

УДК 578.825.11

Антигерпесвирусная эффективность фосфита ациклогуанозина, преодолевающего барьер резистентности к ацикловиру

В. Л. Андропова^{1*}, М. В. Ясько², М. К. Куханова², Г. А. Галегов², Ю. С. Скоблов³,
С. Н. Кочетков²

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

³Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.08.2015

Принята к печати 04.11.2015

РЕФЕРАТ Фосфит ациклогуанозина, как показано ранее, одинаково эффективен в отношении как чувствительных, так и резистентных к ацикловиру штаммов вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) в культуре клеток. На модели герпетического энцефалита, развивающегося у мышей при интраперитонеальном введении ВПГ-1, внутрибрюшинное введение фосфита ациклогуанозина эффективно защищало животных от гибели. В представленной работе продолжено изучение антигерпесвирусной эффективности фосфита ациклогуанозина *in vivo*, вводимого неинвазивными способами – перорально и в виде мазевых накожных аппликаций. Показано, что фосфит ациклогуанозина, вводимый мышам перорально 2 раза в день в течение 5 дней, эффективно предотвращал развитие системной герпетической инфекции. Смертность мышей в контрольной группе составляла 57%. Использование фосфита ациклогуанозина в дозах 600, 800 и 1000 мг/кг в день значительно увеличивало выживаемость и среднюю продолжительность жизни животных по сравнению с животными контрольной группы, получавшими плацебо. На модели экспериментальной герпетической кожной инфекции морских свинок сравнили показатели эффективности мазевой лекарственной формы фосфита ациклогуанозина и ацикловира на основе полиэтиленгликоля после 5-дневного курса. Установлено, что фосфит ациклогуанозина оказывает лечебное действие, которое выражается в статистически значимом сокращении площади пораженной поверхности и уменьшении количества везикулярных образований. Мазь фосфита ациклогуанозина 10% проявляет терапевтический эффект, хорошо сопоставимый с эффектом 5% мази ациклогуанозина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антивирусная активность, вирус простого герпеса, *in vitro*, *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВПГ-1 и ВПГ-2 – вирус простого герпеса первого и второго типа; ТК – тимидинкиназа; АЦВ/АЦГ – ацикловир/ациклогуанозин; Ф-АЦГ – фосфит ациклогуанозина; ПЦВ – пенцикловир; ПЭГ-600 – полиэтиленгликоль 600; СПЖ – средняя продолжительность жизни; ФМК – фосфономуравьиная кислота; ЦДВ – цидофовир; ЦД₅₀ – 50% цитотоксическая концентрация; ИД₅₀ и ИД₉₅ – 50% и 95% ингибирующие дозы; ХТИ – химиотерапевтический индекс; в/б – внутрибрюшинно; ЦПЭ – цитопатический эффект.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызываемые вирусом простого герпеса (ВПГ), чрезвычайно широко распространены: от 50 до 95% взрослого населения Земли имеют антитела к ВПГ-1, а 20–30% людей к 15–29 годам являются носителями ВПГ-2, и с возрастом количество серопозитивных лиц увеличивается [1, 2]. После первич-

ного инфицирования вирусы герпеса устанавливают пожизненную латентную инфекцию с периодически развивающимися рецидивами. Способность ВПГ поражать различные органы и ткани приводит к чрезвычайно широкому многообразию клинических проявлений инфекции – от поражений кожи, слизистых, глаз до генерализованных форм с поражением

внутренних органов и ЦНС [3]. Поэтому для лечения герпетических инфекций различной тяжести и локализации важно иметь лекарственные формы как для наружного использования, так и для системного введения. С этой целью в медицинской практике широко применяют аналоги нуклеозидов. Это прежде всего известный противогерпетический агент АЦВ (АЦГ, зовиракс, 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин), выпускаемый как в виде 5% мази, 5% крема, 3% глазной мази, так и в форме таблеток, суспензии для приема внутрь 8%, лиофилизированного порошка для приготовления инфузионного раствора, лиофилизированного порошка для приготовления раствора для инъекций (группа компаний GlaxoSmithKline и др.). Кроме того, к противогерпетическим препаратам первого ряда относятся пенцикловир (ПЦВ, 1% крем) и метаболитические предшественники АЦВ и ПЦВ – валиновый эфир АЦВ (Валтрекс, таблетки в дозировке 250, 500 и 1000 мг) и фамцикловир (Фамвир, таблетки, покрытые оболочкой, 125, 250, 500 мг).

Однако к этим препаратам у вирусов герпеса развивается резистентность. Частота выделения ВПГ с лекарственной устойчивостью в клинической практике зависит от иммунного статуса пациентов и колеблется от 0.5% у иммунокомпетентных пациентов до 2–36% у иммунокомпромированных больных [4, 5]. Описаны случаи, когда с устойчивыми к АЦВ вариантами ВПГ были ассоциированы заболевания с тяжелым клиническим течением (герпетическая пневмония, менингоэнцефалит, обширные кожно-слизистые поражения и др.), которые могут приводить к смерти больного [6–9].

