

УДК: 615.322

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ КАПЕЛЬ ПЛЕТНЕВА №30
(СЕЛЕФОКЛИТЕНА) НА ВИРУС ГЕПАТИТА С**

В.В. ПЛЕТНЕВ, П.Г. ДЕРЯБИН

*Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ,
ул. Гамалеи, д. 16, Москва, 123098, Россия, e-mail: pletnevtreatment@mail.ru*

Аннотация. В статье показана целесообразность разработки и использования новых фитотерапевтических препаратов. Дана характеристика хронических гепатитов, с акцентом на вызываемых вирусом гепатита С. Показана ограниченность применения лекарственных препаратов и стволовых клеток при его лечении. Изучен противовирусный эффект запатентованных и изготовленных в России из растительного сырья (побеги черники, хлорофилл, β-каротин, витамины) каплей Плетнева №30. Установлена цитотоксическая активность этих капель на культуры клеток инфицированных вирусом гепатита С. Доказана высокая вирулицидная активность препарата.

В разведении 1:50 КП №30 защищают 100% клеток при внесении сразу же после их заражения вирусом гепатита С при 100% гибели в контроле. При этом продукция вируса снижается на 6,0 lg.

В разведении 1:25 КП №30 защищают 100% клеток при внесении через 24 ч после заражения клеток при 100% гибели в контроле и снижают продукцию инфекционного вируса на 6,3 lg.

Установлено также, что КП №30 обладают выраженными вирулицидными свойствами. В разведениях 1:50 КП №30 полностью инактивируют активность вируса гепатита С в течение 15-, 30- и 45-минутной экспозиции. При разведении 1:100, КП №30 полностью инактивируют активность данного вируса через 30 и 45 минут.

Ключевые слова: вирус гепатита С, генотип 1b, капли Плетнева №30, селефоклитен.

**STUDY OF ANTI-VIRAL ACTION OF PLETNEV DROPS No. 30 (SELEPHOCLITEN)
ON THE HEPATITIS C VIRUS**

V.V. PLETNEV, P.G. DERYABIN

*Institute of Virology named after D.I. Ivanovsky of FSBI "NRCEM named after N.F. Gamalei" of Ministry
of Health of Russia, Gamalei str., 16, Moscow, 123098, Russia, e-mail: pletnevtreatment@mail.ru*

Abstract. The article shows the feasibility of the development and use of new phytotherapeutic drugs. The characteristic of chronic hepatitis is given. Attention is focused on hepatitis caused by the hepatitis C virus. The limited use of drugs and stem cells in its treatment has been shown. The antiviral effect of patented and made in Russia from vegetable raw materials (blueberry shoots, chlorophyll, β-carotene, vitamins) of Pletnev drops No. 30 was studied. The cytotoxic activity of these droplets on cultures of cells infected with the hepatitis C virus has been established. High virucidal activity of the drug has been proven.

At 1:50 dilutions, the drops No. 30 protect 100% of the cells when introduced immediately after they are infected with the hepatitis C virus at 100% death in the control. At the same time, the production of the virus is reduced by 6.0 lg.

At 1:25 dilutions, the drops No. 30 protect 100% of the cells when they are applied 24 hours after infection of the cells with 100% death in the control and reduce the production of the infectious virus by 6.3 lg.

It was also established that the drops No. 30 have pronounced virucidal properties. At 1:50 dilutions, the drops No. 30 completely inactivate the activity of the hepatitis C virus during 15, 30 and 45-minute exposure. At a dilution of 1: 100, the drops No. 30 completely inactivate the activity of this virus after 30 and 45 minutes.

Key words: hepatitis C virus, genotype 1b, Pletnev drops №30, Selephoclitene.

Актуальной задачей современной медицины является разработка новых высокоэффективных лекарственных средств, фитотерапевтических препаратов, не вызывающих привыкания, высокоэффективных, без нежелательных побочных эффектов, воздействующих на человеческий организм, как сложную саморегулирующуюся систему (*complexity*) [1].

Вирусный гепатит С (ВГС) является распространенной инфекцией. Этот вирус имеет несколько генотипов. Наиболее сложным, опасным и трудно поддающимся терапии является генотип 1b.

