

Экспериментальные образцы препаратов на основе цетрарии исландской (*Cetraria islandica*), проявляющие противовирусную активность в отношении вируса гриппа А

Е. В. МАКАРЕВИЧ, *М. А. ПРОЦЕНКО, О. Ю. МАЗУРКОВ,
Е. И. ФИЛИППОВА, Н. А. МАЗУРКОВА

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

Experimental Medications Made with *Cetraria Islandica* Showing Antiviral Activity against Influenza A Virus

ELENA V. MAKAREVICH, *MARIYA A. PROTSENKO, OLEG YU. MAZURKOV,
EKATERINA I. FILIPPOVA, NATALIA A. MAZURKOVA

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Резюме

Актуальность. На сегодняшний день вирусологами выявлено более 25000 серотипов вируса гриппа А, и в дальнейшем их число будет увеличиваться. В связи с этим разработка новых противовирусных препаратов, в том числе и против вируса гриппа, актуальна. **Цель исследования** — получение, тестирование химического состава и противовирусной активности экстрактов лишайника *Cetraria islandica* в отношении вируса гриппа А. **Материал и методы.** Для образцов препаратов лишайника *Cetraria islandica* (водный и этанольный экстракты) исследовали токсические свойства и противовирусную активность в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK. **Результаты.** Получены и охарактеризованы по химическому составу образцы водного и этанольного экстрактов *Cetraria islandica*. В культуре клеток MDCK экстракты проявляли противовирусную активность в отношении вируса гриппа человека А/Н3N2 и птиц А/Н5N1. При исследовании механизма действия экстрактов *Cetraria islandica* отмечено, что образцы *Cetraria islandica* обладают выраженными противовирусными свойствами в отношении вируса гриппа птиц А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и вируса гриппа человека А/Aichi/2/68 (H3N2) на стадии их адсорбции и репродукции. **Заключение.** Образцы *Cetraria islandica* обладают противовирусной активностью на стадии адсорбции и репродукции вируса гриппа А в культуре клеток MDCK. Этанольный экстракт показывает более высокую противовирусную эффективность по сравнению с водным экстрактом.

Ключевые слова: *Cetraria islandica*; экстракты; противовирусная активность; вирус гриппа

Для цитирования: Макаревич Е. В., Проценко М. А., Мазурков О. Ю., Филиппова Е. И., Мазуркова Н. А. Экспериментальные образцы препаратов на основе цетрарии исландской (*Cetraria islandica*), проявляющие противовирусную активность в отношении вируса гриппа А. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 12–19. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-12-19>.

Abstract

Background. To date, virologists have identified more than 25,000 influenza virus A serotypes, and their number will increase in the future. Therefore, the development of new antiviral drugs will always be relevant. **The aim** of the study is to obtain and test the chemical composition and antiviral activity of the lichen *Cetraria islandica* extracts against the influenza A virus. **Material and methods.** Samples of lichen *Cetraria islandica* (aqueous and ethanol extracts) were tested for toxic properties and antiviral activity against influenza A virus in MDCK cell culture. **Results.** Samples of aqueous and ethanol extracts of *Cetraria islandica* were obtained; their chemical composition was described. In MDCK cell culture, the extracts exhibited antiviral activity against human influenza virus A/H3N2 and avian influenza virus A/H5N1. When studying the mechanism of action of *Cetraria islandica* extracts, it was noted that *Cetraria islandica* samples possess pronounced antiviral properties against avian influenza A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) and human influenza A/Aichi/2/68 (H3N2) at the stage of their adsorption and reproduction. **Conclusions.** Samples of *Cetraria islandica* have antiviral activity at the stage of adsorption and reproduction of influenza A virus in MDCK cell culture. The ethanol extract shows a higher antiviral efficacy compared to the aqueous extract.

Keywords: *Cetraria islandica*; extracts; antiviral activity; influenza virus

For citation: Makarevich E. V., Protsenko M. A., Mazurkov O. Yu., Filippova E. I., Mazurkova N. A. Experimental drug samples of the *Cetraria islandica* showing antiviral activity against influenza A virus. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68 (9–10): 12–19. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-12-19>.

