

А. Н. Васильев¹, Р. Р. Климова², Ю. А. Тюленев²

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ИНТЕРФЕРОНА- α_{2b} С АНТИОКСИДАНТАМИ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ХИМИОПРЕПАРАТОВ ПРИ ГЕРПЕС-ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

¹ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Центр экспертизы и контроля готовых лекарственных средств Минздравсоцразвития России, 123182, Москва, ул. Щукинская, 6, корп. 1;

²ФГБУ Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

Вирус простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловирус (ЦМВ) чрезвычайно широко распространены в человеческой популяции и могут поражать различные органы и ткани. Особую опасность ВПГ- и ЦМВ-инфекции представляют для беременных женщин и новорожденных детей. Основными недостатками противовирусных химиопрепаратов являются их высокая токсичность, ограниченная биодоступность и при длительном использовании развитие лекарственной устойчивости. В настоящее время проводится поиск новых средств и новых схем терапии, позволяющих избежать проявления побочных токсических эффектов при сохранении высокой противовирусной эффективности.

*Целью настоящего исследования была оценка эффективности схемы мультимодальной терапии герпес-вирусной инфекции новой лекарственной формой (НЛФ) ВИФЕРОН®, раствор для местного применения в сочетании со специфическими противовирусными химиопрепаратами *in vitro* и *in vivo*. Впервые установлено, что использование НЛФ в концентрации 20 000 МЕ/мл ингибирует ЦМВ-инфекцию в терапевтической схеме *in vitro* на 83%. Показано, что НЛФ усиливает специфическую противовирусную активность химиопрепаратов, позволяя значительно снизить эффективную ингибирующую концентрацию последних: для ганцикловира в 3 раза, для ацикловира в 20 раз. В экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что НЛФ не оказывает токсического действия на организм животных. Однократно введение НЛФ через 24 ч после внутрибрюшинного заражения мышей ВПГ1 защищает 60% животных от летальной (20 ЛД₅₀) герпес-вирусной инфекции. Комбинированное использование НЛФ и ацикловира в лечебной схеме *in vivo* позволило: а) уменьшить дозы обоих препаратов в 10 раз (до 2000 МЕ/мл и 5 мг/кг соответственно) по сравнению с применением каждого препарата в отдельности; б) достичь лечебного эффекта при использовании короткой схемы терапии – 3 сут; в) обеспечить полную защиту (100%) животных от летального заражения (20 ЛД₅₀/мл) ВПГ1. Высокий протективный эффект мультимодальной терапии летальной герпес-вирусной инфекции *in vivo* обусловлен синергидным характером взаимодействия использованных препаратов.*

Ключевые слова: вирус простого герпеса, цитомегаловирус человека, новая лекарственная форма ВИФЕРОН®, раствор для местного применения, протективная активность, комбинированная терапия

A. N. Vasiliev¹, R. R. Klimova², Yu. A. Tyulenev²

THE STUDY OF TOXICITY AND THE PROTECTIVE PROPERTIES OF IFN-A2B WITH ANTIOXIDANTS AND SPECIFIC ANTIVIRAL CHEMO DRUGS FOR HERPES VIRAL INFECTIONS "IN VITRO" AND "IN VIVO"

¹Center for examination and control of proprietary medicines, Federal State Institution National Research Center for Medicinal Products Quality Control of Ministry of Public Health and Social Development, 8, Petrovsky boulevard, Moscow 103051; ²Federal State Budget-Financed Institution "D. I. Ivanovskiy Institute of Virology" 16, Gamaleya str., Moscow 123098.

Herpes simplex virus-1 (HSV1) and cytomegalovirus (CMV) are extremely widespread in the human population and can affect various organs and tissues. HSV1 and CMV infections are particularly dangerous for pregnant women and newborns. The main disadvantages of antiviral chemotherapeutic agents are their high toxicity, limited bioavailability and the development of drug resistance during the long-term treatment. Currently the search for new drugs and new regimens which permit to avoid the adverse manifestations of toxic effects while maintenance of high antiviral efficacy is performed. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the of scheme of multimodal therapy of herpes virus infection with a new drug form (NDF) VIFERON®, a solution for local application in combination with specific antiviral chemo drugs "in vitro" and "in vivo". For the first time the use of NDF in a concentration of 20000 IU/ml was found to inhibit CMV infection by 83% in a therapeutic scheme "in vitro". NDF has been shown to increase the specific antiviral activity of chemotherapy, allowing to significantly reduce the effective inhibitory concentration for Acyclovir - by 3 times, for Acyclovir - by 20 times. In "in vivo" experiments NDF has not demonstrated any toxic effect on the animal organism. 24 h after intraperitoneal infection of mice HSV1 the single administration of NDF protects 60% of the animals from lethal (20 LD50) herpes virus infection. Combined use of TDA and ACV therapeutic scheme "in vivo" allowed: a) reduce the dose of both drugs by 10 times (up to 2000 IU/ml and 5 mg/kg, respectively) compared with either single agent; and b) to achieve the therapeutic effect with the use of the short regimen - 3 days; c) to provide full protection (100%) animals from lethal HSV1-infection (20 LD50). The high protective effect of multimodal therapy of lethal herpes virus infection "in vivo" was provided due to the synergistic character of the interaction of drugs used.

Key words: human Herpes simplex, virus-1/cytomegalovirus, a new drug form VIFERON®, a solution for local use, "protective activity", combination therapy

Для корреспонденции: Васильев Андрей Никифорович, канд. биол. наук, дир. Центра экспертизы и контроля готовых лекарственных средств России ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России.

