клеток [2], а также проявляют терапевтические свойства при экспериментальных вирусных инфекциях [3...5, 9] и вирусных заболеваниях мелких домашних животных [7, 8, 10, 11].

## Цель исследования

Изучить влияние ГП, действующим веществом которого являются фосфорилированные полипептолы, выделенные из листьев шелковицы, на продукцию ключевых регуляторных ЦТ: ИФН- $\gamma$ , ИЛ-10 и ИЛ-12 при экспериментальной инфекции, вызванной ВКЭ у мышей.

## Материалы и методы

В работе использовали мышей линий BALB/c, массой 18...20 г и беспородных мышей массой 5...6 г обоего пола, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «НЦБТ ФМБА».

Во всех экспериментах использовали коммерческий препарат ГП производства ООО «ГамаВетФарм», 0,5 %. В экспериментах применяли ГП в дозах от 100 до 200 мкг/мл. В качестве плацебо использовали аликвоты комплексного водного растворителя фосфорилированных полипептолов, выделенных из листьев шелковицы.

При воспроизведении вирусной инфекции использовали ВКЭ (штамм Абсеттаров), полученный из коллекции штаммов ФГБНУ «ФНЦИРИП» им. М.П. Чумакова РАН.

В опытах использовали ВКЭ в виде мозговой суспензии больных мышей-сосунков беспородных мышей, зараженных интрацеребрально. Инфекционную активность вируссодержащих суспензий определяли путем внутримозгового заражения серийными разведениями одно-двухдневных беспородных мышей-сосунков. Титры исследуемых штаммов ВКЭ рассчитывали по формуле Риды-Менча и выражали в  $Ig\ BOE_{50}/мл$ .

Мышей заражали ВКЭ внутрибрюшинно однократно в дозе 100  $LD_{50}/0,2$  мл. После заражения проводили ежедневное визуальное наблюдение за животными в течение 21 суток и регистрировали в каждой группе количество больных и павших животных для расчета СПЖ.

Динамику продукции ЦТ в сыворотке крови мышей определяли методом ИФА. Для определения концентрации ИФН- $\gamma$  использовали коммерческие наборы фирмы «Genzyme» (США), а концентрацию ИЛ-10 и ИЛ-12 оценивали с помощью коммерческих наборов фирмы «BioSource» (США) согласно инструкциям по применению, и выражали в пкг/мл.

## Результаты

**Влияние ГП на течение экспериментальной инфекции, вызванной ВКЭ у мышей.** Инфицирование мышей ВКЭ приводило к развитию острой инфекции, завершающейся быстрым летальным исходом в 100 % случаев. Инкубационный период продолжался около 7 дней, после чего начали проявляться клинические признаки, характеризующиеся парезами или параличами с после-

дующей гибелью. В контроле СПЖ составила 8,4 суток (табл. 1, группа 1). Под действием плацебо, которое вводили в 2 вариантах: за 3 и 2 суток до инфицирования мышей ВКЭ, а также за 3 суток и одновременно с ВКЭ, СПЖ практически не изменилась (группы 2 и 3). Под действием ГП, который вводили за 3 и 2 суток до инфицирования мышей ВКЭ, СПЖ возросла до 10,9 суток (группа 4), а в том случае, когда ГП вводили за 3 суток и одновременно с ВКЭ, СПЖ возросла до 12,5 суток (группа 5).

### 1. Эффективность ГП при экспериментальном КЭ у мышей

#### 1. The effectiveness of GP against experimental TBE in mice

Группы животных	Число павших мышей /общее число мышей в группе	Летальность, %	СПЖ, сутки
1. Контроль ВКЭ	10/10	100	8,4
2. Плацебо двукратно за 3-е и за 2-е суток до введения ВКЭ	10/10	100	8,7
3. Плацебо двукратно за 3-е суток и на 0-е сутки до введения ВКЭ	10/10	100	8,9
4. ГП двукратно за 3-е и за 2-е суток до введения ВКЭ	3/10	30	10,9
5. ГП двукратно за 3-е и на 0-е сутки до введения ВКЭ	4/0	40	12,5

**Влияние ГП на содержание ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей в норме и при инфекции, вызванной ВКЭ.** У мышей, зараженных ВКЭ, но которым не инокулировали ГП, увеличение содержания в сыворотке крови ИФН- $\gamma$  регистрировали на 4-е и 7-е сутки после инфицирования ( $27\pm 6$  и  $281\pm 79$  пкг/мл, соответственно).

Напротив, ГП стимулировал продукцию ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей уже через 48 ч: уровень ИФН- $\gamma$  возрастал от фоновых значений до 98 пкг/мл (табл. 2).

### 2. Влияние ГП на продукцию ИФН- $\gamma$ в сыворотке крови мышей линии BALB/c

#### 2. The influence of GP on the production of IFN- $\gamma$ in the serum of BALB/c mice

Срок, ч, после введения ГП						
2	6	24	48	72	120	168
Содержание ИФН- $\gamma$ в сыворотке крови, пкг/мл						
<15	<15	<15	98 $\pm$ 21	<15	<15	<15

В тех же случаях, когда ГП вводили мышам одновременно с ВКЭ, уровень ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови повышался на 3-и и 7-е сутки после инфицирования и инокуляции ГП (табл. 3).

