

Ракитянская И.А.¹, Рябова Т.С.^{1,2}, Тоджибаев У.А.¹, Калашникова А.А.³

АЛЛОКИН-АЛЬФА – НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ ВИРУС ЭПШТЕЙН-БАРР ИНФЕКЦИИ

¹ Амбулаторное отделение аллергологии-иммунологии и клинической трансфузиологии

ГБУЗ Городская поликлиника 112, 195427, г. Санкт-Петербург, Россия;

² Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия;

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

Введение. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) вызывает рецидивирующие инфекционные мононуклеозоподобные симптомы. Сегодня доказано, что яды насекомых и животных богаты антимикробными веществами (пептидами) и содержат широкий спектр активных биологических соединений. Антимикробные пептиды играют важную роль в иммунном ответе врождённого иммунитета хозяина при попадании патогенных микроорганизмов. На основе антимикробных пептидов в России разработан противовирусный препарат аллокин-альфа. Его действующим веществом является цитокиноподобный пептид аллоферон. **Цель исследования** – оценить влияние терапии аллокином-альфа на количество ДНК ВЭБ в образцах слюны и клинические жалобы у больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр (ХВЭБИ). **Материал и методы.** Обследованы 59 больных ХВЭБИ (45 женщин и 14 мужчин; средний возраст 32,52 ± 1,75 года). У больных определяли количество ДНК ВЭБ в образцах слюны методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 400 копий/мл. Больные были рандомизированы на 2 группы: 25 пациентов 1-й группы получали терапию аллокином-альфа (9 инъекций подкожно по 1,0 мг через день); 33 пациента 2-й группы получали валтрекс (по 500 мг 2 раза в сутки, внутрь) в течение 2 мес. **Результаты.** После терапии аллокином-альфа у 59,67% больных были получены отрицательные результаты ПЦР. После 2-месячной терапии валтрексом отрицательные результаты ПЦР были получены только у 27,27% участников исследования. Корреляционный анализ выявил достоверное влияние исходного количества копий ДНК ВЭБ на выраженность клинических жалоб у больных в общей группе ХВЭБИ. **Обсуждение.** Аллокин-альфа улучшает распознавание вирус-инфицированных клеток и способствует подавлению репликации вируса. **Заключение.** Терапия аллокином-альфа может быть рекомендована для лечения ХВЭБИ в дозе 1 мг подкожно через день при курсовой дозе не менее 9 инъекций.

Ключевые слова: вирус Эпштейн-Барр; иммунитет; пептиды; терапия; аллоферон.

Для цитирования: Ракитянская И.А., Рябова Т.С., Тоджибаев У.А., Калашникова А.А. Аллокин-альфа – новые подходы к лечению хронической вирус Эпштейн-Барр инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3): 118-124.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-118-124>

Rakitiyanskaya I.A.¹, Riabova T.S.^{1,2}, Todzhibaev U.A.¹, Kalashnikova A.A.³

ALLOKIN-ALPHA – NEW APPROACHES IN THE TREATMENT OF CHRONIC VIRUS EPSTEIN-BARR INFECTIONS

¹ Outpatient Department of Allergology-Immunology and Clinical Transfusiology City Ambulant Department №112, St. Petersburg, 195427, Russian Federation;

² Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, 194044, Russian Federation;

³ The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, 194044, Russian Federation

Introduction. Epstein-Barr virus causes recurrent infectious mononucleosis-like symptoms. Today it is shown that the poisons of insects and animals are 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 innate immunity of the host in the presence of pathogenic microorganisms. Russia has developed an antiviral drug Allokin-alpha on the basis of antimicrobial peptides. The active ingredient of this drug is cytokin-like peptide alloferon. The aim 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 infection (ChEBVI). **Material and methods.** 59 patients with ChEBVI were examined (45 women and 14 men; mean age 32.52 ± 1.75 years). Patients were examined quantification of DNA Epstein-Barr virus in saliva samples by the method of polymerase chain reaction (PCR) with hybridization-fluorescence detection in “real time” mode. The analytical sensitivity of the test system is 400 copies / ml. Patients were randomized into two groups: group 1 (25 patients) received Allokin-alpha therapy (9 injections of s / c, 1.0 mg every other day); group 2 (33 patients) received Valtrex (500 mg x 2 times / day, by mouth) for two months. **Results.** 59.67% of patients had negative PCR results after treatment with Allokin-alpha. Only 27.27% of patients had negative PCR results after two months of treatment with Valtrex. In a correlation analysis, a significant effect of the initial number of copies of DNA EBV on the severity of clinical complaints in patients was revealed in the general group ChEBVI. **Discussion.** Allokin-alpha improves the recognition of virus-infected cells and helps suppress viral replication.

