

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-9-3-8
© Коллектив авторов, 2019

Е. А. Новоселова^{1*}, О. Б. Рябова¹, И. А. Ленева², В. А. Макаров¹

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПИРИМИДИН-ДИСПИРОТРИПИПЕРАЗИНИЯ В МОНОТЕРАПИИ И В КОМБИНАЦИИ С АЦИКЛОВИРОМ НА МОДЕЛИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ Институт биохимии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33 – 26.

² НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, 5.

* e-mail: helen.novoselova@gmail.com

В противовирусной терапии инфекций, вызываемых вирусом простого герпеса, применяются аналоги ингибиторов вирусной ДНК-полимеразы нуклеозидов, которые эффективны, но, в связи с широким применением в клинической практике, все чаще встречаются штаммы вируса простого герпеса, резистентные к данной терапии. Ранее синтезированное нами соединение PDSTP (фармацевтическая субстанция соединения пиримидин-диспиротрипиперазиния – 3,3'-(2-метил-5-нитропиримидин-4,6-диил)бис-3,1,2-диаза-6,9-диазониадиспиро[5.2.5.2]гексадекан тетрагидрид дигидрохлорида) в экспериментах *in vitro* обладало высокой противогерпетической активностью. Проведена оценка противогерпетической эффективности новой субстанции на модели герпетического энцефалита мышей при различных схемах лечения (внутрибрюшинное и пероральное введение, монотерапия и комбинированная терапия с ацикловиром).

Ключевые слова: пиримидин-диспиротрипиперазиний; ацикловир; вирус простого герпеса; ВПГ-1; герпетический энцефалит.

Герпес является одной из самых распространенных вирусных инфекций в истории человека, демонстрируя все признаки эпидемии, и занимает второе место после ОРВИ и гриппа в структуре инфекционной патологии [1, 2].

Преобладающей противовирусной терапией инфекций, вызываемых вирусом простого герпеса (ВПГ), являются аналоги ингибиторов нуклеозидов, такие как ацикловир, его пролекарственная форма валациклоvir, фамциклоvir (пролекарственная форма пенцикловира) и вторая линия препаратов для резистентных штаммов ВПГ — фоскарнет и цидофовир. Эти лекарственные средства являются ингибиторами вирусной ДНК-полимеразы [3] и, как препараты прямого действия, обладают доказанной эффективностью. Но их внедрение в широкую клиническую практику привело к селекции резистентных штаммов ВПГ. В связи с вышесказанным выбор схем терапии и профилактики герпесвирусных инфекций крайне ограничен [4], поэтому проблема поиска новых и оптимизации существующих химиопрепаратов остается актуальной.

Один из перспективных подходов в этом направлении основан на обнаружении новых противовирусных соединений, воздействующих на различные, предпочтительно наиболее ранние стадии жизненного цикла ВПГ, такие как прикрепление и внедрение его в клетку хозяина. Актуальным остается также вопрос комбини-

рованного использования препаратов с разными механизмами действия, что отражается не только в синергетическом эффекте терапии, но и в формировании более высокого генетического барьера для развития резистентности вирусов герпеса.

Соединение пиримидин-диспиротрипиперазиния (далее фармацевтическая субстанция PDSTP (I)) в экспериментах *in vitro* обладало высокой противогерпетической активностью в культуре клеток [5]. Изучение механизма действия соединения показало, что оно обладает способностью специфически блокировать гепарансульфат (HS) содержащие рецепторы на клеточной стенке и, как следствие, предотвращать адсорбцию вирусов к клеткам хозяина [6].

Целью настоящего исследования явилась оценка противогерпетической эффективности субстанции I на модели герпетического энцефалита мышей при различных схемах лечения (внутрибрюшинное и пероральное введение, монотерапия и комбинированная терапия с ацикловиром).

Экспериментальная часть

В исследованиях использовали фармацевтическую субстанцию пиримидин-диспиротрипиперазиния I [5]. В качестве препарата сравнения использовали ацикло-

вир, 9-(2-гидроксиэтоксиметил)гуанин (ампулы, Зовиракс, Glaxo Smith Klein, Польша).

Соединения и препараты разводили в стерильной дистиллированной воде непосредственно перед введением животным таким образом, чтобы в объеме 200 мкл содержалась указанная доза. Дозы рассчитывали в относительных весовых единицах — мг/кг массы тела животных.