Введение

Среди острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) одним из самых распространённых инфекционных заболеваний является грипп, периодически появляющийся в виде эпидемий. На сегодняшний день вирусологами выявлено более 25000 серотипов вируса гриппа А, различающихся между собой антигенным спектром, и в дальнейшем их число будет скорее всего возрастать [1].

Противогриппозные препараты этиотропного действия на сегодняшний день представлены ограниченным спектром лекарственных средств, большинство из которых характеризуются узконаправленным действием, наличием нежелательных побочных эффектов, проявлением токсичности, что значительно ограничивает их применение в медицине и фармации. Ситуацию усугубляет то, что одной из главных проблем профилактики является высокая скорость изменчивости вируса гриппа А вследствие быстро протекающих мутаций (например, мутация в гене М2 белка) [2], это приводит к увеличению устойчивости вируса гриппа А к препаратам, а значит и к снижению активности лекарств, по этой причине требуется замена лекарства.

В связи с вышеизложенным разработка новых безопасных и эффективных в отношении вируса гриппа лекарственных препаратов является одной из приоритетных задач медицины и фармации.

Лекарственные растения и препараты на их основе используются человечеством для лечения различных заболеваний ещё с незапамятных времён. Тем не менее, для лечения ОРВИ растения обычно применяются в симптоматической и патогенетической терапии в качестве жаропонижающих, потогонных, отхаркивающих, противовоспалительных средств [3].

Следует отметить, что существуют и препараты растительного происхождения этиотропного действия. Одним из таких препаратов является противовирусное средство гипорамин, получаемое из листьев *Hipporhae rhamnoides* L. семейства Elaeagnaceae, представляющее собой сухой очищенный стандартизованный экстракт на основе полифенольного комплекса галлоэллаготаннинов [4]. Гипорамин обладает выраженной противовирусной активностью в отношении различных штаммов вируса гриппа человека. В основе механизма действия гипорамина лежит ингибирующий эффект на вирусную нейраминидазу. Однако для гипорамина в литературе не описана противовирусная активность в отношении пандемических штаммов вируса гриппа человека субтипа H1N1pdm09, а также в отношении высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц субтипа H5N1 с пандемическим потенциалом, спо-

собных инфицировать людей и вызывать тяжёлые заболевания с летальным исходом.

В народной медицине лишайники используются для лечения многих заболеваний. Известно, что лишайниковые кислоты (в том числе усниновая кислота) проявляют антибиотические, противопаразитарные и противоопухолевые свойства [5]. Усниновая кислота, полученная из лишайника *Cladonia stellaris*, обладает способностью к подавлению репликации штамма вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)v в культуре клеток MDCK. Эффективность усниновой кислоты и её производных в отношении данного штамма вируса гриппа превышала таковую у рибавирина [6].

Химически синтезированные производные усниновой кислоты показывали активность в отношении штаммов вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/California/7/09 (H1N1)v, A/mallard/Pensilvania/10218/84 (H5N2), A/Владивосток/2/09 (H1N1). Однако противовирусная активность производных усниновой кислоты была всё же ниже, чем препаратов сравнения (римантадин и озельтамивир), за исключением штаммов, устойчивых к ним [5].

При этом для усниновой кислоты и её производного не доказана противовирусная активность в отношении штаммов вируса гриппа других субтипов, включая высокопатогенные штаммы вируса гриппа птиц субтипа H5N1, способные инфицировать людей и вызывать у них тяжёлые заболевания с летальным исходом.

Цель исследования — получение, тестирование химического состава и противовирусной активности в отношении вируса гриппа А экспериментальных образцов препаратов лишайника *Cetraria islandica* (L.) Ach. из семейства Parmeliaceae.

Материал и методы

Слоевница лишайника *Cetraria islandica* собраны в Алтайском крае летом 2012 г.

