

Ю.Л. Волянський¹, Л.О. Бобрицька²ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ
НА ОСНОВІ ВАЛАЦИКЛОВІРУ¹ДП «Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова» АМН України, м. Харків²Національний фармацевтичний університет, м. Харків**Ключові слова:** протівірусний препарат, валацикловір, таблетки «Герпевал 500».**Ключевые слова:** протівірусний препарат, валацикловир, таблетки «Герпевал 500».**Key words:** antiviral preparation, valaciclovire, «GERPEVAL 500» pills.

Наведено матеріали вивчення специфічної протигерпетичної активності препарату «ГЕРПЕВАЛ 500». Встановлено цитопатичну й протівірусну дію препарату «ГЕРПЕВАЛ 500» відносно штамів герпесу типів 1 і 2 в культурах кліток, що перевиваються, і на курячих ембріонах. Середня цитопатична доза для культур клітин Нер-2 і Tr, а також фібробластів курячого ембріону знаходиться на рівні 1–2 мг/мл. Протигерпетична активність за МІК виявляється в мінімальній дозі 100,0 мкг/мл і не перевищує 500,0 мкг/мл. Досліджуваний препарат «ГЕРПЕВАЛ 500» і препарат порівняння «Вальтрекс™» характеризуються приблизно рівною специфічною активністю відносно вірусів простого герпесу (типи 1 і 2).

Представлены материалы изучения специфической протигерпетической активности препарата «ГЕРПЕВАЛ 500». Установлено цитопатическое и протівірусное действие препарата «ГЕРПЕВАЛ 500» в отношении штаммов герпеса типов 1 и 2 в культурах перевиваемых клеток и на куриных эмбрионах. Средняя цитопатическая доза для культур клеток Нер-2 и Tr, а также фибробластов куриного эмбриона находится на уровне 1–2 мг/мл. Протигерпетическая активность по МИК проявляется в минимальной дозе 100,0 мкг/мл и не превышает 500,0 мкг/мл. Испытуемый препарат «ГЕРПЕВАЛ 500» и препарат сравнения «Вальтрекс™» обладают примерно равной специфической активностью в отношении вирусов простого герпеса (типы 1 и 2).

Materials of studying of specific antiherpetic activity of the preparation «GERPEVAL 500» are represented. Cytopathic and antiviral activity of «GERPEVAL 500» pills in relation to herpes strains of types 1 and 2 in interwined cells cultures and in chicken embryos have been determined. Average cytopathic dose for Нер-2 and Tr cells cultures and chicken embryos fibroblasts was at level 1-2 mg/ml. Antiherpetic activity in the minimum dose 100,0 mkg/ml have been shown. It does not exceed 500,0 mkg/ml. The preparation «GERPEVAL 500» and compared preparation «Valtrex™» have approximately equal specific activity in relation to herpes simplex viruses (types 1 and 2).

Герпетичні інфекції, зумовлені вірусами простого герпесу 1 і 2 типів, посідають одне з перших місць і є найбільш поширеними. Майже 90% населення всього світу інфіковано вірусом простого герпесу. Такому широкому розповсюдженню захворювання сприяє легкість зараження, оскільки вірус проникає в організм різними шляхами (повітряно-крапельним, контактним, статевим), можлива також трансплацентарна передача вірусу. Особливу небезпеку простий герпес представляє для новонароджених. Нині відомо близько 100 герпесвірусів, для людини патогенні 8 з них (табл. 1). Усі ці віруси мають ДНК [1–3].

За сучасною класифікацією, серед вірусів герпесу виділяють 3 групи залежно від типу клітин [4,7], що включаються в інфекційний процес, характеру реплікації вірусу, його білкового складу й структури генома:

- альфа-герпес-віруси: вірус простого герпесу 1 і 2 типів (ВПГ-1 і ВПГ-2), вірус вітряної віспи, вірус оперізуючого лишая;
- бета-герпес-віруси: цитомегаловірус, вірус герпесу людини 6 і 7 типів;
- гамма-герпес-віруси: вірус Епштейна-Барр, вірус герпесу людини 8 типу.