Использовали мышей линии BALB/c (самки массой 12 – 14 г, питомник РАМН “Андреевка”, Московская обл.). Содержание животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Исследования были проведены в соответствии с этическими нормативными документами, действующими на территории РФ, после утверждения Этического комитета ФГБУ НИИВС имени И. И. Мечникова [7 – 9].

В работе использовали перевиваемую культуру клеток *Vero* (ATCC, American Type Culture Collection). Клетки культивировали в среде роста: DMEM (минимальная среда ИГЛА в модификации Дульбекко, “ПанЭко”, Россия) с добавлением 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, “ПанЭко, Россия), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США) и антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Клетки инкубировали в термостате в атмосфере 5 % CO₂ при + 37 °С.

В опытах использовали вирус простого герпеса 1-го антигенного типа, штамм VR-3 (АТТС), штамм “Кл” (НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского). Титр вируса оценивали по стандартной методике, описанной ниже. Использовали вирусы в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром 6,0 lg ТЦИД₅₀/мл (тканевая цитопатическая инфекционная доза). Все полученные вирусы хранили в аликвотах замороженными при – 80 °С.

Модель герпетического энцефалита мышей воспроизводили на мышах при внутрибрюшинном способе заражения. В предварительных экспериментах была определена доза вируса, вызывающая 100 % гибель в группе вирусного контроля 10 МЛД₅₀ (летальная доза для мышей), которую затем использовали в экспериментах при заражении животных. Мыши BALB/c (самки массой 12 – 16 г) были инфицированы вирусом (титр вируса 10⁵ ТЦИД₅₀/мл соответствует 10 МЛД₅₀) с использованием стерильного одноразового шприца с иглой 25G в брюшную вену, вводя вирус в объеме 100 мкл. После этого животные были снова помещены в клетки.

Препараты применяли внутрибрюшинно и перорально по схеме: за 2 ч до инфицирования, далее через 6 ч, далее в течение последующих 7 дней 2 раза в день с перерывом в 10 ч. Обычно лечение проводили в 9 утра и 7 часов вечера. Для перорального введения использовали одноразовый инсулиновый шприц со специальной иглой (лаваж), взвесь вводили мышам внутрижелудочно в объеме 200 мкл.

Изначально в каждой группе было по 10 животных. В некоторых группах при заражении под влиянием

наркоза, а также в 1-й и 2-й день лечения погибли по 1 – 2 мыши, поэтому в дальнейшем такие группы рассматривали как содержащие 9 и 8 животных соответственно. За лечеными и контрольными животными велось ежедневное наблюдение в течение 21 дня. В первые 5 дней после инфицирования мышей взвешивали каждый день, далее — через 1 день. Химиотерапевтическую активность соединений оценивали по 3 критериям: показатель защиты от смертельной вирусной инфекции, увеличение средней продолжительности жизни и уменьшение снижения массы в группах животных, леченных препаратом, по сравнению с контрольной группой. Среднюю продолжительность жизни мышей рассчитывали по формуле:

$$MSD = \Sigma f(d - 1)/n,$$

где f — количество мышей, погибших на день d , выжившие мыши также включены в f , и d в этом случае равно 21; n — количество мышей в группе. Уменьшение или увеличение массы рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах. При этом за 100 % принимали массу животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение процента потери или увеличения массы.

В части опытов с использованием модели герпетического энцефалита мышей на 5 день после инфицирования в каждой изучаемой группе забивали по 3 мыши, в стерильных условиях из них извлекали мозг. После трехкратной промывки в растворе ФСБ мозг мышей гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса 25 тракциями и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного раствора ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса при 2000 g в течение 10 мин и далее супернатант отбирали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток.