В отличие от вируса гепатита В, ВГС в 50-80% случаев приводит к хроническому заболеванию печени, а приблизительно у половины хронически инфицированных больных впоследствии как осложне-

ние развивается цирроз печени или первичная гепатоцеллюлярная карцинома. В последние годы появляется все больше сообщений, свидетельствующих о способностях ВГС поражать не только печень, но и почки, сердечную мышцу, поджелудочную железу, клетки крови человека, центральную нервную систему и другие органы, и ткани [1].

До сих пор не разработана вакцина против ВГС, а лекарственные препараты для лечения данного заболевания характеризуются недостаточной эффективностью и высокой стоимостью. Остается актуальным поиск и разработка новых эффективных препаратов для оптимизации технологий лечения больных ВГ. Лечение ВГС с использованием стволовых клеток, несмотря на эффективность, сопряжено со значительными финансовыми затратами, что ограничивает доступность метода [2]. Поэтому практический интерес представляет оценка влияния комплексных растительных препаратов, в частности, изготовленных из растительного сырья *капель Плетнева №30* (КП №30) на вирус гепатита С. КП №30 изготавливается с использованием побегов черники обыкновенной – *Vaccinium myrtillus L.*, семейства брусничных (*Vacciniaceae*), в сочетании с хлорофиллом, β-каротином, витаминами С, Р, РР [3], запатентован в РФ.

Материалы и методы исследования. При проведении исследований были использованы высоко чувствительные к патогенному действию ВГС культуры *перевиваемых клеток почек эмбриона свиньи* (СПЭВ), полученные из лабораторий культур тканей ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Иванковского» Минздрава РФ, а также патогенный штамм ВГС, выделенный из сыворотки крови больной хроническим гепатитом С (положительные данные на РНК ВГС и антитела к ВГС). Было показано, что изолированный штамм ВГС относится к наиболее распространенному в России генотипу *Ib* инфекции, который трудно поддается лечению интерфероном. Была использована инфекционная доза ВГС-содержащего материала, равная $10,0 \text{ 50\%-тканевой цитопатической дозы (ТЦД}_{50})/20$ мкл для культур клеток.

Осуществлено изучение противовирусного действия КП №30 на вирус гепатита С. На 3-й день после инфицирования клеток отбирали пробы культуральной жидкости и титровали на культурах клеток СПЭВ. Инфекционная активность ВГС учитывалась на 6-7 день после инфекции по результатам титрования инфекционной активности, когда развилось максимальное цитопатогенное действие вируса. Титр вируса был рассчитан с помощью формулы Рида и Менча. Параллельно изучали жизнеспособность клеток, инфицированных ВГС, под влиянием действия нетоксических доз КП №30, а именно – процент клеток, выживших в результате инфекции в условиях действия КП №30. В качестве контроля служили нормальные неинфицированные культуры клеток СПЭВ, а также ВГС-инфицированные культуры клеток СПЭВ, не обработанные КП №30.

Результаты исследования вирулицидного действия КП №30 на ВГС в культуре клеток учитывали по проценту ВГС-инфицированных культур клеток, погибших в результате вирусной инфекции, и по остаточной инфекционной активности вируса, сохранившейся в результате воздействия КП №30. Вирусологические исследования КП №30 с использованием вируса гепатита С проведены на базе Института вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России с соблюдением мер безопасности и выполнены в соответствии с требованиями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств от 2012 года [2].

Результаты и их обсуждение. Цитотоксическая активность КП №30 исследована путем обработки культур СПЭВ различными концентрациями КП №30 на питательной среде и инкубацией при 37°C в течение 6 дней. Цитотоксическую активность КП №30 регистрировали со 2-го дня после обработки клеток. Затем исследования проводили с концентрациями КП №30, не обладающими цитотоксическим эффектом.

КП №30 обладали токсическим эффектом для суточных культур клеток СПЭВ, выращенных в 24-луночных панелях. КП №30 вызывал гибель 2-3% клеток в разведении 1:25. Большие разведения КП №30 оказались нетоксичными для клеток СПЭВ 2-дневного возраста.

