

УДК 615.281.8 + 578.245

DOI: 10.20535/ibb.2017.1.1.112852

Ю.І. Порва¹, С.Л. Рибалко¹, С.Т. Дядюн¹, Т.М. Луценко², О.Ю. Галкін^{3*},
Я.О. Похолєнко⁴, О.Б. Горбатюк⁴

¹ДУ “Інститут епідеміології і інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України”, Київ, Україна

²ТОВ “УА “Про-фарма”, Київ, Україна

³КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

⁴Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ НА РІЗНИХ МОДЕЛЯХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ГЕПАТИТУ С

Проблематика. Інтерлейкін-7 (ІЛ-7) є одним із найважливіших регуляторних цитокінів імунної системи. З урахуванням здатності ІЛ-7 до модуляції Т- і В-клітинної відповіді і Т-клітинного гомеостазу можливо припустити, що препарати ІЛ-7 мають властивість не лише впливати на формування специфічного імунітету та імунодефіцитного стану, а й інгібувати репродукцію вірусів, зокрема вірусу гепатиту С (ВГС).

Мета дослідження. Вивчення антивірусної дії рекомбінантного ІЛ-7 людини (рІЛ-7) на моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С *in vitro* на чутливих до вірусу епітеліальних і лімфоїдних клітинах.

Методика реалізації. У роботі використовували перешеплювані культури клітин: *Jurkat*, невриноми вузла Гассера щура та нирки бика. Як сурогатний ВГС використовували вірус бичачої вірусної діареї. Для вивчення антивірусної активності рІЛ-7 у різних концентраціях вводили в культуру клітин, яка продукує ВГС, та визначали вірусне навантаження. Проводили також цитологічний аналіз впливу рІЛ-7 на клітини та визначення їх проліферативної активності.

Результати дослідження. Було показано, що рІЛ-7 інгібує репродукцію сурогатного ВГС в умовах *in vitro* (CC50 – 3 мкг/мл, ED50 – 4,7 нг/мл, IS – 640). Найвища проліферація інтактних Т-клітин визначається при дозах рІЛ-7 0,3 і 0,025 мкг/мл. рІЛ-7 по-різному впливав на інфіковані ВГС культури: в перші 3 доби кількість клітин зменшувалася або не змінювалася, а через 2–3 тижні – збільшувалася майже в 2 рази. При введенні рІЛ-7 в дозі 6 мкг/мл упродовж 3 діб на 3-тю добу інгібування вірусного навантаження становило 89 %, а на 4-ту добу – 100 %; при використанні дози рІЛ-7 0,3 мкг/мл інгібіція на 4-ту добу становила 100 %; при використанні дози рІЛ-7 1,5 мкг/мл – на 55 % на 4-ту добу.

Висновки. У результаті проведених досліджень з визначення впливу рІЛ-7 на репродукцію сурогатного ВГС показано, що рІЛ-7 ефективно інгібує репродукцію вірусу.

Ключові слова: інтерлейкін-7 людини рекомбінантний; вірус гепатиту С; противірусна активність; вірусне навантаження.

Вступ

Інтерлейкін-7 (ІЛ-7) – імунний цитокін, який відіграє центральну роль у розвитку та гомеостазі Т- і В-лімфоцитів, бере участь у розвитку дендритних клітин, натуральних кілерів і клітин-індукторів лімфоїдної тканини, які теж є важливими ланками імунітету. ІЛ-7 бере участь у регулюванні гомеостазу імунної системи завдяки його здатності підтримувати баланс між процесами апоптозу і проліферації тимоцитів, наївних Т-лімфоцитів і клітин пам'яті й тим самим забезпечувати постійність чисельності і функціональної активності цих популяцій [1]. Це підтверджують дані про існування оберненої залежності між кількістю лімфоцитів (насамперед CD4-лімфоцитів) і рівнем ІЛ-7 у периферичній крові в осіб з різною патологією, незважаючи на різний генез зниження рівня CD4-лімфоцитів.

Уперше подібна закономірність була виявлена в осіб, що перенесли трансплантацію кісткового мозку і пройшли курси хіміотерапії [2]. В подальшому була виявлена обернена залежність між рівнем ІЛ-7 у сироватці і ступенем зниження кількості CD4-лімфоцитів у онкологічних хворих, що одержували курси хіміотерапії, а також у пацієнтів з ідіопатичною лімфопенією [3].