Резистентность ВПГ к АЦВ обуславливается мутациями в генах ТК (*UL23*) и/или *pol*-гене (*UL30*), с которыми связан механизм действия препарата. Первый этап фосфорилирования АЦВ с образованием монофосфата катализируется вирусной ТК, два следующих – клеточными ферментами. АЦВ-трифосфат (активный метаболит АЦВ) ингибирует вирусную ДНК-полимеразу, а кроме того, включается в синтезирующуюся цепочку ДНК и ингибирует элонгацию по терминационному механизму [10]. Резистентность клинических изолятов ВПГ к АЦВ в 95% случаев обусловлена мутациями в гене *UL23*, которые приводят, как правило, к потере или существенному снижению активности ТК (96%). Гораздо реже выделяют мутанты с измененной субстратной специфичностью ТК (4% от общего количества мутантов ТК) [6, 11].

Важно подчеркнуть, что из-за сходства механизмов действия АЦВ и ПЦВ резистентность ВПГ к ним носит в большинстве случаев перекрестный характер, что приводит к снижению эффективности

терапии, проводимой с использованием АЦВ, ПЦВ или их метаболитических предшественников. В международной практике в таких случаях используют три-натриевую соль фосфономуравьиной кислоты (ФМК, фоскарнет) [12, 13]. Кроме того, есть положительный опыт применения в особо тяжелых случаях ЦДВ (цидофовир, вистид), когда ФМК также оказывался неэффективным [14]. Эти препараты в большинстве случаев одинаково эффективно подавляют репродукцию как чувствительных, так и резистентных к АЦВ и ПЦВ вариантов ВПГ. К сожалению, ФМК и ЦДВ высокотоксичны и в России их использование не разрешено. Описаны также мутанты ВПГ, перекрестно резистентные к АЦВ/ПЦВ и ФМК и/или ЦДВ [15–17]. Поэтому разработка средств, эффективных против ВПГ, а также предотвращающих рецидивы этого заболевания, весьма актуальна.

Фосфит ациклогуанозина (Ф-АЦГ, Нр-АСV, фосфонат 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанина) представляет собой Н-фосфонатное производное АЦВ. Ранее на модели ВПГ-1 мы показали, что Ф-АЦГ проявляет противовирусную активность как *in vitro* (в клеточной культуре Vero E6), так и *in vivo* (при в/б введении инфицированным мышам). Было установлено, что этот препарат активен не только против эталонного штамма ВПГ-1/L₂, но также сохраняет активность в отношении лабораторного АЦВ-резистентного штамма ВПГ-1/L₂/R и АЦВ-резистентных клинических изолятов ВПГ-1 (Avd и Sha), имеющих эпидемическое значение [18–21]. Таким образом, Ф-АЦГ может представлять интерес для практической медицины в качестве препарата, эффективно подавляющего инфекцию, вызванную как чувствительным, так и резистентными к АЦВ вариантами ВПГ-1.

В представленной работе определена эффективность вводимого перорально Ф-АЦГ при генерализованной герпетической инфекции у мышей, а также проведено сравнительное изучение мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ и АЦВ с целью разработки препарата для лечения кожных форм герпетической инфекции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты

Ф-АЦГ синтезирован в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. В качестве референс-препарата использовали АЦВ (9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин) производства GlaxoSmithKline (США/Великобритания).

Вирусы и клетки

В работе использовали ВПГ-1 штамм L₂, полученный из Государственной коллекции Института вирусоло-

логии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ. Культура клеток почек зеленой мартышки Vero E6 любезно предоставлена А.М. Бутенко (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ).

Животные

Морские свинки породы Агути весом 250 г (самцы) и белые линейные мыши BALB/c весом 8–9 г (самцы) получены из питомника ФГБУН НЦВМТ ФМБА России Филиал «Столбовая» (Московская обл., Чеховский район, пос. Столбовая). Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Все процедуры проводились строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977».

Цитотоксичность

Цитотоксичность оценивали в соответствии с общепринятым методом окрашивания клеток трипановым голубым [20, 21]. За величину ЦД₅₀ принимали концентрацию вещества, которая обеспечивает гибель 50% клеток при инкубации в течение 72 ч.

Противовирусная активность

Противовирусную активность соединений *in vitro* оценивали микрометодом по способности защищать инфицированные клетки от гибели, предотвращая развитие вирусиндуцированного ЦПЭ, в соответствии с методом De Clercq E. и соавт. [22], как описано нами ранее [20, 21]. Монослойную культуру клеток Vero E6, выращенную в пластиковых 96-луночных планшетах (Linbro, Flow laboratories, Великобритания), инфицировали с множественностью 0.1 БОЕ/кл; продолжительность инкубации составляла 48 ч при 37°C, при этом в контроле вируса развивался 95–100% ЦПЭ, т.е. ЦПЭ охватывал весь монослой клеток. Эффективность препарата количественно выражали как ИД₅₀ и ИД₉₅ – концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного ЦПЭ на 50% и практически полностью.