Результаты исследования цитотоксической активности КП №30 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Цитотоксические свойства КП №30 для культур клеток СПЭВ

Препарат	% клеток, погибших на 2-й – 3-й дни после внесения препарата в разведениях												
	Контроль клеток		1:25		1:50		1:100		1:200		1:400		
	1 с	2 с	1 с	2 с	1 с	2 с	1 с	2 с	1 с	2 с	1 с	2 с	
КП №30	0	0	100	2,5	50	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: 1 с – обработка клеток препаратами через 1 сутки после посева;
 2 с – через 2 суток высева в пластиковые панели

Жизнеспособность инфицированных культур клеток СПЭВ в условиях обработки КП №30

Препарат	Время обработки культур клеток	Выживаемость ВГС инфицированных клеток (в %) при воздействии КП №30 в разведениях:				
		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
КП №30	За 24 ч до заражения клеток	н.и.	100	100	100	90
Контроль	-	0	0	0	0	0
КП №30	В момент заражения клеток	н.и.	100	50	25	25
Контроль	-	0	0	0	0	0
КП №30	Через 24 ч после заражения клеток	100	25	25	0	0
Контроль	-	0	0	0	0	0

Примечание: н.и. – не исследовали

С целью изучения противовирусного действия КП №30 на ВГС, культуры клеток СПЭВ обрабатывали КП №30 за 24 ч до заражения, в момент заражения и через 24 ч после заражения клеток. Затем определяли жизнеспособность инфицированных культур клеток СПЭВ в условиях обработки КП №30 и титр ВГС в среде инфицированных клеток при воздействии КП №30 по сравнению с контролем вируса.

100% клеток, инфицированных ВГС, сохраняли жизнеспособность в случае, когда были обработаны препаратом в разведении 1:25 через 24 ч после инфекции. Однако в этих условиях происходила утрата способности защищать клетки от цитопатогенного действия вируса при разведении КП №30 1:50 и более. Результаты исследования противовирусной активности КП №30 в отношении вируса гепатита С представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 3

Противовирусный эффект нетоксических доз КП №30, выявленного в условиях инфекции культур клеток СПЭВ, зараженных ВГС

Препарат	Время обработки культур клеток	Титр ВГС в среде инфицированных клеток (в lgТЦД ₅₀ /мл) при воздействии КП №30 в разведениях:				
		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
КП №30	За 24 ч до заражения клеток	н.и.	1,0	1,5	6,0	8,0
Контроль	-	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1
КП №30	В момент заражения клеток	н.и.	3,0	6,0	8,0	8,0
Контроль	-	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
КП №30	Через 24 ч после заражения клеток	3,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Контроль	-	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3

Сохранение высокой жизнеспособности клеток, инфицированных ВГС, под влиянием КП №30 в определенных условиях являлось свидетельством высокой способности КП №30 защищать клетки СПЭВ от цитопатогенного действия ВГС. Однако, известно, что многие вирусы сохраняют способность длительно продуцироваться инфицированными клетками, при этом жизнеспособность этих клеток остается фактически неотличимой от здоровых неинфицированных культур клеток. Поэтому представлялось важным изучить способность выживших от инфекции ВГС клеток СПЭВ продуцировать инфекционный вирус.

Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что обработка ВГС инфицированных клеток СПЭВ каплями Плетнева №30 за 24 ч до инфекции приводила к снижению титров ВГС на 9,1 lg (разведение вносимого КП №30 1:50), на 7,6 lg (разведение КП №30 1:100) и на 3,1 lg (разведение КП №30 1:200). При введении КП №30 в разведении 1:50 сразу после заражения клеток происходило снижение продукции вируса на 6,0 lg. При введении КП №30 в разведении 1:25 сразу через 24 ч после инфекции снижалась продукция вируса на 9,3 lg.

Вирулицидную активность на вирус гепатита СКП №30 определяли при экспозиции вирусосодержащего материала и различных концентраций КП №30 в течение 15, 30 и 45 мин при комнатной температуре. Результаты учитывали по проценту ВГС инфицированных культур клеток, погибших в результате вирусной инфекции, а также по остаточной инфекционной активности вируса, сохранившейся в результате воздействия КП №30.

Полученные данные являлись свидетельством высоких вирулицидных свойств КП №30. В частности, показано, что вирулицидная активность КП №30, в разведении до 1:50 при экспозиции в течение 15, 30 и 45 мин с вирусным материалом равнялась 100%. Экспозиция материала, содержащего ВГС, вместе с препаратом, разведенным до 1:100 при экспозиции в течение 30 и 45 минут, приводила к защите 100% клеток от вирусиндуцированной гибели.