В експериментах на щурах була показана здатність ІЛ-7 брати участь у розвитку дендритних клітин [4]. Вплив ІЛ-7 на дендритні клітини людини вивчено недостатньо. Показано, що ІЛ-7, діючи разом із колонієстимулювальним фактором для гранулоцитів і макрофагів, ініціював диференціювання моноцитів периферичної крові в дендритні клітини. У свою чергу дендритні клітини людини можуть бути продуцентами ІЛ-7 [5–7]. Був показаний зв'язок ІЛ-7 із зовнішньоклітинними матрикс-асоційованими глюкозаміногліка-

* corresponding author: alexfbt@gmail.com

нами, гепаран-сульфатами і фібронектином, що може бути механізмом антивірусної дії на рівні взаємодії з рецепторами адсорбції вірусів, такими як вірус грипу, простого герпесу, гепатиту С тощо, на чутливих клітинах. Крім того, ІЛ-7 впливає на внутрішньоклітинні сигнальні молекули Як-3 і Як-1 і через активацію каскаду ферментів сприяє нормалізації гомеостазу клітин [8–10].

Введення екзогенного ІЛ-7 нормальним мишам призводить до значного збільшення преВ та зрілих В-клітин, що разом із активацією Т-клітинної відповіді може бути підставою для використання препарату як ад'ювантної терапії при імунodefіцитних станах і вакцинації [11–13].

Останнім часом з'явилися праці, в яких відображені результати досліджень антивірусної дії ІЛ-7, в основному на експериментальних моделях *in vivo* [14–16]. З урахуванням здатності ІЛ-7 до модуляції Т- і В-клітинної відповіді і Т-клітинного гомеостазу, взаємодії з мембранними структурами клітин, регуляції каскаду внутрішньоклітинних ферментів, що забезпечують захисні механізми клітин, а також впливу на апоптоз клітин можливо припустити, що препарати ІЛ-7 мають властивість не лише впливати на формування специфічного імунітету та імунodefіцитного стану, а й інгібувати репродукцію вірусів.

Постановка задачі

Метою досліджень є вивчення антивірусної дії препарату рекомбінантного ІЛ-7 людини на моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С *in vitro* на чутливих до вірусу епітеліальних і лімфоїдних клітинах.

Матеріали і методи

Препарат. Рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (рІЛ-7) був наданий ТОВ “Універсальне агентство “ПРО-ФАРМА”, м. Київ.

Культури клітин. У роботі використовували перещеплювану суспензійну культуру клітин *Jurkat* людського походження від хворого на Т-лімфобластoidну лейкемію (Інститут імунології РАМН, Росія), яка культивується в атмосфері 5 % CO₂ у середовищі RPMI-1640, “Sigma”, США, з 2 мМ глютаміну і 10 % прогрітої ембріональної телячої сироватки (за температури 37 °С). Густина клітин становила (3–9)×10⁵ клітин/мл.

Також використовували перещеплювану лінію клітинної культури НГУК (невринома Гассерова вузла щура), одержану в НДІ морфо-

логії людини РАМН, Росія (живильне середовище складалось із 88 % середовища RPMI-1640, “Sigma”, США, з додаванням 12 % інактивованої прогріванням ембріональної телячої сироватки, “Панеко”, Росія) і антибіотиків, та перещеплювану лінію клітинної культури МДВК (нирка бика), отриману з Інституту вірусології РАМН, м. Москва, Росія, живильне середовище RPMI-1640 (“Sigma”, США) та 10 % інактивованої прогріванням ембріональної телячої сироватки (“Панеко”, Росія) і антибіотиків. Культивування проводили в термостаті з 5 % CO₂ за температури 37 °С.

Віруси. Як сурогатний ВГС використовували вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД), що є тест-моделлю вірусу гепатиту С. Вірус бичачої вірусної діареї належить до роду *Pestivirus* у межах родини *Flaviviridae*. Геном ВБВД складається із одного позитивного ланцюга РНК.

Вірусний матеріал на 4 пасажі був наданий науковим співробітником О.М. Дерябіним з Інституту ветеринарної медицини НААН України. Інфекційний титр вірусу після десяти проведених пасажів у культурі клітин МДВК становив 6–7 lg ІД₅₀.

Визначення проліферативної активності клітин. Проліферацію клітин *Jurkat*, оброблених препаратом рІЛ-7 і заражених ВГС, проводили в камері Горяєва за формулою

$$X = A \times 400 \times C / B,$$

де X – шукана кількість клітин у 1 мм³; A – сума клітин, підрахованих у певному об'ємі камери; B – кількість підрахованих малих квадратів; C – розведення клітин.

