

Крылова Н.В.<sup>1</sup>, Ленёва И.А.<sup>2</sup>, Федореев С.А.<sup>3</sup>, Эбралидзе Л.К.<sup>2</sup>,  
Мищенко Н.П.<sup>3</sup>, Васильева Е.А.<sup>3</sup>, Фалынская И.Н.<sup>2</sup>, Иунихина О.В.<sup>1</sup>,  
Лавров В.Ф.<sup>2</sup>, Свитич О.А.<sup>2</sup>

## АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ЭХИНОХРОМ А, В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 2-го ТИПА *IN VITRO* И *IN VIVO*

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»,  
690087, г. Владивосток, Россия;

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;

<sup>3</sup> ФГБНУ «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН,  
690022, г. Владивосток, Россия

**Целью** работы было изучение активности эхинохрома А – нафтохиноидного пигмента из морских ежей и его композиции с антиоксидантами в отношении вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы.** Штамм ВПГ-2 (G ATCC VR-734) выращивали на культуре клеток Vero. Цитотоксическую и анти-ВПГ-2 активность препаратов оценивали *in vitro* по жизнеспособности клеток и подавлению цитопатогенного действия вируса с помощью МТТ-анализа. Эффективность препаратов у мышей с генитальным герпесом оценивали, учитывая изменения их массы тела, средней продолжительности жизни и показателей вирусной нагрузки.

**Результаты и обсуждение.** Композиция антиоксидантов: эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола (5 : 5 : 1) – демонстрировала более высокую противовирусную активность, чем один эхинохром А. Пероральное введение мышам композиции антиоксидантов предотвращало гибель 90% инфицированных ВПГ-2 животных и достоверно снижало вагинальную вирусную нагрузку. Противовирусная активность эхинохрома А и композиции антиоксидантов, вероятно, обусловлена как вирусингибирующей активностью препаратов, так и их антиоксидантными свойствами.

**Заключение.** Результаты исследования позволяют рассматривать эхинохром А и композицию антиоксидантов на его основе как перспективные лекарственные средства, обладающие противовирусными свойствами.

**Ключевые слова:** эхинохром А; композиция антиоксидантов; вирус простого герпеса 2-го типа; противовирусная активность.

**Для цитирования:** Крылова Н.В., Ленёва И.А., Федореев С.А., Эбралидзе Л.К., Мищенко Н.П., Васильева Е.А., Фалынская И.Н., Иунихина О.В., Лавров В.Ф., Свитич О.А. Активность препаратов, содержащих эхинохром А, в отношении вируса простого герпеса 2-го типа *in vitro* и *in vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6):56-64.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-56-64>

Krylova N.V.<sup>1</sup>, Leneva I.A.<sup>2</sup>, Fedoreev S.A.<sup>3</sup>, Ebralidze L.K.<sup>2</sup>, Mishchenko N.P.<sup>3</sup>,  
Vasileva E.V.<sup>3</sup>, Falynskova I.N.<sup>2</sup>, Iunikhina O.V.<sup>1</sup>, Lavrov V.F.<sup>2</sup>, Svitich O.A.<sup>2</sup>

## ACTIVITY OF COMPOUNDS CONTAINING ECHINOCHROME A AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 *IN VITRO* AND *IN VIVO*

<sup>1</sup> G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia;

<sup>2</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

<sup>3</sup> G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, 690022, Russia

**The aim** of the work was to study the activity of echinochrome A, a naphthoquinoid pigment from sea urchins, and its antioxidant composition against herpes simplex virus type 2 (HSV-2) *in vitro* and *in vivo*.

**Для корреспонденции:** Крылова Наталья Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, г. Владивосток. E-mail: [krylovanatalya@gmail.com](mailto:krylovanatalya@gmail.com)

**Materials and methods.** Strain HSV-2 (G ATCC VR-734) was grown in Vero cells. The cytotoxic and anti-HSV-2 activity of the compounds was assessed *in vitro* by the cell viability and by cytopathic effect inhibition of virus using MTT test. The efficacy of compounds in mice model of vaginitis caused by HSV-2 was determined by the average lifetime, body weight and viral load changes.

**Results and discussion.** The antioxidant composition (echinochrome A, ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol (5:5:1)), showed a higher antiviral efficacy than echinochrome A alone. Oral administration of the antioxidant composition protected 90% of the infected mice against death and reduced vaginal viral loads. The antiviral activity of echinochrome A and the antioxidant composition is probably due to the virus-inhibiting activity of the compounds and their antioxidant properties.

