УДК 619:615.37:616.2:636.4

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНТЕРФЕРОНА И ИНДУКТОРОВ ИНТЕРФЕРОНА В СИСТЕМЕ IN VITRO

А.С. Ястребов[1], Д.С. Борисовец[1], П.А. Красочко[1], И.Т. Гринчик[1], В.А. Прокулевич[2]

[1] – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,

[2] – УО «Белорусский государственный университет»,

г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 1.06.2012 г.)

Аннотация. *Проведено изучение антипролиферативной и антивирусной активности интерферона и индукторов интерферона в системе in vitro с использованием перевиваемой культуры клеток СПЭВ и вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС).*

Установлено, что интерферон свиней рекомбинантный обладает антипролиферативной активностью на культуре клеток СПЭВ в разведениях от 1:100 до 1:800, которая сопровождается дегенерацией монослоя клеток.

Установлено, что свиной рекомбинантный интерферон и индуктор интерферона пролонгированного действия «Провест» обладают антивирусной активностью, которая проявлялась в условиях эксперимента на культуре клеток СПЭВ после внесения вируса ТГС. Антивирусное действие названных препаратов проявляется через 6 часов после их внесения в клеточную культуру и продолжается в течение 72-96 часов.

Summary. *Studying of antiproliferative and antiviral activities of interferon and interferon inducers in vitro with use of SPEV culture cells and virus of porcine transmissible gastroenteritis (TGE) were conducted.*

It was established that swine recombinant interferon demonstrates the antiproliferative activity at SPEV culture cells in dilutions from 1:100 to 1:800 accompanied by degeneration of the cell monolayer.

It was established that swine recombinant interferon and the long-acting interferon inducer of "Provest" demonstrate the antiviral activity at SPEV culture cells after its inoculation with TGE virus under the experimental conditions. Antiviral activity of these preparations was appeared 6 hours after their inoculation into the cell culture and lasting for 72-96 hours.

Введение. Заболевания органов дыхания у свиней занимают одно из ведущих мест в инфекционной патологии. В этиологической структуре возбудителей инфекционных заболеваний, вызывающих поражение органов дыхания у поросят, ведущая роль принадлежит вирусам, в частности, вирусу репродуктивно-респираторного синдрома (РРСС), цирковирусной инфекции, респираторной коронавирусной инфекции,

которые являются иммунодепрессантами и вызывают у свиней состояние вторичного иммунодефицита.

Возбудители некоторых бактериальных инфекций – респираторного микоплазмоза (M. hyopneumoniae), пастереллеза (P. multocida, сероварианты А и Д), гемофилезного полисерозита, актинобациллярной плевропневмонии, бордетеллезной и стрептококковой инфекций также являются причиной возникновения заболеваний органов дыхания у поросят.

Литературные данные и наши наблюдения показывают, что в свиноводческих хозяйствах чаще всего регистрируются ассоциированные вирусные и вирусно-бактериальные инфекции, основным клиническим признаком которых является респираторный синдром.

В такой ситуации актуальным является разработка и применение ассоциированных вакцин для проведения специфической профилактики респираторных болезней свиней, так как применение моновакцин при наличии смешанных инфекций является малоэффективным мероприятием.

Анализ результатов серологических исследований на вирусные заболевания свиней, в частности, у поросят в отъемный и послеотъемный периоды свидетельствует о персистенции вирусов – возбудителя РРСС, цирко- и парвовирусной инфекции у обследуемых животных, непривитых против названных инфекций. На персистенцию вируса РРСС, цирко- и парвовируса поросят указывает наличие в сыворотках крови специфических антител к названным вирусам в диагностических титрах. При наблюдении за такими животными у них не всегда проявлялись клинические признаки, свойственные РРСС, цирко- и парвовирусной инфекции за исключением отдельных животных, у которых отмечают заболевания органов дыхания. Предрасполагающими факторами возникновения заболеваний органов дыхания у поросят являлись стрессовые состояния, связанные чаще всего с различными нарушениями технологии содержания и кормления животных, с использованием неполноценных и недоброкачественных кормов, приводящих к угнетению иммунитета и ослаблению устойчивости организма к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. Происходила активация условно-патогенной микрофлоры, приводящая к возникновению т.н. вторичных инфекций и состоянию вторичного иммунодефицита.

В такой ситуации возникает необходимость в стимулировании иммунной системы у животных. Для этой цели разработаны и применяются в ветеринарной практике иммуностимулирующие (иммуномодулирующие) препараты.

В литературе имеются сообщения о применении интерферона, индукторов интерферона, обладающих антивирусными свойствами (1, 2, 3,

4). Их действие заключается в подавлении синтеза РНК- и ДНК-содержащих вирусов в клетке, стимуляции Т-хелперов и Т-киллеров, т.е. воздействии на клеточные системы иммунитета. В результате их воздействия повышается иммунореактивность организма животных, способствующая снижению заболеваемости и повышением сохранности поросят.