### 3. Динамика уровня ИФН- $\gamma$ в сыворотке крови мышей, которым одновременно вводили ВКЭ и ГП

#### 3. The dynamics of IFN- $\gamma$ level in the serum of mice that were simultaneously inoculated by TBEV and GP

Срок, ч, после введения ГП и ВКЭ							
2	6	24	48	72	96	144	168
Содержание ИФН- $\gamma$ в сыворотке крови, пкг/мл							
<15	<15	<15	<15	31 $\pm$ 9	<15	<15	103 $\pm$ 31

4. Влияние ГП на продукцию ИЛ-10 и ИЛ-12 у мышей линии BALB/c											
4. The influence of GP on the production of IL-10 and IL-12 in BALB/c mice											
ЦТ	Контроль (К), пкг/мл	Сутки после введения ГП									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Содержание ЦТ в сыворотке крови, пкг/мл									
ИЛ-10	8±4	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K
ИЛ-12	339±42	≥500	378±21	≥500	181±17	≥500	393±42	379±14	388±28	≥500	232±4

5. Динамика продукции ИЛ-10 и ИЛ-12 у мышей BALB/c, зараженных ВКЭ											
5. Dynamics of production of IL-10 and IL-12 in BALB/c mice infected with TBEV											
ЦТ	Контроль (К), пкг/мл	Сутки после заражения									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Содержание ЦТ в сыворотках крови, пкг/мл									
ИЛ-10	8±4	101±10	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	45±1	58±13	≤K	≤K
ИЛ-12	339±42	339±17	362±37	310±20	391±6	≥500	246±14	284±23	337±18	≥500	≥500

6. Динамика уровня ИЛ-10 и ИЛ-12 в сыворотке крови мышей, которым одновременно вводили ВКЭ и ГП											
6. Dynamics of IL-10 and IL-12 levels in the serum of mice, which were inoculated simultaneously by TBEV and GP											
ЦТ	Контроль (К), пкг/мл	Сутки после заражения ВКЭ и введения ГП									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Содержание ЦТ в сыворотке крови, пкг/мл									
ИЛ-10	8±4	≤K	≤K	33±2	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K	≤K
ИЛ-12	339±42	283±12	435±23	347±7	405±19	≥500	344±31	316±14	379±22	≥500	325±16

**Влияние ГП на содержание ИЛ-10 и ИЛ-12 в сыворотке крови мышей в норме и при инфекции, вызванной ВКЭ.** Показано (табл. 4), что у интактных мышей ГП стимулировал содержание ИЛ-12 на всех этапах опыта, кроме 4-х и 10-х суток. Наиболее значительную стимуляцию продукции ИЛ-12 наблюдали на 1-е, 3-и, 5-е и 9-е сутки после введения ГП. При этом уровень ИЛ-10 не изменялся на всем протяжении опыта, не превышая контрольного (8 пкг/мл).

Иную картину наблюдали при заражении животных ВКЭ без введения ГП. Как видно из данных, представленных в табл. 5, ВКЭ вызывал стимуляцию продукции ИЛ-12 на 5-е (во второй половине инкубационного периода), 9-е и 10-е сутки (в период проявления клинических признаков КЭ) после заражения. Уровень ИЛ-10 возрастал на 1-е (в 12,6 раз), 7-е и 8-е сутки после заражения ВКЭ (в 5,6 и 7,2 раза, соответственно).

При введении мышам ГП одновременно с инокуляцией ВКЭ, наиболее значительную стимуляцию выработки ИЛ-12 наблюдали на 4-е, 5-е, 9-е и 10-е сутки (табл. 6). Выработку ИЛ-10 регистрировали только на 3-и сутки после введения ВКЭ и ГП. На всех остальных этапах исследования уровни ИЛ-10 не превышали контрольного показателя.

## Обсуждение

Данные, полученные нами в опытах *in vivo*, показали, что ГП при двукратном введении мышам до заражения и одновременно с заражением их ВКЭ, снижает летальность в 70 % случаев и увеличивает СПЖ (табл. 1). В связи с этим, было выдвинуто предположение, что существенным вкладом в механизм связанного с ГП предотвращения развития острого инфекционного процесса является стимуляция продукции ЦТ, способствующих формированию сбалансированного Th1/Th2-иммунного ответа. Для проверки этого предположения мы исследовали в сыворотке крови мышей уровни ключевых при вирусных инфекциях ЦТ [1, 13]: ИФН-γ, ИЛ-10 и ИЛ-12.

