

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Федякина И.Т., Коноплева М.В., Прошина Е.С., Линник Е.В., Никитина Н.И.

## ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ СУБСТАНЦИИ «КАГОЦЕЛ» *IN VITRO* В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА H1N1, H1N1pdm09 И H3N2

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098 г. Москва, Россия

**Введение.** Активная циркуляция пандемического гриппа и новых вариантов гриппа H3N2 требует мониторинга противовирусной эффективности лекарственных препаратов, разрешенных для лечения гриппа на территории РФ. **Цель:** оценка противовирусного действия субстанции «Кагоцел» *in vitro* в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2. **Материал и методы.** Цитотоксическое действие субстанции «Кагоцел» в культуре клеток MDCK определяли с помощью красителя MTS. Противовирусную эффективность субстанции «Кагоцел» в отношении гриппозной инфекции изучали *in vitro* для культуры клеток MDCK, инфицированных штаммами вирусов гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2). Антивирусную активность субстанции «Кагоцел» проверяли по её действию на инфекционный титр вируса гриппа и по влиянию на уровень экспрессии вирусных антигенов в иммуноферментной тест-системе. **Результаты.** Субстанция «Кагоцел» была малотоксичной для культуры клеток MDCK. Кагоцел одинаково эффективно подавлял инфекционный титр вирусов гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 в культуре клеток MDCK. Исследование влияния субстанции «Кагоцел» на уровень экспрессии вирусных антигенов в ИФА тест-системе также показало его противовирусную эффективность в отношении всех тестируемых штаммов. Наблюдалась дозозависимость от концентрации субстанции и заражающей дозы вируса. **Обсуждение.** Эффективное подавление «Кагоцелом» репродукции штаммов вируса гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) в разных сублиниях культур клеток MDCK было показано различными методами. Результаты работы позволяют предположить, что наряду со способностью индуцировать интерфероны, Кагоцел может действовать на репродукцию вируса гриппа, но это требует дальнейших исследований. **Заключение.** Субстанция «Кагоцел» эффективно подавляет репродукцию штаммов вируса гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) *in vitro*. При этом индекс селективности достаточно высок.

**Ключевые слова:** Кагоцел; грипп; вирус; *in vitro*.

**Для цитирования:** Федякина И.Т., Коноплева М.В., Прошина Е.С., Линник Е.В., Никитина Н.И. Противовирусное действие субстанции «Кагоцел» *in vitro* в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(3): 125-131.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-125-131>

Fediakina I.T., Konopleva M.V., Proshina E.S., Linnik E.V., Nikitina N.I.

### ANTIVIRAL EFFECT OF «KAGOCHEL» SUBSTANCE *IN VITRO* ON INFLUENZA VIRUSES H1N1, H1N1pdm09 AND H3N2

N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation

**Introduction.** Active circulation of pandemic influenza and new variants of influenza H3N2 strains requires monitoring of antiviral efficacy of drugs permitted for influenza therapy in the Russian Federation. **Purpose.** Assessment of antiviral efficacy of «Kagocel» substance against influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2 *in vitro*. **Material and methods.** Cytotoxic effect of «Kagocel» substance on MDCK cells had been determined by stained with MTS. Antiviral efficacy of «Kagocel» substance against influenza infection has been studied *in vitro* in the culture of MDCK cells infected with influenza virus strains: A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/1/68 (H3N2) and A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2). The antiviral activity of «Kagocel» substance was tested by its effect on the infectious titer of the influenza viruses and on its impact on the expression level of viral antigens in the enzyme immunoassay test system. **Results.** «Kagocel» substance had low toxicity for MDCK cells. «Kagocel» inhibited the infection titer of influenza virus strains A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/1/68 (H3N2) and A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) in the MDCK cell culture with equal efficacy. Study of the impact of «Kagocel» substance on the expression level of viral antigens by ELISA also revealed its antiviral efficacy for all tested strains. Dose dependence was observed from concentration of substance and from infective dose of virus. **Discussion.** Effective suppression of the reproduction of influenza virus strains A(H1N1), A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) in the different sublines of MDCK cells with «Kagocel» was shown by the different methods. These results give the possibility to suggest that along with the ability to induce interferons, «Kagocel» can impact on the reproduction of influenza virus, but the further research is needed. **Conclusion.** «Kagocel» substance effectively inhibits the reproduction of influenza virus strains A(H1N1), A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) *in vitro*. At the same time, the selectivity index is quite high.

**Keywords:** Kagocel; influenza; virus; *in vitro*.

**For citation:** Fediakina I.T., Konopleva M.V., Proshina E.S., Linnik E.V., Nikitina N.I. Antiviral effect of «Kagocel» substance *in vitro* on influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 125-131. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-125-131>

**For correspondence:** Irina T. Fediakina, Lead Researcher of laboratory of Viral Ecology of D.I. Ivanovsky Institute of Virology of «N.F. Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: irfed2@mail.ru

**Для корреспонденции:** Федякина Ирина Тимофеевна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией экологии вирусов, ведущий научный сотрудник отдела экологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098 г. Москва. E-mail: irfed2@mail.ru

**Information about authors:**Konopleva M.V., <http://orcid.org/0000-0002-9724-695X>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 20 March 2019

Accepted 02 April 2019

**Введение**

Грипп – острая респираторная инфекция, представляющая серьезную проблему для общественного здравоохранения. По степени тяжести болезнь варьирует от легкой до тяжелой, возможны летальные исходы. Госпитализация и смерть происходят главным образом в группах высокого риска. Ежегодно в эпидемический сезон гриппа регистрируется 3–5 млн случаев тяжелой болезни и 250 000–500 000 случаев смерти во всем мире [1]. При этом известно, что пандемии вызывали лишь вирусы гриппа типа А. В настоящее время среди людей циркулируют подтипы гриппа А(Н1N1), в частности вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, вызвавший пандемию 2009 г., и А(Н3N2).