Для подготовки экспериментальных образцов препаратов в виде сухих экстрактов использовали разработанную нами ранее технологию [7]. Этанольные экстракты получали четырёхкратной экстракцией 70% этиловым спиртом при температуре 60°C и соотношении сырья к экстрагенту 1:50. Общее время экстракции составляло 4 часа. Водные экстракты получали двукратной экстракцией дистиллированной водой при температуре 95°C в течение 2 ч (общее время). Соотношение сырья к экстрагенту составляло 1:50. Охлаждённые извлечения отделяли от сырья фильтрованием через стеклянный фильтр (размер пор 10–16 мкм), объединяли, упаривали и досушивали в сушильном шкафу при температуре 60°C до влажности 5%.

Анализ содержания катехинов в экспериментальных образцах препаратов *Cetraria islandica* проводили спектрофотометрическим методом, основанном на способности давать малиновое окрашивание с 1% раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны (λ) 504 нм. Пересчётный коэффициент рассчитан по d-катехину [8]. Флавонолы определяли спектрофотометрическим методом по Беликову [9]. Количество их рассчитывали

по графику, построенному по рутину. Содержание танинов определяли титрометрически по Левенталю [10]. Сапонины осаждали из упаренного спиртового экстракта семикратным объёмом ацетона. Количественное содержание белка в образцах определяли по Бредфорду [11]. Суммарное содержание полисахаридов определяли спектрофотометрически модифицированным антроновым методом Дрейвуда [12], включающим кислотный гидролиз полисахаридов серной кислотой с получением моносахаридов, образующих с антроном окрашенные комплексы сине-зелёного цвета с максимумом спектра поглощения при 520–625 нм. При разбавлении реакционной смеси этиловым спиртом максимум спектра поглощения смещается до 430 нм. Определение содержания полисахаридов проводили в пересчёте на глюкозу, используя предварительно построенный калибровочный график зависимости величины оптической плотности глюкозы (при $\lambda=430$ нм) от концентрации [7].

Для тестирования токсичности и противовирусной активности экстрактов использовали перевиваемую культуру клеток MDCK, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. По 100 мкл суспензии клеток MDCK в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы, вносили в 96-луночные планшеты. Планшеты с клетками помещали в термостат при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2–3 сут до образования клеточного монослоя.

Для определения токсических концентраций образцы экстрактов разводили в несколько раз и оценивали наличие токсического действия на монослой культуры клеток MDCK с помощью инвертированного микроскопа. Для этого образцы экстрактов растворяли в среде RPMI-1640, делая разведения образцов в 5, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 раз средой, вносили по 100 мкл в соответствующие лунки планшета и ставили в термостат при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2 сут. Через 2 сут с помощью инвертированного микроскопа оценивали наличие токсического действия на монослой клеток MDCK, инкубированных с разными концентрациями экстрактов лишайника. В опытах по определению противовирусной активности экстрактов в культуре клеток MDCK использовали предварительно определённые их максимально переносимые концентрации (МПК) для этой клеточной культуры, которые составляли 1,0 и 0,1 мкг/мл для водного и этанольного экстракта, соответственно.

В работе использовали штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и штамм вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Нароботку вируса гриппа производили в 10-суточных куриных эмбрионах (КЭ), концентрацию вируса каждого субтипа определяли путём титрования в культуре клеток MDCK: в каждую лунку вносили 50 мкл питательной среды RPMI-1640 без сыворотки и 50 мкл вирусаллантоисной жидкости (ВАЖ) (по 4 лунки на каждое разведение образца). Титры вируса рассчитывали методом Спирмена–Кербера, выражали в десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в 1 мл (\lg ТЦД₅₀/мл) и представляли в виде $M \pm I_{95}$ (где M — среднее значение, I_{95} — 95% доверительный интервал) [13]. Титры используемых в экспериментах штаммов вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) составляли $6,3 \pm 0,57$ и $7,55 \pm 0,75$ \lg ТЦД₅₀/мл, соответственно.

