

Мальдов Д.Г.¹, Андропова В.Л.², Балакина А.А.³, Ильичев А.В.¹, Галегов Г.А.¹

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА СТИМФОРТЕ НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва; ²Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалея» Минздрава России, 123098, г. Москва; ³ФГБУ «Институт проблем химической физики» РАН, 142432, Московская область

При изучении иммуномодулирующего препарата Стимфорте на модели герпесвирусной инфекции мышей BALB/c было установлено, что сыворотки мышей, получавших препарат, на 4-й и 7-й день после инфицирования, по данным дот-блот-анализа, обладали в 3 раза большей способностью специфично связываться с культуральным вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) (в культуре клеток Vero) по сравнению с сыворотками контрольной группы зараженных мышей, полученными в те же сроки. Показано также, что эти сыворотки имели в 5 раз более высокий индекс нейтрализации. На основании вестерн-блота установлено, что антитела из сывороток мышей, получавших Стимфорте, значительно лучше связывались с gB- и gC-гликопротеинами ВПГ-1. Таким образом, Стимфорте как один из самых сильнодействующих на иммунную память препаратов может применяться для лечения хронических вирусных заболеваний.

Ключевые слова: *Стимфорте; вирус простого герпеса; иммуностимулятор; гуморальный ответ; подавление репликации вируса.*

Для цитирования: Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Балакина А.А., Ильичев А.В., Галегов Г.А. Влияние иммуномодулирующего препарата стимфорте на гуморальный иммунный ответ при экспериментальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (4): 172-175. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-172-175

Maldov D.G.¹, Andronova V.L.², Balakina A.A.³, Ilyichev A.V.¹, Galegov G.A.²

INFLUENCE OF THE IMMUNOMODULATORY DRUG STIMFORTE ON THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN THE EXPERIMENTAL HERPES VIRUS INFECTION

¹ZAO «SKY LTD», Moscow, 129301, Russian Federation; ²D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation; ³Institute of Problems of Chemical Physics, Moscow region, 142432, Russian Federation

In the study of the immunostimulation preparation Stimforte activity using the model of the experimental herpes virus infection BALB/c, mice has shown that sera from mice treated with the drug on the 4th and 7th day after infection possessed a 3 times greater capability of specifically binding to the culture of HSV-1 (on cells Vero) according to dot blot analysis, as compared with intact infected mice sera obtained at the same time. It was also shown that these sera had a 5 times higher index of neutralization. On the basis of Western blots, it was detected that antibodies from sera of mice treated with Stimforte contacted the glycoproteins gB and gC of HSV-1 significantly better. Thus, Stimforte stimulates one of the strongest modulatory effects on the immune memory and is a promising drug for the treatment of chronic viral diseases.

Keywords: *Stimforte; herpes simplex virus; immunostimulator; humoral response; inhibition of viral replication.*

For citation: Maldov D.G., Andronova V.L., Balakina A.A., Ilyichev A.V., Galegov G.A. Influence of the immunomodulatory drug stimforte on the humoral immune response in the experimental herpes virus infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(4):172-175. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-172-175

For correspondence: Dmitry G. Maldov, Candidate of Biological Sciences ZAO «SKY LTD», Moscow, 129301, Russia Federation, E-mail: maldov-dv@yandex.ru

Information about authors:

Maldov D.G., <http://orcid.org/0000-0002-8214-0538>

Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0282>

Balakina A.A., <http://orcid.org/0000-0002-5952-9211>

Ilyichev A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4675-0766>

Galegov G.A., <http://orcid.org/0000-0001-6162-1650>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 07 August 2015

Accepted 19 November 2015

Введение

Вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1 и ВПГ-2) характеризуются чрезвычайно широким распространением в человеческой популяции – до 90% населения земного шара серопозитивны к ВПГ-1, ВПГ-2 или

обоим вирусам одновременно [1]. После первичного инфицирования ВПГ устанавливает пожизненную латентную инфекцию с периодическими рецидивами заболевания [2].