В эпидемических сезонах 2014–2015 и 2016–2017 гг. наибольшую активность проявил вирус гриппа А(Н3N2). Эпидемические штаммы вируса гриппа А(Н3N2) принадлежали к генетической группе 3С.2а, представленной А/Гонконг/4801/2014, и его подгруппе 3С.2а1, представленной А/Болзано/7/2016, которые имели близкое родство по антигенным свойствам [1–3]. Обращает на себя внимание то, что современные штаммы вируса гриппа А(Н3N2) полностью утратили антигенное родство с родоначальником пандемического цикла – А/Гонконг/1/68. Кроме того, в отличие от других вирусов гриппа, его эволюционная изменчивость имела линейный, поступательный характер, хотя в отдельные периоды были выявлены реверсии некоторых его дрейф-вариантов, примерами которых могут служить штаммы, выделенные в Австралии в 1979 г. и на Кубе в 1985 г. [4, 5]. Одной из наиболее сложных проблем применения противовирусных препаратов является резистентность вирусов к уже известным препаратам. Например, популяция вируса гриппа А(Н3N2) резистентна к препаратам адамантанового ряда, но сохранила чувствительность к умифеновиру и препаратам с антинейраминидазной активностью [2, 6]. В связи с этим представляется важным оценить способность различных препаратов оказывать противовирусное действие в отношении актуальных штаммов вируса гриппа. Одним из наиболее интересных препаратов, представленных на отечественном рынке, является Кагоцел.

Действующее вещество противовирусного препарата «Кагоцел» – уникальное соединение, полученное методом химического синтеза, в результате которого к полимерным молекулам окисленной перйодатным методом карбоксиметилцеллюлозы ковалентно присоединены молекулы госсипола [7]. В ходе многочисленных зарубежных исследований доказано, что госсипол оказывает выраженное фармакологическое действие, проявляя противовирусную, противоопухолевую, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность [7, 8]. В результате образования конъюгатов с различными соединениями или полимерными носителями госсипол утрачивает токсические свойства [7, 9]. Технология по-

лучения субстанции «Кагоцел» включает химический синтез, при котором применяется именно такой приём. Методом ВЭЖХ показано, что свободный госсипол в Кагоцеле обнаруживается лишь в следовых количествах (<0,005%) [7].

**Цель** настоящего исследования – изучение противовирусной активности субстанции «Кагоцел» в отношении вирусов гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (Н1N1), А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (Н3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (Н3N2).

**Материал и методы**

**Тестируемые вещества.** Навески субстанции «Кагоцел» растворяли в поддерживающей среде (см. ниже) в течение 2 ч при постоянном перемешивании на шейкере, в случае необходимости доводили рН до 7,0–7,5 с помощью 1н НСl. Подготовленные растворы стерилизовали, пропуская через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм и PES-мембраной (Sartorius, кат. № 16541-К). Для каждого эксперимента готовили новый раствор субстанции «Кагоцел».

В качестве препарата сравнения использовали разведённый на поддерживающей среде озельтамивира карбоксилат (Sigma Algrich, кат. № Y0001340).

**Культуры клеток.** В экспериментальной работе использовали культуру клеток MDCK, предоставленную из Всероссийской коллекции клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Культивирование этих клеток осуществляли на среде Игла МЕМ (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») с двойным набором аминокислот и 5% фетальной телячьей сыворотки крови (HyClone, США), 10 мМ глутамина и 4% гентамицином.

Также использовали клеточную линию MDCK ECACC (Sigma, кат. № 85011435), на 68–69 пассажах. Данную линию культивировали в среде Игла МЕМ (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамина и 0,1 мг/мл нормоцина.

**Вирусы.** В исследованиях использовали вирусы гриппа А человека: А/Пуэрто-Рико/8/34 (Н1N1) и А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09, а также штаммы А/Гонконг/1/68 (Н3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (Н3N2). Штаммы были получены из Государственной коллекции вирусов при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Вирусы культивировали в аллантоисной полости 9–10-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36 °С. Инфекционную и гемагглютинирующую активность вируса определяли согласно методам, рекомендованным ВОЗ [10].

**Определение цитотоксического действия Кагоцела в культуре клеток.** Клетки MDCK вносили в 96-луночные планшеты в концентрации 10000 кл/луночку в среде Игла МЕМ (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова» РАН) с

добавлением 5% фетальной сыворотки телят (HyClone, США), 10 мМ глутамин и антибиотиков и культивировали в течение 72 ч. Затем, после 2-кратной промывки культуры клеток бессывороточной средой Игла MEM, вносили предварительно подготовленные на поддерживающей среде (см. ниже) разведения субстанции «Кагоцел», начиная с 60–80 мг/мл.

