

Изучение механизма противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторных вирусов *in vitro*

В. В. ЗАРУБАЕВ¹, В. С. СМЕРНОВ¹, *Т. А. КУДРЯВЦЕВА², С. В. ПЕТЛЕНКО³,
А. В. СЛИТА¹, МИН ХОАНГ⁴, В. А. ЗАПЛУТАНОВ⁵

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт Пастера, Хошимин, Вьетнам

⁵ АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия

Study of the Mechanism of Antiviral Activity of Cytovir®-3 Against Respiratory Viruses *In Vitro*

VLADIMIR V. ZARUBAEV¹, VYACHESLAV S. SMIRNOV¹, *TATIANA A. KUDRYAVTSEVA²,
SERGEY V. PETLENKO³, ALEXANDER V. SLITA¹, HOANG MINH⁴, VASILY A. ZAPLUTANOV⁵

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

³ Scientific and Clinical Center of Toxicology Named after Academician S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency», Saint-Petersburg, Russia

⁴ Pasteur Institute, Ho Chi Minh, Vietnam

⁵ Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology», Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Введение. Требования современных клинических рекомендаций по лечению респираторных вирусных инфекций предполагают возможность идентификации конкретного вирусного возбудителя. В связи с этим является актуальным поиск лекарственных препаратов с избирательной активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса парагриппа, которые имеют широкое распространение в структуре спорадической и сезонной заболеваемости ОРВИ. **Цель исследования** — изучение противовирусной активности препарата Цитовир®-3 *in vitro* в отношении цитопатогенного действия респираторных вирусов (вирус парагриппа и респираторно-синцитиальный вирус). **Материал и методы.** На культуре клеток Vero было изучено противовирусное действие препарата Цитовир®-3 в сравнении с препаратом Умифеновир в отношении вируса парагриппа и респираторно-синцитиального вируса. Лекарственные препараты вводили за 1 ч до (профилактическая схема) и 1 ч после (лечебная схема) заражения клеточной культуры респираторными вирусами. Рабочий диапазон концентраций исследуемых препаратов рассчитывался исходя из значений 50% цитотоксической концентрации, рассчитанной на основании результатов количественного микротетразолиевого теста. **Результаты и обсуждение.** Препарат Цитовир®-3 в двух схемах применения (лечебной или профилактической) проявил противовирусную эффективность *in vitro* в отношении респираторно-синцитиального вируса и вируса парагриппа в нецитотоксическом диапазоне (0–794 мкг/мл). При этом подавляющее действие препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа начинается при более низких концентрациях препарата при его заблаговременном (профилактическом) введении в культуру клеток (250 мкг/мл). **Заключение.** Доказана противовирусная активность *in vitro* препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа и респираторно-синцитиального вируса. При этом во всех сериях опытов Цитовир®-3 имел более высокий индекс селективности противовирусного действия, чем у препарата сравнения Умифеновир.

Ключевые слова: Цитовир®-3; Vero; вирусная цитопатогенность *in vitro*; противовирусное действие; респираторно-синцитиальный вирус; вирус парагриппа

Для цитирования: Зарубаев В. В., Смирнов В. С., Кудрявцева Т. А., Петленко С. В., Слита А. В., Хоанг Мин, Заплутанов В. А. Изучение механизма противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторных вирусов *in vitro*. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-4-10>.

Abstract

Introduction. The requirements of modern clinical guidelines for the treatment of respiratory viral infections suggest the possibility of identifying a specific viral pathogen. In this regard, the search for drugs with selective activity against respi-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Мира, 14, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург, Россия, 197101.
E-mail: tatjana_ku@inbox.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 14 Mira str., St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, 197101 Russia. E-mail: tatjana_ku@inbox.ru

ratory syncytial virus and parainfluenza virus is relevant. *The purpose* of the work is to study the antiviral activity of the drug Cytovir®-3 *in vitro* in relation to the cytopathogenic effect of respiratory viruses (parainfluenza virus and respiratory syncytial virus). *Material and methods.* The antiviral effect of Cytovir®-3 in comparison with Umifenovir against parainfluenza virus and respiratory syncytial virus was studied on Vero cell culture. Drugs were administered 1 hour before (prophylactic regimen) and 1 hour after (treatment regimen) infection of the cell culture with respiratory viruses. The working range of concentrations of the studied drugs was calculated based on the values of 50% cytotoxic concentration calculated based on the results of a quantitative microtetrazole test. *Results and discussion.* The drug Cytovir®-3 in two schemes of application (therapeutic or prophylactic) showed its antiviral efficacy *in vitro* against respiratory syncytial virus and parainfluenza virus due in the non-toxic range (0–794 µg/ml). At the same time, the suppressive effect of the drug Cytovir®-3 against the parainfluenza virus begins at lower concentrations of the drug with its early (preventive) introduction into cell culture (250 mcg/ml). *Conclusion.* Antiviral activity of Cytovir®-3 has been proven *in vitro* against parainfluenza virus and respiratory syncytial virus. At the same time, in all series of experiments, Cytovir®-3 had a higher index of selectivity of antiviral action than that of the comparison drug Umifenovir.

