

Сравнительное изучение противовирусной активности компонентов кордовой крови человека при экспериментальной инфекции вирусом гриппа

UDC 615.361.018.5.013.8.281:578.832.1

E.S. ONASENKO*, E.V. BROVKO, L.V. STEPANYUK, V.L. PONOMAREVA

Comparative Studying of Human Cord Blood Components Antiviral Activity at Experimental Grippe Viral Infection

Проведено сравнительное изучение противовирусной активности лейкоконцентрата ядерных клеток кордовой крови человека и его компонентов. Установлено, что наибольшей ингибирующей активностью обладали лейкоконцентрат и плазма кордовой крови человека. Это позволяет предполагать использование их для профилактики гриппозной инфекции. Для окончательного суждения об эффективности препарата как неспецифического средства профилактики гриппа необходимо дальнейшее исследование его противовирусного действия.

Ключевые слова: кордовая кровь, противовирусный эффект, гемагглютинирующий титр.

Проведено порівняльне вивчення противірусної активності лейкоконцентрату ядерних клітин кордової крові людини та його компонентів. Встановлено, що найбільшу інгібуючу активність має саме лейкоконцентрат та плазма кордової крові людини. Це дозволяє припустити їх використання для профілактики інфекції грипу. Остаточні висновки про ефективність препарату як неспецифічного засобу профілактики грипу потребують подальшого дослідження його противірусної дії.

Ключові слова: кордова кров, противірусний ефект, гемагглютинуючий титр.

Comparative studying of human cord blood leucoconcentrate and its components antiviral activity was carried out. It was established that the highest inhibiting activity possessed human cord blood leucoconcentrate and plasma. This allows to assume their usage for grippe virus diseases prophylaxis. The further research of leucoconcentrate antiviral activity is necessary for final judgement its efficiency as a nonspecific antiviral protective preparation.

Key-words: cord blood, antiviral effect, hemagglutination titre.

Заболееваемость гриппом – одна из актуальных проблем современной медицины. Постоянная смена антигенных вариантов, доминирующих в эпидемическом процессе штаммов, является особенностью вирусов гриппа А, что осложняет разработку эффективных мер борьбы с этой инфекцией [2].

Ранее мы установили, что лейкоконцентрат кордовой крови человека (ЛККЧ) [1] способен нейтрализовать вирус гриппа А/Виктория и обеспечить 100% выживаемость исследуемых животных при предварительном и одновременном интраназальном его введении с вирусом.

Цель работы – изучение влияния лейкоконцентрата и отдельных его компонентов на морфофункциональное состояние органов и систем на этапах развития вирусной инфекции гриппа.

Материалы и методы

Штамм вируса гриппа А/Виктория был предоставлен НИИ гриппа РАМН (г. С.-Петербург). В

работе использовали стандартные вирусологические и серологические методы исследований [3]. Проведено 6 пассажей вируса на белых мышах и 2 пассажа на куриных эмбрионах. Титр гемагглютининов инфицированной аллантоисной жидкости был 1:512, инфекционный титр – 10^4 LD_{50/10}. В качестве объекта исследования использовали ЛККЧ, плазму и сыворотку кордовой крови человека (ККЧ), плазму крови взрослого человека. Сыворотку проверяли с помощью РТГА на наличие специфических антител к вирусу гриппа. В сыворотке данные антитела отсутствовали. В эксперименте использовали 2-месячных беспородных белых мышей. Исследования с животными проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2004) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей”

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

(г. Страсбург, 1985). Все оперативные вмешательства на животных, включая декапитацию, проводили под ингаляционным эфирным наркозом.

Животных инфицировали интраназальным введением 0,05 мл вирусосодержащего материала. Объем ингредиентов серологических реакций РТГА и РГА составлял 0,05 мл. Во все лунки добавляли также по 0,05 мл 2%-й взвеси эритроцитов человека I(0) группы крови.