Для определения противовирусной активности образцов на монослой культуры клеток MDCK вносили по 50 мкл каждого образца экстракта, разведённого поддерживающей средой RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина, до концентрации равной МПК и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в термостате TC-1/80 СПУ (Россия). Затем в лунки с препаратом добавляли по 50 мкл ВАЖ, которую готовили путём разведения ВАЖ каждого вируса от 1 до 8 с десятикратным шагом с использованием поддерживающей

среды RPMI-1640 (ООО «Биолот», Россия) без сыворотки, содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США). Клетки инкубировали 2 сут при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 2 сут в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие в монослое клеток и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% суспензией эритроцитов кур. Титры вируса выражали в \lg ТЦД₅₀/мл в контроле и в опыте и сравнивали по t -критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. Вирусингибирующее действие исследуемых экстрактов оценивали по снижению титра вируса в опыте по сравнению с титром вируса в контроле, для этого высчитывали индекс нейтрализации (ИН) вирусов под влиянием экстракта: $ИН = \text{Титр}_{\text{контроль}} - \text{Титр}_{\text{опыт}}$ (\lg) [8].

В качестве контроля использовали:

1. Контроль клеток MDCK, культивируемых в питательной среде RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США), без внесения исследуемых образцов экстрактов и штаммов вируса гриппа А.

2. Контроль репродукции штаммов вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) с 1 до 8 разведения с десятикратным шагом без внесения экстрактов.

В следующей серии экспериментов нами было проведено сравнительное изучение противогриппозных свойств экстрактов *Cetraria islandica* при введении их в профилактической и лечебной схемах. В данных экспериментах в клеточную культуру вносили растительные образцы в МПК, а также референс-препараты (Тамифлю и Римантадин в конечных концентрациях 50 и 10 мкг/мл, соответственно) по 50 мкл/лунку за 24 ч до (профилактическая схема) и через 24 ч после (лечебная схема) инфицирования клеток десятикратными разведениями (с 1 до 8) ВГ в объёме 50 мкл/лунку. В качестве контроля использовали инфицированный монослой клеток, в который вносили питательную среду вместо экстрактов в те же временные точки, что и в опыте. Через 48 ч после инфицирования определяли наличие вируса в среде культивирования в опыте (с образцом) и контроле (без образца) по РГА с 1% эритроцитами кур, после чего рассчитывали и сравнивали титры вируса в \lg ТЦД₅₀/мл в опыте и в контроле по методу Спирмена–Кербера [13].

В дальнейшем нами было проведено изучение механизма действия экстрактов *Cetraria islandica* на вирус гриппа А, для этого нами был исследован вирусингибирующий эффект данных экстрактов в зависимости от времени введения их в инфицированную культуру клеток, а именно: за 1 ч до и через 1, 3, 6 ч после заражения клеток MDCK вирусом гриппа штаммов A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). Для этого образцы в МПК и референс-препараты (Тамифлю и Римантадин в конечных концентрациях 50 и 10 мкг/мл, соответственно) по 50 мкл/лунку вносили в клеточную культуру за 1 ч до, а также через 1, 3, 6 ч после инфицирования клеток десятикратными разведениями (с 1 до 8) ВГ, внесёнными по 50 мкл/лунку. Экстракты *Cetraria islandica* и вирусосодержащей жидкости были приготовлены на среде RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина. В качестве контроля использовали инфицированный монослой клеток, в который вносили питательную среду вместо экстрактов в те же временные точки, что и в опыте. Наличие или отсутствие вируса в среде культивирования в опыте и контроле определяли после инкубации заражённых клеток при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 сут после инфицирования по РГА [14]. Титры вируса выражали в \lg ТЦД₅₀/мл в контроле и в опыте и сравнивали по методу Спирмена–Кербера [13].

