

## Оригинальные статьи

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

УДК 616-092.6: 615-036.8: 578-76

*Ракитянская И.А.<sup>1</sup>, Рябова Т.С.<sup>1,2</sup>, Тоджибаев У.А.<sup>1</sup>, Калашникова А.А.<sup>3</sup>*

### НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ЛЕЧЕНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВИРУСНОЙ ЭПШТЕЙНА–БАРР ИНФЕКЦИИ

<sup>1</sup>СПб. ГБУЗ «Городская поликлиника № 112», амбулаторное отделение аллергологии-иммунологии и клинической трансфузиологии, 195427, г. Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», 194044, г. Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия

Для корреспонденции: Ракитянская Ирина Анисимовна, д-р мед. наук, проф. амбулаторного отделения аллергологии-иммунологии и клинической трансфузиологии СПб. ГБУЗ «Городская поликлиника № 112», 195427, г. Санкт-Петербург, e-mail: [tat-akyla@inbox.ru](mailto:tat-akyla@inbox.ru)

**Введение.** Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) вызывает рецидивирующие инфекционные мононуклеозоподобные симптомы. Сегодня показано, что яды насекомых и животных являются богатыми источниками антимикробных веществ (пептидов) и содержат широкий спектр активных биологических соединений. Антимикробные пептиды играют важную роль в иммунном ответе врожденного иммунитета хозяина при попадании патогенных микроорганизмов. На основе антимикробных пептидов в России разработан противовирусный препарат аллокин-альфа. Действующим веществом препарата является цитокиноподобный пептид аллоферон.

**Цель исследования** — оценить влияние терапии аллокином-альфа на количество ДНК ВЭБ в образцах слюны и клинические жалобы у больных хронической вирусной Эпштейна–Барр инфекцией (ВЭБИ).

**Материал и методы.** Обследовано 59 больных (45 женщин и 14 мужчин; средний возраст  $32,52 \pm 1,75$  года) хронической ВЭБИ. У больных проводили количественное определение ДНК вируса Эпштейна–Барр в образцах слюны методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 400 копий/мл. Больных разделили на две группы: в 1-ю группу включили 26 больных, которые получали терапию аллокином-альфа (9 инъекций подкожно по 1 мг через день); во 2-ю группу вошли 33 больных, получавших валтрекс (500 мг 2 раза/сут, внутрь) в течение 2 месяцев.

**Результаты.** После терапии аллокином-альфа у 59,67% больных получены отрицательные результаты ПЦР. После двухмесячной терапии валтрексом отрицательные результаты ПЦР получены только у 27,27% больных. При проведении корреляционного анализа выявлено достоверное влияние исходного количества копий ДНК ВЭБ на выраженность клинических жалоб у больных в общей группе больных ВЭБИ.

**Обсуждение.** Аллокин-альфа улучшает распознавание вирус-инфицированных клеток и способствует подавлению репликации вируса.

**Выводы.** Терапия аллокином-альфа может быть рекомендована для лечения хронической ВЭБ-инфекции в дозе 1 мг подкожно через день при курсовой дозе не менее 9 инъекций.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна–Барр; иммунитет; пептиды; терапия; аллоферон.

**Для цитирования:** Ракитянская И.А., Рябова Т.С., Тоджибаев У.А., Калашникова А.А. Новые подходы в лечении хронической вирусной Эпштейна–Барр инфекции. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва.* 2019; 6(1): 19–26. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2019-6-1-19-26>

*Rakityanskaya I.A.<sup>1</sup>, Ryabova T.S.<sup>1,2</sup>, Todzhibaev U.A.<sup>1</sup>, Kalashnikova A.A.<sup>3</sup>*

### NEW APPROACHES IN THE TREATMENT OF CHRONIC VIRAL EPSTEIN-BARR INFECTION

<sup>1</sup>Saint Petersburg Municipal City Polyclinic No 112, St. Petersburg, 195427, Russian Federation;

<sup>2</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044, Russian Federation;

<sup>3</sup>A.M. Nikiforov All-Russian Center for Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, 194044, Russian Federation

**Introduction.** Epstein-Barr virus (EBV) causes recurrent infectious mononucleosis-like symptoms. Today poisons of insects and animals were shown to be rich sources of antimicrobial substances (peptides) and contain a wide range of active biological compounds. Antimicrobial peptides play an important role in the immune response of the host's innate immunity to pathogenic microorganisms. Based on antimicrobial peptides in Russia, an antiviral drug allokin-alpha has been developed. The active ingredient of the drug is cytokine-like peptide alloferon.

**The purpose of the study is** to evaluate the effect of allokin-alpha therapy on the amount of EBV DNA in saliva samples and clinical complaints in patients with chronic Epstein-Barr viral infection (EBI).

**Material and methods.** 59 chronic EBI patients (45 women and 14 men; mean age  $32.52 \pm 1.75$  years) were examined. Patients were subjected to quantitative determination of Epstein-Barr virus DNA in saliva samples by the method of polymerase chain reaction (PCR) with real-time hybridization-fluorescence detection. The analytical sensitivity of the test system is 400 copies/ml. The patients were divided into two groups: 26 patients who received allokin-alpha therapy (9 injections subcutaneously with 1.0 mg every other day) were included in the 1st group; the 2nd group included 33 patients who received Valtrex (500 mg 2 times/day, orally) for 2 months.

**Results.** After treatment with allokin-alpha, negative results of PCR were obtained in 59.67% of patients. After two months of Valtrex therapy, negative PCR results were obtained in only 27.27% of patients. The correlation analysis revealed a significant effect of the initial number of copies of EBV DNA on the severity of clinical complaints in the general group of EBV patients.