Key words: Cytovir®-3; Vero; viral cytopathogenicity; *in vitro*; antiviral effect; respiratory syncytial virus; parainfluenza virus

For citation: Zarubaev V. V., Smirnov V. S., Kudryavtseva T. A., Petlenko S. V., Slita A. V., Minh H., Zaplutanov V. A. Study of the mechanism of antiviral activity of Cytovir®-3 against respiratory viruses *in vitro*. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-4-10>.

Введение

Респираторные вирусы, тропные к мерцательному эпителию респираторного тракта, являются частой причиной инфекций верхних и нижних дыхательных путей человека и оказывают значительное влияние на показатели госпитализации и смертности в России и мире [1]. В настоящее время они рассматриваются в качестве основных этиологических агентов респираторных заболеваний у детей моложе 5 лет, взрослых людей с ослабленной иммунной системой и у лиц в возрасте старше 65 лет [2–4]. Высокие показатели летальности в период сезонного подъёма заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями в указанных группах пациентов, а также у пациентов с хроническими заболеваниями лёгких, являются актуальной проблемой для систем общественного здравоохранения во многих странах независимо от уровня их экономического развития [4]. Серьёзную озабоченность вызывает также эмпирическое назначение антибиотиков больным острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ) из-за отсутствия специфической клинической симптоматики и сложностей в этиологической расшифровке заболеваний по причине недостаточного количества доступных быстрых и чувствительных методов лабораторной диагностики. Неадекватная антибиотикотерапия способствует развитию резистентности микрофлоры заболевших к антимикробным препаратам и задерживает проведение у них надлежащих лечебных мероприятий [5].

К респираторным вирусам — возбудителям ОРВИ — в настоящее время относят вирусы парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы гриппа, метапневмовирус человека, риновирусы, коронавирусы, аденовирусы и бокавирус человека [1]. Респираторно-синцитиальный вирус человека представляет собой основную причину бронхолёгочных заболеваний (нижних ды-

хательных путей) у детей младшего и среднего возраста [6]. Пандемия COVID-19 привела к серьёзным изменениям в этиологической структуре ОРВИ, при этом нарушились и стабильная сезонность, и известная частота выявления различных респираторных инфекций. Так, при введении карантинных мероприятий в мире наблюдалось ожидаемое падение заболеваемости, подкреплённое явлением интерференции вирусов [7]. Однако после постепенной отмены ограничительных мероприятий в различных странах наметилась тенденция к повышению частоты и, особенно, тяжести острой РСВ-инфекции как в качестве самостоятельной нозологической формы, так и в сочетании с риновирусом и парагриппом [8, 9].

Вместе с тем, даже при выполнении целенаправленных мероприятий по определению этиологии респираторных инфекций, примерно в 20% случаев выявить возбудитель ОРВИ не удаётся. Это связано не только с техническими проблемами верификации патогенов, но и с тем, что далеко не все респираторные вирусы известны, о чём свидетельствуют продолжающиеся открытия новых возбудителей ОРВИ у человека [10]. Тем не менее в российских клинических рекомендациях по ОРВИ приведены клинические критерии по дифференциальной диагностике возбудителей ОРВИ, а по некоторым специфическим возбудителям (вирусы гриппа типа А и В, новой коронавирусной инфекции — SARS-CoV-2) существуют отдельные руководящие документы [11].

В этой связи весьма актуальным является поиск и исследование известных лекарственных препаратов на предмет наличия у них избирательной противовирусной активности в отношении конкретных респираторных вирусов [12].

Цель исследования — изучение противовирусной активности препарата Цитовир®-3 *in vitro* по влиянию на цитопатогенное действие респираторных вирусов (вирус парагриппа и респираторно-синцитиальный вирус).