В исследованиях с использованием линии MDCK ECACC клетки вносили в 96-луночные планшеты в среде Игла MEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамин и 0,1 мг/мл нормоцина из расчёта 18 000 кл/лунку, культивировали 24 ч и промывали бессывороточной средой 1 раз перед внесением субстанции.

Для разведения тестируемых веществ использовали 2 варианта поддерживающей среды, в зависимости от дальнейших вирусологических исследований: среду Игла MEM с двойным набором аминокислот и добавлением 0,2% раствора альбумина и среду Игла MEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 2% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамин, 12 мкг/мл химопсин-трипсина и 0,1 мг/мл нормоцина.

Каждую точку тестировали в 4 параллельных лунках. Последнее разведение помещали в первые 2 лунки из 4, в две последние лунки из 4 вносили поддерживающую среду (контроль среды культивирования).

В зависимости от постановки эксперимента клетки инкубировали с тестируемыми веществами в течение 18, 48 или 66 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С, после чего удаляли культуральную среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл поддерживающей среды и 20 мкл раствора MTS (Promega, США, кат. № G3581). После инкубации в течение 3 ч при 37 °С определяли оптическую плотность при длине волны 492 нм и референсной длине волны 620 нм при помощи планшетного спектрофотометра BIO-RAD. Концентрацию тестируемого вещества, уменьшающую значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем клеток, принимали за 50% цитотоксическую дозу (CC<sub>50</sub>).

*Изучение действия препаратов на инфекционный титр вируса в культуре клеток MDCK.* Исследовали действие нетоксичных для клеток MDCK концентраций субстанции «Кагоцел» и озельтамивира карбоксилата на репродукцию вирусов гриппа человека А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2). Каждую концентрацию препарата испытывали в 2 параллельных лунках. Противовирусную активность тестируемых веществ учитывали по снижению инфекционного титра вируса гриппа в культуре клеток MDCK по цитопатическому действию (ЦПД) и в реакции гемагглютинации (РГА).

Для исследования вирусспецифического действия препаратов в отношении штаммов А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) в качестве поддерживающей среды использовали среду Игла MEM с двойным набором аминокислот и добавлением 0,2% раствора альбумина и трипсина (TPCK treated, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. Культуру клеток MDCK подготавливали так же, как и в опытах по определению цитотоксического действия тестируемых веществ. Перед заражением вирусом клетки MDCK 2 раза промывали бессывороточной средой Игла MEM, добавляли изучаемые вещества в необходимой концентрации в 100 мкл поддерживающей

среды и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем добавляли по 100 мкл предварительно приготовленные 10-кратные разведения вируса. Контроли вирусов и клеток культивировали в этой же среде. Учёт результатов проводили через 66 ч по ЦПД и в РГА. В РГА использовали 0,5% взвесь эритроцитов, которую получали из 14-дневных куриных эмбрионов. Представлены результаты 2–3 опытов по каждому вирусу.

Исследования вирусспецифического действия тестируемых веществ в отношении штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) проводили на клетках MDCK ECACC, используя в качестве поддерживающей среду Игла MEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 2% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамин, 12 мкг/мл химопсин-трипсина и 0,1 мг/мл нормоцина. Культуру клеток MDCK ECACC подготавливали так же, как и в опытах по определению цитотоксического действия изучаемых веществ. Перед заражением вирусом клетки MDCK 1 раз промывали бессывороточной средой Игла MEM, добавляли предварительно подготовленные разведения препаратов в 100 мкл поддерживающей среды (однократной концентрации) и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем добавляли по 10 мкл предварительно приготовленных 10-кратных разведений вируса. Контроли вирусов и клеток культивировали в той же среде. Учёт результатов проводили через 48 ч по ЦПД и в РГА. В РГА использовали 0,75% взвесь эритроцитов человека (I группа) в физиологическом растворе.

*Изучение противовирусной активности препаратов в культуре клеток MDCK в тест-системе ИФА.* Исследовали вирусспецифическое действие препаратов в отношении штаммов А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2). Противовирусную активность исследуемых соединений в отношении вируса гриппа А учитывали по уровню экспрессии вирусных антигенов в тест-системе на основе иммуоферментного анализа (ИФА), модифицированного для определения противовирусной активности соединений в культуре клеток. Каждую концентрацию тестируемого вещества испытывали в 4 параллельных лунках.

Культуру клеток MDCK подготавливали так же, как и в опытах по определению цитотоксического действия изучаемых веществ. В качестве поддерживающей среды использовали среду Игла MEM с двойным набором аминокислот и добавлением 0,2% раствора альбумина и трипсина (TPCK treated, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл.