Наиболее перспективным путем предотвращения ре-

Для корреспонденции: Мальдов Дмитрий Григорьевич, канд. биол. наук, зав. лаб. фармакологии департамента высоких технологий ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва, E-mail: maldov-dv@yandex.ru

цидива инфекции и быстрого его купирования может являться создание пула высокоспецифичных антител, способных подавить продукцию вируса. При отсутствии выработки достаточного количества авидных антител или недостаточно быстром их появлении целесообразно стимулировать их продукцию и формирование клеток иммунной памяти в процессе первичного иммунного ответа с помощью препаратов – иммуномодуляторов. Одним из таких препаратов является Стимфорте [3]. Содержащиеся в препарате низкомолекулярные гликозаминогликаны [4], вероятно, и являются тем действующим началом, которое способствует более сильному и быстрому иммунному ответу при воспалении [5, 6] и активации образования антител у экспериментальных животных, что показано для таких гликозаминогликанов, как гиалуроновая кислота и гепараны [7, 8], входящих в состав Стимфорте [4, 9].

В данной работе изучается возможность стимуляции образования специфических антител, блокирующих развитие герпесвирусной инфекции, препаратом Стимфорте при экспериментальной инфекции ВПГ-1 у мышей.

Материал и методы

Клетки. В работе использовали культуру клеток почек зеленой маргышки Vero E6.

Вирус. Эталонный штамм вируса простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1/L₂) получен из Государственной коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Животные. В исследовании использовали самцов белых линейных мышей BALB/c массой тела 12 г по 4 животных в группе. Инфекционный материал вводили внутрибрюшинно в дозе $3,0 \cdot 10^4$ БОЕ/0,2 мл/мышь. Животные были получены из питомника Научного центра биомедицинских технологий ФМБА, филиал «Столбовая» (Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Все процедуры на животных выполняли строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» за № 755 от 12.08.1977.

Препарат Стимфорте (ЗАО «СКАЙ ЛТД») в разовой дозе 100 мг/мышь вводили внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл двукратно: первое введение через 2 ч после заражения животных, затем вторично через 48 ч.

Инфекционный титр вируса определяли методом бляшкообразования [5].

Сыворотку крови животных получали стандартным методом на 4-й и 7-й дни после заражения. Контрольная группа – здоровые мыши, которым двукратно вводили физиологический раствор. Сыворотки каждой мыши тестировали отдельно в реакции нейтрализации и параллельно в вестерн-блоте и дот-блоте.

При постановке реакции нейтрализации сыворотку разводили с кратностью 2. Для разведения использовали среду поддержки. Вирус и сыворотку соединяли в объемных соотношениях 1:1, выдерживали полученную смесь в течение 1 ч при 37°C и использовали для заражения клеточных культур.

Дот-блот реакция. Разведения каждого образца сыворотки в 1X TBS-твин-буфере («Sigma Chemical Co.») готовили с кратностью 100, 300 и 1000. Монослойные культуры клеток Vero E6 инфицировали ВПГ-1 с множественностью 0,1 БОЕ/кл и инкубировали в течение 48 ч, когда вирусиндуцированный цитопатический эффект полностью поражал весь клеточный монослой. В качестве контроля использовали неинфицированную культуру

клеток, инкубированную в тех же условиях. Полученный материал (инфицированные (опыт) и неинфицированные (контроль) клетки) после трехкратного замораживания – оттаивания центрифугировали (5000 об/мин в течение 5 мин). Титр вируса в супернатанте составил $5 \cdot 10^8$ БОЕ/мл. Опытные образцы с титром $5 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^8$ БОЕ/мл наносили на фильтры Hybond PVDF («Amersham GE Healthcare», США) в объеме 3 мкл. Контрольный образец (неинфицированная культура) наносился в тех же разведениях по белку (2 мг/мл), что и зараженная ВПГ-1 культура. Фильтры высушивали и помещали в буфер 100 mM Tris HCl (pH 7,5) + 20% метанол на 2 ч. Затем фильтры промывали в деионизированной воде и помещали в блокирующий буфер TBS + твин-20 + BSA на 15 мин. Полученный таким образом материал переносили в разведения сыворотки (по одной параллели в каждое разведение) на 15 ч при комнатной температуре. Отмывку, инкубацию с вторичными антителами к мышинным иммуноглобулинам («Santa Cruz Biotechnology») и проявление проводили, как описано ранее [10].