Аналогичные результаты, свидетельствующие о высокой вирулицидной активности КП №30, получены и при определении остаточной инфекционной активности ВГС после воздействия препаратом. Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что инфекционные свойства ВГС частично утрачивались после 15-, 30- и 45-минутного воздействия КП №30 в разведении 1:100.

Вирулицидная активность КП №30 проявлялась и при использовании препарата в разведении 1:200.

Результаты исследования вирулицидной активности КП №30 представлены в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Вирусиндуцированная гибель культур клеток СПЭВ (в %), зараженных ВГС после экспозиции в КП №30 разных концентраций на 5-е сутки после заражения

Препарат	Разведения	Время экспозиции вируса в КП №30, мин		
		15	30	45
	1:50	0	0	0
КП №30	1:100	50	0	0
	1:200	80	75	25
Контроль	0	100	100	100

Таблица 5

Способность продуцировать вирус клетками, зараженными ВГС после экспозиции в КП №30

Препарат	Разведения	Время экспозиции вируса в КП №30, мин		
		15	30	45
	1:50	0*	0*	0*
КП №30	1:100	1,5*	0*	0*
	1:200	2,3*	1,5*	1,0*
Контроль вируса	0	5,7*	5,0*	5,3*

Примечание: * – титры ВГС в lg ТЦД₅₀/мл в пробах среды культур клеток СПЭВ, зараженных вирусом гепатита С после экспозиции КП №30

Заключение. Таким образом, при изучении противовирусного действия капель Плетнева №30 в отношении вируса гепатита С в предварительных экспериментах установлено, что препарат обладает умеренной токсичностью на культуру клеток почек эмбриона свиньи и 50-процентная цитотоксическая доза соответствует разведению КП №30 1:50.

Внесенный в культуру СПЭВ за 24 часа до ее инфицирования вирусом гепатита С в разведениях 1:50, 1:100 и 1:200, КП №30 защищают 100% инфицированных клеток от цитопатогенного действия вируса при 100% гибели клеток в необработанных препаратом инфицированных клетках. В этих условиях продукция вируса инфицированными клетками снижается на 8,1 lg , 7,6 lg и 3,1 lg соответственно.

В разведении 1:50 КП №30 защищают 100% клеток при внесении сразу же после их заражения вирусом гепатита С при 100% гибели в контроле. При этом продукция вируса снижается на 6,0 lg .

В разведении 1:25 КП №30 защищают 100% клеток при внесении через 24 ч после заражения клеток при 100% гибели в контроле и снижают продукцию инфекционного вируса на 6,3 lg .

Установлено также, что КП №30 обладают выраженными вирулицидными свойствами. В разведениях 1:50 КП №30 полностью инактивируют активность вируса гепатита С в течение 15-, 30- и 45-минутной экспозиции. При разведении 1:100, КП №30 полностью инактивируют активность данного вируса через 30 и 45 минут.

Выражаем благодарность за помощь и постоянные консультации в проведении настоящих экспериментальных исследований доктору медицинских наук, профессору Петру Григорьевичу Дерябину (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

Литература

1. Дерябин П.Г. Распространение гепатита С в России становится социальной проблемой // Сан-эпидконтроль. Охрана труда. 2009. № 4.
2. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
3. Плетнев В.В. Капли Плетнева для восстановления метаболизма и энергообеспечения тканей и органов. Патент РФ на изобретение №2466734. 2011.

References

1. Deryabin PG. Rasprostranenie gepatita S v Rossii stanovitsya social'noj problemoj [Distribution of HCV in Russia is becoming a social problem]. Sanepidkontrol'. Ohrana truda. 2009;4. Russian.
2. Mironov AN, Bunatyan ND. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv [The guidelines for preclinical studies of pharmaceuticals]. Moscow: Grif i K; 2012. Russian.
3. Pletnev VV. Kapli Pletneva dlya vosstanovleniya metabolizma i ehnergoobespecheniya tkanej i organov [Pletnev Drops to restore metabolism and energy supply of tissues and organs]. Patent Russian Federation na izobretenie №2466734. 2011. Russian.

Библиографическая ссылка:

Плетнев В.В., Дерябин П.Г. Исследование противовирусного действия капель Плетнева №30 (селефоклитена) на вирус гепатита С // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №5. Публикация 3-8. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-5/3-8.pdf> (дата обращения: 02.10.2018). *

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-5/e2018-5.pdf>