Перед внесением вируса клетки MDCK 2 раза промывали средой без сыворотки для снижения возможной неспецифической реакции. Исследуемые вещества добавляли к клеткам в необходимой концентрации в 100 мкл поддерживающей среды за 1 ч до инфицирования. В лунку с вирусным контролем добавляли 100 мкл, а с контролем клеток – 200 мкл поддерживающей среды. Через 1 ч после инкубации клеток с исследуемыми веществами при 37 °С в лунки, исключая контроль клеток, добавляли по 100 мкл вируса на поддерживающей среде. Действие веществ было испытано при разной множественности заражения клеток вирусом: 0,1 и 0,01 ТЦИД<sub>50</sub>/кл. Далее планшеты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 18 ч при 37 °С. После инкубации клетки исследовали в инвертированном микроскопе для регистрации отсутствия цитотоксических и цитопатических изменений. Среду удаляли, а клетки фиксировали 80% ацетоном в PBS в

Таблица 1

## Цитотоксическое действие субстанции «Кагоцел» для клеточной линии MDCK при разных условиях культивирования

Культура клеток	Время инкубации, ч	Цитотоксичность (CC <sub>50</sub> ), мг/мл
MDCK (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)	18	45,28
	66	24,18
MDCK ECACC	48	10,67

течение 15 мин, хорошо высушивали и затем отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером (PBS с 0,05% твин-20). Эти и все дальнейшие процедуры отмывки проводили указанным раствором. Затем, для устранения сайтов неспецифического связывания, к клеткам добавляли по 100 мкл раствора PBS с 1% FBS и 0,1% твин-20, инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После удаления раствора к клеткам добавляли 100 мкл раствора моноклональных антител мыши к вирусу гриппа А (моноклональные антитела к М и NP белку; CDC, США) в концентрации 10 мкг/мл в буфере PBS с 1% FBS и 0,1% твин-20. После инкубации с антителами в течение 1 ч при 37 °С и 3-кратной отмывки в лунки вносили по 100 мкл IgG кролика против IgG мыши (Sigma, США), меченных пероксидазой хрена (конъюгат), в разведении 1:5000 в буфере PBS с 1% FBS и 0,1% твин-20 и инкубировали 1 ч. Затем проводили 4-кратную отмывку и конъюгат пероксидазы выявляли добавлением в лунки 100 мкл ТМБ. Реакцию учитывали по оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП<sub>450</sub>) при помощи планшетного спектрофотометра «БИО-РАД» (iMark™, Microplate Reader). Относительное содержание вирусных белков М и NP в супернатантах определяли, как отношение ОП<sub>450</sub> опыта/ОП<sub>450</sub> вирусного контроля, умноженное на 100%, затем рассчитывали процент ингибирования вируса испытуемыми веществами [11]. Представлены результаты 2 опытов по каждому вирусу.

**Обработка и анализ данных.** Рассчитывали CC<sub>50</sub> и 50% эффективную концентрацию (IC<sub>50</sub>) для каждого из изученных соединений при помощи пакета программ Excel и GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа CC<sub>50</sub> принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой, пункты меню «Нелинейная регрессия» – «Sigmoidal dose-response (variable slope)». Для анализа IC<sub>50</sub> принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой, пункты меню «Нелинейная регрессия» – «log (inhibitor) vs. response (variable slope)».

На основании полученных данных для соединений рассчитывали индекс селективности (SI) по уравнению:

$$SI = CC_{50} / IC_{50}$$

## Результаты

*Изучение цитотоксического действия препаратов.*

В ходе исследований обнаружено, что субстанция «Кагоцел» малотоксична для различных сублиний MDCK. Показатель CC<sub>50</sub> варьировал от 10,67 до 45,28 мг/мл в зависимости от разновидности клеточной линии, состава среды культивирования, времени инкубирования с тестируемыми веществами и других методических особенностей (рис. 1 и табл. 1).

Было также установлено, что субстанция «Кагоцел» в высоких концентрациях обладает спонтанной агглютинирующей способностью в отношении куриных и человеческих эритроцитов. Проагглютинирующее действие Кагоцела на куриные эритроциты проявляется, начиная с концентрации 26,6 мг/мл и выше, а на человеческие – с 10,0 мг/мл и выше. Поэтому для исследований вирусспецифического действия этой субстанции использовали её растворы с концентрацией, не превышающей 5–10 мг/мл, т.е. в диапазоне, где отсутствовали не только цитотоксические проявления, но и спонтанная агглютинация.

В данной серии экспериментов не определяли цитотоксическое действие озельтамивира карбоксилата, однако, согласно данным литературы, она близка цито-