Conclusions. Allokin-alpha therapy can be recommended for the treatment of chronic EBVI at a dose of 1 mg subcutaneously every other day with a course dose of at least 9 injections.

Keywords: Epstein-Barr virus; immunity; peptides; therapy; alloferon.

For citation: Rakitianskaya I.A., Riabova T.S., Todzhibaev U.A., Kalashnikova A.A. Allokin-alpha - new approaches in the treatment of chronic virus Epstein-Barr infections. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 118-124. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-118-124>

For correspondence: Irina A. Rakitianskaya, Doctor of Medical Sciences, Professor of outpatient department of allergology-immunology and clinical transfusiology of the City Polyclinic 112 of St. Petersburg, 195427, Russian Federation.
E-mail: tat-akyla@inbox.ru

Information about authors:

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

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 06 February 2019

Accepted 04 April 2019

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), или вирус инфекционного мононуклеоза, представляет собой прототип персистирующей вирусной инфекции, характеризующейся латентностью. 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 герпес-вируса. В них вирус персистирует с возможностью входа и выхода из ткани с помощью разработанной им стратегии, в результате которой он 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 в очень маленьком количестве (1 инфицированная клетка на 5 мл крови) с минимальным воздействием сохраняется в организме хозяина. При первичном инфицировании у иммунокомпетентных лиц ВЭБ вызывает рецидивирующие инфекционные мононуклеозоподобные симптомы, которые фактически определяются как идиопатические, характеризуются вирусной персистенцией и сопровождаются повышенной продукцией антител IgG к капсидному и раннему антигену, а также низкой продукцией или отсутствием антител к ядерному антигену (EBNA) [1]. В 1980-х годах наибольший интерес стал вызывать синдром хронической усталости, когда именно за связь с ВЭБ его назвали хроническим мононуклеозом или хронической инфекцией ВЭБ (ХВЭБИ). Ранее, в 1983 г. Hellman D. и соавт. [2] впервые предложили определение для этого синдрома «хроническая активная ВЭБ-инфекция» (Chronic Active EBV infection – CAEBV).

Инфицирование клеток ВЭБ может иметь 2 возможных развития. Литическая инфекция возникает, когда образуются вирионы 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 проценте латентно инфицированных клеток [3].

Инфицирование ВЭБ-инфекцией происходит через контакт 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, и в результате клетка становится пролиферирующим лимфобластом (лимфо-

бластный 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 на всю жизнь. Для понимания сложной биологии ВЭБ была предложена модель зародышевого центра (GC) [4]. Согласно модели GC предполагается, что ВЭБ персистирует в латентно инфицированных В-клетках лимфоидной ткани кольца Waldeyer’s, которые проходят этапы дифференцировки, каждый из них использует программу дискретной вирусной транскрипции гена. На первом этапе вирус экспрессирует все 9 латентных белков – это называется программой латенции 3, или транскрипция роста (latency 3 or the growth transcription 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 EBNA1 (известный как программа EBNA1 или латентность 1), либо вообще не имеют вирусных белков. В дальнейшем развивается латентность 0, или программа латентности. Компаратмент 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) конечная фаза, когда высвобождение вируса приводит к 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 перестаёт быть пато-

генным для хозяина. Показано, что уровень инфицированных клеток аналогичен между периферической кровью и кольцом Waldeyer's, но в 20 раз ниже, чем в другой лимфоидной ткани (селезёнка и брыжеечный лимфатический узел) [7]. Вирус постоянно просачивается в полость рта, где в течение примерно 2 мин 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- γ) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) 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 ХВЭБИ происходит клональная экспансия ВЭБ-инфицированных Т-клеток или естественных киллеров (NK), которые экспрессируют только EBNA-1 и латентный мембранный белок 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 чётко выраженной химической структурой. Таким образом, антимикробные пептиды (AMP) – это диверсифицированная группа олигопептидов с различным количеством (от 5 до 100 и более) аминокислот, которые играют важную роль в иммунном ответе врождённого иммунитета хозяина при попадании патогенных микроорганизмов. В настоящее время обнаружено и 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, т.е. AMP не способны конкурировать с вирусными гликопротеинами за связывание с гепарансульфатными рецепторами на клеточной мембране. Вместо этого антивирусные AMP способны проникнуть 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]. Кроме того, запускаются другие механизмы, которые задействованы в работе врождённой 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 врождённые факторы рестрикции, кодируемые инфицированной клеткой [15].