Широкое распространение вируса простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловируса (ЦМВ) в человеческой популяции представляет особую опасность для беременных женщин и для новорожденных детей. Существует несколько лекарственных препаратов,

применяемых при лечении герпес-вирусных инфекций, однако большинство из них не разрешены для лечения указанной выше группы [15]. Недостатками химиопрепаратов являются их высокая токсичность и при длительном использовании развитие лекарственной устойчивости [14]. В связи с этим в настоящее время проводится поиск новых средств и новых схем терапии, позволяющих избежать проявления побочных токсических эффектов при сохранении высокой противовирусной эффективности. Одно из направлений, развиваемых в этой области исследований, состоит в разработке принципов терапии, заключающихся в одновременном воздействии на различные функции организма больного. В связи с этим для лечения герпес-вирусных инфекций представляло интерес изучить эффективность комбинированного применения препаратов, содержащих интерферон (ИФН)- α_{2b} в комплексе с антиоксидантами и специфических химиопрепаратов. ИФН- α_{2b} обладает широким спектром противовирусной активности, а также иммуномодулирующими и антипролиферативными свойствами. В настоящий момент на территории России зарегистрирован препарат ВИФЕРОН®, содержащий ИФН- α_{2b} в комплексе с антиоксидантами, в различных лекарственных формах (суппозитории ректальные, мазь для наружного и местного применения, гель для наружного и местного применения). Препараты под торговым наименованием ВИФЕРОН® разрешены для лечения широкого спектра заболеваний у взрослых и детей, в том числе у беременных женщин и новорожденных. Недавно была разработана новая лекарственная форма (НЛФ) – ВИФЕРОН® – раствор для местного применения, включающая ИФН- α_{2b} человеческий рекомбинантный, комплекс антиоксидантов и вспомогательные вещества. Ранее была показана активность НЛФ против ВПГ-инфекции в клеточной системе *in vitro* при профилактическом использовании [1, 18].

Целью настоящего исследования была оценка эффективности схемы мультимодальной терапии герпес-вирусной инфекции НЛФ ВИФЕРОН®, раствор для местного применения в сочетании со специфическими противовирусными химиопрепаратами, *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Мыши. Опыты проводили на мышях линии ДВА, самках массой тела 18–22 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных “Крюково” РАМН.

Культуры клеток. В работе использовали первичную культуру диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ) и перевиваемую линию клеток Vero, полученные из лаборатории клеточных культур ФГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России. Клетки ФЛЭЧ культивировали на среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), клетки Vero – в среде Игла MEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, “ПанЭко”, Россия), 2 мМ L-глутамин (“ПанЭко”, Россия), 50 мкг/мл гентамицина (“ПанЭко”, Россия).

Вирусы. Использовали референс-штамм ЦМВ че-

ловека AD 169 и референс-штамм F ВПГ1, любезно предоставленные проф. D. Emanuel (США) и проф. L. Pereira (США) соответственно. ЦМВ размножали и титровали на культуре клеток ФЛЭЧ, ВПГ – на культуре клеток Vero по общепринятой методике.

Определение инфекционной активности ВПГ и ЦМВ. Инфекционный титр ВПГ и ЦМВ определяли в культуре клеток модифицированным методом бляшек (очагов инфицированных клеток). Для титрования готовили образцы вируса и вносили в 96-луночные планшеты с монослоем клеток Vero (ВПГ) или ФЛЭЧ (ЦМВ). Панели с материалом инкубировали при 37°C в течение 7 дней. Бляшки выявляли иммуноцитохимическим методом с использованием моноклональных антител (МКА) к белкам ВПГ или ЦМВ [3, 4]. Титр вируса определяли по формуле: $A = axb/v$, где A – число бляшкообразующих единиц на клетку в 1 мл (БОЕ/мл); a – среднее число бляшек на одну лунку; b – разведение вируса; v – объем вносимого вирусосодержащего материала. Титр вируса составлял в среднем $1 \cdot 10^7$ БОЕ/мл для ВПГ и $1 \cdot 10^5$ БОЕ/мл для ЦМВ.

Препараты. В работе использовали следующие препараты: ганцикловир (ГЦВ, Цимевен®, “Роше”, Швейцария), исходная концентрация 500 мг/мл; Ацикловир (АЦВ, Зовиракс®, “ГлаксоСмитКляйн Вэлком”, Великобритания), исходная концентрация 250 мг/мл; интерферон- α_{2b} (НЛФ, ВИФЕРОН®, раствор для местного применения, 40 000 МЕ/мл, ООО “ФЕРОН”, Россия). Препараты ВИФЕРОН®, раствор для местного применения в качестве действующего вещества, содержит ИФН- α_{2b} человеческий рекомбинантный 40 000 МЕ/мл, а также компоненты, обладающие антиоксидантными свойствами: димеркаптопропансульфонат натрия (унитиол) и моногидрат лимонной кислоты (активные компоненты), а также другие вспомогательные вещества.

Определение цитотоксичности исследуемых препаратов. Оценку цитотоксичности исследуемых препаратов проводили следующим образом: к сформированному на стандартных 96-луночных планшетах клеточному монослою добавляли последовательные разведения приготовленных растворов исследуемых препаратов с конечной концентрацией 2,0, 1,5, 1,0, 0,5, 0,1 мг/мл для ГЦВ и АЦВ и 5000, 10 000, 20 000 и 40 000 МЕ/мл для НЛФ. За 50% тканевую цитотоксическую дозу ($ЦД_{50}$) принимали такую концентрацию препарата, которая вызывала гибель 50% клеток на 3-и сутки после внесения образцов.