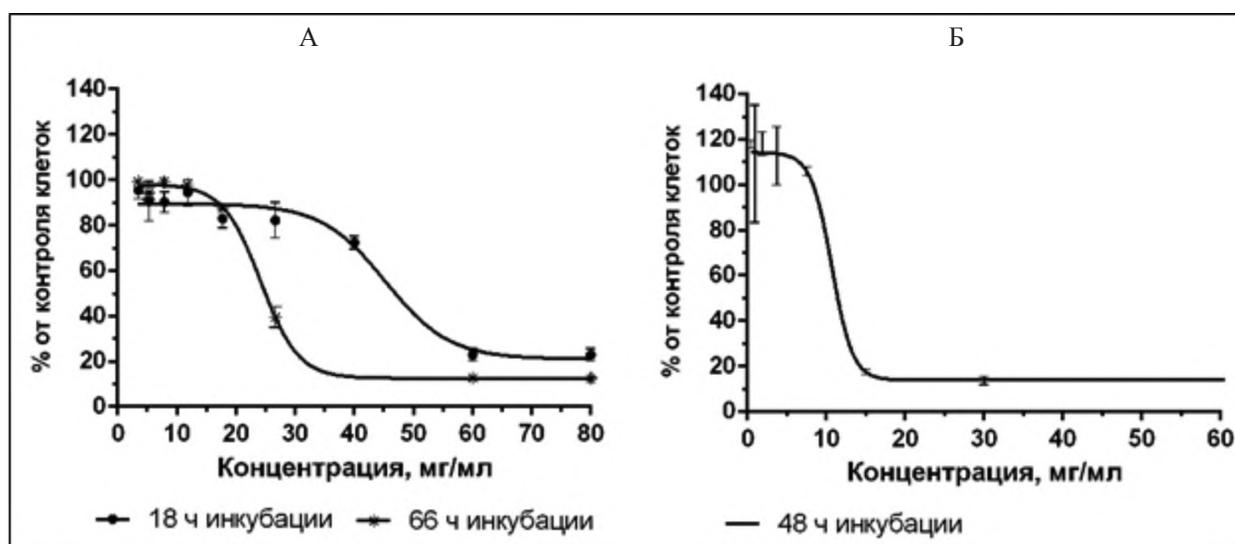


Рис. 1. Цитотоксичность субстанции «Кагоцел» для линии MDCK при различных условиях культивирования.

А – для линии MDCK ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,

Б – для линии MDCK ECACC. Данные представлены как среднее (*Mean*) ± стандартное отклонение (SD).

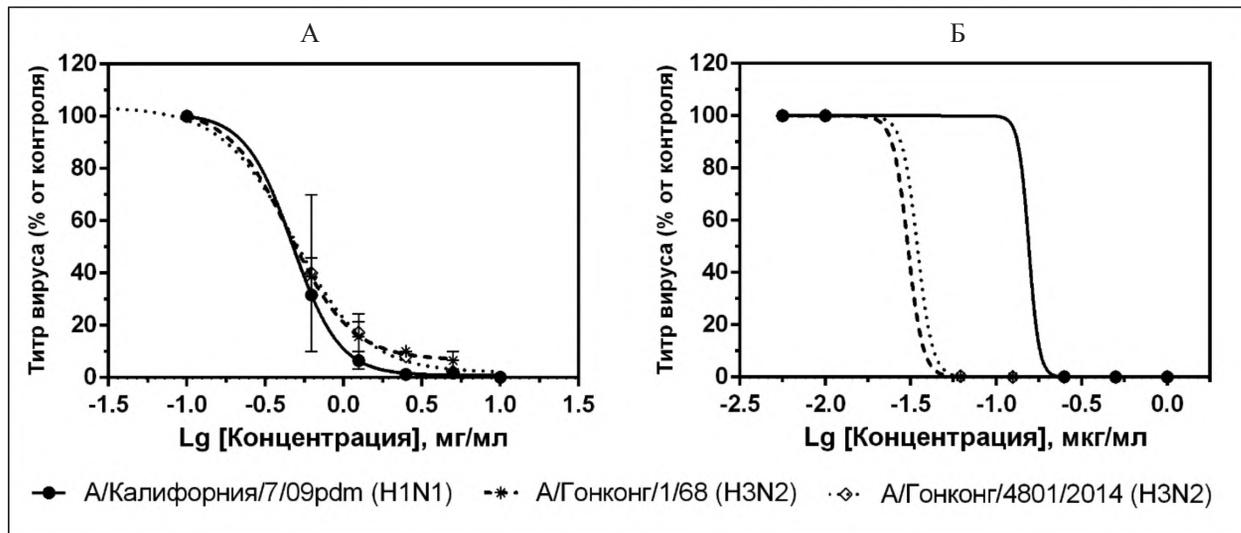


Рис. 2. Ингибирование инфекционного титра вируса гриппа А в культуре клеток MDCK.

Инкубирование проводили в течение 66 ч. Репродукцию вирусов гриппа определяли с помощью реакции гемагглютинации: А – «Кагоцел», Б – озельтамивира карбоксилат. Здесь и на рис. 3 данные представлены как среднее (*Mean*) ± стандартная ошибка среднего (*SEM*).

токсичности озельтамивира фосфата и находится в диапазоне 500–700 мкг/мл [12, 13].

Изучение противовирусной активности препаратов. Известно, что противовирусная эффективность препаратов обычно пропорциональна их концентрации. Эксперименты показали, что эффективность субстанции «Кагоцел» концентрационно зависима. На основании данных, полученных при изучении действия нетоксичных концентраций на репродукцию вирусов гриппа А, были построены кривые «доза–ответ», из которых были определены  $IC_{50}$  (рис. 2 и 3).