Титрование вируса для заражения и из биоматериала животных (супернатант из мозга) проводили в культуре клеток *Vero* с использованием стандартного метода [11]. Для этого клетки помещали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток с плоским дном (Costar, 35000 клеток/луноку) и выращивали до полного монослоя. Перед заражением вирусом клетки 2 раза промывали средой без сыворотки. Из вирусосодержащей жидкости или из мозговой суспензии готовили 10-кратные разведения на среде DMEM с 2 % ЭТС. В качестве контроля служила интактная культура клеток (негативный контроль). Далее клетки инкубировали в термостате при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 5 сут. Клеточный монослой ежедневно просматривали под световым микроскопом с целью оценки степени его интактности и обнаружения специфического цитопатического действия вируса (ЦПД). Учет результатов оценивали визуально, используя инвертированный микроскоп LABOVERT FS (фирмы “Leitz”). Цитопатические изменения, которые выражались в образовании многоядерных гигантских клеток в виде симпластов (характерное ЦПД для ВГП-1), оценивали по следующей шкале: + — незначительные из-

менения в монослое (25 %); ++ — наличие небольших разрывов в монослое (50 %); +++ — разрушение около 50 % монослоя (75 %); ++++ — практически полное разрушение монослоя (100 %). Для подтверждения визуального определения цитопатического действия образцов использовали количественный метод подсчета живых и мертвых клеток с использованием красителя Neutral Red (NR). После промывки клеток (3 раза) раствор NR (концентрация 1,11 мкг/мл) вносили по 50 мкл в каждую лунку планшета, после инкубации в течение 2 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ планшеты трижды промывали и вносили по 100 мкл раствора 50 % EtOH/ 50 % 0,1 М NH₄H₂PO₄ (рН 3,5). Через 30 мин инкубации проводили измерение ОП (оптической плотности) на спектрофотометре при длине волны 490 нм. Положительной считали лунку, в которой значение ОП было на 20 и более % ниже, чем в клетках клеточного контроля. Инфекционный титр вируса определяли по 4 повторностям каждой пробы по методу Рида и Менча [10] и выражали в log₁₀ ТЦИД₅₀/0,1 мл. Каждое значение титра вируса из биоматериала животных (мозга) представляет среднее арифметическое титров вируса от 5 животных.

Статистическую обработку полученных данных проводили общепринятыми методами вариационной статистики, доверительный интервал для 95 % вероятности.

Результаты и их обсуждение

Эффективность субстанции I на модели энцефалита мышей, вызванного внутрибрюшинным заражением ВПГ-1. Изучение эффективности субстанции I проводили на модели энцефалита мышей, вызванного внутрибрюшинным заражением ВПГ-1,

приводящим к острому системному заболеванию с полным поражением ЦНС и дальнейшим распространением вируса по всем органам и тканям. Заражение мышей проводилось 2 различными штаммами ВПГ-1 (см. выше). В группах нелеченных животных (группа вирусного контроля), зараженных ВПГ-1 штамм “Кл” и VR-3, погибли все инфицированные мыши, средняя продолжительность их жизни составляла 6,2 – 6,7 дня. В этой серии экспериментов было использовано пероральное и внутрибрюшинное применение субстанции при лечебно-профилактической схеме (за 2 ч до инфицирования, далее через 6 ч, далее в течение последующих 7 дней 2 раза в день с перерывом 10 ч). В качестве препарата сравнения при обоих путях введения использовали ацикловир. Для заражения обоими штаммами ВПГ-1 была использована определенная в предварительных экспериментах на мышах доза вирусов 10 МЛД₅₀.

Пероральное введение субстанции I и ацикловира. В первой серии экспериментов в условиях данной модели показано, что пероральное применение субстанции I в дозах 40 и 60 мг/кг/день, а также ацикловира в дозе 100 мг/кг/день было неэффективно у мышей, инфицированных внутрибрюшинно ВПГ-1 штамм “Кл”. Данное лечение не влияло на выживаемость животных, не увеличивало среднюю продолжительность жизни, не снижало потерю массы тела по сравнению с группой вирусного контроля (табл. 1).

В дозе 40 мг/кг/день при пероральном введении мышам, зараженным другим штаммом ВПГ-1, VR-3 также было неэффективно, однако увеличение дозы до 60 мг/кг/день при таком же способе введения и по такой же схеме было сравнимо с применением ацикловира в дозе 100 мг/кг/день. В этих опытах применение препарата защищало 30 – 40 % животных, увеличивая