Противогерпесвирусная активность

Противогерпесвирусную активности соединений изучали на модели экспериментальной генерализованной инфекции мышей. Использовали адаптированный к мозгу мышей ВПГ-1/L₂. Инфекционный материал вводили в/б в объеме 200 мкл в дозе, обеспечивающей гибель 95 или 50% животных в контрольной инфицированной нелеченной группе. Заражающая доза указана для каждого эксперимента отдельно. Животные получали тестируемые соединения, растворенные в трижды дистиллированной воде или в физиологическом растворе, в/б

или перорально в объеме 0.2 мл. Разовые дозы препаратов и количество животных в группе указаны отдельно для каждого эксперимента. Соединения вводили дважды в день в течение 5 дней, первый раз через 1 ч после заражения. Срок наблюдения – 21 сутки. Эффективность препаратов оценивали по их способности защищать животных от гибели (процент выживаемости относительно контрольной инфицированной, но нелеченной группы) и по увеличению СПЖ. За максимальную СПЖ принимали 21 день (срок наблюдения).

Через 96 ч после заражения, когда в мозге зараженных животных инфекционный титр достигал максимальных значений, забивали по три мыши из каждой группы. Извлекали головной мозг и легкие и разрушали их в гомогенизаторе Даунса при температуре 4°C. Готовили 10% суспензию в физиологическом растворе, центрифугировали ее при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Инфекционный титр вируса в супернатанте определяли методом бляшкообразования путем титрования в культуре клеток как описано ниже. Эффективность препарата оценивали по снижению величины инфекционного титра вируса в органном материале от животных опытной группы, получавших препарат, по сравнению с контрольной группой животных (инфицированных, но не леченных).

Для оценки эффективности препаратов при экспериментальной кожной инфекции [23] на скарифицированные после депиляции участки кожи морских свинок площадью около 5 см² наносили вирусный материал с последующим его втиранием. Титр вируса составлял 7.87 lg БОЕ/мл.

Через 48 ч после инокуляции ВПГ на инфицированной поверхности появлялось легкое покраснение, после чего начинали лечение путем аппликации мази 2 раза в день в течение 5 дней. В качестве основы при приготовлении мазей использовали ПЭГ-600.

Инфекционный титр вируса

Величину инфекционного титра вируса в везикулярной жидкости определяли методом бляшкообразования, описанным ниже. Забор везикулярной жидкости проводили через 4 суток после инфицирования. Инфекционный титр вируса определяли методом бляшкообразования. 24-часовую культуру клеток, выращенную в 24-луночных пластиковых планшетах (Costar, США), заражали 10-кратными разведениями вируса. Через 1 ч клеточный монослой отмывали от неадсорбированного вируса физиологическим раствором, вносили среду покрытия (по 2 мл/лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Среда покрытия состояла из сред Игла и 199 (производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов

им. М.П. Чумакова РАМН, Москва), соединенных в соотношении 1 : 1, 5% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Москва), 0.4% агарозы (Sigma, США). Через 48 ч среду покрытия удаляли, инфицированные культуры фиксировали 10% нейтральным формалином, окрашивали 0.5% раствором генцианвиолета и подсчитывали число бляшек [24].

Инфекционный титр «Т» вычисляли по формуле:

$$T = \frac{\text{Число бляшек в лунке} \times \text{Кратность разведения}}{\text{Объем вносимого инокулюма}}$$

и выражали в lg БОЕ/мл, где БОЕ – бляшкообразующая единица.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что Ф-АЦГ одинаково эффективно селективно ингибирует репродукцию как чувствительного, так и резистентных к АЦВ штаммов ВПГ, включая лабораторный штамм ВПГ-1/L₂/R и клинические изоляты Avd и Sha, которые циркулируют в человеческой популяции в настоящее время, относящиеся к наиболее часто встречающемуся в клинической практике ТК-негативному/дефицитному фенотипу [18, 19]. Соответствующие данные приведены в табл. 1.

Результаты, полученные *in vitro*, подтверждены в опытах *in vivo* на модели экспериментальной герпетической инфекции у белых мышей BALB/c. Так как инфекция, вызываемая вариантом ВПГ-1/L₂/R, резистентным к АЦВ, не была летальной, то об эффективности Ф-АЦГ при в/б введении судили по его влиянию на накопление вируса в головном мозге животных. Показано, что при введе-

нии Ф-АЦГ (450 мг/кг, 2 раза в день) титр вируса на 4-й день снижался на 1.30 lg БОЕ/мл (с 3.31 ± 0.16 до 2.01 ± 0.11). Этот результат был сходен с эффектом Ф-АЦГ в аналогичных условиях на модели эталонного штамма ВПГ-1: титр вируса снижался с 5.49 ± 0.25 до 4.01 ± 0.16 lg (летальность в контроле в последнем случае составляла 92.5%; в опытной группе смертность снизилась до 67.5%, СПЖ увеличилась с 4.90 ± 0.75 до 10.25 ± 1.20) [18].