В задачи наших исследований входило: изучить антипролиферативную и антивирусную активность интерферонов и индукторов интерферонов в системе in vitro, чтобы в дальнейшем сконструировать комплексный биологический препарат на основе интерферона или индуктора интерферона и иммуностимулятора для профилактики и терапии респираторных болезней свиней.

Материалы и методы исследований. Свиной рекомбинантный интерферон, производитель НЦП «Белагроген» (г. Горки Могилевской области), препарат «Миксоферон» – рекомбинантный человеческий интерферон, производитель ЗАО «Мосагроген».

В качестве индукторов интерферона использовали вакцинные штаммы вируса болезни Ньюкасла: «Ла-Сота» и «В1», «Bor», инфекционного бронхита кур (Н-120) и индуктор интерферона пролонгированного действия «Провест», изготовитель ООО «Диафарм» Новосибирская область, г. Бердск-10.

Антипролиферативную активность интерферона и индукторов интерферона изучали в системе in vitro с использованием перевиваемой культуры клеток СПЭВ и вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней.

Для этой цели интерферон и индуктор интерферона разводили средой 199 от 1:100 до 1:51200, вносили по 100 мкл на культуру клеток СПЭВ (2-3 дня роста клеток) в пробирках или плоскодонных лунках иммунологического 96-луночного планшета, предварительно удалив ростовую среду, заменяя ее на поддерживающую. Инкубировали в термостате в течение 24-72 часов. В системе in vitro изучали антипролиферативную и антивирусную активность интерферона и индукторов интерферона. Результаты исследования оценивали по отсутствию или проявлению дегенерации клеток в монослое через 24, 48 и 72 часа после внесения вируса ТГС.

Антивирусную активность интерферона и индукторов интерферона определяли по устойчивости культуры клеток СПЭВ к воздействию вируса ТГС, т.е. по подавлению или проявлению цитопатического действия (ЦПД) вируса на клетках. Для этой цели интерферон свиной рекомбинантный и миксоферон разводили средой 199 от 1:800 до 1:51200 и вносили по 100 мкл на пробирку (лунку панели). Индукторы интерферона (вакцинные штаммы вируса болезни Ньюкасла, Ла-Сота, В1, Bor; вакцинный штамм вируса инфекционного бронхита кур Н-120; провест –

индуктор интерферона пролонгированного действия) разводили средой 199 от 1:100 до 1:51200. Через 6, 24, 48, 72, 96 часов после внесения индуктора интерферона на монослой клеток вносили по 100 мкл вируса ТГС (100 $ЦПД_{50}$/0,1мл) и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24, 48, 72 и 96 часов. Результаты учитывали по проявлению ЦПД вируса на культуре клеток, сравнивая полученные результаты исследований с контролями – контроль культуры клеток и контроль вируса.

Разведение интерферона или индуктора интерферона, задерживающее цитопатогенное действие вируса ТГС у 50% клеток, обработанных названными препаратами, считали максимальным.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты изучения антипролиферативной активности интерферона свиного рекомбинантного, миксоферона, индукторов интерферона приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Антипролиферативная активность интерферона и индукторов интерферона в системе in vitro

Разведение интерферона и индукторов интерферона	Дегенерация культуры клеток СПЭВ					
	Интерферон		Индукторы интерферона			
	Свиной рекомбинантный	Миксоферон	Провест	Вакцинные штаммы болезни Ньюкасла		
				Ла-Сота	В1	Вог
1:100	4/4	4/4		4/0	4/0	4/0
1:200	4/4	4/4		4/0	4/0	4/0
1:400	4/4	4/4		4/0	4/0	4/0
1:800	4/1	4/1		4/0	4\0	4/0
1:1600	4\1	4/1		4/0	4/0	4/0
1:3200	4/0	4/1		4/0	4/0	4/0
1:6400	4/0	4/0		4/0	4/0	4/0
1:12800	4/0	4/0		4/0	4/0	4/0
1:25600	4/0	4/0		4/0	4/0	4/0
1:51200	4/0	4/0		4/0	4/0	4/0
Контроль	4/0	4/0		4/0	4/	4/0

Примечание: 4/2 – в числителе – количество пробирок (лунок) с культурой клеток в опыте, в знаменателе – количество пробирок (лунок) с культурой клеток, в которых отмечена деградация клеток.

Из таблицы 1 видно, что оба интерферонсодержащих препарата (свиной рекомбинантный интерферон и миксоферон) проявляют антипролиферативную активность на перевиваемой культуре клеток СПЭВ в разведениях от 1:100 до 1:800. В дальнейших разведениях антипролиферативная активность препаратов интерферона не проявлялась. Индуктор интерферона пролонгированного действия «Провест» вакцинные штаммы вируса Ньюкасла антипролиферативными свойствами не обладали.