**Discussion.** *Allokin-alpha improves the recognition of virus-infected cells and helps to suppress viral replication.*

**Conclusion.** *Allokin-alpha therapy can be recommended for the treatment of chronic EBV infection in a dose of 1 mg subcutaneously every other day with a course dose of at least 9 injections.*

**Key words:** *Epstein-Barr virus; immunity; peptides; therapy; alloferon.*

**For citation:** Rakityanskaya I.A., Ryabova T.S., Todzhibaev U.A., Kalashnikova A.A. New approaches in the treatment of chronic viral Epstein-Barr infection. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal.* 2019; 6 (1): 16–26. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2019-6-1-19-26>

**For correspondence:** Irina A. Rakityanskaya, MD, Ph.D., DSci., professor of the Outpatient Department of Allergology-Immunology and Clinical Transfusiology of the Saint Petersburg Municipal City Polyclinic No 112, St. Petersburg, 195427, Russian Federation. E-mail: [tat-akyla@inbox.ru](mailto:tat-akyla@inbox.ru)

**Information about authors:**

Rakityanskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2524-4602>

Ryabova T.S., <https://orcid.org/0000-0001-9543-9646>

Kalashnikova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5338-0866>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 08.02.2019

Accepted 14.02.2019

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), или вирус инфекционного мононуклеоза, представляет собой прототип персистирующей вирусной инфекции, характеризующейся свойством латентности. Реактивация скрытой инфекции ассоциируется с возобновлением репликации вируса и в конечном итоге с его выходом (shedding) из клетки. В организме хозяина имеются ткани-мишени, специфические для каждого герпесвируса, где вирус персистирует с возможностью входа и выхода из ткани с помощью разработанной им стратегии, в результате которой вирус либо экспрессирует минимальное число вирусных генов в небольшом количестве инфицированных клеток, либо устраняет экспрессию генов на уровне белка. Это приводит к уклонению от иммунного ответа хозяина, в результате вирус остаётся в очень маленьком количестве (1 инфицированная клетка на 5 мл крови) с минимальным воздействием, сохраняясь на всю жизнь. Иногда у иммунокомпетентных лиц (возможно, при первичном инфицировании), ВЭБ вызывает рецидивирующие инфекционные мононуклеозоподобные симптомы, которые фактически определяются как «идиопатические», характеризуются «вирусной персистенцией» и сопровождаются повышенной продукцией антител IgG к капсидному антигену (VCA), раннему антигену (EA) и низкой продукцией или отсутствием антител к ядерному антигену (EBNA) [1]. В 80-х годах прошлого века наибольший интерес стал вызывать синдром хронической усталости, когда именно за его связь с ВЭБ его называли хроническим мононуклеозом или хронической инфекцией ВЭБ. Ранее, в 1983 г. D. Hellmann и соавт. впервые предложили название для этого синдрома: «хроническая активная ВЭБ-инфекция» (Chronic Active EBV infection — CAEBV) [2].

Инфицирование клеток ВЭБ может иметь 2 возможных развития. Литическая инфекция возникает, когда происходит образование вирионов и клетка лизируется, что характерно для эпителиальных и частично плазматических клеток. Альтернативно ВЭБ может индуцировать латентную инфекцию путём генерации эписомы —

кольцевого генома ВЭБ, который расположен в ядре лимфоцитов хозяина. В этом случае эписома остаётся в латентной форме в В-клетках, а вирусная репликация спонтанно активируется только в небольшом количестве латентно инфицированных клеток [3].

Инфицирование ВЭБ-инфекцией происходит путём контакта со слюной, при этом вирус инфицирует эпителиальные клетки кольца Waldeyer's, реплицирует, далее инфицирует покоящиеся naïve В-клетки в близлежащих областях посредством активации латентных белков, кодируемых программой роста, в результате клетка становится пролиферирующим лимфобластом (лимфобластный взрыв). В дальнейшем развивается латентная стадия, и вирус сохраняется в ядре покоящихся В-клеток памяти в скрытой эписомальной форме, экспрессируя только ограниченный набор генов, включая ядерный антиген ВЭБ (EBNA-1). Таким образом, В-клетки памяти становятся местом долговременной вирусной персистенции, где ВЭБ сохраняется длительное время, не являясь патогенным для человека, так как не экспрессирует гены, способствующие пролиферации клеток, а иммунологическая память сохраняется всю жизнь. Для понимания сложной биологии ВЭБ предложена модель зародышевого центра (GC) [4]. Согласно модели GC предполагается, что ВЭБ персистирует в латентно инфицированных naïve В-клетках лимфоидной ткани кольца Waldeyer's, они проходят этапы дифференцировки, каждый из которых использует программу дискретной вирусной транскрипции гена. На I этапе вирус экспрессирует все девять латентных белков — это называется «программа латенции 3», или «транскрипция роста» (latency 3, or the grow thtranscription program). Далее эти клетки перемещаются в GC, где вирус экспрессирует более ограниченную структуру скрытых белков, называемую «латентностью 2», или «программой по умолчанию» (latency 2, or the default program), а клетки либо остаются латентно инфицированными В-клетками памяти, либо экспрессируют только вирусный геномный белок EBNA-1 (известный как программа EBNA-1, или ла-