Модель культури – продуцента клітин, трансфектованих кДНК вірусу гепатиту С. Експерименти проводили на лінії клітин *Jurkat*. Джерелом ВГС слугувала нерозведена плазма крові хворих на гепатит С з різним вірусним навантаженням, яка містить РНК ВГС. Останню виділяли з використанням комплекту реагентів “РИБО-сорб” (ФДУН “ЦНДІЕ” Роспозживнагляду, Росія). кДНК ВГС отримували реакцією зворотної транскрипції РНК з використанням комплекту реагентів “Реверта-Л” (ФДУН “ЦНДІЕ” Роспозживнагляду, Росія). До 10 мкл готової реакційної суміші (ліофілізований ДДТ, 125 мкл розчину RT-mix і 6 мкл ревертази MMLv – зворотна транскриптаза вірусу лейкемії мишей) додавали 10 мкл РНК-проби і проводили транскрипцію за температури 37 °С протягом 30 хв, у результаті чого отримували кДНК. Суспензійні культури

Таблиця 2. Ефективна доза (ED₅₀) препарату рІЛ-7 відносно ВБВД

Концентрація препарату, мкг/мл	Інфекційний титр вірусу в lg ID ₅₀
0,15	7,0
0,075	5,0
0,0375	3,0
0,0187	3,0
0,009	3,0
0,0047	3,0
Контроль вірусу	8,0

Таблиця 3. Результати визначення CC₅₀, ED₅₀, IS препарату рІЛ-7

Характеристика	Значення
CC ₅₀	3,0 мкг/мл
ED ₅₀	0,0047 мкг/мл
IS	640

Таблиця 4. Результати трансфекції суспензійних культур *Jurkat* для отримання стабільної продукції ВГС

Трансфекція (пасаж)	Номер зразка			
	1-3A	2-3a	3-3A	4-1b
Вірусне навантаження (г/екв.)				
2-й пасаж	2537	4485	2512	13598
5-й пасаж	3150	5400	3120	14100

Для одержання продукуючих ВГС культур клітин виділяли РНК ВГС від хворих пацієнтів. Далі одержували кДНК на матриці РНК ВГС для трансфекції культур *Jurkat* і подальшого аналізу методом ПЛР (табл. 4).

Таким чином, у результаті трансфекції суспензійних культур *Jurkat* за допомогою трансфекційного реагенту *Turbofect* одержані продукуючі культури клітин, трансфеговані кДНК ВГС, які дають стабільну продукцію вірусу гепатиту С.

Наступним етапом досліджень було визначення впливу різних доз рІЛ-7 на динаміку росту культур *Jurkat*, не інфікованих гепатитом С та інфікованих ВГС. У культури клітин *Jurkat*, неінфікованих та інфікованих ВГС, у концентрації 550 тис. клітин у 1 мл додавали рІЛ-7 у дозах 2,5; 0,25; 0,025 мкг/мл на 1, 2 і 3-тю добу. На кожне розведення препарату та контроль до експерименту: інтактні клітини та клітини, інфіковані продукуючим вірусом гепатиту С, використовували по 5 лунок. У кожній лунці підраховували кількість живих клітин у камері Горяєва. В експерименті було 8 варіантів досліджуваних культур клітин.

Перший варіант – культури клітин *Jurkat*, інфіковані продукуючою культурою трансфегованого вірусу ВГС на 1 мл культури клітин 50 мкл ВГС – лунки № 1–5. Другий варіант – до культур клітин *Jurkat*, інфікованих продукую-

ючою культурою ВГС, додавали рІЛ-7 у дозі 2,5 мкг/мл – лунки № 6–10. Третій варіант – до культур клітин *Jurkat*, інфікованих продукуючою культурою ВГС, додавали рІЛ-7 у дозі 0,25 мкг/мл – лунки № 11–15. Четвертий варіант – до культур клітин *Jurkat*, інфікованих продукуючою культурою ВГС, додавали рІЛ-7 у дозі 0,025 мкг/мл – лунки № 16–20. П'ятий варіант – до неінфікованих культур *Jurkat* додавали рІЛ-7 у дозі 2,5 мкг/мл – лунки № 21–25. Шостий варіант – до неінфікованих культур *Jurkat* додавали рІЛ-7 у дозі 0,25 мкг/мл – лунки № 26–30. Сьомий варіант до неінфікованих культур *Jurkat* додавали рІЛ-7 у дозі 0,025 мкг/мл – лунки № 31–35. Восьмий варіант – інтактні клітини *Jurkat* – лунки № 36–40. Результати середньої кількості клітин з 5 лунок для 8 варіантів досліду подані в табл. 5.

Аналізуючи результати впливу рІЛ-7 на динаміку росту клітин *Jurkat*, інфікованих та неінфікованих ВГС, слід відзначити, що інтактні культури в динаміці постійно збільшували концентрацію клітин в 1 мл, на 22-гу добу кількість клітин подвоювалася. Кількість клітин у лунках, що були інфіковані ВГС, у перші 3 доби майже не змінювалася, на 14 та 22-гу добу кількість клітин в 1 мл подвоїлася. Вплив рІЛ-7 на інтактні клітини в перші 3 доби зале-

Таблиця 5. Вплив рІЛ-7 на динаміку росту інфікованих і неінфікованих ВГС клітин *Jurkat*