Оценка противовирусного действия препаратов *in vitro*. Противовирусную активность препаратов анализировали в лечебной схеме. Химиопрепараты (ГЦВ и АЦВ) изучали в 5 концентрациях: 100, 10, 1,0, 0,2 и 0,1 мкг/мл. НЛФ исследовали в двух концентрациях: 20 000 и 10 000 МЕ/мл. Для определения противовирусной активности препаратов клетки ФЛЭЧ заражали ЦМВ с инфекционной множественностью 0,01 БОЕ/мл, клетки Vero – ВПГ1 с ИМ 0,001 БОЕ/мл. Для оценки комбинированного противовирусного эффекта препараты вносили в различных концентрациях и сочетаниях. В качестве контроля использовали зараженные клетки, не обработанные препаратами.

Противовирусную активность веществ определяли по степени ингибирования цитопатического действия (ЦПД) вирусов, которую выражали в процентах. Концентрацию соединения, подавляющую ЦПД на 50% по отношению к контролю, принимали за ингибирующую дозу (ИД₅₀). Индекс селективности (ИС) рассчитывали как отношение ИД₅₀ к ИД₅₀.

Анализ токсичности НЛФ *in vivo* изучали на беспородных мышях при интраназальном введении в концентрации 4000 МЕ/мышь, привнутрижелудочном введении в концентрации 10 000 МЕ/мышь и внутрибрюшинном введении в концентрации 20 000 МЕ/мышь. В каждой группе использовали по 12 животных. Анализировали следующие показатели: массу тела, гибель и общее состояние животных, гематологические и биохимические показатели крови, анализ мочи и данные патоморфологического исследования органов и тканей. Животных наблюдали в течение 28 сут.

Изучение протективных свойств препаратов in vivo. Защитное действие препаратов против ВПГ исследовали в лечебной схеме, используя 13 групп животных по 10 мышей линии ДВА в каждой группе. Мышей заражали внутрибрюшинно ВПГ1, вводя по 20 50% летальных доз в 1 мл (20 ЛД₅₀/мл). Лечение начинали через 24 ч. Количества препаратов и продолжительность их введения представлены в разделе «Результаты и обсуждение». Лечебные свойства оценивали по способности исследуемого вещества защищать животных от летального заражения ВПГ1. Наблюдение проводили в течение 21 дня.

Определение противовирусной активности комбинации АЦВ и НЛФ in vivo. Концентрации одного вещества и другого в комбинации и по отдельности, которые приводили к 50% защите животных, обозначали как 50% эффективная доза (ЭД₅₀). Для оценки эффективности комбинации использовали понятие индекса суммарной фракционной ингибирующей концентрации (ФИК), значение которого вычисляли по формуле: индекс ФИК = ФИК_А +

ФИК_Б, где ФИК_А равна отношению ЭД₅₀ АЦВ в комбинации к ЭД₅₀ АЦВ, ФИК_Б равна отношению ЭД₅₀ НЛФ в комбинации к ЭД₅₀ НЛФ.

Статистическую обработку результатов осуществляли, применяя двусторонний точный критерий Фишера и критерий χ^2 . Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов была изучена цитотоксичность используемых препаратов *in vitro*. Данные по оценке ЦД₅₀ для каждого из исследованных соединений представлены на рис. 1. Показано, что в условиях наших опытов ЦД₅₀ для ГЦВ, рассчитанная по графику, составила 0,89 мг/мл, для АЦВ – 1,1 мг/мл (см. рис. 1, а), для НЛФ – 30 000 МЕ/мл (см. рис. 1, б). Методика определения противовирусной активности препаратов изложена в разделе «Материалы и методы». Анализ противовирусного действия показал, что оба химиопрепарата в максимальной изученной концентрации (100 мкг/мл) полностью подавляли ЦПД вирусов (рис. 2, а, б). ИД₅₀, рассчитанная по графику, для ГЦВ составила 0,12 мкг/мл (см. рис. 2, а), для АЦВ – 0,7 мкг/мл (см. рис. 2, б). ИС для ГЦВ составил 7417, для АЦВ – 1571. Однократное введение НЛФ в концентрациях 10 000 и 20 000 МЕ/мл вызывало подавление ЦМВ-инфекции на 83 и 88% соответственно, подавление ВПГ-инфекции – на 45 и 65% соответственно. ИД₅₀ для НЛФ против ВПГ составила 12 500 МЕ/мл.

В следующей серии опытов изучали эффективность комбинаций препаратов. Химиопрепараты использовали в низких концентрациях (1,0, 0,2, 0,1 и 0,01 мкг/мл), НЛФ – в концентрациях 20 000 и 10 000 МЕ/мл. Было установлено, что добавление НЛФ в концентрации 20 000 МЕ/мл к ГЦВ в концентрации 0,1 мкг/мл увеличивало противовирусное действие последнего с 42 до 77% (см. рис. 2, а). Добавление НЛФ в той же концентрации к ГЦВ в концентрации 0,01 мкг/мл увеличивало ингибирующий эффект с 15 до 35%. Эффект сочетанного действия ГЦВ и НЛФ против ЦМВ-инфекции в обоих вариантах опыта был статистически значимо выше по сравнению с действием одного ГЦВ ($p < 0,05$). ИД₅₀, рассчитанная по графику (см. рис. 2, а), для двух препаратов (ГЦВ + НЛФ) составила 0,038 мкг/мл. Добавление НЛФ к АЦВ в концентрации 1 мкг/мл не привело к значимому увеличению противовирусной активности смеси по сравнению с использованием одного АЦВ (см. рис. 2, б). При использовании более низких концентраций АЦВ (0,2, 0,1