Материал и методы

Образцы исследуемых препаратов. Для изучения противовирусного действия в эксперименте был использован препарат Цитовир®-3 — смесь активных действующих веществ (аналог его лекарственных форм — порошка, капсул и сиропа): альфа-глутамил-триптофан, аскорбиновая кислота, бендазола гидрохлорид. Состав действующих веществ на одну капсулу: альфа-глутамил-триптофан (Тимоген® натрий) — 0,5 мг, аскорбиновая кислота — 50 мг, бендазола гидрохлорид (дибазол) — 20 мг. В качестве препарата сравнения при исследовании препарата Цитовир®-3 использовалась субстанция умифеновира. Выбор данной субстанции обусловлен тем, что лекарственные препараты, содержащие в своём составе активное действующее вещество умифеновир», согласно инструкции по медицинскому применению (раздел «Фармакодинамика»), обладают широким спектром противовирусной активности, в том числе подавляя *in vitro* вирусы — возбудители ОРВИ (в том числе респираторно-синцитиальный вирус и вирус парагриппа).

Вирус и культура клеток. В исследовании использовали следующие вирусы из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера:

- респираторно-синцитиальный вирус человека (RSV, штамм Long);
- вирус парагриппа человека 3-го типа.

Вирусы накапливали в клетках перmissive линии Vero (ATCC CCL-81). Клетки рассевали на культуральные матрасы площадью 75 см², заражали вирусами в дозе 0,1 TCID₅₀ на клетку и культивировали до появления специфического ЦПД в 90–100% клеток. Клетки с культуральной жидкостью замораживали и после размораживания делили на аликвоты и хранили при температуре –80°C до постановки соответствующих экспериментов.

Оценка цитотоксичности препаратов. Изучение токсичности соединений проводили на основе оценки жизнеспособности клеток при помощи реакции восстановления тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) клетками в культуре, интенсивность которой отражает степень жизнеспособности клеток в результате восстановления красителя митохондриальными и частично цитоплазматическими дегидрогеназами [13].

Клетки Vero рассевали на 96-луночные планшеты (NEST, Китай, кат. #701001) и после формирования монослоя вносили изучаемые препараты в диапазоне концентраций 12–1000 мкг/мл (Цитовир®-3, субстанция умифеновир), растворённые в среде для культивирования клеток в объёме 200 мкл. Планшеты инкубировали в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По истечении срока инкубации клетки промывали средой MEM и в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (0,5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромида на среде для клеток. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч и промывали в течение 5 мин физиологическим раствором. Осадок растворяли в 100 мкл ДМСО на лунку, после чего оптическую плотность измеряли с помощью планшетного анализатора Multiscan FC (Thermo Scientific) при длине волны 540 нм. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую концентрацию (CC₅₀), т. е. концентрацию соединения, снижающую оптическую плотность в лунках вдвое по сравнению с контрольными клетками без препаратов. Расчёт проводили при помощи пакета программ GraphPad Prism v.6.01.

Оценка цитопротекторной активности исследуемых препаратов *in vitro*. Клетки Vero рассевали на 96-луночные планшеты (NEST, Китай, кат. #701001) и после формирования монослоя вносили изучаемые препараты в трехкратных разведениях в диапазоне концентраций 16–1000 мкг/мл (1,6–100% в разведении) для препарата Цитовир®-3 и субстанции умифеновир. Препараты вносили за 1 ч до заражения (аналог профилактической схемы применения) или через 1 ч после заражения (аналог лечебной схемы применения). Клетки заражали соответствующими

вирусами при множественности инфицирования 0,01 TCID₅₀ на клетку. На каждую концентрацию препарата использовали 4 лунки планшета. После инкубации в течение 72 ч действие вирусов оценивали по развитию специфического вирусного ЦПД. О цитопротекторной эффективности препаратов судили по их способности тормозить развитие вирусного ЦПД. За титр исследуемого препарата принимали величину, обратную разведению, при котором монослой клеток был полностью защищён от цитопатического действия вируса в 50% лунок. Титр вычисляли методом Спирмена–Кербера по формуле:

$$\log_2 ED_{50} = D_{max} + \frac{d}{n} \times (p - \frac{n}{2}),$$

где $\log_2 ED_{50}$ — двоичный логарифм титра исследуемого препарата; D_{max} — двоичный логарифм титра, ниже которого произошла 100% защита (–); d — двоичный логарифм интервала между разведениями, равный 1; n — число лунок на каждую дозу, равное 4; p — число лунок, давших защиту (–) в разведении, ниже которого произошла 100% защита, и последующих разведениях.