Изучение действия субстанции «Кагоцел» на инфекционный титр вируса в культуре клеток MDCK показало, что Кагоцел одинаково эффективен в отношении штаммов А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (см. рис. 2 и табл. 2), эффективная доза колеблется в диапазоне 0,45–0,48 мг/мл, а подавление инфекционного титра – в диапазоне 1,4–2,0 lg. При этом за счёт низкой токсичности субстанции достигается SI 50–54. В отношении эталонного штамма вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) субстанция «Кагоцел» также была эффективна,  $IC_{50}$  составила 0,17 мг/мл, а SI – 63. Хотя строгое сопоставление полученных данных с ре-

зультатами по остальным 3 штаммам можно провести с осторожностью, в силу разных условий проведения эксперимента, тем не менее можно утверждать, что противовирусная активность субстанции «Кагоцел» в отношении штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) находится приблизительно в том же диапазоне. В отличие от Кагоцела, озельтамивира карбоксилат проявил большую эффективность в отношении штаммов H3N2, нежели H1N1pdm09. Так, эффективная доза озельтамивира для обоих гонконгских штаммов составила 0,03 мкг/мл, в то время как для А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 – 0,15 мкг/мл.

Исследование влияния субстанции «Кагоцел» на уровень экспрессии вирусных антигенов в ИФА тест-системе также показало его противовирусную эффективность в отношении всех тестируемых штаммов (рис. 3 и табл. 2). Наблюдалась дозозависимость не только от концентрации субстанции, но и от заражающей дозы вируса. Субстанция «Кагоцел» эффективно подавляла размножение вирусов гриппа штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09. При заражающей дозе 0,01 ТЦИД<sub>50</sub>/кл эффективная доза субстанции «Кагоцел» составила около 1,01–2,69 мг/мл и SI 17–45. Активность субстанции

Таблица 2

Противовирусная активность субстанции «Кагоцел»

Культура клеток	Вирус	Метод РГА			Метод ИФА при дозе вируса			
		$\Delta lg_{max}$	$IC_{50}$ , мг/мл	SI	0,1 ТЦИД <sub>50</sub> /кл		0,01 ТЦИД <sub>50</sub> /кл	
					$IC_{50}$ , мг/мл	SI	$IC_{50}$ , мг/мл	SI
MDCK (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)	А/Гонконг/4801/2014 (H3N2)	1,5	0,48	50	–	–	2,69	17
	А/Гонконг/1/68 (H3N2)	1,4	0,45	54	4,60	10	1,10	41
	А/Калифорния/7/09 pdm (H1N1)	2,0	0,47	51	2,13	21	1,01	45
MDCK ECACC	А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1)	1,0	0,17	63	н/о*	н/о	н/о	н/о

Примечание. \* не определяли; РГА – реакция гемагглютинации; ИФА – иммуноферментный анализ; ТЦИД<sub>50</sub>/кл – тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя; SI – индекс селективности;  $IC_{50}$  – 50% ингибирующая концентрация  $\Delta lg_{max}$  – максимальное снижение значения заражающей вирусной дозы в опыте по сравнению с контролем, выраженное в десятичных логарифмах.