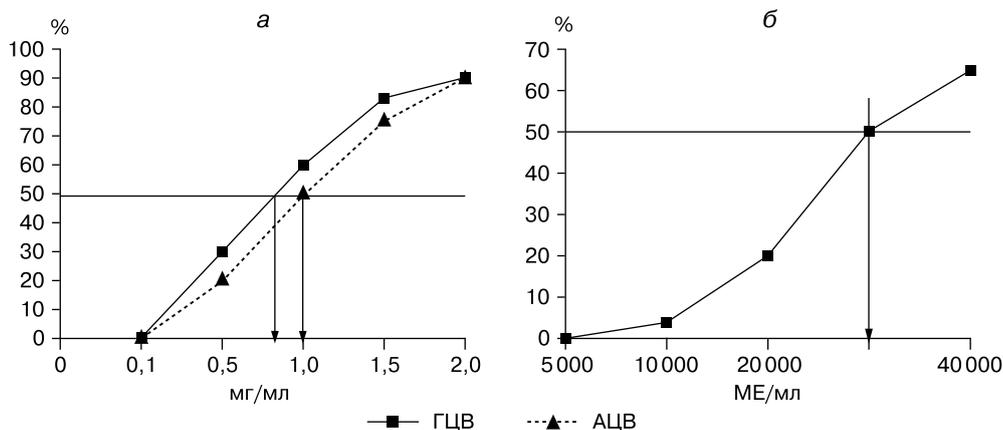


Рис. 1. Анализ цитотоксического действия препаратов.

а – определение 50% цитотоксической дозы ГЦВ (квадраты) и АЦВ (треугольники).

По оси абсцисс – концентрация АЦВ и ГЦВ; по оси ординат – ингибирование ЦПД вирусов по отношению к зараженным клеткам; б – определение 50% цитотоксической дозы НЛФ ВИФЕРОН®, раствор для местного применения.

По оси абсцисс – концентрация; по оси ординат – ингибирование ЦПД вирусов по отношению к зараженным клеткам.

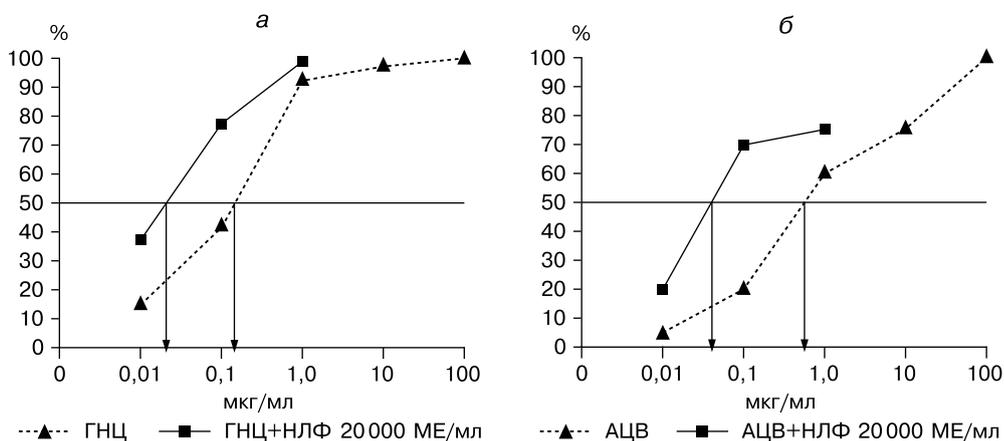


Рис. 2. Сравнительный анализ противовирусной активности химиопрепаратов в отдельности и в комбинации с НЛФ ВИФЕРОН®, раствор для местного применения.

a – противовирусная активность ГЦВ (треугольники) и комбинации ГЦВ с НЛФ (квадраты) при заражении клеток ФЛЭЧ ЦМВ с ИМ 0,01 БОЕ/мл; *б* – противовирусная активность АЦВ (треугольники) и комбинации АЦВ с НЛФ (квадраты) при заражении клеток Vero ВПГ 1-го типа с ИМ 0,001 БОЕ/мл. По оси абсцисс – концентрация препаратов; по оси ординат – ингибирование ЦПД вируса в культуре клеток.

и 0,01 мкг/мл) в смеси с НЛФ ингибирование ВПГ-инфекции отмечено на 71, 70 и 20% соответственно, тогда как при использовании одного АЦВ ингибирующий эффект составлял 35, 20 и 5% соответственно ($p < 0,05$). ИД₅₀ для смеси АЦВ + НЛФ составила 0,035 мкг/мл (см. рис. 2, б). Таким образом, сочетанное использование НЛФ снижает ИД₅₀ ГНЦ в 3 раза (с 0,12 до 0,038 мкг/мл) и ИД₅₀ АЦВ – в 20 раз (с 0,7 до 0,035 мкг/мл).

Следующая часть работы была посвящена изучению противовирусного действия данных соединений *in vivo* – на модели экспериментальной инфекции лабораторных животных. Сочетанное действие препаратов тестировали в отношении летальной инфекции, вызванной ВПГ 1 у мышей.

На первом этапе исследовали токсичность НЛФ. Показано, что НЛФ при однократном (острая токсичность) интраназальном, внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении в концентрациях 4000, 10 000 и 20 000 МЕ/мышь соответственно не обладала токсическим действием на организм животных. При изучении токсичности при повторном введении в течение 15 дней (подострая токсичность) не было установлено видимых признаков изменения общего клинического состояния. На протяжении курса введения и в период отмены динамика изменения массы тела животных была положительной. При проведении клинических лабораторных исследований не было установлено влияния НЛФ на состав периферической крови и показатели мочи животных. В результате проведенного патоморфологического исследования не установлено морфологических изменений в органах и тканях мышей. В дальнейших экспериментах использовали концентрации НЛФ, не превышающие уровней, испытанных при анализе токсичности.