**Conclusion.** The results obtained allow considering the tested compounds as promising agents with antiviral properties.

**Keywords:** *echinochrome A; antioxidant composition; herpes simplex virus type 2; antiviral activity.*

**For citation:** Krylova N.V., Leneva I.A., Fedoreev S.A., Ebralidze L.K., Mishchenko N.P., Vasileva E.V., Falynskova I.N., Iunikhina O.V., Lavrov V.F., Svitich O.A. Activity of compounds containing echinochrome A against herpes simplex virus type 2 *in vitro* and *in vivo*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):56-64. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-56-64>

**For correspondence:** Natalia V. Krylova, Dr. Sci. Biol., Lead Researcher of the Laboratory of Experimental Virology «G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology», G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russia. E-mail: [krylovanatalya@gmail.com](mailto:krylovanatalya@gmail.com)

**Information about authors:**

Krylova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Leneva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Fedoreev S.A., <https://orcid.org/0000-0002-4199-2099>

Ebralidze L.K., <https://orcid.org/0000-0002-4430-8766>

Mishchenko N.P., <https://orcid.org/0000-0001-7616-574X>

Vasileva E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7526-026X>

Falynskova I.N., <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>

Iunikhina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-6723-582X>

Lavrov V.F., <https://orcid.org/0000-0001-7006-506X>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

**Acknowledgments.** This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project RFMEF161317X0076).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 02 September 2019

Accepted 24 September 2019

## Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежедневно в мире более 1 млн человек заражаются возбудителями заболеваний, передаваемых половым путём [1]. Наибольшую опасность представляют 8 патогенных агентов, четыре из которых имеют вирусную природу. Это вирусы гепатита В, иммунодефицита человека, папилломы человека, а также вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) [2], вызывающий у людей генитальный герпес.

До настоящего времени единственным клинически одобренным антигерпетическим средством, применяемым для лечения ВПГ-2-инфекции, являются ацикловир и его аналоги, подавляющие репликацию вирусной ДНК [3, 4]. Однако использование этих препаратов не избавляет пациентов от рецидивов заболевания. Кроме того, в результате их длительного приёма не исключена опасность появления штаммов вируса, устойчивых к лекарственной терапии. Данные обстоятельства актуализируют поиск новых лекарственных средств, включая вещества природного происхождения, обладающие потенциально широким спектром противовирусного, в том числе антигерпетического, действия.

Хорошо известный природный антиоксидант эхинохром А (нафтохиноидный пигмент, получаемый из морских ежей) является действующим веществом отечествен-

ного препарата Гистохром<sup>®</sup>, который используется в кардиологии для лечения ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, а также в офтальмологии при дегенеративных заболеваниях сетчатки и роговицы глаза [5, 6]. Способность эхинохрома А преодолевать гематоэнцефалический барьер [7] стала одной из предпосылок для изучения его противовирусных свойств.

**Цель** настоящего исследования – изучение противовирусного (анти-ВПГ-2) действия эхинохрома А и его композиции с антиоксидантами *in vitro* и *in vivo*.

### Материалы и методы

**Вирус и культура клеток.** В работе был использован штамм G вируса простого герпеса 2-го типа (ATCC VR-734). Вирус пассировали и титровали в культуре клеток Vero и в дальнейшем хранили при -80 °С. Клетки Vero (эпителиальные клетки почек африканской зелёной мартышки) культивировали с использованием среды DMEM (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, Россия), 100 Ед/мл гентамицина и глутамина.

**Животные.** В опытах использовали самок белых аутбредных мышей массой тела 16–20 г, полученных из питомника НЦБТ РАН «Андреевка». Все процедуры выполняли строго в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, от 18 марта 1986 г.

**Препараты.** В работе были использованы:

– Гистохром<sup>®</sup> для внутривенного введения (2,3,5,7,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон), государственный регистрационный № Р N002363/01 (ТИБОХ им. Г.Б. Елякова, ДВО РАН, Владивосток, Россия). В 1 мл препарата в качестве активного вещества содержится 10 мг эхинохрома А (Эх);

– композиция антиоксидантов на основе эхинохрома А: Эх + аскорбиновая кислота (Аск) (AppliChem, Германия) +  $\alpha$ -токоферол (Ток) (Carl Roth, Германия) в соотношении 5 : 5 : 1;

– Ацикловир<sup>®</sup> – лиофилизат для приготовления раствора для инфузий (GlaxoSmithKline Manufacturing, Италия);

– Ацикловир<sup>®</sup> таблетки (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, Польша).