Результаты показали, что у мышей, которых только заражали ВКЭ, но не вводили им ГП, уровень ИФН-γ возрастает на 4-е и 7-е сутки после инфицирования. Сходные результаты получены и при инфекции, вызванной другим представителем флавивирусов — вирусом желтой лихорадки [16], по отношению к которому ГП также проявляет противовирусную активность [4]. Наоборот, под действием ГП уровень ИФН-γ в сыворотке крови интактных (не зараженных) мышей возрастал уже через 48 ч, после чего резко падал (табл. 2). У мышей, которым вводили ВКЭ и ГП, уровень

ИФН- $\gamma$  возрастал на 3-и сутки (табл. 3). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что при попадании в организм патогена (ВКЭ, штамм Абсеттаров), ГП дополнительно стимулирует клетки, которые продуцируют ИФН- $\gamma$ , стимулирующий цитотоксичность по отношению к инфицированным клеткам.

При заражении животных ВКЭ без введения ГП (табл. 5) уровень ИЛ-10 в сыворотке крови резко возрастал на 1-е (в 12,6 раз), 7-е и 8-е сутки после заражения ВКЭ (в 5,6 и 7,2 раза, соответственно). А вот стимуляцию продукции ИЛ-12 под действием ВКЭ наблюдали на 5-е (во второй половине инкубационного периода), 9-е и 10-е сутки (в период проявления клинических признаков КЭ) после заражения. Это соответствовало срокам развития патологических процессов в ЦНС и выраженным проявлениям клинических признаков заболевания.

Напротив, под действием инокуляции одного ГП уровень ИЛ-10 у мышей не изменялся на всем протяжении опыта (табл. 4), не превышая контрольного (8 пкг/мл). В то же время содержание ИЛ-12 у интактных (не зараженных) мышей ГП стимулировал на всех этапах опыта, кроме 4-х и 10-х суток. Наиболее значительную стимуляцию продукции ИЛ-12 наблюдали на 1-е, 3-и, 5-е и 9-е сутки после введения ГП.

Наконец, при введении мышам ГП одновременно с инокуляцией ВКЭ выработку ИЛ-10 регистрировали только на 3-и сутки (табл. 6). На всех остальных этапах исследования уровни ИЛ-10 не превышали контрольного показателя. А вот наиболее значительную стимуляцию выработки ИЛ-12 наблюдали на 2-е, 4-е, 5-е, 9-е и 10-е сутки.

Таким образом, при одновременном введении мышам ВКЭ и ГП наблюдали коррекцию вирусиндуцированного подавления развития Th1-иммунного ответа — отсутствие стимуляции ИЛ-10, и, напротив, стимуляцию ИЛ-12, как на ранних (на 2-е сутки после введения в организм ВКЭ и ГП), так и на более поздних этапах развития инфекционного процесса (на 4-е и 5-е сутки), что, по-видимому, и обеспечивает защиту животных от высоколетальной вирусной инфекции. Также у мышей, которым одновременно вводили ГП и ВКЭ, повышение уровня ИЛ-12 наблюдали на 9-е сутки (более чем в 1,5 раза по сравнению с контролем), а на 10-е сутки данный показатель снижался до нормального уровня. Это, по нашему мнению, свидетельствует о сформировавшемся балансе Th1- и Th2-иммунного ответа, защищающем животных от гибели. Напротив, повышенная концентрация ИЛ-12 на 10-е сутки в группе мышей, зараженных ВКЭ и без инокуляции им ГП, коррелировала с их гибелью. Таким образом, высокие уровни ИЛ-12, по-видимому, важны лишь на ранних этапах развития инфекционного процесса, вызываемого ВКЭ. На поздних же этапах они могут усугублять клиническую картину и приводить к гибели животных.

Острая форма КЭ, вызванная штаммом Абсеттаров у мышей, характеризуется преобладанием выраженного гуморального иммунного ответа, активация которого в более поздние сроки инфекции оказывается недостаточной для предотвращения развития заболевания. При исследовании появления ЦТ в сыворотке крови инфицированных мышей наблюдали резкое (с 1-х суток)

увеличение концентрации ИЛ-10 и постепенное понижение его концентрации к 4-м суткам.

Следует также отметить, что именно баланс всего каскада ЦТ, а не увеличение или уменьшение концентрации каких-то одних отдельно взятых ЦТ, способен защитить организм животного от высоколетальной вирусной инфекции [1, 21].

ИЛ-10, обнаруженный в 1989 г., первоначально называли фактором подавления синтеза цитокинов, затем — ингибитором активности T $\alpha$ 1 [12]. Он является ингибитором синтеза цитокинов как Th1-клетками (ИЛ-2, -3, ФНО- $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ГМ-КСФ), так и макрофагами/моноцитами — (ИЛ-12, ИФН- $\gamma$ ), что приводит к подавлению функций макрофагов, зрелых T-клеток и ЕКК [17]. ИЛ-10 подавляет экспрессию молекул МНС II класса, пролиферацию T-клеток, вызванную митогенами, а также развитие гиперчувствительности замедленного типа. В то же время ИЛ-10 выступает в качестве кофактора ИЛ-2 и ИЛ-7 в отношении пролиферации тимоцитов, служит синергистом ИЛ-4, усиливает пролиферацию В-клеток, защищает их от апоптоза, повышает синтез IgM и IgA [1]. Таким образом, ИЛ-10 служит важнейшим регулятором иммунного ответа, подавляющим активность макрофагов и Th1-клеток и обеспечивающим реализацию некоторых биологических эффектов Th2 [17].