№ лунок	Характер впливу	Кількість клітин, тис./мл				
		1 доба	2 доба	3 доба	14 доба	22 доба
1–5	ВГС	495,0	407,0	462,0	12012,0	1133,0
6–10	ВГС + рІЛ-7 2,5 мкг/мл	503,0	393,0	356,0	829,4	657,8
11–15	ВГС + рІЛ-7 0,25 мкг/мл	613,8	712,8	708,4	1225,4	1298,0
16–20	ВГС + рІЛ-7 0,025 мкг/мл	828,8	679,8	462,0	939,4	753,0
21–25	рІЛ-7 2,5 мкг/мл	750,2	514,8	602,8	1278,0	787,0
26–30	рІЛ-7 0,25 мкг/мл	591,8	382,8	411,4	1199,0	902,0
31–35	рІЛ-7 0,025 мкг/мл	332,2	678,0	796,4	904,2	1372,0
36–40	Контроль <i>Jurkat</i>	514,8	620,4	753,0	1194,0	1012,0

жав від дози препарату: при дозі 2,5 мкг/мл кількість клітин на 1 і 3-тю добу збільшувалася на 100–200 тис.; на 2-гу залишалася на вихідному рівні; на 14-ту добу збільшення клітин досягало максимуму, і на 22-гу добу кількість клітин знижувалася. При дозі 0,25 мкг/мл кількість клітин на 2 та 3-тю добу знижувалася, а на 14-ту добу досягала свого піку і поступово знижувалася на 22-гу добу. Для мінімальної дози 0,025 мкг/мл динаміка росту культур характеризувалася поступовим збільшенням клітин до 22-ї доби у 2-3 рази. Досліджувані концентрації рІЛ-7 зовсім по іншому впливали на динаміку росту інфікованих ВГС клітин. На 1-шу добу дози 0,25 і 0,025 мкг/мл стимулювали ріст клітин, на інші досліджувані терміни рІЛ-7 у дозі 0,25 мкг/мл поступово стимулював ріст клітин. Застосування доз 2,5 і 0,025 мкг/мл на 2 та 3-тю добу зменшувало кількість клітин, на 14 та 22-гу добу збільшувало на 300–400 тис. та 100–200 тис. клітин/мл відповідно.

Jurkat. Максимального росту клітини досягали на 14-ту добу для всіх варіантів досліджу. Ви-

ражений проліферативний вплив на неінфіковані клітини *Jurkat* досягався при найменшій дозі рІЛ-7 – 0,025 мкг/мл. Вірус гепатиту С також мав проліферативний вплив на клітини *Jurkat*. рІЛ-7 у досліджуваних дозах на інфіковані ВГС культури клітин по різному впливав на проліферацію клітин у перші 3 доби та через 2–3 тижні.

Для вивчення мітотичного режиму клітин під впливом рІЛ-7 для всіх 8 варіантів досліджу проведено вивчення на культурі клітин НГУК, інфікованих та неінфікованих ВГС. Результати наведені в табл. 6.

Згідно з наведеними даними, рІЛ-7 у різних дозах від 0,025 мкг/мл до 2,5 мкг/мл не впливав на мітотичний індекс клітин і на кількість аномальних форм мітозу, за винятком дози 0,25 мкг/мл, де кількість аномальних форм мітозу та показники мітотичного індексу незначно, але недостовірно, перевищувала показники інтактних клітин. При зараженні клітин ВГС і внесенні в них рІЛ-7 у різних дозах показники мітотичного індексу й аномальних форм мітозу були на рівні показника інтактних клітин, за винятком дози рІЛ-7 0,025 мкг/мл,

Таблиця 6. Вплив рІЛ-7 на мітотичний режим клітин НГУК, заражених ВГС

Характер впливу	Мітотичний індекс, %	Аномальні мітози, %
Контроль ВГС	21,0	38,0
ВГС + рІЛ-7 (2,5 мкг/мл)	14,0	21,4
ВГС + рІЛ-7 (0,25 мкг/мл)	14,0	21,4
ВГС + рІЛ-7 (0,025 мкг/мл)	19,0	31,5
рІЛ-7 (2,5 мкг/мл)	11,0	19,0
рІЛ-7 (0,25 мкг/мл)	14,0	26,4
рІЛ-7 (0,025 мкг/мл)	12,0	16,6
Контроль клітин	13,0	20,6

де він незначно, але недостовірно, перевищував показник контролю клітин. Показники мітотичного індексу й аномальних форм мітозу контролю ВГС при цьому достовірно перевищували мітотичний режим інтактних клітин.

Таким чином, одержані результати дають додаткову інформацію, що мітотичний режим клітин під впливом репродукції ВГС набуває проліферативного характеру. рІЛ-7 у різних дозах нормалізує мітотичний режим інфікованих клітин. Це може бути пов'язане як з інгібіцією ре-

продукції ВГС, так і з нормалізацією гомеостазу клітин. Тому на 3 і 5-ту добу в культуральному середовищі інфікованих ВГС клітин *Jurkat* перших чотирьох варіантів досліду було встановлено вірусне навантаження ВГС (табл. 7).