Вестерн-блот выполняли по описанной ранее методике [10]. В качестве первичных антител использовали сыворотки «B4 – 4-й день Вирус», «BC4 – 4-й день Ви-

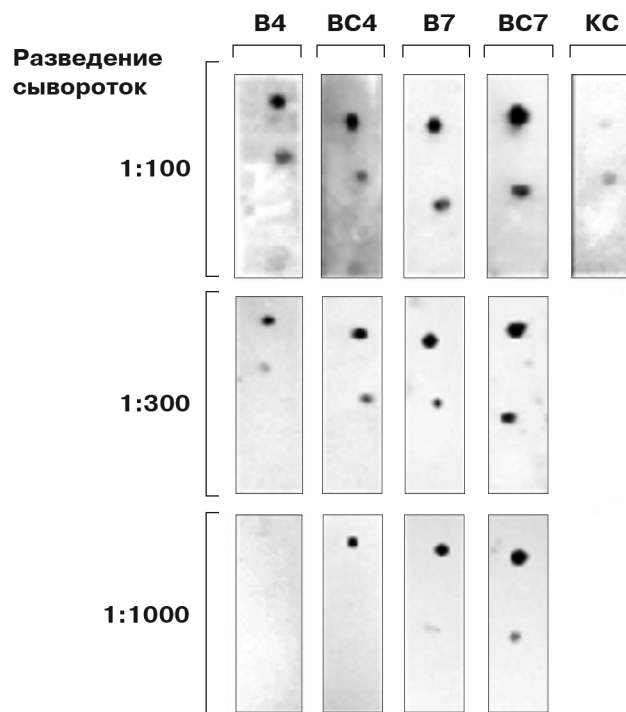


Рис. 1. Дот-блот-анализ сывороток мышей, зараженных ВПГ-1 и леченных Стимфорте.

Для дот-блот-анализа использовали культуральный вирус с исходным титром 10^6 БОЕ/мл (пятно в центре каждого фильтра) и 10^8 БОЕ/мл (пятно в верхней части каждого фильтра). В качестве контроля использовали клетки Vero E6, выращенные и инкубированные в тех же условиях, что и культура-продукент, и в тех же количествах (по белку), – пятно в нижней части каждого фильтра. Объем нанесения 3 мкл/пятно.

KC – сыворотка неинфицированных животных; B4 – сыворотка животных через 4 сут после инфицирования. Здесь и на рис. 2: BC4 – сыворотка животных, получавших Стимфорте, через 4 сут после инфицирования; B7 – сыворотка через 7 сут после инфицирования; BC7 – сыворотка животных, получавших Стимфорте, через 7 сут после инфицирования.

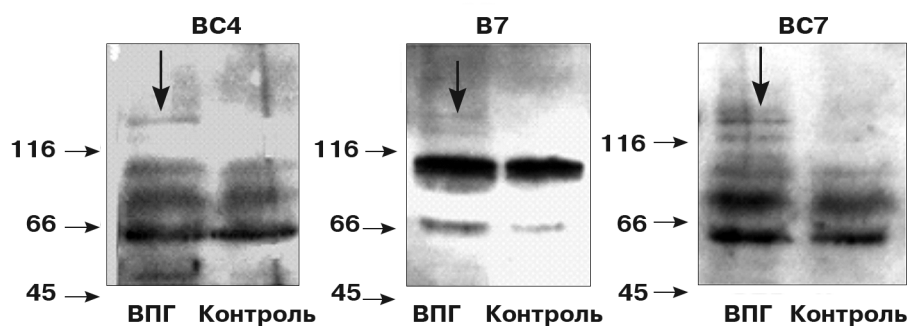


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ сывороток мышей, зараженных ВПГ-1 и леченных Стимфорте.

Для вестерн-блот-анализа использовали культуру клеток Vero E6 с титром ВПГ-1 10^8 БОЕ (внизу). В качестве контроля использовали клетки Vero, выращенные и инкубированные в тех же условиях, – Контроль (внизу). Слева от блотов обозначены мол. массы метчиков. Стрелкой обозначены белки, присутствующие только в зараженной культуре.

рус + Стимфорте», «B7 – 7-й день Вирус» и «BC7 – 7-й день Вирус + Стимфорте» в разведении 1:100.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен дот-блот-анализ мышинных сывороток, полученных на 4-е сутки инфекции, когда впервые появляются антитела к ВПГ в детектируемых количествах, и на 7-е сутки, когда антигенный ответ достигает максимального значения. Кроме того, для контроля использовали нормальную сыворотку неинфицированных животных (КС – контроль сыворотки).