Из гемолимфы светлячка *Calliphora vicina* были выделены катионные пептиды аллоферон 1 и 2, состоящие из 12 и 13 аминокислотных остатков (HGVS GHGQHGVNHG и GVS GHGQHGVNHG соответственно). Аллоферон 2 соответствует усечённой на N-конце форме аллоферона 1. Однако неизвестно, является ли присутствие 2 пептидов результатом естественной деградации 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 происхождение 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 выявлено с двумя бычьими прионными 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 не природные аминокислоты. Биологические свойства этих пептидов были определены в противовирусном тесте *in vitro* против штамма McIntrie вируса герпеса человека 1 типа (HHV-1MC) с использованием клеточной линии Vero. Было 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 (cecropins) 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 NK-клеток, которые играют ключевую роль в противовирусном и противоопухолевом врождённом иммунитете, характерном для позвоночных и некоторых беспозвоночных. Было высказано предположение, что гемолимфа *Calliphora* может содержать цитокин-подобный материал, перекрёстно реагирующий с мышинными NK-клетками и защищающий инфицированных вирусом или привитых опухолью реципиентов. Аллоферон имеет двойные функции: 1) прямое ингибирование репликации герпес-вируса, ассоциированного с саркомой Капоши за счёт подавления активности белка-активатора (AP) 1 и усиления противовирусного иммунитета за счёт усиления цитотоксич-

ности NK-клеток [18]; 2) эффективное уничтожение инфицированных вирусом клеток путём активации NK-клеток. Также показано, что аллоферон оказывает противоопухольевый эффект, опосредованный 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 наиболее активно соединение [3–13]-аллоферон 1, поскольку оно: 1) стимулирует естественную цитотоксичность лимфоцитов периферической крови человека; 2) индуцирует продукцию IFN в эксперименте на мышах и у людей; 3) повышает противовирусную и противоопухольевую резистентность у мышей [21–23].

Аллокин-альфа (BRAND-PHARM, Москва) – российский противовирусный препарат нового типа, разработанный международным коллективом учёных (Reg. № 002829/01 от 22.09.2003). Действующим веществом препарата является цитокиноподобный пептид аллоферон (глистидин-глицин-валин-серин-глицин-гистидин-глицин-глутамин-гистидин-глицин-валин-гистидин-глицин).

Цель настоящего исследования – оценить эффективность терапии аллокином-альфа на динамику количества копий ДНК ВЭБ в образцах слюны методом РВ-ПЦР и клинических жалоб через 1 месяц после окончания терапии у больных ХВЭБИ.

Материал и методы

Обследование было проведено у 59 больных ХВЭБИ (45 женщин и 14 мужчин, средний возраст $32,52 \pm 1,75$ года). Длительность ХВЭБИ 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.

Для ХВЭБИ характерно длительное течение и частые рецидивы с клиническими и лабораторными признаками вирусной активности [24]. Больных беспокоит длительный субфебрилитет ($37,1 - 37,3$ °C), слабость, немотивируемая утомляемость, повышенная потливость (особенно в ночное время), постоянное чувство дискомфорта и/или боли в горле, у некоторых больных появляется кашель, лимфаденит, отёк слизистой носа с обильным стеканием слизи, стоматит, возможны кожные высыпания, артралгии, боли в мышцах туловища и конечностей. Могут отмечаться конъюнктивит, отит. Часто развиваются неврологические расстройства – головные боли, нарушения памяти и сна, снижение концентрации внимания, раздражительность, плаксивость, склонность к депрессиям, может беспокоить чувство тяжести в правом подреберье. По данным ультразвукового исследования брюшной полости, у части больных увеличена селезёнка и/или печень.