Результаты исследований по изучению антивирусной активности интерферона свиного рекомбинантного, миксоферона с использовани-

ем перевиваемой культуры клеток СПЭВ и вируса ТГС приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Антивирусная активность интерферона в системе in vitro

Разведения интерферона	Кол-во пробирок (лунок)	Учет результатов (ЦПД вируса)	
		Интерферон свиной рекомбинантный	Миксоферон
1:800	4	4/0	4/0
1:1600	4	4/0	4/3
1:3200	4	4/0	4/4
1:6400	4	4/3	4/4
1:12800	4	4/4	4/4
1:25600	4	4/4	4/4
1:51200	4	4/4	4/4
Титр интерферона	-	1:5012	1:1259
Контроль клеток	4	4/0	4/0
Контроль вируса	4	4/4	4/4

Примечание: в числителе – количество пробирок с культурой клеток в опыте, в знаменателе – количество пробирок, где вирус проявил ЦПД.

Из таблицы 2 видно, что оба интерферонсодержащих препарата – интерферон свиной рекомбинантный и миксоферон обладают определенной антивирусной активностью в эксперименте на модели перевиваемой культуры клеток СПЭВ и вируса ТГС. Интерферон свиной рекомбинантный в разведении 1:5012 предохранял 50% клеток от заражения вирусом ТГС, миксоферон – в разведении 1:1259. В дальнейших исследованиях использовали интерферон свиной рекомбинантный.

При внесении интерферона на культуру клеток его защитное действие против вируса ТГС проявляется уже через 6 часов (титр 1:2239). Через 24-48 часов его действие усиливается и достигает титра 1:25120 – 1:51200, через 72 часа его уровень снижается до титра 1:2500 – 1:1800.

При испытании антивирусной активности индукторов интерферона установили, что живой вакцинный вирус болезни Ньюкасла – штаммы Ла-Сота, В1, BOR и вирус инфекционного бронхита – штамм Н-120 обладает невысокой интерфероноиндуцирующей и антивирусной активностью. В частности, живой вакцинный вирус болезни Ньюкасла задерживает цитопатогенное действие вируса ТГС на культуре клеток в разведении 1:40. Индуктор интерферона пролонгированного действия «Провест» через 6 часов после внесения его на культуру клеток СПЭВ задерживал репродукцию вируса ТГС в разведении 1:1122, через 24 часа – 1:2239, через 48 часов – 1:5309. Через 72 часа его титр составлял 1:5370. К 96 часам титр интерферона снижался до разведения 1:1020.

Заключение. 1. Интерферон в эксперименте на перевиваемой культуре клеток СНЭВ обладает антипролиферативной активностью в

разведении 1:100 до 1:800, которая сопровождается их дегенерацией. В дальнейших разведениях антипролиферативные свойства интерферона на культуре клеток не проявляются.

Индукторы интерферона (вакцинные вирусы болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита птиц, «Провест») антипролиферативной активностью не обладают.

2. Антивирусное действие интерферона свиного рекомбинантного на модели культуры клеток СПЭВ и вируса трансмиссивного гастроэнтерита проявляется через 6 часов после его внесения на культуру клеток в титре 1:2239, усиливается через 24-48 часов до показателей 1:25120 - 1:51200 и его уровень снижается через 72 часа до показателей 1:2500 – 1:1800.

3. Вакцинные штаммы вируса болезни Ньюкасла как индукторы интерферона в системе in vitro проявили невысокую интерферониндуцирующую и антивирусную активность. Индуктор интерферона пролонгированного действия «Провест» задерживал репродукцию вируса ТГС на культуре клеток СПЭВ через 6 часов после его внесения на культуру клеток в титре 1:1122, через 24 часа - в титре 1:2239, через 48 часов – в титре 1:5309, через 72 часа – в титре 1:5370, через 96 часов – в титре 1:1020.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лаптев С.В., Мезенцева Н.И. Общая биология и микробиология. Основы вирусологии. Особенности репродукции вирусов: Учебное пособие для модульно-рейтинговой технологии обучения.// Алтайский государственный технологический университет. – Бийск.- 2003.- с.164.

2. Бурдейный В.В. Свиной лейкоцитарный интерферон с инактивированным индуктором при некоторых инфекционных болезнях молодняка животных// Труды Костромской государственной сельскохозяйственной академии. – Кострома.- 1999г., в. 57 –с. 40-45.

3. Левагина Г.М. Биотехнологические подходы к разработке препаратов дсДНК как потенциальных противоинфекционных средств// Автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. Биол. Наук. – 2006. – с.150.

4. Сходин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. Ньюкасловская болезнь.- Москва, 1998. – с.220.