Нами установлен механизм формирования резистентности штаммов ВПГ-1/L₂/R, Avd и Sha. Штаммы ВПГ-1/L₂/R и Sha содержат мутации в гене UL23, которые приводят к замене R220H в ТК и, как следствие, к потере активности фермента. Такой фермент не способен катализировать первый этап фосфорилирования АЦВ, необходимый для его превращения в активный метаболит АЦВ-трифосфат, способный встраиваться в синтезирующуюся цепь вирусной ДНК и останавливать ее элонгацию по терминационному механизму. В гене UL23 штамма Avd обнаружена делеция deltaT66, расположенная в непосредственной близости от АТР-связывающего сайта фермента (аминокислотные остатки 51–63), которая может обуславливать снижение эффективности фосфорилирования АЦВ [20, 25]. Полученные результаты подтверждают принадлежность всех включенных в исследование АЦВ-резистентных штаммов ВПГ к ТК-дефицитному фенотипу и позволяют предположить, что мутации в области связывания нуклеозидов и АТР-связывающего центра не влияют существенно на метаболические превращения Ф-АЦГ с образованием монофосфата АЦВ, который, подобно АЦВ, превращается далее в ди- и трифосфат АЦВ. Однако это превращение проис-

Таблица 1. Противовирусная активность Ф-АЦГ и АЦВ в культуре клеток Vero E6 [18, 19]

Соединение	Показатель	ВПГ-1/L ₂	ВПГ-1/L ₂ /R	Avd	Sha
АЦВ	ИД ₅₀ , мкг/мл	0.39	> 400	3.9	12.5
	ИД ₉₅ , мкг/мл	1.56	> 400	31.25	50
	ХТИ	> 1026	> 1	> 102	> 32
Ф-АЦГ	ИД ₅₀ , мкг/мл	15.6	31.25	31.25	31.25
	ИД ₉₅ , мкг/мл	31.25	62.5	250	62.5
	ХТИ	> 64	> 32	> 32	> 32

Примечание. ВПГ-1/L₂ – эталонный штамм вируса; ВПГ-1/L₂/R – лабораторный штамм вируса, глубоко резистентный к АЦВ; Avd и Sha – резистентные к АЦВ клинические изоляты ВПГ-1. Множественность инфицирования – 0.1 БОЕ/кл. Продолжительность инкубации 48 ч. Приведены результаты двух независимых опытов. ЦД₅₀ АЦВ и Ф-АЦГ равны > 400 и > 1000 мкг/мл соответственно. ХТИ вычисляли как отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀.

ходит, по всей вероятности, альтернативным путем, минуя стадию деградации Ф-АЦГ до АЦВ [21].

Известно, что причиной гибели животных в условиях генерализованной герпетической инфекции является развитие герпетического энцефалита, и для проявления противовирусной активности препарат должен преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в мозг инфицированных животных. Очевидно, что при в/б введении Ф-АЦГ в мозге животных создаются концентрации препарата, способные эффективно ингибировать репродукцию вируса. Однако биодоступность лекарственных препаратов при введении *per os* ниже, чем при в/б или внутривенном введении, и для сохранения антивирусной эффективности необходимо увеличивать дозу препарата. Например, биодоступность АЦВ при оральном приеме не превышает 10–20%. При приеме 200 мг препарата *per os* максимальная концентрация АЦВ в сыворотке крови составляет 0.4–0.8 мкг/мл. Внутривенное введение стандартной дозы АЦВ (5 мг/кг 3 раза в сутки) обеспечивает существенно большую его концентрацию в сыворотке крови – около 9.8 мкг/мл [26]. В ряде случаев пероральное введение оказывается неэффективным. Так, из-за крайне низкой биодоступности при введении *per os* (< 5%) препарат ЦДВ вводится только внутривенно [27]. Биодоступность ПЦВ при оральном введении также очень низкая – 5% [28]. В связи с этим перорально ПЦВ применяют только в виде метаболитического предшественника – фамцикловира. Структурные модификации позволяют увеличить абсолютную биодоступность ПЦВ из фамцикловира до 77% после однократного орального введения [29].

Поэтому, развивая логически проведенное нами исследование антигерпетической активности Ф-АЦГ *in vitro* и *in vivo* [18, 19], мы изучили способность Ф-АЦГ, вводимого перорально, защищать мышей от гибели при экспериментальной генерализованной инфекции, вызванной ВПГ-1.

