

## **Отчет о работе по теме: действия препарата "Панавир" на синтез белков вируса простого герпеса 1 и 2 типа в клетках, зараженных *in vitro*.**

### **Материалы и методы.**

#### **Вирусы.**

В работе были использованы следующие штаммы ВПГ: ВПГ-1 – штамм F, ВПГ-2 – штамм G, любезно предоставленные проф. Л. Перейра (Медицинский Центр Университета г. Сан-Франциско, Калифорния, США).

#### **Клетки.**

Для анализа анти-ВПГ активности препарата использовали клетки перевиваемой линии Vero, являющиеся высоко чувствительными к ВПГ. Клетки Vero культивировали в среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, глутамина и гентамицина.

#### **Препарат "Панавир".**

Препарат Панавир был предоставлен в виде сухого порошка. Разведения препарата, содержащие различные концентрации Панавира, готовили на питательной среде для выращивания клеток без добавления сыворотки.

#### **Профилактическая схема.**

Для определения профилактического противовирусного эффекта препарата Панавир культуру клеток Vero обрабатывали за 24 часа до инфекции. Использовали следующие концентрации препарата: от 1000 мкг/мл до 2,5 мкг/мл. Клетки инфицировали ВПГ-1 и ВПГ-2 с ИМ от 0,01 БОЕ/мл до 0,00001 БОЕ/мл.

#### **Определение действия на продукцию инфекционную активность вируса.**

Для анализа действия препарата Панавир на инфекционную активность ВПГ-1 и ВПГ-2 препарат вносили в культуру клеток Vero, зараженных ВПГ-1 и ВПГ-2 с ИМ 0,001 БОЕ/кл. и 0,0001 БОЕ/кл. и культивировали до развития полного ЦПД в контроле (без препарата), которое наблюдалось через 4 дня. Вирусосодержащую культуральную жидкость, отобранную на 4 день, вносили в свежие неинфицированные клетки без добавления препарата Панавир. Об инфекционной активности вируса в опытных и контрольных образцах судили по развитию ЦПД.

#### **Влияние препарата Панавир на синтез белков ВПГ в вирулицидной схеме.**

Для оценки влияния препарата Панавир на синтез белков ВПГ, клетки Vero, выращенные на покровных стеклах, заражали ВПГ-1 и ВПГ-2 с ИМ 0,001 и 0,0001 БОЕ/кл. Препарат Панавир в концентрации 10 мкг/мл вносили в момент заражения. Клетки, инфицированные ВПГ-1, фиксировали через 24 и 48 часов. Клетки,

инфицированные ВПГ-2, фиксировали через 48 и 72 часа. Фиксированные препараты клеток окрашивали МКА к сверххранним, ранним и поздним белкам ВПГ методом ИИФ.

#### Результаты.

Ранее нами было показано, что препарат Панавир обладает относительно низким цитотоксическим и антипролиферативным действием в отношении перевиваемых клеток линии Vero: 50%-ная цитотоксическая доза ( $ЦД_{50}$ ) составляет 1000 мкг/мл. Также было показано, что Панавир в концентрации 10 мкг/мл обладал способностью тормозить развитие вирусспецифического ЦПД, вызванного ВПГ-1 и ВПГ-2 при заражении с ИМ 0,001 БОЕ/мл.

Изучение профилактического действия препарата показало, что при концентрации 5,0 мкг/мл препарат Панавир подавлял ЦПД как ВПГ-1, так и ВПГ-2 с ИМ 0,001 БОЕ/кл на 90%, а при концентрации 10 мкг/мл – на 50% (табл.1).

При анализе ИМ 0,0001 БОЕ/мл ВПГ 1 и 2 типа было показано, что препарат Панавир вызывает 50%-ное подавление инфекционной активности вируса при концентрации 2,5 мкг/мл.

Изучение продукции инфекционно активного вируса показало, что происходит торможение вирусспецифического ЦПД на 2-3 суток.