Першим препаратом, що має антивірусну активність, вважається ацикловір. Це ефективний відносно вірусів простого герпесу ВПГ-1 і ВПГ-2 і достатньо безпечний препарат, проте він має відносно низьку біодоступність, що

обмежує можливості його перорального застосування. Цю проблему вирішено синтезом валацикловіру, що є валіновим ефіром ацикловіру і призначений для перорального застосування. За механізмом дії останній схожий з ацикловіром, добре всмоктується при прийомі всередину, метаболізується з утворенням ацикловіру і валіну. Виявляє більш виражену вибірку протівірусну дію, перш за все відносно збудника оперізуючого герпесу [5,6].

МЕТА РОБОТИ

Вивчення специфічної протигерпетичної активності вітчизняного лікарського препарату «ГЕРПЕВАЛ 500», основною діючою речовиною якого є валацикловір.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження є таблетки «ГЕРПЕВАЛ 500» («Фітофарм»). Як препарат порівняння використовували таблетки «Вальтрекс™» виробництва фірми «Glaxo SmithKline», Іспанія.

У роботі використовували тест-штами вірусів: ВПГ-1 – штам Л-2; ВПГ-1 – дикий штам, виділений від хворого на лабіальний герпес у стадії загострення; ВПГ-2 – штам В-314; ВПГ-2 – дикий штам, виділений від хворого на генітальний герпес у стадії загострення. Охарактеризовані стандартні штами депонують у музеї живих культур мікроорганізмів Інституту мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова АМН України.

Герпесвіруси і захворювання, які вони спричиняють

Типи вірусів герпесу	Захворювання
ВПГ-1 (вірус простого герпесу 1 типу)	Ураження: шкіри, слизової оболонки ротової порожнини, кон'юнктиви або рогівки ока, енцефаліт
ВПГ-2 (вірус простого герпесу 2 типу)	Ураження слизових оболонок статевих органів, у новонароджених – центральної нервової системи
ВЗВ (вірус вітрянки)	Вітряна віспа, оперізуючий лишай, постгерпетична невралгія; виразково-некротична форма оперізуючого герпесу
ЦМВ (цитомегаловірус)	Патологія новонароджених; ускладнення після трансплантації органів і кісткового мозку: інтерстиціальна пневмонія, гастроінтестинальні розлади, гепатити
ВЕБ (вірус Епштейна-Барра)	Інфекційний мононуклеоз, лімфома Беккіта, захворювання носоглотки
ВГ-6	Фатальні інтерстиціальні пневмонії та інфекційні розеоли новонароджених
ВГ-7	Виділений у хворих з синдромом хронічної втоми
ВГ-8	Виділений з біоптату хворого на саркому Капоши, асоційований з лімфопрولیферативними захворюваннями

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Метою дослідження ступеня цитотоксичності противірусних засобів відносно культур клітин, що перевиваються, і фібробластів курячих ембріонів у дослідах *in vitro* та *in ovo* стало визначення максимально переносимої дози препарату, що не викликає необоротних морфологічних змін клітин і не призводить до їх загибелі. Цитотоксичність противірусних засобів вивчено в параметрі доз від 200 до 2000 мкг/мл у різних варіантах дослідів [4].

На першому етапі визначено ступінь впливу валацикловіру і вальтрексу на культури клітин, що перевивають, Нер-2 і Тг, а також фібробласти курячих ембріонів (табл. 2).