**Приготовление стоковых растворов препаратов.** Инъекционные формы препаратов (Гистохром<sup>®</sup> и Ацикловир<sup>®</sup>) для исследований *in vitro* и *in vivo* разводили до необходимых концентраций средой DMEM. Композицию антиоксидантов для опытов *in vitro* растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, Sigma, США) и хранили при -20 °С, стоковый раствор (10 мг/кг) готовили путём разведения средой DMEM до конечной концентрации ДМСО 0,5%. Для перорального применения препаратов композицию антиоксидантов и таблетированную форму ацикловира суспендировали и разводили средой DMEM до необходимых концентраций.

**Определение цитотоксической активности препаратов.** Цитотоксичность препаратов оценивали на клетках Vero с помощью МТТ (метилтиазолилтетразолий бромид) теста [8]. Монослой клеток ( $1 \times 10^4$  клеток/лунку), выращенных в 96-луночных планшетах (Nuncclon Delta, ООО «Росмедбио», Санкт-Петербург, Россия), обрабатывали препаратами в концентрациях от 0 до 2000 мкг/мл и культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 сут в среде DMEM; необработанные клетки использовали в качестве контроля. К клеткам добавляли раствор МТТ в концентрации 5 мг/мл (Sigma, США) и инкубировали при 37 °С в течение 2 ч. Затем супернатант удаляли и добавляли 150 мкл/лунку изопропанола. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре Varioscan Flash (Thermo Scientific, США) при длине волны 540 нм. Жизнеспособность клеток рассчитывали, как (ОП<sub>0</sub>) / (ОП<sub>к</sub>) · 100%, где ОП<sub>0</sub> и ОП<sub>к</sub> соответствуют оптической плотности обработанных препаратами и контрольных клеток соответственно. 50% цитотоксическую концентрацию препарата, снижающую жизнеспособность обработанных клеток на 50% по сравнению с контролем, рассчитывали с помощью регрессионного анализа дозозависимых кривых [9].

*Противовирусная активность препаратов in vitro.* Противовирусную активность препаратов оценивали, учитывая подавление цитопатического действия (ЦПД) ВПГ-2 и с помощью МТТ-теста. Культуру клеток Vero, выращенных в 96-луночных планшетах, инфицировали вирусом в дозе 100 ТЦИД<sub>50</sub>/мл (тканевая цитопатическая инфекционная доза) и одновременно обрабатывали препаратами в концентрациях от 0 до 50 мкг/мл в течение 60 мин при 37 °С. Затем супернатант удаляли, клетки отмывали, добавляли поддерживающую среду с 1% фетальной телячьей сыворотки и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 сут. ЦПД вируса (%) рассчитывали по формуле:

$$(\text{ОПtv} - \text{ОПcv}) / (\text{ОПcd} - \text{ОПcv}) \cdot 100\%,$$

где ОПtv соответствует оптической плотности инфицированных клеток, обработанных соответствующим препаратом; ОПcv – оптической плотности необработанных препаратом инфицированных клеток, ОПcd – оптической плотности контрольных (необработанных и неинфицированных) клеток. 50% ингибирующую концентрацию препарата (IC<sub>50</sub>), снижающую на 50% вирус-индуцированное ЦПД, рассчитывали с помощью регрессионного анализа дозозависимых кривых [9]. Селективный индекс препарата (SI) вычисляли как отношение 50% цитотоксической концентрации (CC<sub>50</sub>) к IC<sub>50</sub>.

При изучении влияния препаратов на разные стадии репродукции вируса в культуре клеток гистохром и композицию антиоксидантов использовали в концентрации 20 мкг/мл, ацикловир – 10 мкг/мл при инфицирующей дозе вируса – 100 ТЦИД<sub>50</sub>/мл. Для определения *профилактической активности* препаратов монослой клеток обрабатывали препаратом в течение 2 ч при 37 °С, затем инфицировали вирусом в течение 1 ч при 37 °С, отмывали и инкубировали в течение 3 сут при 37 °С в 5% атмосфере CO<sub>2</sub>. При исследовании *вирулицидной активности* вирусосодержащую жидкость смешивали с препаратом в соотношении 1:1, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем наносили на монослой клеток и инкубировали в течение 3 сут при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Для определения *вирусингибирующей активности* препаратов монослой клеток инфицировали вирусом в течение 1 ч при 37 °С, затем к клеткам добавляли тестируемый препарат и в течение 3 сут инкубировали при 37 °С в 5% атмосфере CO<sub>2</sub>. Противовирусную активность препаратов оценивали по подавлению ЦПД вируса (%), как было показано выше.