Клинические методы исследования включали сбор анамнеза, данные о ранее проводимой противовирусной терапии, сопутствующих заболеваниях. Клини-

ческое состояние пациентов оценивали по общепринятой методике, включающей объективные данные и жалобы пациента на момент осмотра. Регистрировали жалобы пациента с использованием Шкалы субъективной оценки по 3-балльной системе (0 – отсутствие симптомов, 1 – слабая выраженность симптомов, 2 – умеренная выраженность симптомов, 3 – значительная выраженность симптомов). Больных рандомизировали на 2 группы для проведения разных схем терапии. В 1-ю группу вошли 26 больных в возрасте от 21 до 62 лет, которые получали терапию аллокином-альфа (9 инъекций подкожно по 1,0 мг через день). Больные хорошо переносили подкожное введение аллокина-альфа, не выявлено аллергических реакций, гепатонейротоксического и токсического действия на кровяные органы. У 3 пациентов отмечалась умеренная слабость (в течение нескольких часов) после 1-й и 2-й инъекций, ещё у 2 больных после 3-й инъекции появились новые высыпания на кожных покровах. Во 2-ю группу были включены 33 больных в возрасте от 22 до 49 лет, получавших пролонгированную схему терапии препаратом из группы ациклических нуклеозидов – валтрексом (по 500 мг 2 раза в сутки, внутрь) в течение 2 мес.

Для оценки эффективности проводимого лечения через 1 мес после окончания курса терапии проанализировали динамику количества ДНК ВЭБ в образцах слюны и клинических жалоб в обеих группах.

Для подтверждения вирусной этиологии заболевания у больных выявляли ДНК вируса методом ПЦР в образцах слюны, так как известно, что при хронических формах инфекции исследование ПЦР в образцах крови не даёт положительного результата и большей информативностью по определению ДНК ВЭБ при хронических и атипичных формах имеет анализ проб слюны. Количество ДНК вируса Эпштейна-Барр в образцах слюны определяли методом ПЦР с гибридоизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (РВ-ПЦР). 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 1 мл образца. Этот показатель рассчитывают по формуле из инструкции к набору:

$$\text{КПДНК} = \text{КДНК} \cdot 100 \text{ (копий/мл)},$$

где КДНК – количество копий ДНК ВЭБ в пробе. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 400 копий/мл.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью статистического пакета программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26. Групповые результаты представлены в виде средней (M) \pm стандартная ошибка от средней (Standard Error). Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических (метод Пирсона) и непараметрических (метод Спирмена, τ Кендалла) критериев. Для определения прогностической значимости количества копий ДНК ВЭБ использовали регрессионный линейный анализ с расчётом коэффициента детерминации (R Square) и критерия Дарбина-Уотсона (Durban-Watson) для проверки соблюдения условия независимости наблюдений, анализ дисперсионный (Analysis of Variance, ANOVA) с расчётом критерия Фишера (F) для проверки значимости модели. Кроме того, рассчитывали стандартизован-

ный коэффициент β с 95% доверительным интервалом. Критический уровень значимости различия показателей принимали равным 0,05.

Результаты

Из анамнеза известно, что у 40 (67,79%) больных в детстве было неоднократное обострение хронического тонзиллита; 20 (33,89%) человек перенесли острый инфекционный мононуклеоз, 43 (72,88%) пациента жаловались на частые ОРВИ (от 5 до 10 раз в год), 49 (83,05%) больных связывали появление клинических жалоб с длительным стрессом. До начала терапии количество копий ДНК ВЭБ на 1 мл образца слюны у всех больных ХВЭБИ ($n = 58$) варьировало от $1,28 \cdot 10^4$ до $3,52 \cdot 10^6$ копий. При анализе динамики количества копий ДНК ВЭБ в группе больных, получавших монотерапию аллокином-альфа, и в группе больных, получавших только валтрекс, через 1 мес были получены следующие результаты (табл. 1).

Из представленных в таблице данных видно, что на фоне терапии аллокином-альфа у 59,67% больных получены отрицательные результаты ПЦР, а на фоне приема валтрекса – только у 27,27%. Далее была проанализирована динамика клинических жалоб в каждой отдельной группе

больных через 1 мес после окончания терапии (табл. 2).

У больных 1-й группы отмечается достоверное уменьшение таких клинических жалоб, как субфебрильная температура тела, 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 аллокином-альфа. Остальные жалобы остались без изменения. Во 2-й группе больных, получавших терапию валтрексом, отмечалось достоверное уменьшение жалоб только на боли в горле, озноб и потливость. Остальные жалобы у больных сохранялись через 1 мес после проведения 2-месячного курса терапии.