У результаті проведених досліджень було показано, що тільки в II варіанті дослідження при внесенні рІЛ-7 у дозі 2,5 мкг/мл достовірно більш ніж на 50 % знижується вірусне навантаження на 3-тю добу. Але на 5-ту добу, коли в культуру клітин не вносили рІЛ-7, вірусне наван-

Таблиця 7. Вплив рІЛ-7 на репродукцію ВГС в культурах *Jurkat*

№ варіанта (лунки)	Вплив ВГС на рІЛ-7 на 1, 2, 3-тю добу	Вірусне навантаження, геном/екв.	
		3 доба	5 доба
I (1–5)	ВГС	69,6	51,6
II (6–10)	ВГС + рІЛ-7 (2,5 мкг/мл)	29,2	47,2
III (11–15)	ВГС + рІЛ-7 (0,25 мкг/мл)	57,8	63,0
IV (16–20)	ВГС + рІЛ-7 (0,025 мкг/мл)	68,6	46,4

Таблиця 8. Вплив рІЛ-7 на динаміку росту неінфікованих та інфікованих ВГС клітин *Jurkat*

№ варіанта (лунки)	Характер впливу	Кількість клітин, тис./мл			
		1 доба	2 доба	3 доба	4 доба
I (1–5)	ВГС	388,0	280,5	230,5	116,6
II (6–10)	ВГС + рІЛ-7 (6,0 мкг/мл)	354,2	268,4	233,2	162,8
III (11–15)	ВГС + рІЛ-7 (1,5 мкг/мл)	255,2	464,0	418,0	158,4
IV (16–20)	ВГС + рІЛ-7 (0,3 мкг/мл)	303,6	327,8	294,8	112,4
V (21–25)	рІЛ-7 (6,0 мкг/мл)	935,0	1405,0	464,2	413,6
VI (26–30)	рІЛ-7 (1,5 мкг/мл)	994,5	470,4	1192,4	892,8
VII (31–35)	рІЛ-7 (0,3 мкг/мл)	805,8	1738,0	1018,6	2065,8
VIII (36–40)	Контроль клітин	498,8	889,0	1564,2	1600,0

Таблиця 9. Вплив рІЛ-7 на репродукцію ВГС у культурах *Jurkat*

№ варіанта (лунки)	Характер впливу	Вірусне навантаження, геном/екв.							
		1 доба	Інг*, %	2 доба	Інг, %	3 доба	Інг, %	4 доба	Інг, %
I (1–5)	ВГС	2123,2		1387,0		806,0		79,2	
II (6–10)	ВГС + рІЛ-7 (6 мкг/мл)	1746,8	18	791,8	43	89,6	89	0	100
III (11–20)	ВГС + рІЛ-7 (1,5 мкг/мл)	2376,4	0	1487,0	0	1499,0	0	36,2	55
IV (16–20)	ВГС + рІЛ-7 (0,3 мкг/мл)	2159,4	0	1072,0	23	1001,2	0	0	100

* Інг – інгібування проліферації клітин.

таження відновлюється. Тому було проведено нове дослідження з вивчення впливу рІЛ-7 на репродукцію ВГС з більш високими дозами препарату. Дослідження проведено за тією ж схемою, лише дози рІЛ-7 були 6; 1,5; 0,3 мкг/мл.

Результати визначення динаміки росту інфікованих та неінфікованих ВГС культур *Jurkat* під впливом рІЛ-7 подані в табл. 8.

Вихідна концентрація клітин *Jurkat* становила 500 тис./мл. Динаміка росту інтактних клітин була поступовою, збільшуючись у перші 3 доби. рІЛ-7 у дозі 0,3 мкг/мл з 1 до 4-ї доби значно збільшував проліферацію клітин. рІЛ-7 у дозі 1,5 мкг/мл на 1-шу добу збільшував проліферацію клітин, на 2-гу добу кількість клітин зменшувалася до значень вихідної кількості, але на 3 і 4-ту добу проліферація клітин збільшувалася. рІЛ-7 у дозі 6 мкг/мл збільшував проліферацію клітин в перші 2 доби, а на 3 і 4-ту добу кількість клітин зменшувалася до вихідної.

Вірус гепатиту С поступово значно зменшував проліферацію клітин упродовж 4-ї доби. рІЛ-7 у дозах 6; 1,5 та 0,3 мкг/мл не впливав на проліферацію клітин, інфікованих ВГС.