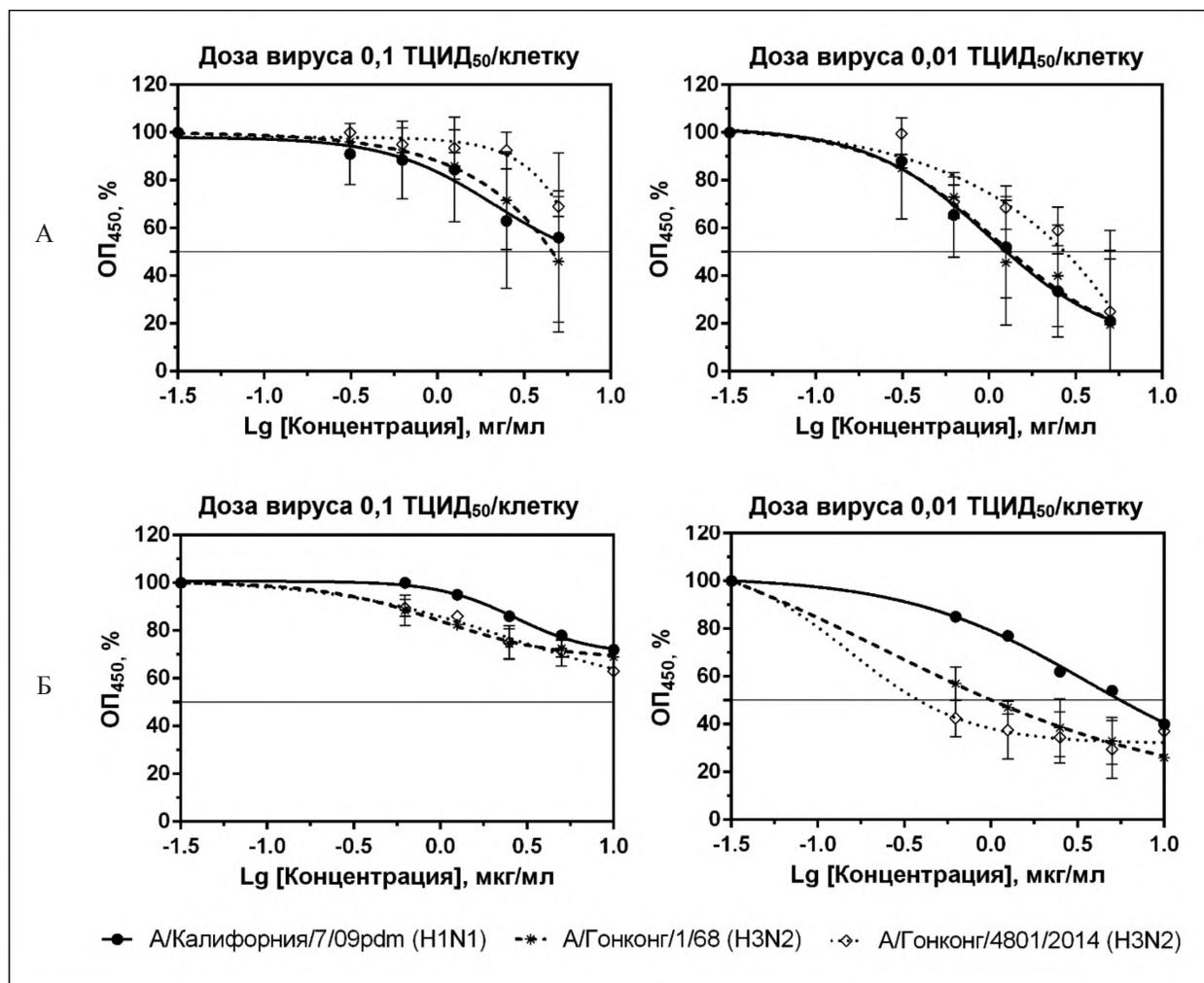


Рис. 3. Дозозависимый эффект ингибирования Кагоцелом инфекционной активности вирусов гриппа А, взятых в разных заражающих дозах, в линии MDCK.

Инкубирование проводили в течение 18 ч. Репродукцию вирусов гриппа определяли методом иммуноферментного анализа: А – Кагоцел, Б – озельтамивира карбоксилат. По оси абсцисс – концентрации исследуемых веществ (lg); по оси ординат – величина оптической плотности (ОП<sub>450</sub>), в %. Горизонтальная линия – 50% ингибирование репродукции вируса.

«Кагоцел» в отношении штамма А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) была ниже примерно в 2,5 раза.

Озельтамивира карбоксилат, напротив, был наиболее активен в отношении штаммов вируса гриппа А (H3N2), в частности, его эффективные дозы при множественности заражения 0,01 ТЦИД<sub>50</sub>/кл были 0,24 и 0,15 мкг/мл для штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) соответственно. Однако для штамма А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 его активность была ниже, IC<sub>50</sub> составила 3,5 мкг/мл. При множественности заражения 0,1 ТЦИД<sub>50</sub>/кл 50% ингибирующую концентрацию озельтамивира карбоксилата определить не удалось. В то же время при этой множественности заражения эффективная доза для «Кагоцела» определялась и составляла 4,60 мг/мл для вируса А/Гонконг/1/68 (H3N2) и 2,13 мг/мл для штамма А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09.

### Обсуждение

Каким бы высоким ни был уровень профилактических мероприятий против гриппа, наступает момент,

когда ситуация выходит из-под контроля, поскольку современные вакцины не способны решить проблемы антигенного дрейфа вируса гриппа в процессе эволюции и антигенного шифта вируса гриппа, связанного с механизмом реассортации фрагментов генома [14, 15]. Поэтому в период циркуляции вируса, не соответствующего вакцинному штамму, заболеваемость среди населения увеличивается и применение противогриппозных препаратов становится одним из основных средств в борьбе с гриппозной инфекцией. Однако количество эффективных препаратов чрезвычайно ограничено.

Одним из препаратов, входящих в Стандарты Минздрава России по оказанию специализированной медицинской помощи при гриппе средней и тяжелой степени тяжести, является «Кагоцел». В работе Ф.И. Ершова [16], а также в инструкции по применению «Кагоцела», отмечено, что основным механизмом его действия является способность индуцировать продукцию интерферонов.

В данной работе изучалось действие субстанции «Кагоцел» на репродукцию разных штаммов вируса гриппа

в культуре клеток MDCK, которые широко используются во всём мире для изоляции вирусов гриппа и изучения их биологических свойств, в частности противовирусной активности коммерческих препаратов и новых химических веществ. Исследования проведены в соответствии с нормативными документами, действующими на территории РФ [11], а также с учётом рекомендаций международных разрешительных органов [17].

Результаты показали, что субстанция «Кагоцел» обладала выраженной противовирусной активностью в условиях *in vitro*. Эффективное подавление репродукции разных штаммов вируса гриппа (А/Н1N1, А/Н1N1pdm09 и А/Н3N2), продемонстрированное на разных сублиниях культур клеток MDCK, при различных методах определения противовирусной активности, позволяет высказать предположение, что «Кагоцел», наряду со способностью индуцировать интерфероны, указанной в публикации [16], может действовать и на репродукцию вируса гриппа, но это требует дальнейшего углублённого изучения.