Противовирусные свойства препаратов анализировали в лечебной схеме. Схема, сроки и результаты терапии представлены в таблице. Наиболее вы-

раженный протективный ответ представлен на рис. 3. Из таблицы видно, что в контрольной 12-й группе в течение 10 дней после заражения погибли все 100% (10/10) животных. Все животные 13-й группы оставались живыми в течение 21 дня опыта и в следующие 30 дней (время наблюдения). Однократное введение НЛФ в концентрации 20 000 МЕ/мышь (3-я группа) привело к защите 60% (6/10) животных, однако различия оказались статистически незначимыми; $p = 0,087$ (см. таблицу, рис. 3).

В 1, 2, 4, 5 и 6-й группах терапевтический эффект выявлен не был. Применение в 7-й группе более длительной схемы терапии (50 мг/кг АЦВ каждые 12 ч в течение 3 сут) привело к 100% (10/10) защите животных (см. таблицу). Использование АЦВ в концентрации 5 мг/кг в 3-дневной схеме защищало 40% (4/10) животных 7-й группы (см. таблицу, рис. 3). У животных 9-й и 10-й групп наблюдали 30% протективный эффект. Совместное применение НЛФ в концентрации 2000 МЕ/мышь и АЦВ в концентрации 5 мг/кг (11-я группа) позволило статистически значимо увеличить защитный эффект – с 40 до 100%; $p = 0,11$ (см. таблицу, рис. 3). Рассчитанная по графику ЭД₅₀ для АЦВ составила 12,5 мг/кг, а в сочетании с НЛФ – 3 мг/кг, ФИК_A равна 0,24. Для НЛФ значение ЭД₅₀ составило 18 333

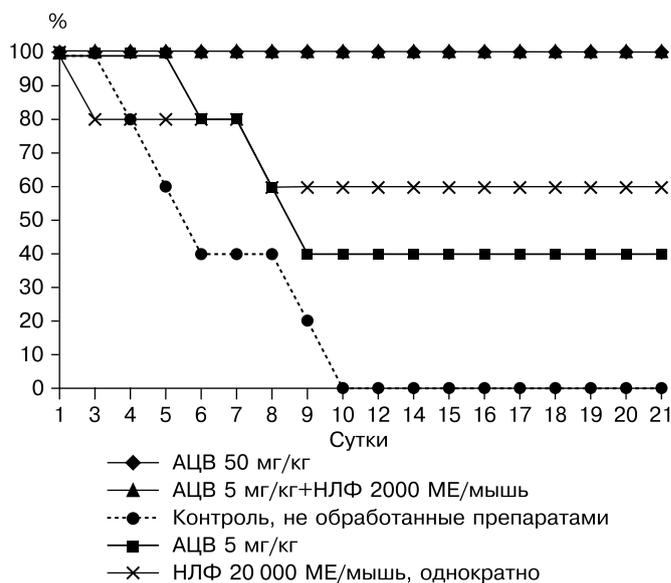


Рис. 3. Протективные свойства АЦВ и комбинации АЦВ с НЛФ ВИФЕРОН®, раствор для местного применения при заражении мышей ВПГ 1-го типа в дозе 20 ЛД₅₀/мл.

По оси абсцисс – время наблюдения; по оси ординат – доля выживших животных.

Режим лечения летальной герпес-вирусной инфекции мышей противовирусным препаратом «Ацикловир» в сочетании с НЛФ ВИФЕРОН®, раствор для местного применения.

Группа животных	Препараты	Количество выживших животных, %	Схема введения
1	АЦВ 50 мг/кг	0/10	0,5 мл через 24 ч после заражения, однократно, внутривентриально
2	АЦВ 5 мг/кг	0/10	
3	НЛФ 20 000 МЕ/мышь	6/10 (60%)	
4	НЛФ 10 000 МЕ/мышь	0/10	
5	АЦВ 50 мг/кг + НЛФ 2000 МЕ/мышь	0/10	
6	АЦВ 5 мг/кг + НЛФ 2000 МЕ/мышь	0/10	
7	АЦВ 50 мг/кг	10/10 (100%)	0,5 мл через 24 ч после заражения, 2 раза в сутки, в течение 3 суток, внутривентриально
8	АЦВ 5 мг/кг	4/10 (40%)	
9	АЦВ 5 мг/кг + НЛФ 1000 МЕ/мышь	3/10 (30%)	
10	АЦВ 2,5 мг/кг + НЛФ 2000 МЕ/мышь	3/10 (30%)	
11	АЦВ 5 мг/кг + НЛФ 2000 МЕ/мышь	10/10 (100%)	
12	Инфицированные мыши, не обработанные препаратами (контроль)	0/10	20 ЛД ₅₀ ВПГ1, внутривентриально
13	неинфицированные мыши, обработанные физиологическим раствором (плацебо)	10/10 (100%)	0,5 мл физиологического раствора, внутривентриально

МЕ/мышь, а в сочетании с АЦВ – 1090 МЕ/мышь, ФИК₅₀ равна 0,06. На основе полученных результатов было определено значение индекса ФИК для двух изученных препаратов, которое составило 0,3, что свидетельствует о синергидном действии препаратов. Таким образом, снижение концентраций АЦВ и НЛФ в 10 раз при совместном введении в течение 3 дней обеспечивало 100% защиту экспериментальных лабораторных животных от летального заражения ВПГ1 в дозе 20 ЛД₅₀/мл.