Для многих вирусных инфекций характерна утрата и функциональная инактивация антивирусных эффекторных T-клеток, что препятствует клиренсу вирусов. ИЛ-10 подавляет клеточный иммунитет. При экспериментальной инфекции, вызванной у мышей вирусом лимфоцитарного хориоменингита (РНК-содержащий вирус из семейства ареновирусов) уровень ИЛ-10 резко возрастает. Блокада *in vivo* рецептора ИЛ-10 нейтрализующими антителами приводит к быстрому угасанию инфекционного процесса на фоне возрастания продукции ИФН- $\gamma$  [14]. Кроме того, ИЛ-10 является физиологическим ингибитором синтеза ИЛ-12 [15].

ИЛ-12 также известен с 1989 г. [19]. Первоначально его называли фактором, который стимулирует естественные киллеры, или фактором созревания цитотоксических T-лимфоцитов. Это один из ключевых ЦТ в защите организма от вирусной инфекции [22]. На самой ранней стадии иммунного ответа макрофаги и дендритные клетки, распознающие патоген, начинают продуцировать ИЛ-12, стимулируя пролиферацию ЕКК и T-клеток, увеличивая их киллерную активность и способствуя выделению ИФН- $\gamma$  обоими типами клеток. В свою очередь, ИФН- $\gamma$  начинает потенцировать индукцию синтеза ИЛ-12 макрофагами [21].

ИЛ-12 также активирует цитотоксичность макрофагов, он служит естественным связующим звеном между макрофагами и T-клетками, между врожденным и приобретенным иммунитетом [20]. Это проявляется в его способности регулировать соотношение клеточного и гуморального иммунного ответа через стимуляцию дифференцировки наивных T-хелперов в направлении Th1. Этот эффект в значительной степени опосредован быстрым увеличением продукции ИФН- $\gamma$ .

Биологические функции ИЛ-12 осуществляются через связывание с мембранным рецепторным комплексом, состоящим из 2 субъединиц: ИЛ-12R  $\beta$ 1 и ИЛ-12R  $\beta$ 2, выполняющих различные роли. ИЛ-12R  $\beta$ 1