*Экспериментальная герпетическая инфекция у мышей.* Генитальный герпес у мышей моделировали путём введения во влагалище животных по 30 мкл ВПГ-2 (10<sup>5</sup> ТЦИД<sub>50</sub>/мл). Интактным мышам (в качестве отрицательного контроля) вводили эквивалентное количество физраствора. Методом случайной выборки все животные были разделены на 8 групп (по 10 мышей в группе): контроль (-) – группа интактных животных; контроль (+) – группа инфицированных животных, не получавших лечения; мыши, получавшие гистохром по 1 мг/кг или 2 мг/кг; мыши, которым вводили композицию антиоксидантов по 2 мг/кг или 4 мг/кг; животные, получавшие по 50 мг/кг ацикловира. Ранее [10] было показано, что гистохром в указанных дозах нетоксичен для мышей. Эффективность применения ацикловира в дозе 50 мг/кг при инфекциях, вызываемых заражением мышей вирусом простого герпеса 1-го и 2-го типа, продемонстрировали в своих работах E.R. Kern и соавт. (1982) [11] и M.N. Prichard и соавт. (2011) [12]. Препараты использовали следующим образом: гистохром, как инъекционное средство, вводили внутривентриально, композицию антиоксидантов – внутривентриально (аналог пероральному способу введения в клинике). Препарат сравнения – ацикловир вводили как внутривентриально, так и внутривентриально. Все препараты вводили в объёме 0,2 мл 1 раз в день в течение 5 дней. Срок наблюдения за животными составлял 21 день. Эффективность лечения оценивали по количеству выживших животных (%), средней продолжительности жизни, изменению массы тела, их общему состоянию и инфекционному титру вируса.

Для определения титра вируса у животных каждой группы брали вагинальные смывы на 5-й и 7-й дни после заражения. С этой целью мышам во влагалище вводили 30 мкл охлажденной среды DMEM, собранные смывы доводили до объёма 150 мкл средой DMEM,

центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеток и слизи. Десятикратные разведения супернатантов наносили на монослой клеток Vero в 96-луночных планшетах, инкубировали в течение 3 дней при 37 °С, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Титр вируса определяли, используя метод Рида и Менча (1938) [13] и выражали в lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл.

*Статистический анализ* проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Различия между показателями в контрольной и опытной группах выявляли с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Они считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

*Снижение вызываемого ВПГ-2 цитопатогенного эффекта в культуре клеток Vero под действием препаратов.* Перед оценкой противовирусной активности препаратов была исследована их цитотоксическая активность в отношении клеток Vero в диапазоне концентраций от 0 до 2000 мкг/мл. Ацикловир использовали в качестве контроля, как стандартный противовирусный препарат. На основании результатов МТТ-анализа были определены СС<sub>50</sub> всех исследуемых препаратов. Дальнейшее изучение противовирусной активности проводили при концентрациях препаратов менее 50 мкг/мл, которые обеспечивали жизнеспособность клеток на уровне >70%.

Вначале противовирусное действие тестируемых соединений исследовали путём обработки клеток Vero препаратами и различных концентрациях (от 0 до 50 мкг/мл) и одновременно вирусом (100 ТЦИД<sub>50</sub>/мл). В результате была показана умеренная противовирусная активность тестируемых препаратов, которые дозозависимо подавляли опосредуемое вирусами ЦПД. IC<sub>50</sub> препаратов и их SI, характеризующие противовирусную активность, представлены в **табл. 1**. Установлено, что композиция антиоксидантов защищала клетки Vero от вирусной инфекции при существенно более низких IC<sub>50</sub> и более высоких показателях SI, чем один гистохром ( $p \leq 0,05$ ).