### Заключение

Результаты изучения противовирусной активности показали, что субстанция «Кагоцел» в культуре клеток MDCK в нетоксичных для клеток дозах эффективно подавляла репродукцию вирусов гриппа А – А/Пуэрто-Рико/8/34 (Н1N1), А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (Н3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (Н3N2). При этом она малотоксична для культуры клеток, поэтому индекс селективности был достаточно высок.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 6, 8, 10, 12-15, 17 см. REFERENCES)

- ВОЗ. Грипп. Информационный бюллетень. Available at: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г., Кириллова Е.С., Трушаклова С.В. и др. Особенности эпидемического сезона 2014/2015 гг. по гриппу в разных регионах России. *Инфекционные болезни*. 2015; (4): 59-67.
- Литвинова О.М., Смородинцева Е.А., Деева Э.Г., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И. Этиология современного гриппа. В кн.: *Грипп и другие респираторные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия*. СПб.; 2003: 55-69.
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушаклова С.В. и др. Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015-2016 гг. Доминирование вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 159-66.
- Киселева И.В., Рудой Б.А., Пирогов А.В., Толмачева Н.Г. Валидация ВЭЖХ-методики определения госсипола в субстанции «Кагоцел». *Фармация*. 2016; 65(8): 18-24.
- Тылябаев К.З., Камаев Ф.Г., Выпова Н.Л., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т., Талипов С.А. Синтез, структура и «острая» токсичность несимметричных альдегидных производных госсипола. *Биоорганическая химия*. 2010; 36(3): 423-8.
- Методические указания по изучению специфической противовирусной активности фармакологических веществ: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005: 532-57.
- Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.

### REFERENCES

- WHO. Influenza (Seasonal). Fact Sheet. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Deryabin P.G., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. The peculiarities of influenza epidemic season 2014/2015 in different regions of Russia. *Infektsionnye bolezni*. 2015; (4): 59-67. (in Russian)
- Pebody R., Warburton F., Ellis J., Andrews N., Thompson C., von Wissmann B., et al. Low effectiveness of seasonal influenza vaccine in preventing laboratory confirmed influenza in primary care in the United Kingdom: 2014/2015 mid-season results. *Euro Surveill*. 2015; 20(5): 21025.
- Litvinova O.M., Smorodintseva E.A., Deeva E.G., Lobova T.G., Konovalova N.I. Etiology of modern influenza. In: *Influenza and Other Respiratory Infections: Epidemiology, Prevention, Diagnostics and Therapy [Gripp i drugie respiratornye infektsii: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika i terapiya]*. St. Petersburg; 2003: 55-69. (in Russian)
- L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. Virological, epidemiological, clinic, and molecular genetic features of the influenza epidemic in 2015-2016: prevailing of the influenza A(H1N1)09 pdm virus in Russia and countries of the Northern hemisphere. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 159-66. (in Russian)
- Leneva I.A., Burtseva E.I., Yatsyshina S.B., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Selkova E.P., et al. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010-2011 influenza season in Russia. *Int. J. Infect. Dis*. 2016; 43: 77-84. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.01.001>
- Kiseleva I.V., Rudoy B.A., Pirogov A.V., Tolmacheva N.G. Validation of HPLC procedure for detection of gossypol in the substance Kagocel. *Farmatsiya*. 2016; 65(8): 18-24. (in Russian)
- Keshmiri-Neghab H., Goliaei B. Therapeutic potential of gossypol: an overview. *Pharm. Biol*. 2014; 52(1): 124-8. Doi: <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.832776>
- Tilyabaev K.Z., Kamaev F.G., Vypova N.L., Yuldashev A.M., Ibragimov B.T., Talipov S.A. Synthesis, Structures, and Acute Toxicity of Gossypol Nonsymmetrical Aldehyde Derivatives. Synthesis, Structures, and Acute Toxicity of Gossypol Nonsymmetrical Aldehyde Derivatives. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2010; 36(3): 423-8. (in Russian)
- WHO. Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at: [https://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/manual\\_diagnosis\\_surveillance\\_influenza/en/](https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/)
- Methodological guidelines for the study of specific antiviral activity of pharmacological substances: Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. Moscow: Meditsina; 2005: 532-57. (in Russian)
- Kocik J., Kolodziej M., Joniec J., Kwiatek M., Bartoszcz M. Antiviral activity of novel oseltamivir derivatives against some influenza virus strains. *Acta Biochim. Pol*. 2014; 61(3): 509-13.
- Cai W., Li Y., Chen S., Wang M., Zhang A., Zhou H., et al. 14-Deoxy-11,12-dehydroandrographolide exerts anti-influenza A virus activity and inhibits replication of H5N1 virus by restraining nuclear export of viral ribonucleoprotein complexes. *Antiviral Res*. 2015; 118: 82-92. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.008>
- Garten R.J., Davis C.T., Russel C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325(5937): 197-201. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1176225>
- Skowronski D.M., Chambers C., Sabaiduc S., De Serres G., Dickinson J.A., Winter A.L., et al. Interim estimates of 2014/2015 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance network, January 2015. *Euro Surveill*. 2015; 20(4): 21022. Doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.4.21022>
- Ershov F.I., Kiselev O.I. *Interferones and their Inducers (from Molecules to Pharmaceuticals) [Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2005. (in Russian)
- Guidance for Industry. Antiviral Product Development-Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. Available at: <https://www.fda.gov/media/71223/download>

Поступила 20.03.19

Принята в печать 02.04.19