В настоящее время АЦВ, специфически ингибирующей активностью вирусной ДНК-полимеразы, является препаратом выбора для лечения ВПГ-инфекции у новорожденных детей. Длительность лечения составляет 14 сут при инфицировании кожи, глаз и/или ротовой области и 21 сут для лечения генерализованной инфекции и заболеваний ЦНС [9]. Несмотря на то что при использовании данной терапии смертность от энцефалитов снижается до 15%, только 50% выживших детей развиваются нормально [7]. В связи с токсичностью ГЦВ важной проблемой является выбор адекватного курса терапии новорожденных, в том числе недоношенных, с ЦМВ-инфекцией [13]. Хорошие результаты дает препарат «Цитотект»® («Biotest Pharma», Германия), содержащий антитела к ЦМВ, однако этот импортный препарат является дорогостоящим и малодоступным. В настоящее время накоплен опыт лечения ЦМВ-инфекции препаратами иммуноглобулинового ряда (пентаглобин), лекарственными средствами на основе цитокинов (виферон, ронколейкин),

индукторов интерферона (неовир, циклоферон). Однако, несмотря на лечение этими препаратами, смертность при генерализованной неонатальной герпес-вирусной инфекции остается высокой, составляя от 40 до 65% [8].

В ряде исследований предприняты попытки усилить терапевтическое действие патентованных химиопрепаратов, противовирусное действие которых хорошо изучено. К этому побудили не только данные о токсическом действии этих препаратов, но также сведения о том, что задержка с началом лечения тяжелых форм ВПГ-инфекции даже на 24 ч делает использование АЦВ малоэффективным. Недавно была изучена противовирусная активность новых соединений: ингибитора тимидинкиназы и геликазы-праймазного комплекса ВПГ [6, 7]. Комбинированное действие ингибиторов с АЦВ защищало мышей от герпетического энцефалита. И хотя в опытах использовали относительно высокие дозы препаратов, авторы полагают, что дальнейшие исследования в этом направлении перспективны. Ранее в работе Т. Спектор и соавт. [17] было установлено, что инактиватор еще одного фермента ВПГ – рибонуклеотидредуктазы – усиливает действие АЦВ против ВПГ. Поиск новых молекулярных мишеней проводится и в отношении ЦМВ-инфекции, однако ингибиторы вирусной протеинкиназы UL97 и терминазы ЦМВ не дали обнадеживающих результатов при клинических испытаниях [11, 12]. В настоящей работе был использован другой подход, направленный не на расширение спектра ингибиторов вирусных ферментов, а на разработку комплексной терапии, включающей препараты, воздействующие как на вирус, так и на инфицированный организм. Основным действующим компонентом НЛФ является ИФН- α_{2b} – полифункциональный цитокин, который индуцирует экспрессию генов системы ИФН и оказывает иммуномодулирующее и противовирусное действие. Кроме того, препарат содержит два антиоксиданта (унитиол и лимонную кислоту), препятствующих повреждающему действию свободнорадикального окисления. Ранее было установлено, что комбинация из этих двух антиоксидантов с ИФН- α_{2b} позволяет усилить противовирусную активность ИФН- α_{2b} в опытах *in vitro* в несколько раз [2].

В настоящей работе впервые показана высокая активность НЛФ против ЦМВ-инфекции. Следует отметить, что эффективность НЛФ в подавлении ЦМВ-инфекции превосходила таковую против ВПГ-инфекции почти в 2 раза (83% против 45%). Большой терапевтический эффект НЛФ, полученный при ЦМВ-инфекции по сравнению с ВПГ-инфекцией, возможно, связан с различиями в жизненном цикле обоих вирусов. Известно, что ЦМВ-инфекция развивает-

ся медленнее, чем ВПГ-инфекция. В культуре клеток первые инфекционно активные вирионы ЦМВ высвобождаются из клеток через 96 ч после инфицирования, тогда как вирионы ВПГ – через 8 ч [16]. НЛФ, внесенный через 24 ч после заражения клеток ЦМВ, по-видимому, воздействует на более ранние стадии вирусной инфекции, предшествующие репликации вирусной ДНК, запуская ряд механизмов, эффективно ингибирующих вирусное ЦПД. АЦВ и ГЦВ в составе комплексной терапии с иммунопрепаратом подавляют репликацию вирусной ДНК, дополняя и усиливая действие каждого из компонентов в отдельности. В пользу этого предположения свидетельствуют данные анализа эффективности сочетанного действия КП с химиопрепаратами *in vitro* [2]. В настоящей работе в опытах на клеточных культурах это заключение нашло подтверждение на примерах ВПГ- и ЦМВ-инфекций: было показано, что сочетанное применение НЛФ и химиопрепаратов позволяет значительно снизить эффективную концентрацию последних.

Наиболее важной характеристикой любого исследуемого препарата является его низкая токсичность и способность защищать зараженный организм от летальных доз вируса. В настоящей работе показано, что НЛФ в максимально изученной концентрации (20 000 МЕ/мышь) не обладает токсическим действием на животных при различных способах введения. Впервые показано, что даже однократное введение НЛФ в концентрации 20 000 МЕ/мышь защищает 60% мышей, а в комбинации с АЦВ – 100% мышей от 20 ЛД₅₀ ВПГ 1-го типа. Наибольший протективный эффект был достигнут при 3-дневном комплексном лечении животных. При этом удалось снизить дозу обоих соединений в 10 раз по сравнению со стандартной схемой терапии АЦВ, используемой при лечении более легких форм ВПГ-инфекции у животных [5, 7]. Ранее было установлено, что НЛФ в сочетании со специфическими химиопрепаратами оказывают синергическое действие в отношении ряда вирусных инфекций *in vitro* [2]. Представляло интерес выяснить характер взаимодействия препаратов в ситуации *in vivo*. Было определено значение индекса ФИК, которое составило 0,3. Согласно имеющимся данным, значение индекса ФИК, меньшее или равное 0,5, свидетельствует о синергидном характере взаимодействия изученных препаратов [10].