Визначення впливу різних доз на репродукцію ВГС проводили методом ПЛР у культуральній рідині різних варіантів дослідження (табл. 9). Згідно з отриманими результатами, рІЛ-7 у дозі 6 мкг/мл на 3-тю добу знижував вірусне навантаження ВГС на 89 %, а на 4-ту добу повністю гальмував репродукцію вірусу гепатиту С. При додаванні рІЛ-7 у дозі 0,3 мкг/мл також відбувалась повна інгібіція репродукції ВГС на 4-ту добу. Використання дози 1,5 мкг/мл у перші 3 доби навіть незначно збільшувало вірусне навантаження, але на 4-ту добу вірусне навантаження зменшувалося на 55 %.

Таким чином, на моделі сурогатного вірусу гепатиту С та продукуючої культури ВГС

було показано, що рІЛ-7 дозозалежно інгібує репродукцію вірусу гепатиту С.

Висновки

У результаті проведених досліджень було показано, що рІЛ-7 інгібує репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С – вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД) з показниками CC_{50} – 3 мкг/мл, ED_{50} – 4,7 нг/мл, IS – 640. На моделі продукуючих вірус гепатиту С суспензійних Т-клітин людини *Jurkat* визначена динаміка росту інтактних Т-клітин і продукуючих ВГС Т-клітин *Jurkat* під впливом різних доз рІЛ-7. Найвища проліферація інтактних Т-клітин визначається при дозах рІЛ-7 0,3 і 0,025 мкг/мл. У досліджуваних дозах рІЛ-7 по-різному впливав на інфіковані ВГС культури *Jurkat*: у перші 3 доби кількість клітин зменшувалася або залишалася на вихідному рівні, а через 2–3 тижні кількість клітин збільшувалася майже в 2 рази. У результаті скринінгу різних доз рІЛ-7 на репродукцію ВГС у продукуючих культурах *Jurkat* було показано, що при введенні рІЛ-7 у дозі 6 мкг/мл упродовж 3 діб на 3-тю добу процент інгібування вірусного навантаження становить 89 %, а на 4-ту добу – 100 %; при використанні дози рІЛ-7 0,3 мкг/мл процент інгібіції на 4-ту добу становить 100 %; при використанні дози рІЛ-7 1,5 мкг/мл – на 55 % на 4-ту добу.

Таким чином, у результаті проведених досліджень з визначення впливу рІЛ-7 на репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С показано, що рІЛ-7 ефективно інгібує репродукцію вірусу.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на дослідження впливу рекомбінантного ІЛ-7 людини на перебіг інших вірусних та бактеріальних інфекцій.

Список літератури

1. Fry T.J. Interleukin-7: from bench to clinic / T.J. Fry, C.L. Maskall // *Blood*. – 2002. – Vol. 99, № 11. – P. 3892–3894.
2. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count / E. Bolotin, D. Annett, R. Parkman [et al.] // *Bone Marrow Transplant*. – 1999. – Vol. 23. – P. 783–788.
3. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells / S.A. Rosenberg, C. Sportès, M. Ahmadzadeh [et al.] // *J. Immunother.* – 2006. – Vol. 29, № 3. – P. 313–319.
4. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation / B. de Saint-Vis, I. Fugier-Vivier, C. Massacrier [et al.] // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160, № 4. – P. 1666–1676.
5. Human dendritic cells express functional interleukin-7 / R.V. Sorg, A.D. McLellan, B.D. Hock [et al.] // *Immunobiology*. – 1998. – Vol. 198, № 5. – P. 514–526.
6. Interaction of interleukin-7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance / D. Clarke, O. Katoh, R.V. Gibbs [et al.] // *Cytokine*. – 1995. – Vol. 7, № 4. – P. 325–330.

7. Role of glycosaminoglycans in the regulation of T cell proliferation induced by thymic stroma-derived T cell growth factor / K. Kimura, H. Matsubara, S. Sogol [et al.] // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146, № 8. – P. 2618–2624.
8. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID) / P. Macchi, A. Villa, S. Giliani [et al.] // *Nature.* – 1995. – Vol. 377, № 6544. – P. 65–68.
9. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development / S. Russell, N. Tayebi, H. Nakajima [et al.] // *Science.* – 1995. – Vol. 270, № 5237. – P. 797–800.
10. Fry T. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? / T. Fry, C. Mackall // *Trends Immunol.* – 2001. – Vol. 22, № 10. – P. 564–571.
11. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow / R. Hardy, C. Carmack, S. Shinton [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1991. – Vol. 173, № 5. – P. 1213–1225.
12. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation / P.J. Morrissey, P. Conlon, S. Braddy [et al.] // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146, № 5. – P. 1547–1552.
13. Lynch D. *In vivo* evaluation of the effects of interleukins 2, 4 and 7 on enhancing the immunotherapeutic efficacy of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes / D. Lynch, A. Namen, R. Miller // *Eur. J. Immunol.* – 1991. – Vol. 21, № 12. – P. 2977–2985.
14. Interleukin-7, but not thymic stromal lymphopoietin, plays a key role in the T cell response to influenza A virus / A.W. Plumb, D.T. Patton, H.J. Seo [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. e50199.
15. Persistent hepatitis C virus (HCV) infection impairs HCV-specific cytotoxic T cell reactivity through Mcl-1/Bim imbalance due to CD127 down-regulation / J. Larrubia, M. Lokhande, S. Garcia-Garzon [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, № 2. – P. 612–617.
16. Early IL-7 production by intrahepatic T cell is important for adaptive immune responses in viral hepatitis / L. Hou, Z. Jie, M. Desai [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190, № 2. – P. 621–629.
17. Блюмкин В.Н. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток / В.Н. Блюмкин, В.М. Жданов. – М. Медицина, 1973. – 128 с.