Результаты исследований

С целью изучения противовирусной активности ЛККЧ и его компонентов первой опытной группе животных O_1 интраназально вводили одновременно вирус гриппа А/Виктория в дозе $LD_{100/10} = 10^2$ и ЛККЧ в соотношении 1:1 (по 0,05 мл). Второй опытной группе животных O_2 вводили одновременно вирус гриппа А/Виктория и плазму ККЧ. В эксперименте было 4 контрольных группы животных, которым вводили: K_1 – вирус гриппа + физиологический раствор в соотношении 1:1 (по 0,05мл); K_2 – вирус гриппа + плазма взрослого человека; K_3 – вирус гриппа + сыворотка ККЧ. Группа K_4 – интактные мыши. Каждая группа состояла из 10 животных.

Полученные результаты представлены в табл. 1.

В опытных группах выживаемость животных составила 100%, что свидетельствует о противовирусной активности лейкоконцентрата и плазмы ККЧ (табл. 1). В группе K_3 погибло по 1 мыши из

10, в группе K_1 гибель животных составляла 100%.

Гистологический анализ показал, что в группе K_1 через 48 ч после инфицирования наблюдалась десквамация эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей с сохранением базального слоя клеток. Часть клеток набухла и утрачивала мерцательные ворсинки. Отмечались вакуолизация цитоплазмы значительного числа клеток, поражение ядер эпителиальных клеток, перераспределение в них хроматина и его концентрации по периферии ядра, исчезновение ядрышка. В легочной ткани в этот период исследования выявлялась очаговая десквамация альвеолярных клеток в просвет альвеол, в отдельных альвеолярных клетках – базофильные включения. Вокруг бронхососудистого пучка легкого отмечалась лимфоцитарная инфильтрация с гистиоцитами. Сосуды легкого были расширены.

Гистологические изменения и десквамация поверхностных слоев эпителия верхних дыхательных путей в опытных группах через 48 ч после введения вируса гриппа, лейкоконцентрата и плазмы ККЧ были незначительными. Изменения в ядрах отмечались лишь в некоторых эпителиальных клетках. Изредка обнаруживались фрагментация цитоплазмы этих клеток, вакуолизация и базофильные включения. Полнокровие, незначительный отёк и скудная лимфоцитарная инфильтрация подслизистых оболочек выявлялись через 48 ч и быстро исчезали.

Таблица 1. Противовирусная активность ядросодержащих клеток и плазмы ККЧ

Сутки после инфицирования	Группы животных														
	O_1			O_2			K_1			K_2			K_3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–	–	1	2	1	1	–	–	–	–
5	–	–	–	–	–	–	–	1	2	–	1	–	–	1	–
6	–	–	–	–	–	–	2	2	1	–	–	1	1	–	–
7	–	–	–	–	–	–	1	–	2	1	–	–	–	–	1
8	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: цифрами обозначено число погибших животных.

При морфометрическом анализе установлено, что вес легких и селезенки животных во всех группах не изменился, тогда как вес тимуса в группе животных O_1 через 48 ч был достоверно выше, чем в группе K_4 , но достоверно ниже, чем в группе K_1 .

В ходе исследований проведен сравнительный цитологический анализ периферической крови и костного мозга мышцей. Выявлено, что у мышцей при экспериментальной инфекции гриппа в группах O_1 , O_2 количество лейкоцитов существенно не отличалось от показателей контрольной группы K_4 (интактные мыши) на всех этапах исследования. В контрольной группе K_1 отмечено резкое снижение числа лейкоцитов, что характерно для тяжелой формы течения гриппа. Количество эритроцитов через 48 ч после инфицирования достоверно снизилось в группе K_1 по сравнению с группой K_4 , а в группах O_1 и O_2 эти показатели соответствовали контролю.

Проведенные исследования костного мозга у экспериментальных животных показали, что на 2-е сутки количество ядросодержащих клеток в нем снижалось в группе K_1 по сравнению с контрольной группой K_4 (интактные мыши) и опытными группами O_1 , O_2 , показатели которых достоверно не отличались от контроля K_4 . На 7-е сутки исследования наблюдалась тенденция к дальнейшему снижению количества ядросодержащих клеток в группе животных K_1 . В опытных группах O_1 и O_2 этот показатель не изменялся по сравнению с контролем K_4 и был достоверно выше, чем в группе K_1 .