Таблица 1
Эффективность субстанции I и ацикловира в монотерапии при пероральном и внутрибрюшинном введении на модели герпетического энцефалита мышей при внутрибрюшинном заражении ВПГ-1 различными штаммами

| Доза, мг/кг/день | Штамм “Кл” | | | | Штамм VR-3 | | | |
|---------------------------------------|--------------|----------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|----------|--------------------------------|--------------------------------------|
| | выживаемость | | показатель защиты от гибели, % | средняя продолжительность жизни, дни | выживаемость | | показатель защиты от гибели, % | средняя продолжительность жизни, дни |
| | живые/общее | % гибели | | | живые/общее | % гибели | | |
| Субстанция I (перорально) | | | | | | | | |
| 40 | 0/10 | 100 | 0 | 7,5 | 1/10 | 90 | 10 | 7,5 |
| 80 | 0/10 | 100 | 0 | 5,1 | 3/10 | 70 | 30 | 2,1 |
| Ацикловир (лечение перорально) | | | | | | | | |
| 100 | 0/10 | 100 | 0 | 6,5 | 4/10 | 60 | 40 | 11,3 |
| Субстанция I (внутрибрюшинно) | | | | | | | | |
| 10 | 0/10 | 100 | 0 | 5,9 | 1/9 | 89 | 11 | 6,4 |
| 20 | 2/10*** | 80 | 20 | 8,7 | 2/9 | 78 | 22 | 8 |
| 50 | 4/8* | 50 | 50 | 13,75 | 6/10 | 40 | 60 | 15,8 |
| 70 | 0/10 | 100 | 0 | 6 | 0/10 | 100 | 0 | 5,1 |
| Ацикловир (внутрибрюшинно) | | | | | | | | |
| 50 | 9/10** | 10 | 90 | 18,5 | 10/10 | 0 | 100 | 15 |
| Вирусный контроль | | | | | | | | |
| | 0/10 | 100 | | 6,7 | 0/10 | 100 | | 6,2 |

* $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,5$.

среднюю продолжительность жизни в 1,8 – 1,9 раза (табл. 1).

Данные об эффективности субстанции I и ацикловира при внутрибрюшинном заражении мышей штаммом “Кл” позволили в следующей серии экспериментов изучить их комбинированное действие при пероральном введении (табл. 2). По результатам предыдущего эксперимента были отобраны 2 дозы субстанции I — 50 и 70 мг/кг/день, и ацикловир в дозе 50 мг/кг/день. При заражении животных ВПГ-1 штамм “Кл”, вызывающим гибель 100 % животных в группе вирусного контроля, пероральное применение субстанции I и ацикловира по отдельности было практически неэффективно, в отличие от применения комбинации субстанции I (50 мг/кг/день) с ацикловиром (50 мг/кг/день). При комбинации субстанции I в наиболее высокой из изученных доз (70 мг/кг/день) с ацикловиром (50 мг/кг/день) применение было практически неэффективно и сравнимо по всем параметрам с применением каждого препарата в соответствующей дозе в отдельности.

Внутрибрюшинное введение субстанции I и ацикловира. В этой же серии экспериментов на мышах, инфицированных внутрибрюшинным введением ВПГ-1 штаммами “Кл” и VR-3, была изучена эффективность субстанций I при внутрибрюшинном применении. При аналогичном режиме применения за 2 ч до инфекции, далее в течение 5 дней 2 раза в день (внутрибрюшинно) эффективность субстанции I зависела от дозы и была равнозначна, вне зависимости от штаммов. Применение субстанции I в дозе 10 мг/кг/день было практически неэффективно, увеличение дозы до 20 мг/кг/день приводило к незначитель-