Видно, что КС не связывает ни зараженный, ни незараженный материал. Следовательно, связывание, обнаруженное в остальных образцах, специфическое. Пятно из незараженной культуры также визуальное не обнаруживается на блоте. На фильтре, обработанном сывороткой В4, полученной на 4-й день после заражения животных, при количестве вируса $1,5 \cdot 10^4$ БОЕ/проба пятно отчетливо видно при разведении сыворотки в 100 и 300 раз и едва различимы при разведении сыворотки в 1000 раз. При увеличении количества вируса до $1,5 \cdot 10^6$ БОЕ/проба пятно видно и при разведении в 1000 раз. Вид блотов с сывороткой В7 практически неотличим от такового для ВС4. Самая активная сыворотка – ВС7: при ее разведении в 1000 раз пятно вируса еще видно даже при низкой дозе вируса $1,5 \cdot 10^4$ БОЕ/проба.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что специфическая иммуногенность сывороток крови мышей, получавших Стимфорте, примерно в 3 раза выше, чем у зараженных, но не леченных животных.

В таблице представлены результаты изучения нейтрализующей активности сывороток крови инфицированных ВПГ-1 мышей, получавших препарат Стимфорте (BC4 и BC7), по сравнению с контрольными сыворотками, полученными из крови инфицированных, но не леченных животных (B4 и B7).

Так как сыворотка крови незараженных животных (КС) может содержать неспецифические антитела, способные повлиять на конечный результат титрования вируса даже в отсутствие специфических антител, в качестве контроля использовали физиологический раствор, а КС – в качестве референс-пробы при определении нейтрализующей активности сывороток крови мышей, инфицированных ВПГ-1. Результаты, приведенные в таблице, показывают, что титр инфекционного материала,

обработанного КС, не отличается существенно от титра вируса, обработанного в тех же условиях физиологическим раствором. Следовательно, нейтрализующую активность сыворотки интактных животных можно признать несущественной.

При титровании сыворотки крови, полученной через 4 сут после инфицирования, установлено, что ее способность нейтрализовать ВПГ-1 значительно выше в группе животных, получавших Стимфорте (группа BC4), по сравнению с B4 (мыши, которые не получали препарат).

Аналогичный результат был получен при изучении нейтрализующей активности сыворотки крови животных, полученной через 7 сут после инфицирования (группы B7

и BC7). Наиболее выраженной способностью нейтрализовать ВПГ-1 обладала сыворотка крови, полученная от леченных животных через 7 сут после инфицирования (группа BC7).

После вычитания величины неспецифической сорбции (сыворотка КС) видно, что индекс нейтрализации сывороток от мышей, получавших Стимфорте, примерно в 5 раз выше, чем у нелеченных животных (0,95 против 4,57 через 4 ч и 5,03 против 27,1 через 7 ч). Это позволяет предположить, что Стимфорте стимулирует выработку антител, значительно увеличивает не только специфичность сывороток, но и их avidность.

Результаты вестерн-блота также указывают на увеличение специфического связывания антител из сывороток крови мышей, получавших Стимфорте. Как видно на рис. 2, на блоттинге с сывороткой BC4 единственный белок, который определяется в пробе зараженных клеток Vero E6, но не определяется в неинфицированных клетках, – это белок с мол. массой 130 кДа. Сывороткой B7 выявляется, кроме этого, еще один полипептид

Влияние препарата Стимфорте на нейтрализующую активность сыворотки крови мышей BALB/c, инфицированных ВПГ-1

Сыворотка	Условия эксперимента	Титр вируса, Ig БОЕ/мл	Индекс нейтрализации
К	Физиологический раствор	4,51±0,03	Нет
КС	Сыворотка крови неинфицированных животных	4,27±0,03	1,74
B4	Сыворотка крови животных через 4 сут после инфицирования	4,08±0,01	2,69
BC4	Сыворотка крови животных, получавших Стимфорте, через 4 сут после инфицирования	3,68±0,03	6,77
B7	Сыворотка крови животных через 7 сут после инфицирования	3,71±0,03	6,31
BC7	Сыворотка крови животных, получавших Стимфорте, через 7 сут после инфицирования	3,05±0,05	28,84

Примечание. Индекс нейтрализации вычисляли как антилогарифм показателя снижения величины инфекционного титра вируса относительно контроля.