тентность 1), либо вообще не имеют вирусных белков. В дальнейшем развивается латентность 0, или программа латентности. Компартмент В-клеток памяти — это место длительной персистенции, так как вирус находится в состоянии покоя и невидим для иммунного ответа. Однако небольшая субпопуляция латентно инфицированных В-клеток памяти может инициировать литическую реактивацию в сочетании с терминальными сигналами дифференцировки [5]. Реактивацию вируса можно подразделить на 3 дискретные фазы: 1) немедленная ранняя, когда в период образования белков рано экспрессируются транскрипционные факторы, участвующие в репликации вирусной ДНК; 2) поздняя, когда вирусная ДНК и структурные белки собираются в вирионы [6]; 3) в конечной фазе это приводит к высвобождению вируса, инфицированию новых *naïve* В-клеток, тем самым завершая цикл. ВЭБ инфицирует клетки посредством взаимодействия вирусных гликопротеинов gp350/220 с CD21 и gp42/gH/gL с HLA II класса в В-клетке. Таким образом, В-клетки памяти являются местом длительной вирусной персистенции, где вирус может оставаться в течение всей жизни пациента, потому что формируется иммунологическая память, а вирус перестает быть патогенным для хозяина. Показано, что уровень инфицированных клеток аналогичен в периферической крови и кольце Waldeyer's, но в 20 раз ниже, чем в другой лимфоидной ткани (селезенка и брыжеечный лимфатический узел) [7]. Вирус постоянно просачивается в полость рта, где в течение примерно 2 минут он смешивается со слюной перед актом глотания. Таким образом, полость рта является резервуаром потока ВЭБ. Ротовая полость и периферическая кровь представляют собой важные анатомические места локализации и персистенции ВЭБ-инфекции. Находясь в латентной форме, вирус способствует развитию низкоуровневой активации иммунной системы, что сопровождается продукцией интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) и фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) в ответ на частую, но субклиническую реактивацию вируса [8]. По-видимому, в этом случае активация иммунной системы может быть обусловлена либо хронической презентацией вирусных антигенов, либо трансактивацией суперантигена, которая зависит от основного транскрибирующего ВЭБ-латентного гена EBNA-2, активирующего большинство других латентных генов ВЭБ [9]. При хронической ВЭБИ происходит клональная экспансия ВЭБ-инфицированных Т-клеток или естественных киллеров (NK), которые экспрессируют только ядерный антиген 1 вируса Эпштейна–Барр и белок латентной мембраны 1 (латентная инфекция типа 2) [10].

В последние годы опубликовано много исследований о том, что яды насекомых и животных богаты источниками антимикробных веществ и содержат широкий спектр активных биологических соединений с четко выраженной химической структурой. Антимикробные пептиды (AMP) — это диверсифицированная группа олигопептидов с различным количеством (от 5 до 100

и более) аминокислот, которые играют важную роль в иммунном ответе врожденного иммунитета хозяина при попадании патогенных микроорганизмов. В настоящее время обнаружено или синтезировано более 5000 AMP [11]. Природные AMP могут быть обнаружены как у прокариот (например у бактерий), так и у эукариот (например у простейших, грибов, растений, насекомых и животных) [12].

Противовирусные AMP нейтрализуют вирусы либо путём интеграции в вирусную оболочку, либо нарушая прикрепление вирусных частиц к поверхности клеточной мембраны, то есть AMP не способны конкурировать с вирусными гликопротеинами за связывание с гепарансульфатными рецепторами на клеточной мембране. Вместо этого противовирусные AMP могут проникать через клеточную мембрану и локализоваться в цитоплазме и органеллах, вызывая изменения в профиле экспрессии генов в клетках, что помогает блокировать экспрессию вирусных генов. В том случае, когда AMP вмешиваются в репликацию вируса, они внутриклеточно взаимодействуют с капсидом вириона, предотвращая его декапсидирование, следовательно, вирусная нуклеиновая кислота не может быть освобождена и транскрибирована [13]. Также запускаются другие механизмы, которые задействованы в работе врожденной иммунной системы: 1) индукция экспрессии toll-like рецепторов, которые взаимодействуют с вирусной нуклеиновой кислотой; 2) продукция цитокинов, которые стимулируют действие Т-цитотоксических клеток и NK-клеток; 3) экспрессия в инфицированных клетках молекул главного комплекса гистосовместимости с целью презентации вирусных пептидов другим клеткам иммунной системы [14]; 4) противовирусные соединения могут активировать врожденные факторы рестрикции, кодируемые инфицированной клеткой [15].

Из гемолимфы *Calliphora vicina* были выделены слегка катионные пептиды, называемые аллоферон 1 и 2, состоящие из 13 и 12 аминокислотных остатков (HGVS $\text{GHGQHG}\text{VHG}$  и  $\text{GVSGHGQHG}\text{VHG}$  соответственно). Аллоферон 2 соответствует усеченной на N-конце форме аллоферона 1. Однако неизвестно, является ли присутствие двух пептидов результатом естественной дегградации аллоферона 1 или молекулы аллоферона кодируются разными генами. Даже если структура аллоферона уникальна среди известных иммуномодулирующих пептидов, поиск в банке данных выявил очень мало идентификаторов с известными крупными функционально значимыми белками [16].