Таблиця 2
Ступінь цитотоксичної дії противірусних препаратів на культури клітин, що перевивають, і фібробласти КЕ

Препарати	Доза, мкг/мл	Ступінь цитотоксичної дії, бали		
		Нер-2	Тг	КЕ
Контроль без препарату	-	0	0	0
Валацикловір	100,0	0,67±0,05	0,48±0,02	0,36±0,04
	200,0	1,39±0,09	1,06±0,13	0,67±0,07
	500,0	1,84±0,07	1,39±0,09	1,06±0,05
	1000,0	2,67±0,19	1,86±0,15	1,28±0,09
	2000,0	3,96±0,20	3,48±0,18	1,86±0,21
Вальтрекс виробництва фірми Glaxo Smithkline	100,0	0,52±0,06	0,66±0,07	0,41±0,03
	200,0	1,46±0,09	1,12±0,12	0,71±0,11
	500,0	1,87±0,12	1,47±0,17	1,04±0,14
	1000,0	3,14±0,22	1,94±0,11	1,27±0,09
	2000,0	3,87±0,16	3,62±0,22	1,80±0,16

Результати табл. 2 свідчать про те, що у випробуваних дозах досліджувані препарати не проявляють вираженої дії на взяті в експеримент культури клітин, що перевиваються. Достовірно менш чутливими до цитопатичної дії противірусних засобів виявились фібробласти курячих ембріонів. Виходячи цього, додатково досліджено ступінь токсичності препаратів при їх введенні в алантоїсну порожнину неінфікованих курячих ембріонів. Противірусні засоби переводили в рідку фазу з використанням ізотонічного розчину хлориду натрію (рН 7,2) з подальшим перерахунком на активну речовину. В експерименті використано 5- і

10-добові курячі ембріони. Отримані результати свідчать про приблизно рівнозначну ($P>0,5$) ембріотоксичну дію валацикловіру й вальтрексу у використуваних дозах. Більш схильними до цитопатичного впливу виявились 5-добові ембріони, тому в подальших експериментах *in ovo* використані 10-добові курячі ембріони.

Противірусну активність валацикловіру і вальтрексу досліджували на моделі інфікованого вірусами герпесу моношару клітин культур, що перевиваються, Нер-2 і Тг. У попередніх дослідженнях з використанням доз, що в 100–1000 разів вище за передбачувані терапевтичні, доведено порівняно низьку токсичність противірусних засобів відносно культур клітин, що дозволяє в подальших експериментах враховувати її як незначну похибку.

В усіх варіантах експерименту в дозі 500 мкг/мл досліджувані препарати інгібували розвиток бляшок більш ніж у 50% випадків. Порівняно менш чутливим до валацикловіру і вальтрексу в усіх дозах був стандартний штаб Л-2 ВПГ-1. У дозі 50 мкг/мл використано противірусні засоби редукували бляшки обох штабів ВПГ-2 і дикого штабу ВПГ-1 у межах від 60 до 72%, в дозі 100 мкг/мл – від 80 до 93%. Тому дозу препарату, що на 50% зменшує кількість бляшок, вважаємо можливим, з запасом на рівні 20%, прийняти дозу 50 мкг/мл.

Оцінюючи ступінь протигерпетичної активності досліджуваних ліків за основним показником – індексом ефективності – слід зазначити, що всі препарати в дозі до 2000 мкг/мл виявили рівнозначну і вельми високу активність (ІЕ 79,4–83,9), а в дозі 500 мкг/мл – достатньо високу (ІЕ 60,2–63,4).

З використанням цитоморфології вивчено процес зниження кількості клітин, що мають ядерні включення вірусного характеру, під впливом противірусних препаратів у різних дозах. Використовувана методика дозволяє оцінити інтенсивність процесу власне репродукції вірусів. Вона доступна, кількісна, візуальна і досить специфічна. Адсорбцію ВПГ-1 і ВПГ-2 проводили протягом години при кімнатній температурі, відмивали розчином Хенкса від позаклітинного (неадсорбованого) вірусу і додавали досліджувані пре-



Ступінь зниження кількості клітин з герпесвірусними включеннями під впливом різних доз валацикловіру і вальтрексу