По полученным в исследовании значениям ED₅₀ и CC₅₀ определяли значение 50% ингибирующей концентрации препаратов (IC₅₀) и индекс селективности препарата (SI). SI, характеризующий избирательность ингибирующего действия препарата в отношении вируса по сравнению с действием на клетки, определяли, как отношение CC₅₀ к IC₅₀.

Статистическая оценка. Статистическую обработку полученных количественных данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 365. Для сравнения двух независимых групп использовался непараметрический критерий U Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Оценка цитотоксичности препаратов. На первом этапе исследования были изучены цитотоксические свойства препарата Цитовир®-3 для культуры клеток, в дальнейшем используемой в вирусологических экспериментах. Результаты изучения цитотоксических свойств препарата Цитовир®-3 представлены в табл. 1 и для наглядности суммированы на рисунке. В качестве препарата сравнения использовали субстанцию умифеновир, используемую в клинической практике для профилактики и лечения респираторных вирусных инфекций.

Как видно из представленных результатов, препарат сравнения Умифеновир даже в наибольшей из использованных концентраций не приводил к достоверному снижению оптической плотности в лунках планшета с клетками, что говорит о том, что его значение CC₅₀ выше 1000 мкг/мл. В то же время Цитовир®-3 в дозе 1000 мкг/мл приводил к снижению жизнеспособности клеток на 50% и более, что позволяет оценить значение его CC₅₀ как 794 мкг/мл (см. рисунок).

На основании полученных данных изучения цитотоксичности выявлен нетоксический диапазон концентраций для препарата Цитовир®-3, имеющий значение 0–794 мкг/мл, в котором проводили дальнейшие исследования по противовирусной активности препарата.

Изучение противовирусной активности препаратов. Прямая противовирусная активность препарата Цитовир®-3 в отношении вируса пара-

Таблица 1. Цитотоксические свойства препаратов Цитовир®-3 и Умифеновир в культуре клеток Vero (ATCC CCL-81)**Table 1.** Cytotoxic properties of Cytovir®-3 and Umifenovir preparations in Vero cell culture (ATCC CCL-81)

Препарат	Оптическая плотность (OD ₅₄₀) в лунках с клетками при концентрации препарата, мкг/мл					
	0 (контроль клеток)	1000 (100*)	333 (33,3*)	111 (11,1*)	37 (3,7*)	12 (1,2*)
Цитовир®-3	0,684±0,108	0,310±0,035	0,645±0,031	0,520±0,036	0,585±0,079	0,654±0,067
Умифеновир	0,747±0,088	0,705±0,041	0,761±0,040	0,659±0,047	0,633±0,025	0,644±0,035

Примечание. * — концентрация (%) ГЛС в разведении.

Note. * — concentration (%) of GLS in dilution.

гриппа и респираторно-синцитиального вируса была изучена в тесте на подавление вирусного цитопатогенного действия в культуре клеток. Результаты изучения активности Цитовир®-3 в сравнении с аналогичными характеристиками препарата сравнения Умифеновир суммированы в табл. 2–5.

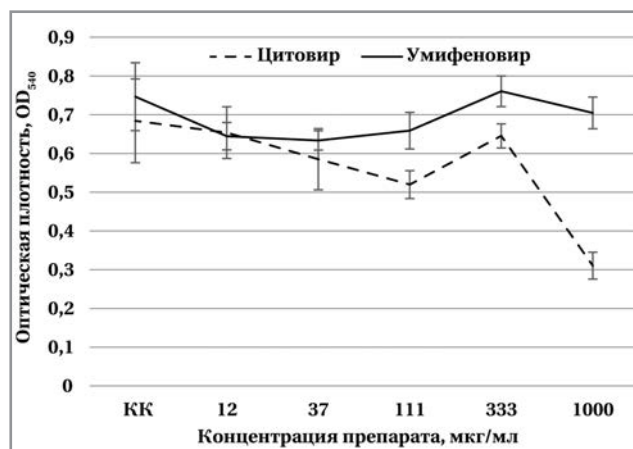
В результате опытов 2-го этапа (табл. 2) по изучению противовирусной активности препаратов при их профилактической схеме введения за 1 ч до заражения клеток Vero вирусом парагриппа в опытах *in vitro* было выявлено, что препараты Цитовир®-3 и Умифеновир обеспечивают 50% ингибирование вирусной активности в нетоксических концентрациях 250 мкг/мл и 297,3 мкг/мл, соответственно.