References

- [1] Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):3892-3894. DOI 10.1182/blood.V99.11.3892
- [2] Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant.* 1999 Apr;23(8):783-8.
- [3] Rosenberg SA, Sportès C, Ahmadzadeh M, Fry TJ, Ngo LT, Schwarz SL, et al. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother.* 2006 May-Jun;29(3):313-9. DOI 10.1097/01.cji.0000210386.55951.c2
- [4] De Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, et al. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol.* 1998 Feb 15;160(4):1666-76.
- [5] Sorg RV, McLellan AD, Hock BD, Fearnley DB, Hart DN. Human dendritic cells express functional interleukin-7. *Immunobiology.* 1998 Mar;198(5):514-26. DOI 10.1016/S0171-2985(98)80075-2
- [6] Clarke D, Katoh O, Gibbs RV, Griffiths SD, Gordon MY. Interaction of interleukin-7 (IL-7) with glycosaminoglycans and its biological relevance. *Cytokine.* 1995 May;7(4):325-30. DOI 10.1006/cyto.1995.0041
- [7] Kimura K, Matsubara H, Sogoh S, Kita Y, Sakata T, Nishitani Y, et al. Role of glycosaminoglycans in the regulation of T cell proliferation induced by thymic stroma-derived T cell growth factor. *J Immunol.* 1991 Apr 15;146(8):2618-24.
- [8] Macchi P, Villa A, Giliani S, Sacco MG, Frattini A, Porta F, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature.* 1995 Sep 7;377(6544):65-8. DOI 10.1038/377065a0
- [9] Russell S, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, Aman MJ, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science.* 1995 Nov 3;270(5237):797-800.
- [10] Fry T, Mackall C. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.* 2001 Oct;22(10):564-71.
- [11] Hardy R, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med.* 1991 May 1;173(5):1213-25.
- [12] Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol.* 1991 Mar 1;146(5):1547-52.
- [13] Lynch D, Namen A, Miller R. *In vivo* evaluation of the effects of interleukins 2, 4 and 7 on enhancing the immunotherapeutic efficacy of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1991 Dec;21(12):2977-85. DOI 10.1002/eji.1830211212

- [14] Plumb AW, Patton DT, Seo JH, Loveday EK, Jean F, Ziegler SF, et al. Interleukin-7, but not thymic stromal lymphopoietin, plays a key role in the T cell response to influenza A virus. *PLoS One*. 2012;7(11):e50199. DOI 10.1371/journal.pone.0050199
- [15] Larrubia J, Lokhande MU, García-Garzyn S, Miquel J, González-Praetorius A, Parra-Cid T, et al. Persistent hepatitis C virus (HCV) infection impairs HCV-specific cytotoxic T cell reactivity through Mcl-1/Bim imbalance due to CD127 down-regulation. *J Viral Hepat*. 2013 Feb;20(2):85-94. DOI 10.1111/j.1365-2893.2012.01618.x
- [16] Hou L, Jie Z, Desai M, Liang Y, Soong L, Wang T, et al. Early IL-7 production by intrahepatic T cell is important for adaptive immune responses in viral hepatitis. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):621-9. DOI 10.4049/jimmunol.1201970
- [17] Blumkin VN, Zhdanov VM. The impact of viruses on the chromosome apparatus and cell division. Moscow: Medicina; 1973. 128 p.

Yu.I. Porva, S.L. Rybalko, S.T. Dyadyun, T.N. Lutsenko, A.Yu. Galkin, Ya.A. Poholenko, O.B. Gorbatyuk

STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF RECOMBINANT HUMAN INTERLEUKIN-7 WITH VARIOUS EXPERIMENTAL MODELS OF HEPATITIS C VIRAL INFECTION

Background. Interleukin-7 (IL-7) is one of the most important regulatory cytokine of immune system. Given the ability of IL-7 to the modulation of T- and B-cell responses and T-cell homeostasis we may assume that IL-7 not only has the ability to influence the formation of specific immunity and immunodeficiency state, but also inhibit the reproduction of viruses, including hepatitis C virus (HCV).