При изучении влияния препаратов на разные стадии жизненного цикла ВПГ-2 была установлена их способность повышать устойчивость клеток к заражению (*оценка профилактического действия*); оказывать непосредственное влияние на вирусные частицы, снижая их способность заражать клетки (*оценка вирулицидного действия*); подавлять ранние стадии репликации вируса (*оценка вирусингибирующего действия*). Показано, что наиболее значительное подавление репликации наблюдалось после обработки вируса тестируемыми препаратами перед заражением им культуры клеток. Так, степень подавления ЦПД вируса после его обработки гистохромом и композицией антиоксидантов составляла соответственно  $57 \pm 5$  и  $84 \pm 6\%$ . А предварительная обработка вируса ацикловиром вызвала незначительный вирулицидный эффект (**рис. 1**). Обработка клеток гистохромом или ацикловиром перед заражением вирусом (*профилактическое действие*) была малоэффективной, и лишь композиция антиоксидантов в определённой степени ( $28 \pm 4\%$ ) защищала клетки. Исследуемые препараты на ранней стадии репликации вируса (через 60 мин после заражения) демонстрировали умеренную вирусингибирующую активность:  $21 \pm 4$  и  $40 \pm 5\%$  соответственно. При этом вирусингибирующая активность ацикловира в этом случае была существенно выше –  $78 \pm 6\%$  (см. рис. 1).

Таблица 1

### Цитотоксическая и противовирусная (анти-ВПГ-2) активность препаратов в культуре клеток Vero

Препараты	СС <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	SI
Гистохром	62,5 ± 3,5	20,8 ± 2,3	3,0 ± 0,4
Композиция антиоксидантов	72,8 ± 4,1	13,1 ± 1,1*	5,7 ± 0,5*
Ацикловир	1250 ± 115	11,5 ± 0,9	108,7 ± 9,9

Примечание. СС<sub>50</sub> – 50% цитотоксическая концентрация препаратов; IC<sub>50</sub> – 50% ингибирующая концентрация препаратов; SI – селективный индекс препаратов; \* статистически значимые различия между гистохромом и композицией антиоксидантов ( $p \leq 0,05$ ).

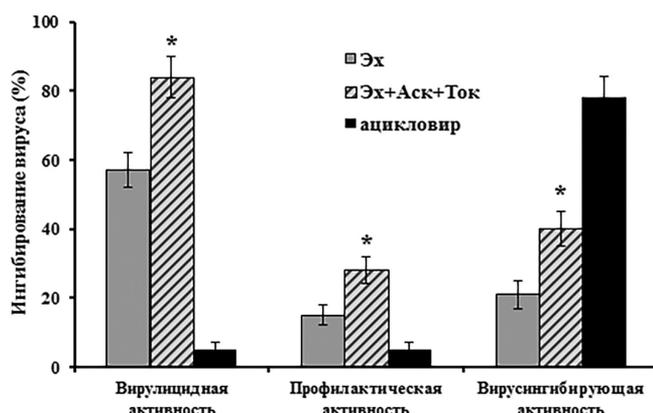


Рис. 1. Противовирусное действие препаратов на различных стадиях репликационного цикла ВПП-2.

\* статистически значимые различия между действием гистохрома (Эх) и композицией антиоксидантов (Эх + Аск + Ток) ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 2

**Защитное действие препаратов у мышей, инфицированных ВПП-2**

Группа	Число выживших мышей/общее количество животных	Индекс защиты, %	Средняя продолжительность жизни мышей, дни
Гистохром (1 мг/кг) внутривбрюшинно	3/10	22,2	13,4 ± 2,2
Гистохром (2 мг/кг) внутривбрюшинно	7/10*	66,7	17,3 ± 1,5*
Композиция антиоксидантов (2 мг/кг) перорально	3/10	22,2	14,8 ± 2,4
Композиция антиоксидантов (4 мг/кг) перорально	9/10*	88,9	19,7 ± 1,3*
Ацикловир (50 мг/кг) внутривбрюшинно	10/10*	100	21,0 ± 0,5*
Ацикловир (50 мг/кг) перорально	6/10*	55,6	16,1 ± 1,9*
Контроль (+)	1/10	-	9,7 ± 2,6
Контроль (-)	10/10	100	> 21,0

Примечание. Индекс защиты рассчитывали по формуле:  $(L_c - L_e) / L_c \cdot 100\%$ , где  $L_c$  – летальность в контрольной (+) группе;  $L_e$  – летальность в опытной группе; \* статистически значимые различия между показателями опытной и контрольной (+) групп ( $p \leq 0,05$ ). Контроль (+) – инфицированные нелеченные животные; контроль (-) – неинфицированные нелеченные животные.

*Эффективность противовирусного действия препаратов при развитии генитального герпеса у мышей.* После внутривагинального заражения ВПП-2 у животных развивался генитальный герпес. Клинические симптомы болезни появлялись с 5-го дня после инфицирования. При этом наблюдалось снижение массы тела, появление отёка и гиперемии в области влагалища, выделений из влагалища, отмечалось снижение физической активности животных, уменьшение потребления ими корма и воды, а через 7 дней у мышей, как правило, развивался парез задних конечностей. Средняя продолжительность жизни животных в контрольной (+) группе составила  $9,7 \pm 2,6$  дня (табл. 2).