Название «аллоферон» было выбрано, чтобы показать функциональное сходство вещества с интерферонами, нативными регуляторами цитотоксических лимфоцитов у позвоночных (-ферон) и происхождением от разных видов беспозвоночных (алло-). Однако сходные аминокислотные участки были обнаружены в некоторых функционально значимых белках, таких как предшественник гемагглютинаина вируса гриппа В из 583 остатков, некоторое сходство с двумя бычьими прион-

ными белками I и II на протяжении 13 остатков. Прионные белки в значительной степени экспрессируются в тканях центральной нервной системы и многих тканях экстранейронов, в частности лимфоцитах, участвуя в активации Т-клеток [17]. Некоторые сходства выявлены между аллофероном и двумя короткими доменами высокомолекулярного бычьего кининогена 1 (аминокислоты 452–460) и эндотелиального коллагена человека  $\alpha 2$  (аминокислоты 33–44). Структура пептида была модифицирована путём замены His в положении 9 или 12 на природные или неприродные аминокислоты. Биологические свойства этих пептидов определены в противовирусном тесте *in vitro* против штамма McIntrie вируса герпеса 1-го типа человека (HHV-1MC) с использованием клеточной линии Vero. Обнаружено, что большинство оцениваемых пептидов могут снижать титр HHV-1 в клетках Vero. Показано, что после экспериментального заражения бактериями *Calliphora vicina* продуцирует ряд сильнодействующих антимикробных веществ с первичными структурами, сходными с описанными для других насекомых, а именно: дефензин (defensin), диптерицины (dipterocins), цекропины (secropins) и богатые пролином пептиды (proline-rich peptides) [16]. До открытия аллоферона было показано, что сырая гемолимфа *Calliphora vicina* содержит фактор, способный при введении мышам стимулировать противовирусную и противоопухолевую резистентность. Это приводит к увеличению активности естественных киллеров (NK), которые играют ключевую роль в противовирусном и противоопухолевом врождённом иммунитете, характерном для позвоночных и некоторых беспозвоночных. Высказано предположение, что гемолимфа *Calliphora* может содержать цитокиноподобный материал, перекрёстно реагирующий с мышинными NK-клетками и защищающий инфицированных вирусом или привитых опухолью реципиентов. Аллоферон имеет двойные функции: 1) прямое ингибирование репликации герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши (KSHV), за счёт подавления активности белка-активатора-1 (AP) и усиления противовирусного иммунитета за счёт роста цитотоксичности NK-клеток [18]; 2) эффективное уничтожение инфицированных вирусом клеток путём активации NK-клеток. Также показано, что аллоферон обладает противоопухолевым эффектом, опосредованным повышением экспрессии рецептора 2B4, активирующего NK-клетки, и усилением гранулярного экзоцитоза NK-клеток [19]. Кроме того, в экспериментальной работе выявлено противовоспалительное действие аллоферона на линию клеток кератиноцитов HaCaT человека и мыши [20].

Среди анализируемых соединений наибольшую активность проявляет соединение [3-13]-аллоферон-1, который: 1) стимулирует естественную цитотоксичность лимфоцитов периферической крови человека; 2) индуцирует продукцию IFN в эксперименте на мышах и у людей; 3) повышает противовирусную и противоопухолевую резистентность у мышей [21–23].

В России разработан препарат аллокин-альфа («Brand-Pharm», Москва) — отечественный антивирусный препарат нового типа, разработанный международным коллективом учёных (рег. № 002829/01 от 22.09.03 г.). Действующим веществом препарата является цитокиноподобный пептид аллоферон (глистидин-глицин-валин-серин-глицин-гистидин-глицин-глутамин-гистидин-глицин-валин-гистидин-глицин).

### Пациенты и методы исследования

Обследование включило 59 больных, страдающих хронической ВЭБИ, из них 45 женщин и 14 мужчин. Средний возраст больных составлял  $32,52 \pm 1,75$  года. Длительность хронической ВЭБИ от момента появления первых жалоб у больного до лабораторного подтверждения ВЭБ-инфекции и постановки диагноза составила  $2,18 \pm 0,20$  года. У всех больных отсутствовали какие-либо иммунологические нарушения или другие инфекции, которые могли бы объяснить жалобы на момент начала исследования, а также любые хронические заболевания, которые могли повлиять на результаты исследования. В исследование не были включены больные, которые последние 3 мес получали противовирусную или иммуномодулирующую терапию.

Из анамнеза известно, что у 40 (67,79%) больных в детстве имело место неоднократное обострение хронического тонзиллита, 20 (33,89%) больных перенесли острый инфекционный мононуклеоз, 43 (72,88%) больных жаловались на частые ОРВИ (5–10 раз в год), 49 (83,05%) больных связывали появление клинических жалоб с длительным стрессом. Более того, все обследованные женщины (45 больных) находились под наблюдением у гинеколога в течение длительного времени по следующим причинам: у 12 (26,67%) женщин отмечено отсутствие беременности в течение 2 и более лет; у 18 (40%) женщин — нарушение менструального цикла; у 6 (13,33%) женщин — замершая беременность (у 2 больных дважды, у 4 больных — однократно) и у 10 (22,22%) женщин — хронический эндометрит. Мужчины — 14 человек — включены в исследование в качестве половых партнёров, у которых также выявлена хроническая ВЭБИ и присутствовали жалобы на момент обследования и лечения.

Для хронической ВЭБИ характерно длительное течение и частые рецидивы с клиническими и лабораторными признаками вирусной активности [24]. Больных беспокоит длительный субфебрилитет ( $37,1–37,3^\circ$ ), слабость, немотивируемая утомляемость, повышенная потливость (особенно в ночное время), постоянное чувство дискомфорта и/или боли в области горла, у части больных появляется кашель, лимфаденит, отёк слизистой носа с обильным стеканием слизи, стоматит, возможны кожные высыпания, артралгии, боли в мышцах туловища и конечностей. Возможны проявления конъюнктивита, отита. Часто развиваются неврологические расстройства — головные боли, нарушения памяти и сна, снижение концентрации внимания, раздражительность,

плаксивость, склонность к депрессиям. По данным УЗИ брюшной полости у части больных выявляется увеличение селезёнки и/или печени, может беспокоить чувство тяжести в правом подреберье.