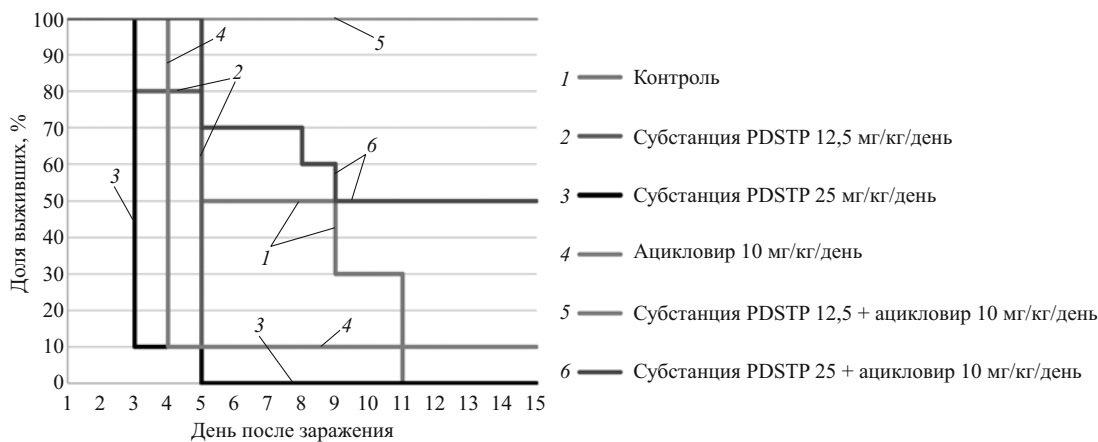
ному увеличению эффективности, защищая 20 – 22 % животных, увеличивая среднюю продолжительность жизни в 1,3 раза и снижая потерю массы по сравнению с группой вирусного контроля. Наиболее эффективным при заражении обоими штаммами было применение субстанции I в дозе 50 мг/кг/день, снижающее гибель на 50 – 60 %, увеличивающее среднюю продолжительность жизни в 2 – 2,5 раза, и снижающее потерю массы мышей. Однако при дальнейшем увеличении дозы субстанции I до 70 мг/кг/день применение было неэффективно из-за проявления токсических свойств соединения. Внутрибрюшинное введение препарата сравнения ацикловира в дозе 50 мг/кг/день полностью защищало от гибели инфицированных мышей. Полученные нами данные по защитному действию ацикловира при пероральном и внутрибрюшинном введении на модели герпетического энцефалита мышей, вызванного их внутрибрюшинным заражением в этом эксперименте, совпадают с ранее полученными данными литературы и подтверждают адекватность модели для изучения противогерпетической активности препаратов [11, 12].

Эффективность комбинированного действия субстанции пиримидин-диспиротрипиперазиния и ацикловира на модели энцефалита мышей, вызванного внутрибрюшинным заражением ВПГ-1. Данные об эффективности внутрибрюшинного применения субстанции I на модели герпетического энцефалита мышей, вызванного внутрибрюшинным заражением, во второй серии опытов позволили изучить комбинированное действие данной субстанции и ацикловира. Чтобы выявить эффект комбинации были использованы препараты в низких дозах. Заражение

Таблица 2
Эффективность субстанции I, ацикловира и их комбинированного применения на модели герпетического энцефалита мышей при внутрибрюшинном заражении ВПГ-1 штамм “Кл” при пероральном и внутрибрюшинном применении

| Доза препарата, мг/кг/день | Выживаемость | | Показатель защиты от гибели, % | Средняя продолжительность жизни, дни |
|---|--------------|----------|--------------------------------|--------------------------------------|
| | живые/общее | % гибели | | |
| Субстанция I (перорально) | | | | |
| 50 | 3/9* | 67 | 33 | 10,4 |
| 70 | 1/9*** | 89 | 11 | 6 |
| Ацикловир (перорально) | | | | |
| 50 | 0/8 | 100 | 0 | 4,25 |
| Комбинация ацикловира 50 мг/кг/день (перорально) | | | | |
| 50 | 5/9* | 45 | 55 | 14,1 |
| 70 | 1/8*** | 88 | 12 | 8,5 |
| Субстанция I (внутрибрюшинно) | | | | |
| 12,5 | 0/10 | 100 | 0 | 3,6 |
| 25 | 0/10 | 100 | 0 | 2,2 |
| Ацикловир (внутрибрюшинно) | | | | |
| 10 | 1/9*** | 89 | 11 | 4,9 |
| Комбинация ацикловира 10 мг/кг/день (внутрибрюшинно) | | | | |
| 12,5 | 10/10 | 0 | 100 | 15 |
| 25 | 5/10* | 50 | 50 | 12,7 |
| Вирусный контроль | | | | |
| | 0/10 | | | 6,6 |

* $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,05$.



Влияние внутрибрюшинного применения субстанции I и ацикловира в отдельности и в комбинации на выживаемость при внутрибрюшинном заражении их ВПГ-1 штамм "Кл".