Известно, что патогенность АЦВ-резистентных вариантов ВПГ, содержащих мутации в гене ТК, определяется их фенотипом, так как зависит от уровня активности ТК. В опытах на лабораторных животных показано, что у ТК-негативных и ТК-дефицитных штаммов вирулентность, как правило, существенно снижена или такие штаммы авирулентны, т.е. не способны вызывать летальную инфекцию у лабораторных животных и проявляться в виде зостерформы [30, 31]. Как отмечалось, использованные в предыдущей серии опытов резистентные к АЦВ штаммы ВПГ-1/L₂/R, Avd и Sha относятся именно к ТК-негативному или ТК-дефицитному фенотипам, поэтому в дальнейшем мы инфицировали животных исходным родительским штаммом ВПГ-

1/L₂ с неизменной лекарственной чувствительностью. Хотелось бы подчеркнуть, что способность ТК-дефицитных и ТК-негативных штаммов вызывать тяжелые клинические формы герпетической инфекции обусловлена их естественной гетерогенностью. Присутствие в популяции ТК-позитивных вирусных частиц, способных синтезировать функционально активную ТК, позволяет компенсировать отсутствие или низкий уровень активности ТК АЦВ-резистентных вирусных частиц [6, 32].

Инфицированные животные в опытных группах получали Ф-АЦГ в виде раствора в трижды дистиллированной воде как описано в разделе «Экспериментальная часть». При выборе разовых доз Ф-АЦГ опирались на данные об эффективности препарата при в/б введении на модели экспериментальной инфекции мышей, вызванной ВПГ-1: способность Ф-АЦГ защищать инфицированных животных от гибели была в 3–4 раза ниже по сравнению с АЦВ [18].

Из представленных в табл. 2 результатов видно, что в предложенных экспериментальных условиях перорально введенный Ф-АЦГ эффективно защищает животных от гибели. Защитный эффект носит при этом выраженный дозозависимый характер: при увеличении дозы Ф-АЦГ увеличивались и показатели выживаемости и СПЖ животных, что обусловлено ингибированием репродукции вируса в мозге инфицированных животных. Однако эффективность Ф-АЦГ при пероральном введении была ниже, чем при в/б, при практически равной смертности животных в контрольных группах. Так, при 57% смертности в контроле, из 40 животных, получавших препарат *per os* в дозе 300 мг/кг, погибло 29. Эффективность Ф-АЦГ при в/б введении в той же разовой дозе и по той же схеме была существенно выше – погибла лишь одна мышь из 40. Смертность в контроле в этом случае составляла 60% [19].

Снижение эффективности Ф-АЦГ и АЦВ при пероральном введении (2 раза в сутки, 5 дней) по сравнению с в/б введением по той же схеме в обоих случаях оказалось примерно одинаковым: пероральная эффективность АЦВ была в 3–4 раза ниже, чем интраперитонеальная. Так, в соответствии с нашими данными, при в/б использовании АЦВ в разовой дозе 25 мг/кг защитный эффект составлял 30%, а увеличение СПЖ – 5.2 суток при 65% смертности в контрольной группе [33], что хорошо сопоставимо с показателями эффективности АЦВ, вводимого мышам *per os* в разовой дозе 100 мг/кг (табл. 2).

Важно подчеркнуть, что эффективность Ф-АЦГ при его пероральном введении в разовой дозе 300 мг/кг хорошо сопоставима с эффективностью АЦВ в разовой дозе 100 мг/кг, вводимого по той же схе-

ме и в тех же экспериментальных условиях. Защита животных от гибели составляла в последнем случае 21.67%, увеличение СПЖ – 3.7 суток, снижение титра вируса в головном мозге – 0.73 lg.

При сопоставлении этих данных с результатами, приведенными в *табл. 1*, видно, что различие показателей эффективности Ф-АЦГ и АЦВ на модели генерализованной герпетической инфекции оказалось менее существенным, чем в опытах *in vitro*. Возможно, структурная модификация молекулы АЦВ (введение Н-фосфонатной группы) приводит к изменению фармакокинетических параметров препарата, например, повышает его биодоступность при пероральном введении.

Антивирусный эффект Ф-АЦГ в разовой дозе 500 мг/кг при пероральном способе введения приближался к эффекту Ф-АЦГ в дозе 300 мг/кг при в/б введении (погибли три мыши из 40). Показатели СПЖ и снижение титра вируса в головном мозге также были сопоставимыми (отличие СПЖ от контроля составило 9.64 и 8.43 суток, а снижение титра вируса 3.47 и 2.15 lg БОЕ/мл (в/б и пероральное введение соответственно). Таким образом, можно заключить, что противогерпетическая эффективность Ф-АЦГ при пероральном введении снижена менее чем в 2 раза по сравнению с интраперитонеальным. Поскольку пероральный способ введения более удобен, не требует участия квалифицированного медперсонала и безболезнен, то полученные результаты могут представлять практический интерес.