При этом 100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 500 мкг/мл, а Умифеновир при 1000 мкг/мл. Это обеспечило более высокий индекс селективности противовирусного действия препарата (SI) у Цитовир®-3 по сравнению с препаратом Умифеновир (4,0 и 3,4, соответственно).

Изучение противовирусной активности препаратов при лечебной схеме введения через 1 ч после заражения клеток Vero вирусом парагриппа показало (см. табл. 3), что препарат Умифеновир обеспечивал 50% подавление вирусной активности при концентрации 500 мкг/мл. Препарат Цитовир®-3 в концентрации 250 мкг/мл снижал вирусную активность на 25%, а его 50% ингибирующая концентрация составила 297,3 мкг/мл.

Как и при профилактической схеме применения, 100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 500 мкг/мл, а Умифеновир при 1000 мкг/мл. При лечебной схеме введения препаратов Цитовир®-3 также показал более высокий индекс селективности (SI) по сравнению с препаратом Умифеновир (3,4 и 2,0, соответственно).

На 2-м этапе опытов по изучению противовирусной активности препаратов при их профилактической схеме введения за 1 ч до заражения клеток Vero респираторно-синцитиальным вирусом было выявлено (см. табл. 4), что препарат Ци-

**Цитотоксические свойства препаратов Цитовир®-3 и Умифеновир в культуре клеток Vero.****Cytotoxic properties of Cytovir®-3 and Umifenovir preparations in Vero cell culture****Таблица 2.** Противовирусная активность препаратов в отношении вируса парагриппа в культуре клеток Vero при профилактической схеме внесения (введение препаратов за 1 ч до заражения)**Table 2.** Antiviral activity of drugs against parainfluenza virus in Vero cell culture with a preventive application scheme (administration of drugs 1 hour before infection)

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4***
500	0/4***	1/4
250	2/4	2/4
125	4/4	4/4
62,5	4/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC ₅₀ , мкг/мл	250**	297,3**
SI	4,0	3,4

Примечание. Здесь и табл. 3–5: ** — расчётная 50% ингибирующая концентрация препаратов (IC₅₀); *** — достижение 100% ингибирования вирусной активности.

Note. Here and Tables 3–5: ** — estimated 50% inhibitory concentration of drugs (IC₅₀); *** — achievement of 100% inhibition of viral activity

товир®-3 снижал вирусную активность на 50% в нетоксической концентрации 105,1 мкг/мл. В то же время 50% ингибирующая концентрация препарата Умифеновир составила 353,6 мкг/мл.

100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 250 мкг/мл, а Умифеновир при 500 мкг/мл. В этой серии опытов индекс селективности противовирусного действия препарата (SI) у Цитовир®-3 оказался значительно выше, чем у препарата Умифеновир (в 3,4 раза — 9,5 и 2,8, соответственно).

При лечебной схеме применения (через 1 ч после заражения клеток Vero респираторно-синцитиальным вирусом) оба исследуемых препарата обеспечивали 50% подавление вирусной активности в концентрациях 125 мкг/мл (IC₅₀ для препарата Цитовир®-3 составил 105,1 мкг/мл, Умифеновир — 210,2 мкг/мл). 50% ингибирующая концентрация препарата Цитовир®-3 составила 297,3 мкг/мл (см. табл. 5).

100% ингибирования вирусной активности Цитовир®-3 достиг при нетоксической концентрации препарата 250 мкг/мл, а Умифеновир только при 1000 мкг/мл, что и повлияло на то, что в лечебной схеме введения препаратов Цитовир®-3 также показал более высокий индекс селективности (SI) по сравнению с препаратом Умифеновир (9,5 и 4,8, соответственно).

Как следует из представленных данных, оба исследуемых препарата, Цитовир®-3 и Умифеновир, во всех четырёх сериях опытов по изучению противовирусной активности в отношении HPIV и RSV в лечебных и профилактических схемах введения показали эффективность за счёт подавления цитопатического действия вируса в нетоксических концентрациях.

Необходимо отметить, что индекс селективности противовирусного действия препарата Цитовир®-3 оказался выше, чем таковой у препарата Умифеновир во всех сериях опытов, достигая наибольшей разницы при профилактическом введении в отношении респираторно-синцитиального вируса.

В отношении вируса парагриппа было выявлено, что Цитовир®-3 при профилактическом введении проявляет большую активность по сравнению с лечебной схемой применения.