Таким образом, показанная в данной работе возможность комбинирования новой лекарственной формы ВИФЕРОНА®, раствора для местного применения, 40 000 МЕ/мл (ООО «ФЕРОН», Россия) с химиопрепаратами дает основание для разработки новых схем мультимодальной терапии герпес-вирусных инфекций человека, позволяющих снизить терапевтические концентрации лекарственных соединений, сократить продолжительность лечения и, следовательно, избежать проявления побочных токсических эффектов при сохранении высокой противовирусной эффективности.

Выводы

1. Впервые установлено, что НЛФ ВИФЕРОН®, раствор для местного применения, в концентрации

20 000 МЕ/мл на 83% ингибирует ЦМВ-инфекцию в терапевтической схеме *in vitro*.

2. Опыты острой и подострой токсичности на животных при интраназальном, внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении НЛФ препарата ВИФЕРОН® продемонстрировали отсутствие изменений по следующим показателям: масса тела, гибель и общее состояние животных, гематологические и биохимические показатели крови, анализ мочи и патоморфологии органов и тканей.

3. Показано, что НЛФ препарата ВИФЕРОН®, раствора для местного применения, усиливает специфическую противовирусную активность химиопрепаратов в лечебной схеме *in vitro*, позволяя значительно снизить эффективную ингибирующую концентрацию последних: для ГЦВ в 3 раза, для АЦВ в 20 раз.

4. В экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что НЛФ препарата ВИФЕРОН®, раствора для местного применения, однократно введенного через 24 ч после внутрибрюшинного заражения мышей ВПГ1, защищает 60% животных от летальной (20 ЛД₅₀/мл) герпес-вирусной инфекции.

5. Использование НЛФ препарата ВИФЕРОН®, раствора для местного применения, в сочетании с АЦВ в лечебной схеме *in vivo* позволило: а) уменьшить дозы обоих препаратов в 10 раз (до 2000 МЕ/мл и 5 мг/кг соответственно) по сравнению с применением каждого препарата в отдельности; б) достичь лечебного эффекта при использовании короткой схемы терапии – 3 сут; в) обеспечить полную защиту (100%) животных от летального заражения (20 ЛД₅₀/мл) ВПГ1.

6. Высокий протективный эффект мультимодальной терапии летальной герпес-вирусной инфекции *in vivo* обусловлен синергидным характером взаимодействия использованных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выжлова Е. Н., Андропова В. Л., Галегов Г. А., Малиновская В. В. Комбинированное антигерпесвирусное действие комплексного препарата “Виферон – капли глазные” и модифицированных нуклеозидов // Бюл. экспер. биол. – 2006. – Т. 141, № 6. – С. 672–676.
2. Выжлова Е. Н. Антивирусная активность новой лекарственной формы интерферона для местного применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2008.
3. Климова Р. Р., Масалова О. В., Атанадзе С. Н. и др. Получение и свойства моноклональных антител к вирусу герпеса 1-го и 2-го типа // Журн. микробиол. – 1999. – № 5. – С. 99–103.
4. Макарова Н., Куц А., Иванова Л. и др. Получение моноклональных антител к сверххранним белкам цитомегаловируса человека и их применение для выявления инфицированных клеток // Вопр. вирусол. – 1996. – № 1. – С. 28–32.
5. Farley N., Bernstein D. I., Bravo F. J. et al. Recurrent vaginal shedding of herpes simplex type 2 virus in the mouse and effects of antiviral therapy // Antiviral Res. – 2010. – Vol. 86, N 2. – P. 188–195.
6. Field H. J., Biswas S. Antiviral drug resistance and helicase-primase inhibitors of herpes simplex virus // Drug Resist. Updat. – 2010. – [Epub ahead of print].
7. Gebhardt B. M., Focher F., Eberle R. et al. Effect of combinations of antiviral drugs on herpes simplex encephalitis // Drug Des. Devel. Ther. – 2009. – Vol. 3. – P. 289–294.
8. Khetsuriani N., Holman R. C., Anderson L. J. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988–1997 // Clin. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 35. – P. 175–182.
9. Kimberlin D. W. Management of HSV encephalitis in adults and