Препарат	Доза, мкг/мл	ВПГ-1		ВПГ-2	
		% клітин, що мають ядерні включення	Коефіцієнт редукції	% клітин, що мають ядерні включення	Коефіцієнт редукції
Контроль без препарату	-	100		100	
Валацикловір	100,0	69,7	19,27	62,4	17,22
	200,0	36,4	58,12	26,8	64,07
	500,0	7,8	90,41	3,2	93,12
	1000,0	-	-	-	-
	2000,0	-	-	-	-
Вальтрекс виробництва фірми Glaxo Smithkline	100,0	71,2	17,46	66,8	16,08
	200,0	29,8	60,04	23,5	64,13
	500,0	8,2	90,72	4,3	92,11
	1000,0	-	-	-	-
	2000,0	-	-	-	-

парат у певній концентрації на середовищі 199. Отримані результати наведено в табл. 3.

З даних табл. 3 видно, що в діапазоні доз 500–1000 мкг/мл усі випробовувані противірусні препарати істотно знижували кількість клітин, що мають всередині специфічні ядерні включення (різниця з контролем високодостовірна, а між аналогічними групами недостовірна ($P < 0,5$)). Результати дослідів підтверджують, що мінімальна інгібуюча концентрація валацикловіру і вальтрексу становить 500 мкг/мл [4].

ВИСНОВКИ

1. Вивчено цитопатичну і противірусну дію препарату «ГЕРПЕВАЛ 500» відносно штамів герпесу типів 1 і 2 в культурах клітин, що перевивають, і на курячих ембріонах.

2. Середня цитопатична доза для культур клітин Her-2 і Tr, а також фібробластів курячого ембріону знаходиться на рівні 1–2 мг/мл. Противогерпетична активність зі МК виявляється в мінімальній дозі 100,0 мкг/мл і не перевищує 500,0 мкг/мл.

3. Випробовуваний препарат «ГЕРПЕВАЛ 500» і препарат порівняння «Вальтрекс™» характеризуються приблизно

однаковими значеннями специфічної активності відносно вірусів простого герпесу (типи 1 та 2).

ЛІТЕРАТУРА

1. Панченко Л.А. Синдром хронической усталости и иммунной дисфункции у жителей города Харькова и Харьковской области / Л.А. Панченко, С.В. Брусник, И.И. Торяник [и др.] // *Аннали Мечниковського інституту*. – 2002. – №2–3. – С. 89–92.
2. Дмитриевский Д.И. Технологические аспекты к разработке лекарственного препарата противовирусного действия / Д.И. Дмитриевский, Л.А. Бобрицкая // *Збірн. наук. пр. співр. НМА-ПО ім. П.Л. Шупика*. – 2009. – Вип. 18, кн. 3. – С. 335–340.
3. Книженко О.В. Східчасть противовірусна терапія герпесвірусних енцефалітів / О.В. Книженко // *Клінічна фармація*. – 2004. – Т. 8, №1. – С. 22–25.
4. Отчет о результатах экспериментального исследования специфической активности валацикловира (таблетки по 500 мг) производства ОАО «Фитофарм» / Ин-т микробиол. и иммунол. им. И.И. Мечникова АМН Украины; рук. Волянский Ю.Л.; исполн.: Казмирчук В.В. [и др.]. – Х., 2007. – 24 с.
5. Спосіб лікування та профілактики герпетичних інфекцій: інформ. лист / Д.І. Дмитрієвський, Л.О. Бобрицька, О.М. Нікітенко. – Х., 2010. – Вип.29.: «Фармація». – 4 с.
6. Коржикова Е.Б. «Вульгарный» герпес / Е.Б. Коржикова // *Косметика и медицина*. – 2005. – №3. – С. 54–56.
7. Андреева Е.И. Врожденный токсоплазмоз / Е.И. Андреева // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2006. – №1. – С. 49–52.

Відомості про авторів:

Волянський Ю.Л., д. мед. н., професор, директор ДП «Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечникова» АМН України.
Бобрицька Л.О., к. фарм. н., доцент каф. заводської технології ліків НФаУ.

Адреса для листування:

Бобрицька Лариса Олександрівна. 61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.
Тел: (0572) 67 88 52.