Введение инфицированным мышам исследуемых нами препаратов вызывало дозозависимый противовирусный эффект, который заключался в уменьшении клинических симптомов болезни и смертности среди животных. Парентеральное введение мышам гистохрома в дозе 2 мг/кг защищало от гибели 66,7% животных и увеличивало среднюю продолжительность жизни мышей по сравнению с контролем (+) более, чем на 7 сут. Кроме того, в данной концентрации гистохром эффективно препятствовал снижению массы тела больных животных. Введение этого препарата в концентрации 1 мг/кг увеличивало срок жизни больных мышей на 4 дня, однако недостаточно успешно ограничивало сниже-

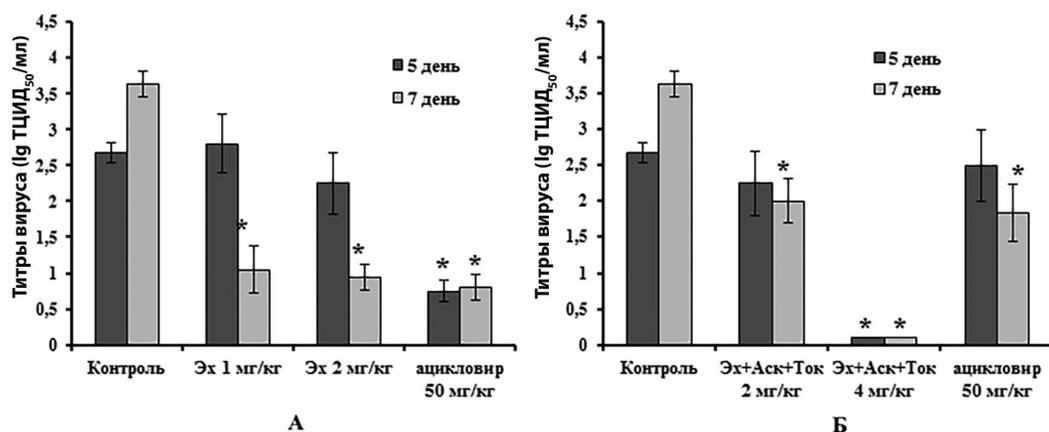


Рис. 2. Влияние препаратов на динамику изменений титров вируса в вагинальных смывах мышей, инфицированных ВПП-2.

А – внутрив брюшинное введение гистохрома (Эх) и ацикловира; Б – пероральное введение композиции антиоксидантов (Эх + Аск + Ток) и ацикловира; \* статистически значимые различия между показателями опытной и контрольной (+) групп ( $p \leq 0,05$ ). Контроль – инфицированные животные, не получавшие лечения.

ние их массы тела. В то же время лечение ацикловиром (50 мг/кг) полностью предотвращало гибель больных мышей – индекс защиты составил 100% (см. табл. 2).

Пероральное введение больным мышам композиции антиоксидантов в дозе 4 мг/кг защищало от гибели 88,9% животных (см. табл. 2). Их средняя продолжительность жизни увеличилась на 10 дней, а средняя масса тела достоверно не отличалась от соответствующего показателя у здоровых мышей. В то же время индекс защиты, обусловленный пероральным введением ацикловира (50 мг/кг), был меньше и составил лишь 55,6%. Кроме того, у этих животных установлено статистически значимое снижение средней массы тела.

*Влияние препаратов на динамику титра вируса в вагинальных смывах мышей, инфицированных ВПП-2.* Опыты *in vivo* показали, что ВПП-2 реплицируется в клетках эпителия влагалища мышей, достигая к 7-м суткам у животных контрольной группы (инфицированных вирусом мышей, не получавших лечения)  $3,63 \pm 0,18 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$  (рис. 2). Парентеральное введение гистохрома (в дозах 1 и 2 мг/кг) вызывало статистически значимое (до  $\sim 1,0 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$ ) снижение титра вируса в вагинальных смывах животных ( $p \leq 0,05$ ) (см. рис. 2А). Ацикловир (50 мг/кг) также ослаблял репликацию вируса в клетках вагинального эпителия по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ( $p \leq 0,05$ ) уже к 5-м суткам.