ВПГ-1 штамм "Кл" вызвало 100 % гибель животных в группе вирусного контроля, при этом средняя продолжительность жизни составляла 6,6 дня. Внутрибрюшинное применение по отдельности субстанции I в дозах 25 и 12,5 мг/кг/день или ацикловира в дозе 10 мг/кг/день оказалось неэффективным. Использование комбинации субстанции I в дозе 12,5 мг/кг/день с ацикловиром в дозе 10 мг/кг/день было высокоэффективно и полностью предотвращало гибель животных и потерю их массы. При дальнейшем увеличении дозы в комбинации субстанции I до 25 мг/кг/день при сохранении дозы ацикловира (10 мг/кг/день) не наблюдалось полной защиты от гибели инфицированных животных, лечение все еще было эффективно, при этом показатель защиты от гибели и средняя продолжительность жизни составляли 50 % и 12,7 дня соответственно (табл. 2, рисунок).

Определение титра вируса в мозге мышей, инфицированных внутрибрюшинно ВПГ-1 штамм "Кл", леченных перорально и внутрибрюшинно субстанцией I отдельно и в комбинации с ацикловиром. Данные по эффективности препаратов, полученные с использованием параметров гибели, средней продолжительности жизни и потери массы были подтверждены данными вирусологических исследований. Определение титра вируса в тканях головного мозга животных показало, что максимальным он был в контрольной группе нелеченных животных и составлял $(4,8 \pm 0,28) \lg \text{ТЦД}_{50}$ (табл. 3). Из данных, представленных в табл. 3, видно, что применение у мышей всех изученных препаратов приводит к снижению титра вируса в тканях мозга во всех группах, причем это снижение было неодинаковым. Хотя снижение титра вируса у мышей, леченных субстанцией PDSTP как перорально, так и внутрибрюшинно в низких дозах, не обладающих высокой эффективностью лечения, имело место, оно было статистически недостоверно. Увеличение дозы субстанции I приводило к достоверному снижению титра вируса по сравнению с группой вирусного контроля, но при этом никак не отражалось на клинических параметрах эффективности терапии.

Данные оценки эффективности комбинированного применения препаратов полностью коррелируют с полученными данными снижения титра ВПГ-1 в биологическом материале. Титр вируса в тканях мозга мышей, леченных вышеназванной комбинацией как перорально, так и внутрибрюшинно, был достоверно ниже титра вируса в группе вирусного контроля и у животных, леченных каждым препаратом в таких же дозах и по такой же схеме в отдельности.

Отсутствие усиления эффективности применения при увеличении дозы субстанции I (как при пероральном, так и внутрибрюшинном пути введения) на фоне достоверного снижения титра вируса, по сравнению с группой вирусного контроля, может свидетельствовать о проявлении токсических эффектов субстанции в

Таблица 3
Эффект перорального и внутрибрюшинного применения субстанции в отдельности и в комбинации с ацикловиром на титр ВПГ-1 в тканях головного мозга мышей при их внутрибрюшинном заражении

| Доза препарата, мг/кг/день | Защита от гибели, % | Титр вируса в тканях мозга, $\lg \text{ТЦД}_{50}$ |
|---|---------------------|---|
| Субстанция I (перорально) | | |
| 50 | 33 | $3,5 \pm 0,5$ |
| 70 | 11 | $1,57 \pm 0,4$ |
| Ацикловир (перорально) | | |
| 50 | 0 | $3 \pm 0,5$ |
| Комбинация ацикловир 50 мг/кг/день (перорально) + субстанция I | | |
| 50 | 55 | $1 \pm 0,26$ |
| 70 | 12 | $1 \pm 0,5$ |
| Субстанция I (внутрибрюшинно) | | |
| 12,5 | 0 | $4,07 \pm 0,11$ |
| 25 | 0 | $2,3 \pm 0,57$ |
| Ацикловир (внутрибрюшинно) | | |
| 10 | 11 | $3,43 \pm 0,46$ |
| Комбинация ацикловир 50 мг/кг/день (внутрибрюшинно) + субстанция I | | |
| 12,5 | 100 | $1,4 \pm 0,17$ |
| 25 | 50 | 0 |
| Вирусный контроль | | |
| | | $4,83 \pm 0,26$ |

высоких дозах у зараженных животных. Более высокая эффективность низких доз субстанции I при внутривенном введении, по сравнению с пероральным, возможно, связана с особенностями метаболизма соединений пиримидин-диспиротрипиперазиния и биодоступностью в организме животных. Эти данные, наряду с данными по противовирусной активности субстанции I в культуре клеток [5, 6, 13, 14], подтверждают прямое вирусспецифическое действие субстанции и позволяют предположить высокую эффективность субстанции I при местном применении при герпетической инфекции, но требуют дальнейшего изучения токсичности и фармакокинетики субстанции.