с близкой мол. массой 120 кДа, оба слабо проявляются в данной сыворотке. Наконец, оба этих белка очень хорошо видны при использовании ВС7. Белки с 120 и 130 кДа хорошо известны как поверхностные прикрепительные гликопротеины ВПГ-1 – gВ и gС соответственно [11]. Они обеспечивают связывание вируса с клеточными рецепторами на наружной мембране клеток. Кроме того, gВ является белком слияния и отвечает за проникновение в клетку, а gС (как gЕ и gI) относится к иммунным белкам «уклонения». Антитела к белку gС являются специфическими для распознавания клеток, зараженных ВПГ, Т-киллерами, и их элиминации [12].

Таким образом, антитела сывороток крови мышей, леченных Стимфорте, более аффинны к вирусспецифическим поверхностным белкам ВПГ-1, раньше специализируются и достигают более высоких нейтрализующих титров, чем сыворотки крови нелеченных животных.

Известно, что первичная инфекция ВПГ протекает тяжелее, чем рецидив [13]. Снижение тяжести клинического течения инфекционного процесса при повторной инфекции, вероятно, обуславливается присутствием специфических антител, быстротой и уровнем специфического гуморального ответа [14]. Так как IgM появляются в крови в течение первых 5 дней после заражения, а IgA и IgG к VP5, gВ, gD и gC/gE определяются у большинства пациентов в течение 2 и 3 нед соответственно [15], стимуляция процесса антителообразования может препятствовать распространению вируса с кровью- и лимфотоком и способствовать ускорению клинического разрешения острой инфекции.

Особенно важно при хронических заболеваниях воздействие на иммунную память, так как активированная против определенного генотипа иммунная система очень быстро мобилизуется, причем это касается всей системы адаптивного иммунитета. Одним из путей купирования очередного рецидива может являться быстрая нейтрализация начавшего репродуцироваться вируса. Этим можно объяснить ряд наблюдений при применении Стимфорте в клинике. Так, в ходе клинических испытаний Стимфорте у пациентов с хронической герпесвирусной инфекцией наблюдалось сокращение сроков затухания рецидивов под действием этого препарата [16]. При проведении клинических испытаний Стимфорте при хроническом гепатите В также наблюдалось быстрое купирование рецидивов и снижение количества вирусных антигенов и ДНК в организме пациентов, а также ферментов-маркеров, свидетельствующих о поражении печени [17], а в ходе испытаний Стимфорте против острого гепатита В отмечено полное отсутствие хронизации заболевания у 50 пациентов [18].

Финансирование. Работа выполнена без дополнительной финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 5–8, 11–15 см. REFERENCES)

3. Мальдов Д.Г., Чирвон Е.А., Ильичев А.В., Бабаян С.С. Активация препаратом «Стимфорте» моноцитов и макрофагов. *Иммунология*. 2011; (5): 105–12.
4. Мальдов Д.Г., Григорян С.С., Муругин В., Ильичев А.В., Чубарова Г.Д., Бельков А.П. Гликозаминогликаны в составе Стимфорте. *Фармация*. 2014; (8): 27–31.
9. Мальдов Д.Г., Муругин В., Ильичев А.В., Чубарова Г.Д., Иванова Н.Е., Бельков А.П. Гиалуроновая кислота в составе Стимфорте. *Фармация*. 2013; (4): 40–3.

10. Ступина Т.С., Пархоменко И.И., Балалаева И.В., Костюк Г.В., Санина Н.А., Терентьев А. А. Цитотоксические свойства нитрозильного комплекса железа с фенилтиолом. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2011; (7): 1464–9.
16. Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Пинегин Б.В. Применение препарата «Стимфорте» в комплексной терапии рецидивирующей герпес-вирусной инфекции. *Герпес*. 2009; (2): 30–6.
17. Погорельская Л.В., Хлопова И.Н., Григорян С.С., Трякина И.П., Рик Н.А., Мальдов Д.Г. Перспективы использования «Стимфорте» при хроническом гепатите В. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (5): 15–20.
18. Погорельская Л.В., Хлопова И.Н., Григорян С.С., Трякина И.П., Рик Н.А., Мальдов Д.Г. Клинико-иммунологическая и вирусологическая оценка препарата «Стимфорте» при остром гепатите В. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (3): 14–8.