У животных, которым перорально вводили композицию антиоксидантов (2 мг/кг) и ацикловир (50 мг/кг), лишь на 7-е сутки после заражения в эпителии влагалища снижалась репликация до  $\sim 2 \text{ lg TCID}_{50}/\text{мл}$  ( $p \leq 0,05$ ) (см. рис. 2Б). В вагинальных смывах животных, получавших перорально 4 мг/кг композиции антиоксидантов, на 5-е и 7-е сутки после заражения вирус определялся в незначительном количестве (см. рис. 2Б).

## Обсуждение

Известно, что при инфекциях, вызываемых ВПП-1 и -2, наблюдается увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) и усиление перекисного окисления липидов – процессов, способствующих активной репликации вирусов [14, 15]. Ранее [16] нами была показана способность эхинохрома А и композиции антиоксидантов на его основе снижать образование АФК (на модели липополисахарид-индуцированного образования АФК в культуре клеток Vero) и подавлять репликацию таких нейротропных вирусов, как ВПП-1 и вирус клещевого энцефалита. При этом композиция

антиоксидантов, состоящая из эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола (5 : 5 : 1), демонстрировала более высокий уровень антиоксидантной и противовирусной активности, чем один эхинохром А. В настоящем исследовании было показано, что эхинохром А и его композиция с антиоксидантами способны подавлять репликацию как *in vitro*, так и *in vivo* ещё одного патогена – ВПГ-2, вызывающего у человека генитальный герпес.

Установлено, что эхинохром А в сочетании с аскорбиновой кислотой и  $\alpha$ -токоферолом эффективно блокирует в культуре клеток Vero цитопатогенное действие ВПГ-2.  $IC_{50}$  данной композиции была в 1,5 раза ниже, а SI, соответственно, выше, чем одного эхинохрома (см. табл. 1). При исследовании действия данных соединений на различные стадии жизненного цикла ВПГ-2 было установлено, что обработка вируса этими препаратами перед заражением клеток вызывает так называемый вирулицидный эффект, подавляя на ранних стадиях инфекции репликативную активность ВПГ-2 (см. рис. 1). Было сделано предположение, что вирулицидная активность тестируемых нами соединений связана с их способностью непосредственно влиять на гликопротеины вирусной оболочки, нарушая взаимодействие вирусных частиц и заражаемых клеток. Показано, что некоторые нафтохиноны демонстрировали подобный механизм ВПГ-2-ингибирующего действия [17, 18]. Необходимо отметить, что ацикловир в отличие от гистохрома и композиции антиоксидантов в этих условиях не проявлял вирулицидную активность по отношению к ВПГ-2.

Стабильная масса тела заражённых животных, увеличение средней продолжительности жизни, а также снижение вирусной нагрузки под воздействием противовирусных препаратов – наиболее надёжные критерии эффективности тестируемых нами соединений. Было показано, что введение животным гистохрома или композиции антиоксидантов после их внутривагинального заражения ВПГ-2 сопровождается выраженным дозозависимым противовирусным эффектом (см. табл. 2), при этом способ введения препаратов имеет определяющее значение. Так, при интраперитонеальном введении гистохрома (2 мг/кг) защитный индекс составил 66,7% (после введения ацикловира 50 мг/кг он был 100%). При пероральном введении животным композиции антиоксидантов (4 мг/кг) защитный индекс существенно возрастал и составлял уже 88,9%, (после введения ацикловира (50 мг/кг) этот показатель был значительно ниже – 55,6%). При этом у мышей, противовирусная защита которых осуществлялась с помощью тестируемых нами препаратов, по сравнению с животными контрольной группы (см. рис. 2) увеличилась средняя продолжительность жизни, незначительно снизилась масса тела, а также статистически достоверно уменьшилась вагинальная вирусная нагрузка на ранней стадии инфекции. По-видимому, обнаруженный нами протективный эффект, вызываемый гистохромом и композицией антиоксидантов на его основе, обусловлен как прямым вирусингибирующим действием, так и выраженной антиоксидантной активностью этих препаратов.

Таким образом, нами впервые выявлена способность гистохрома, а также композиции антиоксидантов активно подавлять репликацию ВПГ-2 *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты расширяют спектр патогенных агентов, в отношении которых данные соединения демонстрировали противовирусную активность. Вероятно, в перспективе эти соединения можно использовать в качестве лекарственных средств при терапии вирусных инфекций.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект RFMEF161317X0076).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4-9, 11-18 см. REFERENCES)

3. Куханова М.К., Коровина А.Н., Кочетков С.Н. Вирус простого герпеса человека: жизненный цикл и поиск ингибиторов. *Успехи биологической химии*. 2014; 54: 457-94.
10. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Ильницкий А.П., Травкин А.Г., Трещалина Е.М., Андропова Н.В. Действие природного антиоксиданта эхинохрома на рост подкожно перевитой аденокарциномы Эрлиха. *Российский онкологический журнал*. 2003; (5): 32-6.