В данных опытах эффективность субстанции I была несколько ниже эффективности используемого в качестве контроля “золотого” стандарта терапии ВПГ-1 ацикловира. Однако использование комбинации субстанции I и ацикловира было более эффективно, чем монотерапия данными препаратами в аналогичных дозах, что выражается в снижении гибели, увеличении средней продолжительности жизни и динамике массы тела животных, а также подтверждается данными титра ВПГ-1 в тканях головного мозга.

Кроме того, сочетанное применение препаратов с прямым противовирусным действием с различными механизмами может стать решением вопроса преодоления устойчивости вируса простого герпеса к существующей терапии соединениями ацикловира за счет сложности формирования генетического барьера для возникновения резистентности, так как в этом случае

от вируса требуется наличие множественных мутаций в генетической структуре.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. К. Львов, И. Ф. Баринский, М. М. Гараев и др., *Актуальные проблемы герпесвирусных инфекций*, Москва (2004).
2. Г. Х. Викулов, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (2009).
3. E. De Clercq, *Nat. Rev. Drug Discov.*, No. 1, 13 – 25 (2002).
4. S. Biswas, S. Sukla, H. J. Field, *Future Med. Chem.*, 6(45), 55 (2014).
5. M. Schmidtke, O. Riabova, H.-M. Dahse, et al., *Antivir. Res.*, No. 55, 117 – 127 (2002).
6. M. Schmidtke, P. Wutzler, V. Makarov, *Let. Drug Design Discov.*, 1(4), 293 – 300 (2004).
7. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Т. 1, Гриф и К, Москва (2012).
8. Приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”, Москва (2010).
9. “*Правила производства и контроля качества лекарственных средств*”, утв. и введено в действие постановлением Госстандарта России от 10 марта 2004 г. № 160-ст), ГФ XI и XII, Москва (2007).
10. Reed L. J., Muench H., *Am. J. Trop. Med. Hygiene*, 27(20), 493 – 497 (1938).
11. D. C. Quenelle, B. Lampert, D. J. Collins, et al., *JID*, No. 202, 1492 – 1499 (2010).
12. B. M. Gebhardt, F. Focher, R. Eberle, et al., *Drug Design, Develop. Ther.*, No. 3, 289 – 294 (2009).
13. R. Peaschke, I. Woskobojsnik, V. Makarov, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58(4), 1963 – 1971 (2014).
14. M. Schmidtke, A. Karger, A. Meerbach, et al., *Virology*, No. 311, 134 – 143 (2003).

Поступила 25.09.18

STUDY OF THE SPECIFIC ANTIVIRAL ACTIVITY OF PYRIMIDINE-DISPIROTRIPERAZINIUM ALONE AND IN COMBINATION WITH ACYCLOVIR ON THE MODEL OF HERPESVIRUS INFECTION

E. A. Novoselova^{1*}, O. B. Ryabova¹, I. A. Leneva², and V. A. Makarov¹

¹ A. N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

² I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia

* e-mail: helen.novoselova@gmail.com

The main antiviral drugs for treating infections caused by the herpes simplex virus (HSV) are analogs of inhibitors of the viral DNA polymerase of nucleosides, which are effective, but, due to widespread use in clinical practice, HSV strains acquired resistance to this therapy. Previously, we synthesized a new pyrimidyl-di(diazaspiroalkane) derivative called PDSTP compound (3,3'-(2-methyl-5-nitropyrimidine-4,6-diyl)-3,12-bis-6,9-diazadiazoniadispiro[5.2.5.2]hexadecane tetrachloride dihydrochloride), which exhibited high antiherpetic activity *in vitro*. In the present experimental work, the antiviral efficacy of PDSTP was evaluated *in vivo* on a model of herpetic encephalitis in mice under various treatment regimens (intraperitoneal and oral administration, monotherapy, and in combined therapy with acyclovir).

Keywords: pyrimidine-dispirotripiperazinium; acyclovir; herpes simplex virus; HSV-1; herpetic encephalitis.