Наиболее широко распространенными формами герпетической инфекции являются поражения кожи и слизистых, не затрагивающие внутренние органы и ЦНС. Например, рецидивы орофациального герпеса (герпеса *labialis*) наблюдаются у 15–45%

взрослого населения [34]. Так как герпетические поражения в большинстве случаев локализованы на ограниченной площади, то системное введение противогерпетических препаратов может быть нецелесообразным. Оптимальными лекарственными формами в этом случае будут мази, кремы и гели для наружного нанесения. В случае эффективного проникновения лекарства через кожу подобный способ не только гарантирует направленное избирательное воздействие непосредственно на пораженные ткани, но и позволяет обеспечить терапевтическую концентрацию антивирусного агента в очаге инфекции при использовании в существенно меньших дозах, чем при системном введении. Следовательно, уменьшается токсическое воздействие препарата на организм, минимизируется риск развития нежелательных побочных эффектов, и, что также немаловажно, снижается стоимость курса терапии. Поэтому на следующем этапе исследований нам представлялось целесообразным изучить эффективность Ф-АЦГ при использовании в виде мазевой лекарственной формы.

Так как экспериментальная кожная инфекция ВПГ морских свинок вызывается тем же вирусом, что и у человека, а ее проявления сходны с клиническим течением кожной герпетической инфекции у человека, то для изучения противогерпетической активности веществ мы использовали эту модель.

Предварительно на интактных морских свинках оценили безопасность накожных аппликаций 5 и 10% мазей Ф-АЦГ, а также ПЭГ-600, служившего в наших экспериментах мазевой основой. Мази наносили на депилированные участки кожи дважды в день в течение 5 дней. Не обнаружено покраснения или изъязвления кожных покровов в месте нанесе-

Таблица 2. Влияние перорально введенного Ф-АЦГ на выживаемость мышей BALB/c (8.41 ± 0.31 г), инфицированных ВПГ-1/L₂

Соединение	Схема и доза введения Ф-АЦГ	Число выживших животных / число животных в группе	Смертность, %	Защита, %	СПЖ, сутки	Титр вируса в головном мозге, lg БОЕ/мл
- (контроль вируса)	-	26/60	56.67 ± 3.33	-	11.35 ± 1.11	4.18 ± 0.18
Ф-АЦГ	300 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	29/40	27.50 ± 2.50	29.17	16.40 ± 1.15	3.06 ± 0.12
Ф-АЦГ	400 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	33/40	17.50 ± 2.50	39.17	18.13 ± 1.00	2.56 ± 0.05
Ф-АЦГ	500 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	37/40	7.50 ± 2.50	49.17	19.78 ± 0.69	2.03 ± 0.15
АЦВ	100 мг/кг × 2 раза в сутки/5 суток	14/40	35 ± 0	21.67	15.05 ± 1.30	3.45 ± 0.05

Примечание. Инфицирующая доза 4×10^6 БОЕ/мышь (титр вирусосодержащего материала 7.30 lg БОЕ/мл). Представлены результаты двух независимых опытов.

ния мази, изменения поведения животных, снижения аппетита.

Для оценки эффективности мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ животных инфицировали как подробно описано нами ранее [35] и приведено в разделе «Экспериментальная часть». Для предупреждения развития генерализованной инфекции, приводящей к гибели животного от энцефалита, мы использовали культуральный вирус ВПГ-1/L₂, менее нейровирулентный, чем свежие клинические изоляты, или лабораторный вирус, прошедший пассирование через мозг мышей.

Так как точный расчет дозы препарата при местном использовании невозможен, испытуемые мази наносили тонким слоем непосредственно на пораженные участки кожи. В контроле в тех же условиях наносили плацебо в виде мазевой основы ПЭГ-600, не содержащей лекарственное средство.

Визуальную оценку клинических проявлений экспериментальной инфекции проводили ежедневно. В контроле на 3-и сутки (72 ч после инфицирования) развивались характерные для герпетической инфекции локальные поражения – пузырьковые высыпания (везикулы) около 2 мм как сгруппированные, так и одиночные. Еще через 24 ч (4-й день инфекции) интенсивность поражения достигала максимального развития, после чего начиналось постепенное подсыхание герпетических везикул с образованием корочек. Через 7–8 суток после инокуляции вируса начиналось обратное развитие процесса (отторжение

корочек). На 12-й день наблюдалась полная реэпителизация.

Для количественной характеристики активности соединения учитывали как достоверное уменьшение тяжести клинических симптомов инфекции, так и сокращение сроков излечения под действием изучаемого вещества по сравнению с показателями в контроле. Соответствующие результаты приведены в табл. 3.

При использовании мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ (5%) через 2 суток (4 дня после инокуляции вируса) средняя площадь поражения в опыте была на 5.76% меньше, чем в контроле ($P < 0.05$ при оценке с использованием t -теста Стьюдента), а количество герпетических высыпаний составило 95.55% по сравнению с контролем ($P < 0.3$). Сроки начала обратного развития процесса и излечения (полная реэпителизация) при использовании 5% мази Ф-АЦГ сокращались на 1 сутки по сравнению с контролем.