Клинические методы исследования включали в себя сбор анамнеза, данных о ранее проведённой противовирусной терапии, наличии сопутствующих заболеваний. Клиническое состояние пациентов оценивалось по общепринятой методике, включающей объективные данные и жалобы пациента на момент осмотра. Регистрация жалоб пациента проводилась с использованием шкалы субъективной оценки по 3-балльной шкале (0 — отсутствие симптомов, 1 — слабая выраженность симптомов, 2 — умеренная выраженность симптомов, 3 — значительная выраженность симптомов). Все больные были разделены на 2 группы для проведения разных схем терапии. В 1-ю группу вошли 26 больных, которые получали терапию аллокином-альфа (9 инъекций подкожно, по 1,0 мг через день). Подкожное введение аллокина-альфа хорошо переносилось больными, не вызывало аллергических реакций, не оказывало гепато-, нефротоксического и токсического действия на кроветворные органы, у 3 пациентов отмечалась умеренная слабость (в течение нескольких часов) после 1-й и 2-й инъекций, у 2 пациентов после 3-й инъекции появились новые высыпания на кожных покровах. Во 2-ю группу включили 33 больных, получавших терапию по пролонгированной схеме препаратом валтрекс из группы ациклических нуклеозидов (500 мг 2 раза/сут, внутрь) в течение 2 мес.

Для оценки эффективности проводимого лечения через месяц после окончания курса терапии был проведён анализ динамики количества ДНК ВЭБ в образцах слюны и клинических жалоб в обеих группах.

С целью подтверждения вирусной этиологии заболевания у больных выявляли ДНК вируса методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в образцах слюны, так как известно, что при хронических формах инфекции исследование с помощью ПЦР в образцах крови не даёт положительного результата. Большой информативностью по определению ДНК ВЭБ при хронических и атипичных формах обладает анализ проб слюны. Количественное определение ДНК вируса Эпштейна–Барр в образцах слюны проводили методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (RT-PCR-EBV — real-time polymerase chain reaction Epstein–Barr virus). Использовали тест-системы «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН

ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Единицы измерения, используемые для оценки вирусной нагрузки при экстракции ДНК из слюны, — количество копий ДНК ВЭБ на мл образца (КПДНК). Этот показатель рассчитывается по формуле из инструкции к набору: КПДНК = КДНК × 100 (копий/мл), где КДНК — количество копий ДНК ВЭБ в пробе ДНК. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 400 копий/мл.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью статистического пакета программного обеспечения IBM SPSS Statistics, версия 26. Групповые результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm Standard Error$ ). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием параметрических (метод Пирсона) и непараметрических (метод Спирмена, тау ( $\tau$ ) Кендалла) критериев. Для определения прогностической значимости количества копий ДНК ВЭБ использован регрессионный линейный анализ с расчётом коэффициента детерминации ( $R Square$ ) и критерия Дарбина–Уотсона (Durbin–Watson) для проверки соблюдения условия независимости наблюдений, анализ дисперсионный (ANOVA — Analysis of Variance) с расчётом критерия Фишера ( $F$ ) для проверки значимости модели. Также рассчитывался стандартизованный коэффициент бета ( $\beta$ ) с 95% доверительным интервалом (Confidence intervals). Критический уровень значимости различия показателей принимали равным 0,05.

Цель настоящего исследования — оценить эффект терапии аллокином-альфа на содержание количества копий ДНК ВЭБ в образцах слюны методом ПЦР в реальном времени и на динамику клинических жалоб через месяц после окончания терапии у больных хронической ВЭБИ.

## Результаты

До начала терапии колебания количества копий ДНК ВЭБ на мл образца слюны в общей группе больных хронической ВЭБИ (59 больных) составили порядка  $1,28 \times 10^4$  —  $3,52 \times 10^6$  копий. При анализе динамики количества копий ДНК ВЭБ в группе больных, получавших монотерапию аллокином-альфа, и в группе больных, получавших только валтрекс, через месяц были получены следующие результаты (табл. 1).

Из приведённых данных видно, что на фоне терапии аллокином-альфа у 57,69% больных получены отрицательные результаты ПЦР. А на фоне приёма валтрек-

Таблица 1

### Динамика количества копий ДНК ВЭБ через месяц после окончания противовирусной терапии у больных хронической ВЭБИ

Группа больных	Количество копий/мл		p
	до терапии	после терапии	
Аллокин-альфа	320773,75 ± 151893,17 (n = 26)	206589,37 ± 190659,95 (n = 11) У 15 (57,69%) больных — 0,00 копий	0,069
Валтрекс	253837,25 ± 48202,14 (n = 33)	53109,08 ± 28828,32 (n = 24) У 9 (27,27%) больных — 0,00 копий	0,001

Таблица 2

**Частота клинических жалоб у больных до начала терапии и через месяц после окончания терапии в 1-й и 2-й группах хронической ВЭБИ, %**