При изучении противовирусной активности препаратов в отношении респираторно-синцитиального вируса показано, что препарат Цитовир®-3 независимо от схемы введения (лечебной или профилактической) проявил свою эффективность *in vitro* за счёт 50% снижения вирусной активности в концентрации 105,1 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о его избирательном действии на респираторно-синцитиальный вирус, что

Таблица 3. Противовирусная активность препаратов в отношении вируса парагриппа в культуре клеток Vero при лечебной схеме внесения (введение препаратов через 1 ч после заражения)

Table 3. Antiviral activity of drugs against parainfluenza virus in Vero cell culture with a therapeutic application scheme (administration of drugs 1 hour after infection)

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4***
500	0/4***	2/4*
250	3/4	4/4
125	4/4	4/4
62,5	4/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC ₅₀ , мкг/мл	297,3**	500**
SI	3,4	2,0

Таблица 4. Противовирусная активность препаратов в отношении респираторно-синцитиального вируса в культуре клеток Vero при профилактической схеме внесения (введение препаратов за 1 ч до заражения)

Table 4. Antiviral activity of drugs against respiratory syncytial virus in Vero cell culture with a preventive application scheme (administration of drugs 1 hour before infection)

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4
500	0/4	0/4***
250	0/4***	4/4
125	2/4	4/4
62,5	3/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC ₅₀ , мкг/мл	105,1**	353,6**
SI	9,5	2,8

Таблица 5. Противовирусная активность препаратов в отношении респираторно-синцитиального вируса в культуре клеток Vero при лечебной схеме внесения (введение препаратов через 1 ч после заражения)

Table 5. Antiviral activity of drugs against respiratory syncytial virus in Vero cell culture with a therapeutic application scheme (administration of drugs 1 hour after infection)

Концентрация препарата, мкг/мл	Количество лунок с ЦПД (ЦПД/всего инфицированных лунок в присутствии препарата)	
	Цитовир®-3	Умифеновир
1000	Цитотоксичность	0/4***
500	0/4	1/4
250	0/4***	2/4
125	2/4	2/4
62,5	3/4	4/4
32	4/4	4/4
16	4/4	4/4
Контроль вируса	4/4	4/4
IC ₅₀ , мкг/мл	105,1**	210,2**
SI	9,5	4,8

подтверждается более высоким индексом селективности (9,5 как при лечебном, так и при профилактическом использовании).

Оба исследуемых препарата достигали 100% инаktivации вирусов в нетоксическом диапазоне концентраций во всех сериях опытов по исследованию противовирусной активности, что свидетельствует об их высоком профиле безопасности *in vitro* (профилактическая схема введения при изучении влияния на вирус парагриппа: 500 мкг для препарата Цитовир®-3 и 1000 мкг для препарата Умифеновир; лечебная схема введения при изучении влияния на вирус парагриппа: 500 мкг для препарата Цитовир®-3 и 1000 мкг для препарата Умифеновир; профилактическая схема введения при изучении влияния на респираторно-синцитиальный вирус: 250 мкг для препарата Цитовир®-3 и 500 мкг для препарата Умифеновир; лечебная схема введения при изучении влияния на респираторно-синцитиальный вирус: 250 мкг для препарата Цитовир®-3 и 1000 мкг для препарата Умифеновир).

Одинаковый верхний потолок значений концентраций препарата Цитовир®-3, при которых было достигнуто 100% подавление вирусной активности (500 мкг для всех схем введения при изучении влияния на вирус парагриппа и 250 мкг для всех схем введения при изучении влияния на респираторно-синцитиальный вирус) также свидетельствует об избирательном (селективном) действии препарата Цитовир®-3 на оба изучаемых вируса *in vitro*. Однако необходимо уточнить, что подавляющее действие препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа начинается на более низких концентрациях препарата при его заблаговременном (профилактическом) введении в культуру клеток.

Выводы

1. При изучении противовирусной активности препарата Цитовир®-3 в отношении респираторно-синцитиального вируса показано, что препарат независимо от схемы применения (лечебной или профилактической) проявляет противовирусную активность в нетоксическом диапазоне концентраций, что свидетельствует о его высоком профиле безопасности.

2. Изучение действия препарата Цитовир®-3 в отношении вируса парагриппа показало, что препарат проявляет противовирусную активность как при лечебной, так и при профилактической схемах применения в нетоксическом диапазоне, что свидетельствует о его высоком профиле безопасности.