Лечебное действие Ф-АЦГ было более выраженным при его применении в виде 10% мази и было хорошо сопоставимым с эффектом 5% мази АЦВ. В течение всего срока наблюдения в обоих случаях отмечалось более легкое клиническое течение инфекции, что выражалось в снижении как количества везикулярных образований, так и площади поражения. Различие показателей, полученных в опытной и контрольной группах, оказалось статистически значимым ($P < 0.05$ при использовании t -критерия Стьюдента). Обратное развитие процесса и излече-

Таблица 3. Сравнение лечебного эффекта мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ и АЦВ на экспериментальной модели кожной герпетической инфекции морских свинок, вызванной ВПГ-1/L₂

Соединение	Концентрация соединения в мази, %	Площадь пораженной поверхности		Количество герпетических высыпаний		Титр вируса в везикулярной жидкости, lg БОЕ/мл	Начало обратного развития процесса, сут	Полная реэпителизация, сут
		S _{ср} , см ²	снижение относительно контроля, %	n _{ср}	снижение относительно контроля, %			
- (контроль)	0	4.62 ± 0.08	-	11.25 ± 0.49	-	4.11 ± 0.10 (3.78–4.54)	7–8	12
Ф-АЦГ	5	4.36 ± 0.07	5.76	10.75 ± 0.31	4.44	4.00 ± 0.08 (3.60–4.38)	6	11
	10	4.22 ± 0.07	8.60	10.00 ± 0.27	11.11	3.85 ± 0.11 (3.54–4.40)	6	11
АЦВ	5	4.30 ± 0.18	6.95	10.00 ± 0.38	11.11	3.89 ± 0.15 (3.40–4.48)	6	11

Примечание. Мазь наносили 2 раза в день в течение 5 суток. Первое нанесение – через 48 ч после инфицирования, когда появляется легкое покраснение. Результаты учитывали через 4 суток после инфицирования. Титр вируса в везикулярной жидкости определяли через 4 суток после инокуляции, когда в контроле клиническая выраженность герпетических проявлений была максимальной.

Представлены результаты двух независимых опытов.

ние морских свинок наступало на 1 сутки раньше, чем в контроле.

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что во всех случаях использование мазевой лекарственной формы не приводило к существенному снижению инфекционного титра вируса в везикулярной жидкости. Поэтому нельзя утверждать, что способность Ф-АЦГ ингибировать развитие кожной герпетической инфекции, вызванной у морских свинок эталонным штаммом ВПГ-1/L₂, происходит благодаря ингибированию репликации вируса в очаге инфекции. Однако полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными данными о влиянии АЦВ при местном использовании на инфекционный титр ВПГ в аналогичных экспериментальных условиях. При этом обнаружено статистически значимое уменьшение количества герпетических везикулярных образований и площади пораженной поверхности [36–38]. Вероятно, действие Ф-АЦГ при местном использовании носит прежде всего профилактический характер, что выражается в предотвращении формирования герпетических высыпаний при нане-