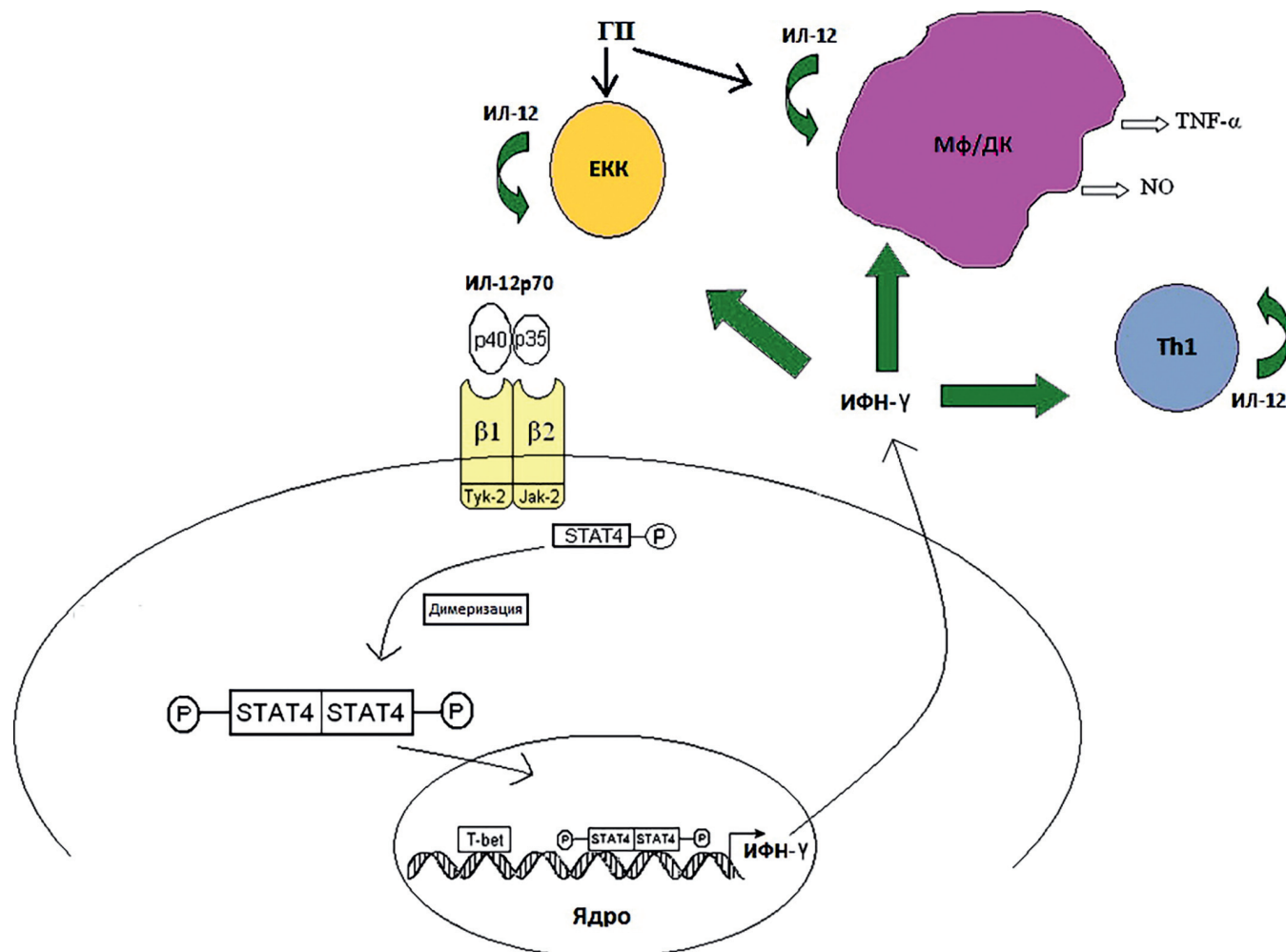


Рис. Влияние ГП на активацию сигнального пути Jak/STAT по действию ИЛ-12 (по 20, модифицировано)  
Influence of Gamapren on activation of Jak / STAT signal path by IL-12 [according to 20]

требуется для высокоаффинного связывания с субъединицей ИЛ-12p40 и связана с Tyk-2, членом семейства Janus киназы (Jak), тогда как ИЛ-12R β2 опосредует передачу сигнала через три тирозиновых остатка, которые выступают в качестве док-сайта для STAT4 и связаны с Jak-2. ИЛ-12R β2 распознает либо гетеродимер ИЛ-12, либо субъединицу ИЛ-12p35. ИЛ-12R β2 является основой для проведения сигнала внутрь наивных Th0 для их дифференциации в Th1 [18]. Схема возможного воздействия ГП на активацию сигнального пути Jak/STAT по действию ИЛ-12 представлена на рисунке.

Под действием ГП происходит стимуляция продукции ИЛ-12. После связывания ИЛ-12p40 и ИЛ-12p35 с ИЛ-12R β1 и ИЛ-12R β2, соответственно, происходит трансфосфорилирование Jak-2 и Tyk-2. Фосфорилированный ИЛ-12R β2 связывается с молекулой STAT4, которая затем димеризуется с другой молекулой STAT4. Гомодимеры STAT4 транслоцируются в ядро и стимулируют транскрипцию гена ИФН-γ. Еще одним транскрипционным фактором, играющим важную роль в активации Th1 и продукции ИФН-γ, служит T-bet. ИЛ-12 и ИФН-γ стимулируют активность и размножение макрофагов, ЕКК и Т-клеток, которые также продуцируют ИЛ-12 [20].

Известно, что необходимым условием противовирусного иммунитета является ранний иммунный ответ

по типу Th1. Полученные результаты свидетельствуют о способности ВКЭ (штамм Абсеттаров) стимулировать продукцию ИЛ-10, обеспечивающего формирование преимущественно Th2-иммунного ответа, и, как следствие, подавление развития Th1-иммунного ответа на ранних этапах инфекционного процесса. Для защиты от вирусной инфекции нужны Th1, но их образование в данном случае нарушено из-за гиперпродукции ИЛ-10.

Препараты на основе ФП после введения в организм при вирусной инфекции стимулируют раннюю продукцию ИФН-γ, ФНОα и ИЛ-6 и ИЛ-12 в сыворотке [4, 6], что, по-видимому, является одним из ключевых механизмов противовирусной активности ГП при его использовании в качестве профилактического средства или на самых ранних стадиях инфекционного процесса.

Вирусы способны нарушать сбалансированное развитие Th1/Th 2 иммунного ответа, необходимого для формирования эффективного противовирусного иммунитета, а ГП, судя по всему, может восстанавливать этот необходимый баланс, в частности — благодаря стимуляции продукции ключевых цитокинов, обеспечивающих сбалансированное формирование Th1 и Th2 иммунного ответа при вирусном инфекционном процессе. Это свойство ГП в сочетании с прямым противовирусным действием, по-видимому, и обеспечивает защиту животных от вирусной инфекции.