Клинические жалобы	1-я группа (n = 26), аллокин-альфа		2-я группа (n = 33), валтрекс	
	до терапии	после терапии	до терапии	после терапии
Субфебрильная температура	50,00	23,07 (p = 0,001)	76,75	66,67 (p = 0,054)
Лимфаденит	23,07	19,23 (p = 0,083)	54,54	45,45 (p = 0,082)
Боли в горле	50,00	42,30 (p = 0,001)	81,81	57,57 (p = 0,001)
Слабость	69,23	53,84 (p = 0,001)	81,81	66,67 (p = 0,056)
Озноб	34,62	15,38 (p = 0,006)	66,67	36,36 (p = 0,001)
Потливость	65,38	57,69 (p = 0,001)	90,91	54,54 (p = 0,001)
Стекание слизи	42,30	26,92 (p = 0,001)	69,69	60,60 (p = 0,052)
Стоматит	23,07	15,38 (p = 0,031)	36,36	33,33 (p = 0,054)
Боли в суставах	19,23	11,54 (p = 0,036)	33,33	27,27 (p = 0,054)
Раздражительность и плаксивость	73,08	65,38 (p = 0,001)	69,69	66,67 (p = 0,058)
Высыпания на коже	69,23	53,85 (p = 0,001)	54,54	45,45 (p = 0,058)

са отрицательные результаты ПЦР получены только у 27,27% пациентов. Далее проведён анализ динамики клинических жалоб в каждой отдельной группе больных через месяц после окончания проводимой терапии. В таблице 2 приведены полученные результаты в двух группах после проведённой терапии.

У больных 1-й группы отмечалась достоверная динамика таких клинических жалоб, как субфебрильная температура, боли в горле, слабость, озноб, потливость, стекание слизи по задней стенке глотки, стоматит, боли в суставах, раздражительность и плаксивость, высыпания на кожных покровах, после проведения терапии аллокин-альфа. Частота остальных жалоб осталась без изменения. Во 2-й группе больных, получавших терапию валтрексом, отмечалось достоверное уменьшение частоты жалоб только на боли в горле, озноб и потливость. Частота остальных жалоб у больных сохранялась через месяц после проведения 2-месячного курса терапии без изменений.

При проведении корреляционного анализа выявлено достоверное влияние исходного количества копий ДНК ВЭБ на выраженность клинических жалоб у больных в общей группе больных хронической ВЭБИ. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Влияние количества копий ДНК ВЭБ на выраженность клинических жалоб в общей группе больных хронической ВЭБИ**

Жалобы	Коэффициент корреляции
Слабость	$t = 0,46; p = 0,022$ $r = 0,55; p = 0,026$
Боли в горле	$t = 0,63; p = 0,002$ $r = 0,73; p = 0,001$
Боли в суставах	$t = -0,41; p = 0,050$ $r = -0,52; p = 0,039$
Субфебрильная температура	$t = -0,40; p = 0,050$ $r = -0,55; p = 0,030$

Далее для определения прогностической значимости влияния исходного количества копий ДНК ВЭБ на эффективность проводимой терапии в обеих группах был использован регрессионный линейный анализ с расчётом коэффициента детерминации (R Square) и критерия Дарбина–Уотсона (Durbin–Watson) для проверки соблюдения условия независимости наблюдений. Допустимые значения критерия были в диапазоне 2,049–2,668. Все возможные полученные значения R<sup>2</sup> оказались меньше 50%, что свидетельствует об отсутствии статистической связи между количеством копий ДНК ВЭБ и клинико-лабораторными показателями, так как регрессионные модели имеют низкое значение. Далее был проведён дисперсионный анализ (ANOVA — Analysis of Variance) с расчётом критерия Фишера (F) для проверки значимости модели. Также рассчитывался стандартизованный коэффициент бета (β) с 95% доверительным интервалом (Confidence intervals). Критический уровень значимости различия показателей принимали равным 0,05. Достоверно значимых результатов критерия F и коэффициента β, свидетельствующих о значимости полученной регрессионной модели, нами получено не было. Вероятно, полученный результат обусловлен исходным количеством копий ДНК ВЭБ у больных максимально в пределах 10<sup>5</sup>.

### Обсуждение

В настоящее время единого подхода к лечению хронической ВЭБ-инфекции нет, несмотря на то что существует целый ряд специфических противовирусных препаратов. В частности, широко используются ациклические нуклеозиды (ацикловир, валтрекс, фамвир) и синтетический нуклеозидный аналог гуанозина — ганцикловир (цимевен, вальцит). В отдельных работах показано, что противовирусная терапия может быть эффективной при лечении хронической ВЭБИ, так как нуклеозидные аналоги тимидина могут выраженно ингибировать фосфорилирование тимидина и быть наи-

более подходящими нуклеозидными противовирусными препаратами, воздействующими на фермент [10]. Однако *in vitro* показано, что тирозинкиназа ВЭБ имеет переменное сродство к антигерпетическим противовирусным препаратам и не может фосфорилировать ацикловир или ганцикловир, именно поэтому эти препараты не эффективны при лечении хронической ВЭБ-инфекции [25, 26]. Эти препараты ингибируют вирусную ДНК-полимеразу и, следовательно, ингибируют литическую репликацию ВЭБ в инфицированных клетках. ВЭБ-инфицированные НК- или Т-клетки у пациентов с хронической ВЭБИ обычно экспрессируют латентный ВЭБ-ядерный антиген-1 (EBNA) и латентный мембранный белок-1 (LMP), LMP2A. Однако репликация латентного ВЭБ в пролиферирующих В-клетках не требует вирусной ДНК-полимеразы, поэтому антивирусная терапия обычно неэффективна [27].