При проведении корреляционного анализа было выявлено достоверное влияние исходного количества копий ДНК ВЭБ на выраженность клинических жалоб больных ХВЭБИ. Результаты представлены в табл. 3.

Для определения прогностической значимости исходного количества копий ДНК ВЭБ на эффективность проводимой терапии в обеих группах использовали регрессионный линейный анализ с расчетом коэффициента детерминации и критерия Дарбин–Уотсона для проверки соблюдения условия независимости наблюдений. Допустимые значения критерия были от 2,049 до 2,668.

Таблица 1

Динамика количества копий ДНК вируса Эпштейна–Барр через 1 мес после окончания противовирусной терапии у больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр

Группа больных	Количество копий/мл до терапии	Количество копий/мл после терапии	<i>p</i>
1-я группа (аллокин-альфа)	320773,75 ± 151893,17 (<i>n</i> = 26)	206589,37 ± 190659,95 (<i>n</i> = 11) 0,00 (<i>n</i> = 15)	0,069
2-я группа (валтрекс)	253837,25 ± 48202,14 (<i>n</i> = 33)	53109,08 ± 28828,32 (<i>n</i> = 24) 0,00 (<i>n</i> = 9)	0,001

Таблица 2

Частота клинических жалоб (%) у больных до начала терапии и через 1 мес после ее окончания в 1-й и 2-й группах больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр

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

Таблица 3

Влияние количества копий ДНК вируса Эпштейна–Барр на выраженность клинических жалоб больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр

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

Все возможные полученные значения R^2 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. Достоверно значимых результатов критерия F и коэффициента β , свидетельствующих о значимости полученной регрессионной модели, нами не получено. Вероятно, результат обусловлен исходным количеством копий ДНК ВЭБ в пределах 10^5 .

Обсуждение

В настоящее время единого подхода в лечении ХВЭБИ 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 ХВЭБИ, так как нуклеозидные аналоги тимидина могут выраженно ингибировать фосфорилирование тимидина и быть наиболее подходящими нуклеозидными противовирусными препаратами, воздействующими на фермент [10]. Однако *in vitro* показано, что тирозинкиназа ВЭБ имеет варибельное сродство к антигерпетическим противовирусным препаратам и не может фосфорилировать ацикловир или ганцикловир, именно поэтому данные препараты неэффективны при лечении ХВЭБИ [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 ХВЭБИ обычно экспрессируют латентный ВЭБ-ядерный антиген

EBNA-1 и латентный мембранный белок LMP2A. Однако репликация латентного ВЭБ в пролиферирующих В-клетках не требует вирусной ДНК-полимеразы, поэтому антивирусная терапия обычно неэффективна [27].

В 2016 г. были опубликованы результаты анализа эффективности лечения инфекционного мононуклеоза по Всемирному реестру клинических испытаний ВОЗ (с 1981 по 2016 г.), 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 терапии [28]. На фоне противовирусной терапии количество инфицированных лимфоцитов практически не меняется, уровень вирусной нагрузки незначительно снижается, но имеет тенденцию возвращаться к исходному значению после прекращения терапии [29]. Показано, что ВЭБ-тимидинкиназа не фосфорилирует ацикловир и ганцикловир, именно поэтому данные препараты неэффективны при лечении ХВЭБИ [26]. В нашем исследовании отрицательные результаты по количеству копий ДНК ВЭБ во 2-й группе после лечения (валтрекс 1000 мг/сут 2 мес) были получены только у 27,7% больных, а у остальных 72,72% больных количество копий ДНК имело тенденцию к снижению. Больные отмечали отсутствие положительной динамики клинических жалоб при приеме валтрекса. Таким образом, наши результаты подтвердили опубликованные ранее данные, свидетельствующие о низкой эффективности препаратов группы ациклических нуклеозидов в лечении ХВЭБИ.