3. Полученные данные свидетельствуют о том, что подавляющее действие Цитовир®-3 в от-

ношении вируса парагриппа начинается при более низких концентрациях препарата при его профилактическом внесении в культуру клеток по сравнению с лечебной схемой применения.

4. Доказано что в отношении исследованных вирусов препарат Цитовир®-3 имеет более высокий индекс селективности, чем препарат сравнения Умифеновир.

5. Полученные результаты обосновывают возможность дальнейшего изучения противовирусной активности препарата Цитовир®-3 у больных респираторными вирусными инфекциями, обусловленными респираторно-синцитиальным вирусом и вирусом парагриппа.

Дополнительная информация

Участие авторов. Зарубаев В. В. — дизайн и проведение исследования, редактирование публикации, статистическая обработка; Смирнов В. С. — дизайн исследования, редактирование публикации; Кудрявцева Т. А. — дизайн исследования, статистическая обработка, написание публикации; Петленко С. В. — дизайн исследования, редактирование публикации; Хоанг Мин — дизайн исследования, редактирование публикации; Слита А. В. — проведение исследования, редактирование публикации; Заплутанов В. А. — дизайн исследования, написание публикации.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы в ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (г. Санкт-Петербург, РФ) по заказу и финансовой поддержке АО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед» (г. Санкт-Петербург, РФ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Additional information

Contribution. Zarubaev V. V. — research design and management, publication editing, statistical processing management; Smirnov V. S. — research design, publication editing; Kudryavtseva T. A. — research design and statistical processing management, publication writing; Petlenko S. V. — research design, publication editing; Slita A. V. — research management, publication editing; Hoang Minh — research design, publication editing; Zaplutanov V. A. — research design, publication writing.

Acknowledgments. The study was carried out within the framework of research work at the Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint-Petersburg, Russian Federation) on the order and financial support of JSC «CYTOMED» (Saint-Petersburg, Russian Federation).

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

Литература/References

1. Клинические рекомендации: Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) у взрослых. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/724_1 (accessed February 17, 2022). [Clinical guidelines: Acute respiratory viral infections (ARVI) in adults. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/724_1 (accessed February 17, 2022). (in Russian)]
2. Маркова Т.П., Чувилов Д.Г. ОРВИ: профилактика и лечение в эпидемический сезон. Русский медицинский журнал. 2016; 3: 171–176. [Markova T.P., Chuvilov D.G. ORVI: profilaktika i lechenie v epidemicheskii sezon. Russkii Meditsinskii Zhurnal. 2016; 3: 171–176. (in Russian)]
3. Клинические рекомендации: Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ). Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/25_2 (accessed February 17, 2022). [Clinical guidelines: Acute respiratory viral infections (ARVI). Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/25_2 (accessed February 17, 2022). (in Russian)]
4. Александрович Ю.С., Козлова Е.М., Новопольцева Е.Г., Новопольцев Д.Е. Острые респираторные инфекции у детей. Осложнения и жизнеугрожающие состояния: Учебное пособие для врачей. СПб.: СПбГПМУ; 2021. [Aleksandrovich Yu.S., Kozlova E.M., Novopol'tseva E.G., Novopol'tsev D.E. Ostrye respiratornye infektsii u detei. Oslozhneniya i zhiznuegrozhayushchie sostoyaniya: Uchebnoe posobie dlya vrachei. SPb.: SPbGPMU; 2021. (in Russian)]
5. Бабченко И.В., Орлова Е.Д., Лобзин Ю.В. Влияние пандемии COVID-19 на сезонность респираторно-синцитиальной вирусной инфекции. Журнал инфектологии. 2022; 14 (2): 39–46. doi: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-2-39-46>. [Babchenko I.V., Orlova E.D., Lobzin Yu.V. Impact of the COVID-19 pandemic on the seasonality of respiratory syncytial viral infection. Zhurnal Infektologii. 2022; 14 (2): 39–46. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2022-14-2-39-46>. (in Russian)]
6. Summeren van J., Meijer A., Aspelund G. et al. Low levels of respiratory syncytial virus activity in Europe during the 2020/21 season: what can we expect in the coming summer and autumn/winter? Eurosurveillance. 2021; 26 (29): 1–6. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.29.2100639.
7. Foley D.A., Yeoh D.K., Minney-Smith C.A. et al. The interseasonal resurgence of respiratory syncytial virus in Australian children following the reduction of coronavirus disease 2019-related public health measures. Clin Infect Dis. 2021 Nov 2; 73 (9): e2829–e2830. doi: 10.1093/cid/ciaa1906.
8. Halabi K.C., Saiman L., Zachariah P. The Epidemiology of respiratory syncytial virus in New York City during the coronavirus disease-2019 pandemic compared with previous years. J Pediatr. 2022; 242: 242–244. doi: 10.1016/j.jpeds.2021.10.057.
9. Julian D., Dorothy D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and molecular biology reviews. 2010; 74 (3): 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
10. Liu Y., Wang H., Yang J., Zeng J., Sun G.M. Virome of respiratory secretion from children with unknown etiological acute respiratory disease revealed recombinant human parechovirus and other significant viruses. Virol J. 2021; 18 (1): 122. doi: 10.1186/s12985-021-01586-0.
11. Клинические рекомендации: Грипп у взрослых. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/749_1 (accessed February 17, 2022). [Clinical guidelines: Influenza in adults. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/749_1 (accessed February 17, 2022). (in Russian)]
12. Головачева Е.Г., Афанасьева О.И., Гончарова Е.С., Быковская А.Г., Давлетгареева Д.В., Апрытина В.А. Возможности терапевтической коррекции патологии носоглотки, ассоциированной с COVID-19, у детей в амбулаторных условиях. Вестник оториноларингологии. 2021; 86 (6): 69–73. doi: <https://doi.org/10.17116/otorino20218606169>. [Golovacheva E.G., Afanasyeva O.I., Goncharova E.S., Bykovskaya A.G., Davletgareeva D.V., Apryatina V.A. Possibilities of therapeutic correction of ENT pathology associated with COVID-19 in children on an outpatient basis. Vestnik Oto-Rino-Laringologii. 2021; 86 (6): 69–73. doi: <https://doi.org/10.17116/otorino20218606169>. (in Russian, in English)]
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65 (1–2): 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Информация об авторах