## REFERENCES

1. WHO. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018. Geneva; 2018.
2. Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(1): e114989. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114989>
3. Kukhanova M.K., Korovina A.N., Kochetkov S.N. Human Herpes simplex virus: life cycle and the search for inhibitors. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2014; 54: 457-94. (in Russian)
4. Klysik K., Pietraszek A., Karewicz A., Nowakowska M. Acyclovir in the Treatment of Herpes Viruses – a Review. *Curr. Med. Chem.* 2018; Mar 8. Doi: <https://doi.org/10.2174/0929867325666180309105519>
5. Elyakov G.B., Maximov O.B., Mischenko N.P., Koltsova E.A., Fedoreev S.A., Glebko L.I., et al. Composition Comprising di-and Trisodium Salts of Echinochrome for Treating Ocular Conditions. European Patent № 1121929; 2004.
6. Elyakov G.B., Maximov O.B., Mischenko N.P., Koltsova E.A., Fedoreev S.A., Glebko L.I., et al. Drug preparation “Histochrome” for treating acute myocardial infarction and ischemic heart diseases. European Patent № 1121930; 2007.
7. Stonik V.A., Gusev E.I., Martynov M.Yu., Guseva M.R., Shchukin I.A., Agafonova I.G., et al. New medications for treatment of hemorrhagic stroke. High-resolution MRI in evaluation of histochrome in experimental hemorrhagic stroke. *Dokl. Boil. Sci.* 2005; 405: 421-3.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
9. Weislow O.S., Kiser R., Fine D.L., Bader J., Shoemaker R.H., Boyd M.R. New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: Application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81(8): 577-86. Doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/81.8.577>
10. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Il'inskiy A.P., Travkin A.G., Treshchalina E.M., Andronova N.V. The effect of the natural antioxidant echinochrome on the growth of subcutaneously inoculated Ehrlich adenocarcinoma. *Rossiyskiy onkologicheskij zhurnal*. 2003; (5): 32-6. (in Russian)
11. Kern E.R., Richards J.T., Glasgow L.A., Overall J.C. Jr, de Miranda P. Optimal treatment of herpes simplex virus encephalitis in mice with oral acyclovir. *Am. J. Med.* 1982; 73(1A): 125-31. Doi: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(82)90077-8)
12. Prichard M.N., Kern E.R., Hartline C.B., Lanier E.R., Quenelle D.C. CMX001 Potentiates the Efficacy of Acyclovir in Herpes Simplex Virus Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(10): 4728-34. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-11>
13. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent's endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493-7.
14. Cymerys J., Chodkowski M., Słowska A., Krzyzowska M., Bańbura M.W. Disturbances of mitochondrial dynamics in cultured neurons infected with human herpesvirus type 1 and type 2. *J. Neurovirol.* 2019; June 3. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00762-x>
15. Santana S., Sastre I., Recuero M., Bullido M.J., Aldudo J. Oxidative stress enhances neurodegeneration markers induced by herpes simplex virus type 1 infection in human neuroblastoma cells. *PLoS One*. 2013; 8(10): e75842. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075842>
16. Fedoreyev S.A., Krylova N.V., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Pislyagin E.A., Iunikhina O.V., et al. Antiviral and antioxidant properties of echinochrome A. *Mar. Drugs*. 2018; 16(12). Doi: <https://doi.org/10.3390/md16120509>
17. Boominathan S.P., Sarangan G., Srikakulapu S., Rajesh S., Duraipandian C., Srikanth P. Antiviral activity of bioassay guided fractionation of Plumbago Zeylanica roots against Herpes simplex virus type 2. *WJPPS*. 2014; 3(12): 1003-17.
18. Roa-Linares V.C., Miranda-Brand Y., Tangarife-Castaño V., Ochoa R., García P.A., Castro M.Á., et al. Anti-Herpetic, Anti-Dengue and Antineoplastic Activities of Simple and Heterocycle-Fused Derivatives of Terpenyl-1,4-Naphthoquinone and 1,4-Anthraquinone. *Molecules*. 2019; 24(7). Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24071279>

Поступила 02.09.19

Принята в печать 24.09.19