Objective. Study of antiviral activity of recombinant human IL-7 (rIL-7) with experimental models of viral hepatitis C infection *in vitro* on sensitive virus epithelial and lymphoid cells.

Methods. We have used the following inoculated cell cultures: *Jurkat*, rat neurinoma of gasserian ganglion and bovine kidney. As used surrogate HCV we used virus of bovine diarrhea. To study the antiviral activity different concentrations of rIL-7 were injected into the cell culture, producing HCV, and determined virus load. Also we have performed cytological analysis of cells and determined its proliferative activity under influence of rIL-7.

Results. It has been shown that rIL-7 inhibits surrogate HCV reproduction in *in vitro* conditions ($SS_{50} - 3$ mg/ml, $ED_{50} - 4.7$ ng/ml, $IS - 640$). Highest proliferation of intact T-cells is determined at rIL-7 doses 0.3 mg/m and 0.025 mg/ml. rIL-7 affected HCV infected cells differently: during the first 3 days the number of cells decreased or did not change, and after 2–3 weeks the number of cells increased almost 2 times. When we injected rIL-7 with dose of 6 mg/ml within 3 days we obtained 89% viral inhibition at the 3rd day and 100 % at the 4th day; using the dose of rIL-7 0.3 mg/ml the inhibition on the 4th day was 100 %; using dose of rIL-7 1.5 mg/ml the inhibition settled at 55 % for 4 days.

Conclusions. As a result of the studies directed towards determining the effect of rIL-7 on surrogate HCV reproduction, HCV cDNA producing transfected human T-cells *Jurkat*, it was showed that rIL-7 effectively inhibits virus reproduction.

Keywords: human interleukin-7 recombinant; hepatitis C virus; antiviral activity; viral load.

Ю.И. Порва, С.Л. Рыбалко, С.Т. Дядюн, Т.Н. Луценко, А.Ю. Галкин, Я.А. Похолоенко, О.Б. Горбатюк

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-7 ЧЕЛОВЕКА НА РАЗНЫХ МОДЕЛЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ГЕПАТИТА С

Проблематика. Интерлейкин-7 (ИЛ-7) является одним из важнейших регуляторных цитокинов иммунной системы. С учетом способности ИЛ-7 к модуляции Т- и В-клеточного ответа и Т-клеточного гомеостаза возможно предположить, что препараты ИЛ-7 имеют свойство не только влиять на формирование специфического иммунитета и иммунодефицита, но и ингибировать репродукцию вирусов, в частности вируса гепатита С (ВГС).

Цель исследования. Изучение антивирусного действия рекомбинантного ИЛ-7 человека (рИЛ-7) на моделях экспериментальной вирусной инфекции гепатита С *in vitro* на чувствительных к вирусу эпителиальных и лимфоидных клетках.

Методика реализации. В работе использовали перевиваемые культуры клеток: *Jurkat*, невриномы узла Гассера крысы и почки быка. В качестве суррогатного ВГС использовали вирус бычьей вирусной диареи. Для изучения антивирусной активности рИЛ-7 в различных концентрациях вводили в культуру клеток, продуцирующих ВГС, и определяли вирусную нагрузку. Проводили также цитологический анализ влияния рИЛ-7 на клетки и определяли их пролиферативную активность.

Результаты исследования. Было показано, что рИЛ-7 ингибирует репродукцию суррогатного ВГС в условиях *in vitro* ($CC_{50} - 3$ мкг/мл, $ED_{50} - 4,7$ нг/мл, $IS - 640$). Самая высокая пролиферация интактных Т-клеток определялась при дозах рИЛ-7 0,3 мкг/мл и 0,025 мкг/мл. рИЛ-7 по-разному влиял на инфицированные ВГС культуры: в первые 3 суток количество клеток уменьшалось или не менялось, а через 2–3 недели количество клеток увеличивалось почти в 2 раза. При введении рИЛ-7 в дозе 6 мкг/мл в течение 3 суток на 3-е сутки ингибирование вирусной нагрузки составляло 89 %, а на 4-е сутки – 100 %; при использовании дозы рИЛ-7 0,3 мкг/мл ингибирование на 4-е сутки составило 100 %; при использовании дозы рИЛ-7 1,5 мкг/мл – на 55 % на 4-е сутки.

Выводы. В результате проведенных исследований по определению влияния рИЛ-7 на репродукцию суррогатного ВГС показано, что рИЛ-7 эффективно ингибирует репродукцию вируса.

Ключевые слова: интерлейкин-7 человека рекомбинантный; вирус гепатита С; противовирусная активность; вирусная нагрузка.

Reprinted from: *Naukovi Visti NTUU KPI*. 2015;3:52-60

Received 6 November 2017

Accepted 4 December 2017