REFERENCES

1. Díaz-Ramón J.L., DÍaz-Pérez J.L. Skin diseases with high public health impact. Herpes simplex and zoster. *Eur. J. Dermatol.* 2008; 18 (1): 108–11.
2. Pereira F.A. Herpes simplex: evolving concepts. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996; 35 (4): 503–20.
3. Mal'dov D.G., Chirvon E.A., Il'ichev A.V., Babayan S.S. Monocytes and macrophages are activated by «Stimforte» medicine. *Immunologiya*. 2011; (5): 105–12. (in Russian)
4. Mal'dov D.G., Grigoryan S.S., Murugin V., Il'ichev A.V., Chubarova G.D., Bel'kov A.P. Glycosaminoglycans composed Stimforte. *Farmatsiya*. 2014; (8): 27–31. (in Russian)
5. Akbarshahi H., Axelsson J.B., Said K., Malmström A., Fischer H., Andersson R. TLR4 dependent 1galisulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. *J. Transl. Med.* 2011; 9: 219.
6. Kumar S., Iyer S., Bauer H., Coenen M., Bahn R.S. A stimulatory thyrotropin receptor antibody enhances hyaluronic acid synthesis in graves' orbital fibroblasts: inhibition by an IGF-I receptor blocking antibody. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97 (5): 1681–7.
7. Ma L., Qiao H., He C., Yang Q., Cheung C.H., Kanwar J.R. et al. Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer. *Invest. New Drugs*. 2012; 30 (2): 508–17.
8. Scott R.A., Panitch A. Glycosaminoglycans in biomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2013; 5 (4): 388–98.
9. Mal'dov D.G., Murugin V., Il'ichev A.V., Chubarova G.D., Ivanova N.E., Bel'kov A.P. The hyaluronic acid in the Stimforte composition. *Farmatsiya*. 2013; (4): 40–3. (in Russian)
10. Stupina T.S., Parkhomenko I.I., Balalaeva I.V., Kostyuk G.V., Sanina N.A., Terent'ev A. A. Cytotoxic properties of nitrosyl iron complex with fenistil. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2011; (7): 1464–9. (in Russian)
11. Grandi P., Wang S., Schuback D., Krasnykh V., Spear M., Curiel D.T. et al. HSV-1 virions engineered for specific binding to cell surface receptors. *Mol. Ther.* 2004; 9 (3): 419–27.
12. Glorioso J., Kees U., Kumel G., Kirchner H., Krammer P.H. Identification of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein gC as the immunodominant antigen for HSV-1-specific memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 1985; 135 (1): 575–82.
13. Kishore J., Misra R., Paisal A., Pradeep Y. Adverse reproductive outcome induced by Parvovirus B19 and TORCH infections in women with high-risk pregnancy. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5 (12): 868–73.
14. Stanberry L.R., Cunningham A.L., Mindel A., Scott L.L., Spruance S.L., Aoki F.Y. et al. Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30 (3): 549–66.
15. Ashley R.L., Corey L., Dalessio J., Wilson P., Remington M., Barnum G. et al. Protein-specific cervical antibody responses to primary genital herpes simplex virus type 2 infections. *J. Infect. Dis.* 1994; 170 (1): 20–6.
16. Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E., Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Pinegin B.V. Use of the drug «Stimforte» in the complex treatment of recurrent herpes virus infection. *Herpes*. 2009; (2): 30–6. (in Russian)
17. Pogorel'skaya L.V., Khlopova I.N., Grigoryan S.S., Ttryakina I.P., Rik N.A., Mal'dov D.G. Prospects for the use «Stimforte» in chronic hepatitis B. *Epidemiologiya i infektzionnye bolezni*. 2013; (5): 15–20. (in Russian)
18. Pogorel'skaya L.V., Khlopova I.N., Grigoryan S.S., Ttryakina I.P., Rik N.A., Mal'dov D.G. Clinical, immunological and virological assessment of the drug «Stimforte» acute hepatitis B. *Epidemiologiya i infektzionnye bolezni*. 2013; (3): 14–8. (in Russian)