С целью выявления вируса гриппа А/Виктория и установления гемагглютинирующего титра (по РГА) на 2, 7, 14 и 30-е сутки после интраназального введения у животных изымали и исследовали легкие, лимфоузлы, носоглотку, надпочечники, селезенку, тимус, щитовидную железу. На 2-е сутки исследования вирус гриппа выявлен в лимфатических узлах, тимусе, селезенке, щитовидной железе, надпочечниках в группе животных K_1 . Число животных с низким титром вируса в органах и животных, у которых вирус в данных органах не

Таблица 2. Гемагглютинирующий титр вируса в органах мышцей на разных стадиях экспериментальной инфекции гриппа

Исследуемый материал	Сроки исследования, сут	Гемагглютинирующий титр вируса в исследуемых группах				
		O_1	O_2	K_1	K_2	K_3
Легкие	2	1:16	1:8	1:64	1:16	1:16
	7	1:32	1:32	1:128	1:64	1:32
	14	1:256	1:256	*	1:128	1:128
	30	—	—	*	—	—
Носоглотка	2	1:1	1:1	1:8	1:2	1:4
	7	—	—	—	—	1:4
	14	—	—	—	—	1:4
	30	—	—	—	—	1:4
Надпочечники	2	1:1	1:1	1:4	1:2	1:1
	7	1:2	1:4	1:8	1:4	1:4
	14	1:4	1:16	*	1:8	1:4
	30	—	—	*	—	—
Селезенка	2	1:4	1:8	1:8	1:4	1:2
	7	1:16	1:32	1:16	1:32	1:8
	14	1:16	1:32	*	1:32	1:8
	30	—	—	*	—	—
Лимфоузлы	2	—	—	1:4	—	1:2
	7	—	—	1:8	—	1:4
	14	—	—	*	—	1:1
	30	—	—	*	—	—
Тимус	2	1:1	1:1	1:8	1:2	1:1
	7	1:2	1:4	1:16	1:8	1:2
	14	1:4	1:4	*	1:16	1:2
	30	—	*	*	—	—
Щитовидная железа	2	1:2	1:1	1:2	1:4	1:1
	7	1:8	1:8	1:4	1:16	1:4
	14	1:8	1:4	*	1:16	1:8
	30	—	—	*	—	—

Примечание: * – гибель животных 100%; "–" – вирус не обнаружен.

обнаруживался, было достоверно выше в группах O_1 и O_2 . В указанный период эксперимента титр вируса в легких животных групп O_1 , O_2 , K_3 был достоверно ниже, чем в группе K_1 .

Результаты исследования патологического материала, выделенного из исследуемых животных, приведены в табл. 2.

Выводы

Установлено, что ЛККЧ и плазма ККЧ обладают более выраженным противовирусным действием в отношении вируса гриппа А/Виктория. Об этом свидетельствуют 100%-я выживаемость животных, зараженных вирусом гриппа А/Виктория в летальной дозе $LD_{100/10} = 10^2$, результаты гистологических исследований и показатели периферической крови. В опытных группах животных O_1 , O_2 , которым вводили ЛККЧ и плазму ККЧ одновременно с вирусом в течение всего развития гриппозной инфекции, количество лейкоцитов и эритроцитов достоверно не изменялось, тогда как в периферической крови животных контрольной группы K_1 наблюдалось резкое снижение данных показателей, характерное для тяжелой формы течения гриппозной инфекции. Под действием

ЛККЧ и плазмы ККЧ у зараженных животных вырабатывался противовирусный иммунитет, о котором свидетельствует появление нейтрализующих антител в сыворотке крови.

Литература

1. *Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н.* Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови // Вопросы онкологии.–2000.–Т. 46, №5.– С. 513–520.
2. *Вирусология* / Под ред. Б.Филдса, Д. Найна.– М.: Мир, 1998.–319 с.
3. *Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В.* Ветеринарная вирусология.– М.: Колос,1984.– 375 с.

Поступила 07.07.2008