Исследования последних лет способствовали 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, не индуцируя системную продукцию, что позволяет 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. [32] показано, что после курса терапии аллокином-альфа в сыворотке больных исчезли маркеры репликации ВЭБ – IgM и IgG к ранним белкам. Методом ПЦР в крови, в биоптатах лимфатических узлов и печени, а также в соскобе со слизистой прямой кишки не обнаружено ДНК ВЭБ. 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 уровень ПЦР в образцах слюны был $3,39 \pm 1,78$ (Ig ГЭ на 10^5 клеток), а через 2 нед после терапии – $1,79 \pm 2,61$ (Ig ГЭ на 10^5 клеток). Частота выявления вирусной нагрузки до терапии была 30%, а через 2 нед после терапии – 10%. В нашей работе отрицательные результаты ПЦР через 1 мес после терапии аллокином-альфа выявлены у 59,67% больных, из клинических жалоб сохранился только лимфаденит ($p = 0,083$). Таким образом, полученные данные подтверждают опубликованные ранее результаты эффективности препарата в лечении ХВЭБИ.

Выводы

1. Терапия аллокином-альфа оказывает выраженный противовирусный эффект на количество копий ДНК ВЭБ у больных ХВЭБИ.

2. Через 1 мес после окончания терапии аллокином-альфа достоверно уменьшается число клинических жалоб у больных ХВЭБИ.

3. Терапия аллокином-альфа может быть рекомендована для лечения ХВЭБИ 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 (п.п. 1-25, 27, 28, 30 см. REFERENCES)

26. Хахалин Л.Н., Абазова Ф.И. Ацикловир при лечении острых и рецидивирующих герпесвирусных инфекций. *Клиническая фармакология и терапия*. 1995; 4(4): 78-81.
29. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. *Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека*. Киев: Феникс; 2009.
31. Коновалова Н.В., Храменко Н.И., Величко Л.Н., Юрченко Л.А. Роль уровня интерферонов α и γ 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. Сборник научных трудов по препарату Аллокин-альфа*. М.; 2016.

REFERENCES

1. Straus S.E. The chronic mononucleosis syndrome. *J. Infect. Dis.* 1988; 157(3): 405-12. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/157.3.405>
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(4): 585-8.
3. Cohen J.L. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343(7): 481-92. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM200008173430707>
4. Thorley-Lawson D.A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1(1): 75-82. Doi: <https://doi.org/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(2): 1296-307. Doi: <https://doi.org/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*. 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(5): 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. Doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20022058>
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- α /IFN- γ response. *BMC Cancer*. 2014; 14: 665. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-665>
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(2): 280-6. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood.v98.2.280>
11. Zhao X., Wu H., Lu H., Li G., Huang Q. Lamp: A database linking antimicrobial peptides. *PLoS One*. 2013; 8(6): e66557. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066557>
12. Conlon J.M., Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol. Biol.* 2010; 618: 3-14. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1_1
13. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013; 6(12): 1543-75. Doi: <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
14. Altfeld M., Gale M. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* 2015; 16(6): 554-62. Doi: <https://doi.org/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: <https://doi.org/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. U.S.A.* 2002; 99(20): 12628-32. Doi: <https://doi.org/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. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00331.x>
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(1): 17-26. Doi: <https://doi.org/10.3851/IMP1709>
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(8): 1026-33. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.12.002>
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(1-2): 110-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.09.005>
21. Kuczer M., Dziubasik K., Midak-Siewirska A., Zahorska R., Luczak 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. Doi: <https://doi.org/10.1002/psc.1219>
22. Kuczer M., Majewska A., Zahorska R. New alloferon analogues: synthesis and antiviral properties. *Chem. Biol. Drug Des.* 2013; 81(2): 302-9. Doi: <https://doi.org/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: <https://doi.org/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., Fingerth 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. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 1995; 4(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: <https://doi.org/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; 12: CD011487. Doi: <https://doi.org/10.1002/14651858>
29. Kazmirchuk V.E., Mal'tsev D.V. *Clinic, Diagnosis and Treatment of Human Herpesvirus Infections [Klinika, diagnostika i lechenie herpesvirusnykh infektsiy cheloveka]*. Kiev: Feniks; 2009. (in Russian)
30. Martínez 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: <https://doi.org/10.1039/C4NP00085D>
31. Konovalova N.V., Khramenko N.I., Velichko L.N., Yurchenko L.A. The role of interferon α and γ in the blood of patients with viral uveitis during treatment with the drug allokin-alpha. *Tochka zreniya. 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. Collection of Scientific Papers on the Drug Allokin-alpha [Novye podkhody k lecheniyu bol'nykh VEB-infektsiyey. Sbornik nauchnykh trudov po preparatu Allokin-al'fa]*. Moscow; 2016. (in Russian)

Поступила 06.02.19

Принята в печать 02.04.19