В 2016 г. опубликованы результаты анализа эффективности лечения инфекционного мононуклеоза по Всемирному реестру клинических испытаний ВОЗ (1981–2016 гг.), которые показали сомнительную эффективность противовирусных препаратов (ацикловир, валацикловир) при остром инфекционном мононуклеозе. На фоне противовирусной терапии наблюдалось подавление вирусного выброса (shedding), но этот эффект прекращался после окончания проведения противовирусной терапии [28]. На фоне противовирусной терапии количество инфицированных лимфоцитов практически не меняется, уровень вирусной нагрузки незначительно снижается, но имеет тенденцию возвращаться к исходному уровню после прекращения терапии [29]. Показано, что ВЭБ-тимидинкиназа не фосфорилирует ацикловир и ганцикловир, именно поэтому эти препараты не эффективны при лечении хронической ВЭБ-инфекции [26]. Отрицательные результаты по количеству копий ДНК ВЭБ во 2-й группе (валтрекс 1000 мг/сут 2 мес) получены только у 27,27% больных, а у 72,72% больных количество копий ДНК ВЭБ уменьшилось. Больные отмечали отсутствие положительной динамики клинических жалоб при приёме валтрекса. Таким образом, наши результаты подтвердили опубликованные ранее данные, свидетельствующие о низкой эффективности препаратов группы ациклических нуклеозидов в лечении хронической ВЭБИ.

Вирусы обладают быстрой мутационной способностью обманывать и инфицировать клетки хозяина. Это способствовало разработке и появлению новых противовирусных препаратов, особенно из натуральных продуктов, поскольку они составляют более 25% новых прототипов лекарств, одобренных в последние десятилетия [30]. Аллокин-альфа улучшает распознавание вирус-инфицированных клеток и способствует подавлению репликации вируса. Противовирусный эффект препарата обусловлен: 1) блокированием и уничтожением вирусов и инфицированных клеток путём локальной продукции интерферона в очаге вирусной инфекции, без индуцирования системной продукции, что позволя-

ет избежать ненужного иммунного влияния на организм в целом; 2) формированием противовирусного иммунного ответа за счёт усиления цитотоксической активности НК-клеток и В-лимфоцитов, ответственных за продукцию специфических антител [31]. В работе М.Ю. Серебрякова и соавт. показано, что после курса терапии аллокином-альфа у больных исчезли в сыворотке маркеры репликации ВЭБ — IgM и IgG к ранним белкам. Методом ПЦР в крови, биоптатах лимфоузлов и печени, а также в соскобе со слизистой прямой кишки ДНК ВЭБ не обнаруживалась [32]. Аналогичные результаты по снижению количества копий ДНК ВЭБ в образцах слюны получены у больных с хроническим воспалительным заболеванием верхних дыхательных путей, обусловленным ВЭБ, через 2 нед после 6 инъекций аллокина-альфа. До терапии количество копий ДНК ВЭБ в образцах слюны было равно  $3,39 \pm 1,78$  (lg ГЭ (геном. экв.) на  $10^5$  клеток), а через две недели после терапии —  $1,79 \pm 2,61$  (lg ГЭ на  $10^5$  клеток). Частота выявления вирусной нагрузки до терапии составила 30%, а через 2 недели после терапии — 10%. В нашей работе отрицательные результаты ПЦР через месяц после терапии аллокином-альфа выявлены у 57,69% больных, из клинических жалоб сохранялся только лимфаденит ( $p = 0,083$ ). Таким образом, полученные данные подтверждают опубликованные ранее результаты эффективности препарата при лечении хронической ВЭБ-инфекции.

## Выводы

1. Терапия аллокином-альфа оказывает выраженный противовирусный эффект на количество копий ДНК ВЭБ у больных хронической ВЭБИ.
2. Терапия аллокином-альфа через месяц после её окончания приводит к достоверному уменьшению клинических жалоб у больных хронической ВЭБИ.
3. Терапия аллокином-альфа может быть рекомендована для лечения хронической ВЭБИ в дозе 1 мг подкожно через день при курсовой дозе не менее 9 инъекций.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–25, 27, 28, 30 см. REFERENCES)

26. Хахалин Л.Н., Абазова Ф.И. Ацикловир при лечении острых и рецидивирующих герпесвирусных инфекций. *Клин. фармакол., терапия.* 1995; 4: 78-81.
29. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. *Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека.* К.: Феникс; 2009.
31. Коновалова Н.В., Храменко Н.И., Величко Л.Н., Юрченко Л.А. Роль уровня интерферонов  $\alpha$  и  $\gamma$  в крови больных увеитами вирусной этиологии под влиянием лечения препаратом аллокин-альфа. *Точка зрения. Восток — Запад.* 2018; (4): 26-9. DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2018-4-26-29>
32. Серебряков М.Ю., Тищенко М.С., Воронов А.В., Салимов А.Г., Сметанина С.Е., Платонова Т.К. и др. Новые подходы к лечению больных ВЭБ-инфекцией. В кн.: *Сборник научных трудов по препарату Аллокин-альфа.* М.; 2016: 181–4.