Результаты анализа экспрессии вирусных белков в клетках Vero, обработанных препаратом Панавир в момент заражения, представлены в табл.2. Было показано, что препарат "Панавир" не подавляет экспрессию всех трех исследованных белков ВПГ-1 при заражении с ИМ 0,001 БОЕ/мл через 48 часов после инфицирования. Через 24 часа после заражения ВПГ-1 с ИМ 0,001 и 0,0001 БОЕ/мл наблюдали экспрессию сверххранних и ранних белков. Что касается поздних белков, то было показано, что препарат Панавир подавляет накопление данных белков через 24 часа после инфицирования.

Изучение действия препарата Панавир на экспрессию белков ВПГ-2 показало, что экспрессия сверххранних и ранних белков была одинаковой при заражении с ИМ 0,0001 БОЕ/мл через 48 и 72 часа после инфицирования. Экспрессия поздних белков была низкой (менее 10% окрашенных клеток) при ИМ 0,001 БОЕ/мл через 72 часа после инфицирования и не наблюдалась при остальных вариантах исследования. При заражении клеток Vero ВПГ-2 с ИМ 0,0001 БОЕ/мл было показано, что препарат Панавир полностью подавляет экспрессию всех трех вирусных белков от момента заражения и вплоть до 48 часов после инфицирования.

Таблица 1.

Профилактическое действие препарата "Панавир" на клетки Vero, зараженные ВПГ 1 типа и ВПГ 2 типа

Показатель	ВПГ-1				ВПГ-2			
	<i>Множественность инфицирования, БОЕ/мл.</i>							
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,1	0,01	0,001	0,0001
ИД <sub>50</sub> , мкг/мл	-	-	10	5	-	-	10	5
ИД <sub>95</sub> , мкг/мл	-	-	5	2,5	-	-	5	2,5
ХТИ	-	-	100	200	-	-	100	200

Примечание. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) вычислялся как отношение ЦД<sub>50</sub> к ИД<sub>50</sub>.  
ЦД<sub>50</sub> = 1000 мкг/мл.

Таблица 2.

Экспрессия белков ВПГ-1 и ВПГ-2 в клетках Vero в присутствии препарата "Панавир".

Белки ВПГ	ВПГ-1				ВПГ-2			
	<i>множественность инфицирования, БОЕ/мл</i>							
	0,001	0,0001	0,001	0,0001	0,001	0,0001	0,001	0,0001
	<i>сроки инфицирования, часы.</i>							
	24		48		48		72	
сверхранние (α)	++	+	+++	+++	+	-	++	+
ранние (β)	++	+	+++	+++	+	-	+	+
поздние (γ)	-	-	+++	+	-	-	+	-

Примечание:

- "+" – менее 10% окрашенных клеток;
- "++" – менее 50% окрашенных клеток;
- "+++” – более 50% окрашенных клеток;
- "-" – нет окрашенных клеток.

#### Заключение.

1. Препарат "Панавир" полностью подавляет экспрессию поздних белков ВПГ 1 типа через 24 часа после заражения с ИМ 0,001-0,0001 БОЕ/мл.
2. Препарат "Панавир" полностью подавляет экспрессию поздних белков ВПГ 2 типа через 48 часов после заражения с ИМ 0,001 БОЕ/мл и через 72 часа после заражения с ИМ 0,0001 БОЕ/мл.

3. Препарат "Панавир" полностью подавляет экспрессию всех изученных (сверхранних, ранних и поздних) белков ВПГ 2 типа в течение 48 часов после заражения с ИМ 0,0001 БОЕ/мл.
4. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) для препарата "Панавир", рассчитанный как отношение  $ЦД_{50}/ИД_{50}$ , в условиях наших опытов равен 100-200 для ВПГ 1 и 2 типа в профилактической схеме исследований.

Руководитель  
лаборатории клеточной инженерии  
Профессор

С.н.с. к.б.н

Отчет утверждено.  
Зам. директора НИИ вирусологии  
им. Д.И. Ивановского РАМН  
д.м.н.

*А.А. Куш*  
*Р.Р. Климова*

А.А.Куш

Р.Р. Климова



*П.Г. Дерябин*

П.Г. Дерябин