## Библиография

1. Ершов, Ф.И. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях / Ф.И. Ершов, А.Н. Наровлянский, М.В. Мезенцева // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т.3. — №1. — С. 3–6.
2. Кожевникова, Т.Н. Морепренилфосфаты подавляют размножение вируса энцефаломиелиита Тейлера и накопление вирусного белка VP3 в чувствительных культурах клеток ВНК-21 и P388D1 / Т.Н. Кожевникова, Е.Г. Викторова, В.Г. Козлов, А.Н. Наровлянский, А.В. Санин, А.В. Пронин, С.В. Ожерелков // Ж. микробиол. — 2007. — №3. — С. 26–30.
3. Наровлянский, А.Н. Противовирусная активность и возможные механизмы действия морепренилфосфатов при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом простого герпеса 1 типа / А.Н. Наровлянский, С.В. Ожерелков, А.В. Санин, В.В. Козлов, А.В. Саличев, А.С. Есьман, Т.М. Парфенова, А.В. Пронин, А.В. Деева, А.В. Измestьева, Т.Н. Кожевникова, О.Ю. Сосновская // Ж. микробиол. — 2014. — №5. — С. 54–60.
4. Ожерелков, С.В. Противовирусное действие препаратов Фосспренил и Гамапрен в отношении флавивирусов / С.В. Ожерелков, Т.Н. Кожевникова, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, А.В. Санин // Ветеринария и кормление. — 2017. — №3. — С. 78–80.
5. Ожерелков, С.В. Защитное действие нового противовирусного препарата Фосспренил при экспериментальном клещевом энцефалите / С.В. Ожерелков, А.В. Тимофеев, Г.П. Новикова, А.В. Деева, А.Н. Наровлянский, А.В. Санин, А.В. Пронин // Вопросы вирусологии. — 2000. — Т. 45. — С. 33–37.
6. Pronin, A.V. Polyprenols as Possible Factors that Determine the Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response / A.V. Pronin, E.A. Grigorieva, A.V. Sanin, A.N. Narovlyansky, S.V. Ozherelkov, A.V. Deyeva, L.L. Danilov, S.D. Maltsev, A. Najid // Russian J. Immunol. — 2002. — Vol. 7. — No. 2. — pp. 135–142.
7. Руднева, С.Ю. Лечение папилломатоза ротовой полости у собаки с использованием фосспренила / С.Ю. Руднева, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, Т.Н. Степанова, А.В. Санин // Российский ветеринарный журнал. МДЖ. — 2016. — № 3 — С. 9–11.
8. Санин, А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных / А.В. Санин // Российский ветеринарный журнал. МДЖ. — 2005. — №1. — С. 38–42.
9. Санин, А.В. Разнонаправленное влияние MIF и полипренилфосфата на течение экспериментальной флавивирусной инфекции у мышей. / А.В. Санин, А.П. Суслов, О.Ю. Третьяков, Р.В. Зварцев, А.В. Саличев, Т.Н. Кожевникова, В.Ю. Санина, Е.Г. Смирнова, С.В. Ожерелков // Ж. микробиол. — 2011. — №5 — С. 56–61.
10. Санин, А.В. Применение Гамапрена при лечении вирусных инфекций у кошек / А.В. Санин, С.Л. Савойская, И.К. Васильев, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, Гордеева Е.В. // Ветеринария Кубани. — 2009. — №6. — С. 29–30.
11. Фурман, И.М. Применение препаратов на основе растительных полипрениолов при различных формах кошачьего инфекционного перитонита / И.М. Фурман, И.К. Васильев, А.Н. Наровлянский, А.В. Пронин, А.В. Санин // Российский ветеринарный журнал. МДЖ. — 2010. — №3 — С. 42–43.
12. Abbas, A.K. Cellular and molecular immunology (7th ed.) / A.K. Abbas, A.N. Lichtman, S. Pillai. — Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012. — 583 p.
13. Baxter, V.K. Interferon gamma modulation of disease manifestation and the local antibody response to alphavirus encephalomyelitis / V.K. Baxter, D.E. Griffin // J Gen Virol. — 2016 Nov. — No. 97(11). — pp. 2908–2925.
14. Croxford, A.L. IL-12-and IL-23 in health and disease / A.L. Croxford, P. Kulig, B. Becher // Cytokine Growth Factor Rev. — 2014 Aug. — No. 25(4). — pp. 415–421.
15. Hamza, T. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications / T. Hamza, J.B. Barnett, B. Li // Int. J. Mol. Sci. — 2010. — Vol. 11(3). — No. 7. — pp. 789–806.
16. Lam, L.K.M. Gamma-interferon exerts a critical early restriction on replication and dissemination of yellow fever virus vaccine strain 17D-204. / L.K.M. Lam, A.M. Watson, K.D. Ryman, W.B. Klimstra // NPJ Vaccines. — 2018. — Vol. 3. — pp. 5.
17. Mosser, D.M. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine / D.M. Mosser, X. Zhang // Immunological Reviews. — 2008 December. — No. 226(1) — pp. 205–218.
18. Nan, Y. Interplay between Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Activated by Type I Interferons and Viral Antagonism / Y. Nan, C. Wu, Y. Zhang // J. Front Immunol. — 2017. — No. 8. — pp. 1758.
19. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity / G. Trinchieri // Nat. Rev. Immunol. — 2003. — No. 3. — pp. 133–146.
20. Watford, W.T. The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses / W.T. Watford, M. Moriguchi, A. Morinobu, J.J. O'Shea // Cytokine Growth Factor Rev. — 2003. — No. 14. — pp. 361–368.
21. Zhang, C. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D / C. Zhang, J. Zhang, J. Niu, Z. Zhou, J. Zhang, Z. Tian // Human Immunology. — 2008 Aug. — No. 69(8). — pp. 490–500.
22. Zvirner, N.W. Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27/ N.W. Zvirner, A. Ziblat // Front Immunol. — 2017. — No. 8. — pp. 25.