сении препарата в продромальный период на стадии легкого покраснения, а не в ингибировании репликации вируса в уже образовавшихся везикулах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение эффективности лечебного действия Ф-АЦГ в опытах *in vivo* показало, что при использовании *per os* или в виде мазевой лекарственной формы Ф-АЦГ эффективно воздействует на генерализованную и кожную инфекцию, вызванную ВПГ-1. Несмотря на то что это соединение уступает АЦВ (для достижения хорошо сопоставимого лечебного эффекта необходимо увеличить концентрацию Ф-АЦГ в 2 раза), оно способно ингибировать репродукцию вариантов вируса, резистентных к АЦВ, как показано нами в опытах *in vitro* и *in vivo*. Это делает потенциально возможным использование Ф-АЦГ в случаях, когда АЦВ оказывается неэффективным. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-00198.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Díaz-Ramón J.L., Díaz-Pérez J.L. // Eur. J. Dermatol. 2008. V. 18. № 1. P. 108–111.
- Smith J.S., Robinson N.J. // J. Infect. Dis. 2002. V. 186. Suppl. 1. P. S3–S28.
- Pereira F.A. // J. Am. Acad. Dermatol. 1996. V. 35. № 4. P. 503–520.
- Danve-Szatanek C., Aymard M., Thouveno D., Morfin F., Agius G., Bertin I., Billaudel S., Chanzy B., Coste-Burel M., Finkielsztejn L., et al. // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. № 1. P. 242–249.
- Langston A.A., Redei I., Caliendo A.M., Somani J., Hutcherson D., Lonial S., Bucur S., Cherry J., Allen A., Waller E.K. // Blood. 2002. V. 99. № 3. P. 1085–1088.
- Andrei G., Georgala A., Topalis D., Fiten P., Aoun M., Opdenakker G., Snoeck R. // J. Infect. Dis. 2013. V. 207. № 8. P. 1295–1305.
- Gateley A., Gander R.M., Johnson P.C., Kit S., Otsuka H., Kohl S. // J. Infect. Dis. 1990. V. 161. № 4. P. 711–715.
- Ljungman P., Ellis M.N., Hackman R.C., Shepp D.H., Meyers J.D. // J. Infect. Dis. 1990. V. 162. № 1. P. 244–248.
- Marks G.L., Nolan P.E., Erlich K.S., Ellis M.N. // Rev. Infect. Dis. 1989. V. 11. № 3. P. 474–476.
- Reardon J.E., Spector T. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 13. P. 7405–7411.
- Gaudreau A., Hill E., Balfour Jr., H.H., Erice A., Boivin G. // J. Infect. Dis. 1998. V. 178. № 2. P. 297–303.
- Andrei G., De Clercq E., Snoeck R. // Antiviral Res. 2004. V. 61. № 3. P. 181–187.
- Sauerbrei A., Bohn K., Heim A., Hofmann J., Weissbrich B., Schnitzler P., Hoffmann D., Zell R., Jahn G., Wutzler P., et al. // Antivir. Ther. 2011. V. 16. № 8. P. 1297–1308.
- Lalezari J.P., Drew W.L., Glutzer E., Miner D., Safrin S., Owen W.F. Jr., Davidson J.M., Fisher P.E., Jaffe H.S. // J. Infect. Dis. 1994. V. 170. № 3. P. 570–572.
- Gibbs J.S., Chiou H.C., Bastow K.F., Cheng Y.C., Coen D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 18. P. 6672–6676.
- Larder B.A., Kemp S.D., Darby G. // EMBO J. 1987. V. 6. № 1. P. 169–175.
- Saijo M., Suzutani T., Morikawa S., Kurane I. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. № 2. P. 606–611.
- Андропова В.Л., Галегов Г.А., Ясько М.В., Куханова М.К., Скоблов Ю.С. // Вопр. вирусол. 2010. Т. 55. № 1. С. 31–34.
- Андропова В.Л., Галегов Г.А., Ясько М.В., Куханова М.К., Кочетков С.Н., Скоблов Ю.С. // Вопр. вирусол. 2011. Т. 56. № 5. С. 37–40.
- Коровина А.Н., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Кочетков С.Н., Куханова М.К., Скоблов Ю.С. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. № 3. С. 488–496.
- Karpenko I.L., Jasko M.V., Andronova V.L., Ivanov A.V., Kukhanova M.K., Galegov G.A., Skoblov Y.S. // Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids. 2003. V. 22. № 3. P. 319–328.
- De Clercq E., Descamps J., Verheist G., Walker R.T., Jones A.S., Torrence P.F., Shugar D. // J. Infect. Dis. 1980. V. 141. № 5. P. 563–573.
- McKeough M.B., Spruance S.L. // Arch. Dermatol. 2001. V. 137. № 9. P. 1153–1158.
- Sarisky R.T., Nguyen T.T., Duffy K.E., Wittrock R.J., Leary J.J. // Antimicrob. Agent Chemother. 2000. V. 44. № 6. P. 1524–1529.
- Gus'kova A.A., Zagurnyi A.V., Skoblov M.Yu., Baranova A.V., Andronova V.L., Iankovskii N.K., Galegov G.A., Skoblov Yu.S. // Mol. Biol. 2005. V. 39. № 1. P. 155–158.
- Wagstaff A.J., Faulds D., Goa K.L. // Drugs. 1994. V. 47. № 1. P. 153–205.
- Cundy K.C. // Clin. Pharmacokinet. 1999. V. 36. № 2. P. 127–143.
- Harden M.R., Jarvest R.L. // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. P. 4265–4268.

29. Perry C.M., Wagstaff A.J. // *Drugs*. 1995. V. 50. № 2. P. 396–415.
30. Coen D.M. // *Trends Microbiol.* 1994. V. 2. № 12. P. 481–485.
31. Efstathiou S., Kemp S., Darby G., Minson A.C. // *J. Gen. Virol.* 1989. V. 70. Pt. 4. P. 869–879.
32. Horsburgh B.C., Chen S.H., Hu A., Mulamba G.B., Burns W.H., Coen D.M. // *J. Infect. Dis.* 1998. V. 178. № 3. P. 618–625.
33. Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суровая А.Н., Гурский Г.В., Галегов Г.А. // *ДАН*. 2007. Т. 413. № 6. С. 830–834.
34. Harmenberg J., Oberg B., Spruance S. // *Acta Derm. Venereol.* 2010. V. 90. № 2. P. 122–130.
35. Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суровая А.Н., Гурский Г.В., Дерябин П.Г., Львов Д.К., Галегов Г.А. // *Вопр. вирусол.* 2013. Т. 58. № 1. С. 32–35.
36. Spruance S.L., Freeman D.J., Sheth N.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985. V. 28. № 1. P. 103–106.
37. Spruance S.L., McKeough M.B., Cardinal J.R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984. V. 25. № 1. P. 10–15.
38. Spruance S.L., Freeman D.J., Sheth N.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986. V. 30. № 1. P. 196–198.