Зарубаев Владимир Викторович — д. б. н., заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-5224-3771. Researcher ID: H-1534-2018. eLIBRARY SPIN-код: 7030-1541. Scopus Author ID: 6602439930

Смирнов Вячеслав Сергеевич — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-2723-1496

Кудрявцева Татьяна Анатольевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории нанотехнологии и синтеза лекарственных веществ отдела нейрорфармакологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0003-4997-9830

Петленко Сергей Викторович — д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0002-2752-4598

Слита Александр Валентинович — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0001-8229-0715. Researcher ID: 9683-2017. Scopus Author ID: 7801335709

Хоанг Мин — научный сотрудник, Институт Пастера, Хошимин, Вьетнам. ORCID-ID: 0000-0002-3444-1360

Заплутанов Василий Андреевич — старший научный сотрудник лаборатории фармакологии пептидов, Автономная некоммерческая организация научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия. ORCID-ID: 0000-0001-5294-6533. Researcher ID: F-1215-2015. eLIBRARY SPIN-код: 6067-5480. Scopus Author ID: 553 12771400

About the authors

Vladimir V. Zarubaev — D. Sc. in Biology, Head of the Laboratory of experimental virology researcher, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0002-5224-3771. Researcher ID: H-1534-2018. eLibrary SPIN code: 7030-1541. Scopus Author ID: 6602439930

Vyacheslav S. Smirnov — D. Sc. in Medicine, Professor, Leading researcher at the Laboratory of molecular immunology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0002-2723-1496

Tatiana A. Kudryavtseva — Ph. D. in Biology, Research scientist at the Laboratory of nanotechnology and synthesis of medicinal substances, Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0003-4997-9830

Sergey V. Petlenko — D. Sc. in Medicine, Leading researcher, Laboratory of biochemical toxicology and pharmacology Scientific and Clinical Center of Toxicology named after Academician S. N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0002-2752-4598.

Alexander V. Slita — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of experimental virology Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0001-8229-0715. Researcher ID: 9683-2017. Scopus Author ID: 7801335709

Hoang Minh — Researcher, Ho Chi Minh Pasteur Institute, Ho Chi Minh, Vietnam. ORCID-ID: 0000-0002-3444-1360

Vasily A. Zaplutanov — Senior Researcher of the Laboratory pharmacology of peptides, Institute of bioregulation and gerontology, Saint-Petersburg, Russia. ORCID-ID: 0000-0001-5294-6533. Researcher ID: F-1215-2015. eLibrary SPIN code: 6067-5480. Scopus Author ID: 553 12771400