## References

1. Ershov F.I. Narovlyanskij A.N., Mezenceva M.V., Rannie citokinovye reakcii pri virusnyh infekciyah, *Citokiny i vospalenie*, 2004, Vol. 3, No. 1, pp. 3–6.
2. Kozhevnikova T.N., Viktorova E.G., Kozlov V.G., Narovlyanskij A.N., Sanin A.V., Pronin A.V., Ozherelkov S.V., Moraprenilfosfaty podavlyayut razmnozhenie virusa ehncefalomielita Tejlera i nakoplenie virusnogo belka VP3 v chuvstvitel'nyh kul'turah kletok BHK-21 i P388D1, *Zh. mikrobiol.*, 2007, No. 3, pp. 26–30.
3. Narovlyanskij A.N., Ozherelkov S.V., Sanin A.V., Kozlov V.V., Salichev A.V., Es'man A.S., Parfenova T.M., Pronin A.V., Deeva A.V., Izmest'eva A.V., Kozhevnikova T.N., Sosnovskaya O.YU., Protivovirusnaya aktivnost' i vozmozhnye mekhanizmy dejstviya moraprenilfosfatov pri ehksperimental'noj infekcii, vyzvannoj virusom prostogo gerpesa 1 tipa, *Zh. mikrobiol.*, 2014, No. 5, pp. 54–60.
4. Ozherelkov S.V., Kozhevnikova T.N., Narovlyanskij A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. Protivovirusnoe dejstvie preparatov Fossprenil i Gamapren v otnoshenii flavivirusov, *Veterinariya i kormlenie*, 2017, No. 3, pp.78–80.
5. Ozherelkov S.V., Timofeev A.V., Novikova G.P., Deeva A.V., Narovlyanskij A.N., Sanin A.V., Pronin A.V. Zashchitnoe dejstvie novogo protivovirusnogo preparata Fossprenil pri ehksperimental'nom kleshchevom ehncefalite, *Voprosy virusologii*, 2000, Vol. 45, pp. 33–37.
6. Pronin A.V., Grigorieva E.A., Sanin A.V., Narovlyanskij A.N., Ozherelkov S.V., Deyeva A.V., Danilov L.L., Maltsev S.D., Najid A. Polyprenols as Possible Factors that Determine the Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response *Russian J. Immunol*, 2002, Vol. 7, No. 2, pp. 135–142.
7. Rudneva S.YU., Narovlyanskij A.N., Pronin A.V., Stepanova T.N., Sanin A.V. Lechenie papillomatoza rotovoj polosti u sobaki s ispol'zovaniem fossprenila, *Rossijskij veterinarnyj zhurnal. MDZH*, 2016, No. 3, pp. 9–11.
8. Sanin A.V., Primenenie immunomodulyatorov pri virusnyh zabolevaniyah melkih domashnih zivotnyh, *Rossijskij veterinarnyj zhurnal. MDZH*, 2005, No. 1, pp. 38–42.
9. Sanin A.V., Suslov A.P., Tret'yakov O.YU., Zvarcev R.V., Salichev A.V., Kozhevnikova T.N., Sanina V.YU., Smirnova E.G., Ozherelkov S.V. Raznopravlennoe vliyanie MIF i poliprenilfosfata na techenie ehksperimental'noj flavivirusnoj infekcii u myshej, *Zh. mikrobiol.*, 2011, No. 5, pp. 56–61.
10. Sanin A.V., Savojskaya S.L., Vasil'ev I.K., Narovlyanskij A.N., Pronin A.V., E.V.Gordeeva, Primenenie Gamaprena pri lechenii virusnyh infekcij u koshek, *Veterinariya Kubani*, 2009, No. 6, pp. 29–30.
11. Furman I.M., Vasil'ev I.K., Narovlyanskij A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. Primenenie preparatov na osnove rastitel'nyh poliprenolov pri razlichnyh formah koschach'ego infekcionnogo peritonita, *Rossijskij veterinarnyj zhurnal. MDZH*, 2010, No. 3, pp. 42–43.
12. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. *Cellular and molecular immunology* (7th ed.), 2012, Philadelphia: Elsevier/Saunders.
13. Baxter V.K., Griffin D.E., Interferon gamma modulation of disease manifestation and the local antibody response to alphavirus encephalomyelitis, *J Gen Virol.*, 2016 Nov, No. 97(11), pp. 2908–2925.
14. Croxford A.L., Kulig P., Becher B., IL-12-and IL-23 in health and disease, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014 Aug, No. 25(4), pp. 415–421.
15. Hamza T., Barnett J.B., Li B. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications, *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, Vol. 11(3), No. 7, pp. 789–806.
16. Lam L.K.M., Watson A.M., Ryman K.D., Klimstra W.B. Gamma-interferon exerts a critical early restriction on replication and dissemination of yellow fever virus vaccine strain 17D-204, *NPJ Vaccines.*, 2018, Vol. 3, pp. 5.
17. Mosser D.M., Zhang X., Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine, *Immunological Reviews*, 2008 December, No. 226(1), pp. 205–218.
18. Nan Y., Wu C., Zhang Y., Interplay between Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Activated by Type I Interferons and Viral Antagonism, *Front Immunol.*, 2017, No. 8, pp. 1758.
19. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, No. 3, pp. 133–146.