## REFERENCES

1. Straus S.E. The chronic mononucleosis syndrome. *J. Infect. Dis.* 1988;157: 405-12.

2. Hellmann D., Cowan M.J., Ammann A.J., Wara D.W., Chudwin D., Chang R.S. Chronic active Epstein-Barr virus infections in two immunodeficient patients. *J. Pediatr.* 1983; 103: 585-8.
3. Choen J.L. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 480-92.
4. Thorley-Lawson D.A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1: 75-82. DOI:10.1038/35095584
5. Laichalk L.L., Thorley-Lawson D.A. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* 2005; 79: 1296-1307. DOI: 10.1128/JVI.79.2.1296-1307.2005
6. Kieff E., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus and its replication. In: *Knipe D.M., Howley P.M., eds. Fields Virology.* 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
7. Laichalk L.L., Hochberg D., Babcock G.J., Freeman R.B., Thorley-Lawson D.A. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity.* 2002;16:745-54.
8. Amyes E., Hatton C., Montamat-Sicotte D., Gudgeon N., Rickinson A.B., McMichael A.J. et al. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J. Exp. Med.* 2003; 198(6): 903-11.
9. Marrão G., Habib M., Paiva A., Bicout D., Fallecker C., Franco S. et al. Epstein-Barr virus infection and clinical outcome in breast cancer patients correlate with immune cell TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  response. *BMC Cancer.* 2014; 14: 665.
10. Kimura H., Hoshino Y., Kanegane H., Tsuge I., Okamura T., Kawa K. et al. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood.* 2001; 98: 280-6.
11. Zhao X., Wu H., Lu H., Li G., Huang Q. Lamp: a database linking antimicrobial peptides. *PLoS One.* 2013; 8: e66557. doi: 10.1371/journal.pone.0066557.
12. Conlon J.M., Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol. Biol.* 2010; 618: 3-14.
13. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013; 6(12): 1543-75. doi: 10.3390/ph6121543.
14. Altfeld M., Gale M.Jr. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* 2015;16(6): 554-62. doi: 10.1038/ni.3157.
15. Meije Y., Tonjes R.R., Fishman J.A. Retroviral restriction factors and infectious risk in xenotransplantation. *Am. J. Transplant.* 2010; 10(7): 1511-6. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03146.x.
16. Chernysh S., Kim S., Bekker G., Pleskach V.A., Filatova N.A., Anikin V.B. et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(20): 12628-32. doi: [10.1073/pnas.192301899]
17. Mabbott N.A., Brown K.L., Manson J., Bruce M.E. T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology.* 1997; 92(2):161-5.
18. Lee N., Bae S., Kim H., Kong J.M., Kim H.R., Cho B.J. et al. Inhibition of lytic reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by alloferon. *Antivir. Ther.* 2011; 16: 17-26.
19. Bae S., Oh K., Kim H., Kim Y., Kim H.R., Hwang Y.I. et al. The effect of alloferon on the enhancement of NK cell cytotoxicity against cancer via the up-regulation of perforin/granzyme B secretion. *Immunobiology.* 2013; 218: 1026-33.
20. Kim Y., Lee S.K., Bae S., Kim H., Park Y., Chu N.K. et al. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. *Immunol. Lett.* 2013;149: 110-8.
21. Kuczer M., Dziubasik K., Midak-Siewirska A., Zahorska R., Łuczak M., Konopińska D. Studies of insect peptides alloferon, Any-GS and their analogues. Synthesis and antiherpes activity. *J. Pept. Sci.* 2010;16(4):186-9.
22. Kuczer M., Majewska A., Zahorska R. New alloferon analogues: synthesis and antiviral properties. *Chem. Biol. Drug Des.* 2013; 81(2): 302-9. doi: 10.1111/cbdd.12020
23. Kuczer M., Czarniewska E., Majewska A., Różanowska M., Rosiński G., Lisowski M. Novel analogs of alloferon: Synthesis, conformational studies, pro-apoptotic and antiviral activity. *Bioorg. Chem.* 2016; 66: 12-20. doi: 10.1016/j.bioorg.2016.03.002.
24. Kragstbjerg P. Chronic active mononucleosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997; 29 (5): 517-8.
25. Gustafson E.A., Chillemi A.C., Sage D.R., Fingerroth J.D. The Epstein-Barr virus thymidine kinase does not phosphorylate ganciclovir or acyclovir and demonstrates a narrow substrate specificity compared to the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(11): 2923-31.
26. Khakhalin L.N., Abazova F.I. Acyclovir in the treatment of acute and recurrent herpes virus infections. *Klin. Farmakol., Terapiya.* 1995; 4: 78-81. (in Russian)
27. Cohen J.I. Optimal treatment for chronic active Epstein-Barr virus disease. *Pediatr. Transplant.* 2009; 13(4): 393-6. doi: 10.1111/j.1399-3046.2008.01095.x
28. De Paor M., O'Brien K., Fahey T., Smith S.M. Antiviral agents for infectious mononucleosis (glandular fever). *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016; 8(12): CD011487. doi: 10.1002/14651858.
29. Kazmirchuk V.E., Mal'tsev D.V. *Clinic, diagnosis and treatment of human herpesvirus infections. [Klinika, diagnostika i lecheniye gerpsevirusnykh infektsiy cheloveka].* Kiev: Feniks; 2009. (in Russian).
30. Martinez J.P., Sasse F., Brönstrup M., Diez J., Meyerhans A. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat. Prod. Rep.* 2015; 32(1): 29-48. doi: 10.1039/C4NP00085D.
31. Konovalova N.V., Khramenko N.I., Velichko L.N., Iurchenko L.A. The role of interferon  $\alpha$  and  $\gamma$  in the blood of patients with viral uveitis during treatment with the drug allokina-alpha. *Tochka Zreniia. Vostok-Zapad.* 2018; (4): 26-9. DOI: https://doi.org/10.25276/2410-1257-2018-4-26-29. (in Russian)
32. Serebryakov M.Yu., Tishchenko M.S., Voronov A.V., Salimov A.G., Smetanina S.E., Platonova T.K. et al. New approaches to the treatment of patients with EBV infection. In: *Collection of scientific papers on the drug Allokina-alpha. [Sbornik nauchnykh trudov po preparatu Allokina-alpha].* Moscow; 2016: 181-4. (in Russian).

Поступила 08.02.2019

Принята к печати 14.02.2019