- neonates: diagnosis, prognosis and treatment // *Herpes*. – 2007. – Vol. 14. – N 1. – P. 11–16.
10. *Lampi G., Deidda D., Pinza M.* et al. Enhancement of anti-herpetic activity of glycyrrhizic acid by physiological proteins // *Antiviral Chem. Chemother.* – 2001. – Vol. 12, N 2. – P. 125–131.
 11. *Lischka P., Zimmermann H.* Antiviral strategies to combat cytomegalovirus infections in transplant recipients // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 8, N 5. – P. 541–548.
 12. *Lischka P., Hewlett G., Wunberg T.* et al. In vitro and in vivo activities of the novel anticytomegalovirus compound AIC246 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, N 3. – P. 1290–1297.
 13. *Michaels M. G.* Treatment of congenital cytomegalovirus: where are we now? // *Expert. Rev. Antiinfect. Ther.* – 2007. – Vol. 5, N 3. – P. 441–448.
 14. *Naesens L., De Clercq E.* Recent developments in herpesvirus therapy // *Herpes*. – 2001. – Vol. 8, N 1. – P. 12–16.
 15. *Scott H. J., Kimberlin D. W., Whitley R. J.* Antiviral therapy for herpesvirus central nervous system infections: Neonatal herpes simplex virus infection, herpes simplex encephalitis, and congenital cytomegalovirus infection // *Antiviral Res.* – 2009. – Vol. 83, N 3. – P. 207–213.
 16. *Smith J. D., De Harven E.* Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequence of viral replication // *J. Virol.* – 1973. – Vol. 12, N 4. – P. 919–930.
 17. *Spector T., Harrington J. A., Morrison R. W.* et al. 2-Acetylpyridine 5-[(dimethylamino)thiocarbonyl]-thiocarbohydrazide (A1110U), a potent inactivator of ribonucleotide reductases of herpes simplex and varicella-zoster viruses and a potentiator of acyclovir // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86, N 3. – P. 1051–1055.
 18. *Uzhlova E. N., Andronova V. L., Galegov G. A., Malinovskaya V. V.* Synergistic antiherpesviral combination of alpha interferon and nucleoside analog or pyrophosphate analog in relation to herpes simplex virus in cell culture in vitro // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2007. – Vol. 27, N 8. – P. 737–738.

Поступила 18.01.12

Сведения об авторах:

Климова Регина Рафаиловна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России; **Тюленев Юрий Александрович**, мл. науч. сотр. ФГБУ Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616.36-002-022-078

Н. И. Громова¹, И. В. Гордейчук², К. К. Кюрегян², Л. Ю. Ильченко², М. И. Михайлов²

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК HGV У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ

¹ФГБУ Поликлиника № 1 Управления делами Президента РФ, 119002, Москва, ул. Сивцев Вражек, 26/28;

²Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, 142782, Московская обл., Ленинский р-н, 27 км Киевского ш.

593 пациента с хроническими вирусными гепатитами были обследованы на РНК HGV и ДНК TTV. РНК HGV обнаруживалась в 3 раза реже, чем ДНК TTV, – у 13,6 и 46,64% больных соответственно. При сравнительной оценке клинико-биохимических показателей пациентов с коинфицированием HCV/HGV и моноинфекцией HCV выявлены достоверные различия среднего уровня активности АЛТ и частоты повышения АЛТ, которые были выше у больных ХГС с РНК HGV в крови. Влияние инфицирования HGV на другие клинико-биохимические показатели и уровни фиброза в группах больных с моноинфекцией HCV и коинфекцией HCV/HGV отсутствовало. Наличие РНК HGV в крови больных ХГС не влияло на эффективность ПВТ.

30 больных ХГС и ХГВ с РНК HGV в крови были обследованы трижды на фоне ПВТ (до, во время и после окончания лечения). У 23 (76,6%) из 30 пациентов на фоне ПВТ имело место исчезновение РНК HGV в крови, однако после окончания лечения у 17 (53,3%) больных репликация РНК HGV возобновилась, т. е. подавление репликации на фоне ПВТ носило временный характер. У лиц с моноинфекцией HGV (n = 12) клиническая симптоматика была скудной, у половины больных этой группы молодого и среднего возраста отмечались повышение уровня холестерина, а также явления стеатоза печени по данным УЗИ.

Ключевые слова: гепатит С, гепатит В, хронический вирусный гепатит, вирус гепатита G, эффективность противовирусной терапии, ПЦР-диагностика вирусных гепатитов

N. I. Gromova¹, I. V. Gordeychuk², K. K. Kyuregyan², L. U. Ilchenko², M. I. Mikhailov²

THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETECTION OF RNA IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITES

¹Federal State Institution Polyclinic №1 of the Office of Presidential Affairs of Russia, 26/28, Sivtsev Vrazhek pereulok, Moscow 119002; ²Federal State Budget-Financed Institution Chumakov Institute of poliomyelitis and viral encephalites of RAMS, Institut poliomyelita, 27 km Kiev Highway, Leninsky District, Moscow Region 142782

593 patients with chronic viral hepatitis were tested for HGV-RNA and TTV DNA of. HGV-RNA detected in 3 times less than TTV DNA - in 13.6% and 46.64%, respectively. A comparative evaluation of clinical and biochemical parameters in patients with co-infection HCV/HGV and HCV monoinfection revealed significant differences in the average level of activity of ALT and the rate of increased ALT, which were higher in Hepatitis C patients with HGV RNA in the blood. There was no influence of HGV infection on other clinical and biochemical parameters and levels of fibrosis in groups of patients with HCV monoinfected and co-infection HCV/HGV. The presence of HGV RNA in blood Hepatitis C patients did not affect the effectiveness of AVT. 30 patients with Hepatitis C and Hepatitis B with HGV RNA in blood were examined three times on the background of the AVT (before, during and after treatment). In 23 out of 30 patients (76.6%) a disappearance of HGV RNA in the blood took place during AVT, but after treatment in 17 patients (53.3%) HGV RNA replication is resumed, i. e. suppression of replication on the background of AVT was temporary. In individuals with HGV monoinfection (n 12) clinical symptoms were poor; in half of the patients in this group of young and middle age the increase in cholesterol levels was noticed, as well as the sonographic signs of fatty liver.

Key words: hepatitis C, hepatitis B, chronic hepatitis, hepatitis G, the effectiveness of antiviral therapy, PCR diagnosis of viral hepatitis