20. Watford W.T., Moriguchi M., Morinobu A., O'Shea J.J. The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003, No. 14, pp.361–368.
21. Zhang C., Zhang J., Niu J., Zhou Z., Zhang J., Tian Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D, *Human Immunology*, 2008 Aug, No. 69(8), pp. 490–500.
22. Zwirner N.W., Ziblat A., Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27, *Front Immunol.*, 2017, No. 8, pp. 25.

## ABSTRACT

**A.V. Sanin<sup>1</sup>, A.N. Narovlyanskiy<sup>1</sup>, A.V. Pronin<sup>1</sup>, S.V. Ozherelkov<sup>2</sup>, T.N. Kozhevnikova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (18, Gamaleya str., Moscow, 123098)

<sup>2</sup>Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and Biological products of RAS F (8/1, village of Institute of poliomyelitis, Moscow settlement, Moscow, 108819).

**Effect of Gamapren on the production of regulatory cytokines in mice following experimental Flavivirus infection.** Phosphorylated polyphenols-based medicines are known to inhibit the reproduction of viruses in vitro, as well as exert therapeutic effect in experimental viral infections and viral diseases of pets.

The aim of the study was to assess the effect of Gamapren (GP), the active ingredient of which are phosphorylated polyphenols isolated from mulberry leaves, on the production of key regulatory cytokines (CT) — interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-12 (IL-12) in experimental infection caused by tick-borne encephalitis virus (TBEV), Absettarov strain, in mice.

The levels of CT production in the serum of mice was determined by ELISA using commercial sets of firms «Genzyme» and «BioSource» (USA) according to the instructions for use. Infection of mice with TBEV led to the development of acute lethal infection. In the control life expectancy was 8.4 days. Under the action of GP, which was administered 3 and 2 days before infection of mice TBEV, life expectancy increased to 10.9 days, and in the case when GP was administered 3 days before and simultaneously with TBEV, life expectancy increased to 12.5 days. In TBEV-infected mice an increase in serum levels of IFN- $\gamma$  was recorded on day 4 and 7. On the contrary, GP stimulated the production of IFN- $\gamma$  at 48 hours. When GP was inoculated simultaneously with TBEV, the level of IFN- $\gamma$  in blood serum increased on the 3rd and 7th day.

When studying the content of IL-10 and IL-12 in the serum of mice, it was shown that in intact mice GP stimulated the content of IL-12 at all stages of the experiment, except for 4 and 10 days. The level of IL-10 did not change throughout the experience, not exceeding the control. To the contrary, in TBEV-infected mice stimulation of IL-12 production was revealed at the 5th (in the second half of the incubation period), 9-th and 10-th day (the period of TBE clinical signs) after infection. The level of IL-10 was increased by 1-st (12.6-fold), 7th and 8th day after infection, tick-borne encephalitis virus (5.6 and 7.2-fold, respectively). In mice simultaneously inoculated with GP and TBEV, the most significant stimulation of IL-12 production was observed at 4th, 5th, 9th and 10th days. IL-10 production was found only at day 3 following GP and TBEV inoculation. At all other stages of the study, IL-10 levels did not exceed the benchmark.

Thus, GP inoculated to the TBEV-infected mice stimulates the early production of IFN- $\gamma$  and IL-12, which may act as one of the key mechanisms of GP antiviral activity.

Viruses have the ability to disrupt the balanced development of Th1/Th 2 immune response needed to form an effective antiviral immunity, and GP stimulating the production of key cytokines providing a balanced formation of Th1 and Th2 immune response is able to restore this necessary balance. This property of GP in combination with direct antiviral action, apparently, also provides protection against a virus infection.

**Keywords:** Gamapren, phosphorylated polyphenols, cytokines, interferon- $\gamma$ , interleukin 10, interleukin 12, viral infection, cell-mediated immunity.

# ГАМАПРЕН



## Лечение и профилактика вирусных инфекций!

- Эффективен на любой стадии заболевания
- Обладает прямой противовирусной активностью
- Подтвержденная безопасность
- Удобство применения. Возможно выпаивание

[GAMAPREN.RU](http://GAMAPREN.RU)



Одобрено учеными ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России