Результаты и обсуждение

По разработанной и апробированной технологии [7] получены экспериментальные образцы препаратов из сырья лишайника *Cetraria islandica*

Таблица 1. Содержание групп биологически активных веществ в экстрактах *Cetraria islandica*
Table 1. Groups of biologically active substances in extracts of *Cetraria islandica*

Наименование группы БАВ	Содержание групп БАВ, мг/г, $M \pm Sm$; $n=3$	
	Водный экстракт	Этанольный экстракт
Полисахариды	39,7 \pm 4,0	131,0 \pm 13,0*
Белки	4,1 \pm 0,4	11,4 \pm 1,1*
Катехины	1,1 \pm 0,1*	0,7 \pm 0,1
Флавонолы	35,5 \pm 3,5*	6,6 \pm 0,7
Танины	70,0 \pm 7,0*	26,5 \pm 1,5
Сапонины	69,0 \pm 7,0	563,5 \pm 56,5*

Примечание. БАВ — биологически активные вещества; M — среднее арифметическое; Sm — стандартное отклонение; n — число опытов; * — достоверное отличие большего значения от соответствующего показателя в водном и этанольном экстрактах по t -критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Note. БАВ — biologically active substances; M — arithmetic mean; Sm — standard deviation; n — the number of experiments; * — a significant difference of a higher value from the corresponding indicator in aqueous and ethanol extracts according to Student's t -test at $P \leq 0.05$.

Таблица 2. Противовирусная активность экстрактов лишайника в отношении вируса гриппа в монослое клеток MDCK
Table 2. Antiviral activity of lichen extracts against influenza virus in the monolayer of MDCK cells

Table 2. Antiviral activity of lichen extracts against influenza virus in the monolayer of MDCK cells			
Образец	Максимально переносимая концентрация для клеток MDCK, мг/мл	Титр инфекционной активности вируса гриппа lg ТЦД ₅₀ /мл (M±I ₉₅), n=3	Индекс нейтрализации (Титр _{контроль} – Титр _{опыт}), lg
A/Aichi/2/68 (H3N2)			
Водный экстракт	1,0	5,3±0,57*	1,00
Этанольный экстракт	0,1	4,3±0,57*	2,00
Контроль вируса	—	6,3±0,57	—
A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)			
Водный экстракт	1,0	6,05±0,49*	1,50
Этанольный экстракт	0,1	5,05±0,49*	2,50
Контроль вируса	—	7,55±0,75	—

Примечание. * — отличие от соответствующего контроля по t -критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$; I_{95} — верительный интервал; n — число повторов экспериментов.

Note. * — difference from the corresponding control according to the Student's t -test at $P \leq 0.05$; I_{95} — confidence interval; n — the number of experiment repetitions.

в виде сухих этанольного и водного экстрактов. В образцах определяли содержание биологически активных веществ. Результаты определения химических характеристик образцов приведены в табл. 1. Как видно из табл. 1, этанольный экстракт лишайника по сравнению с водным экстрактом содержит сахаров больше в 3,3 раза, белков больше в 2,8 раза, сапонинов больше в 8,2 раза, в то время как катехинов меньше в 1,6 раза, флавонолов меньше в 5,4 раза и танинов меньше в 2,6 раза.

Далее в культуре клеток MDCK тестировали токсические свойства и противовирусную активность образцов *Cetraria islandica* в отношении вируса гриппа А.

В экспериментах по определению токсических свойств экстрактов было определено, что максимально переносимые концентрации (МПК) для водного и этанольного экстрактов в культуре клеток MDCK составили 1,0 и 0,1 мг/мл, соответственно. Данные МПК экстрактов использовались в дальнейших экспериментах.

Исследование ингибирования репродукции вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и ви-

руса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) экстрактами лишайника по профилактической схеме в монослое клеток MDCK показало, что водный экстракт лишайника проявил незначительный противовирусный эффект в отношении данных вирусов (табл. 2). Индексы нейтрализации для штаммов вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) под действием водного экстракта в концентрации 1,0 мг/мл составили 1,0 и 1,5 lg, соответственно. В то же время индексы нейтрализации штаммов A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) под действием этанольного экстракта составили 2,0 и 2,5, соответственно (см. табл. 2).

Этанольный экстракт, проявивший по сравнению с водным экстрактом более выраженный противогриппозный эффект при более низкой концентрации — 0,1 мг/мл, содержал 11,4 мг/г суммарных белков и 131,0 мг/г суммарных сахаров (см. табл. 1). Более значительная противовирусная активность экстракта из этанольного извлечения лишайника по сравнению с таковым из водного извлечения может быть связана с большим содержанием суммарных

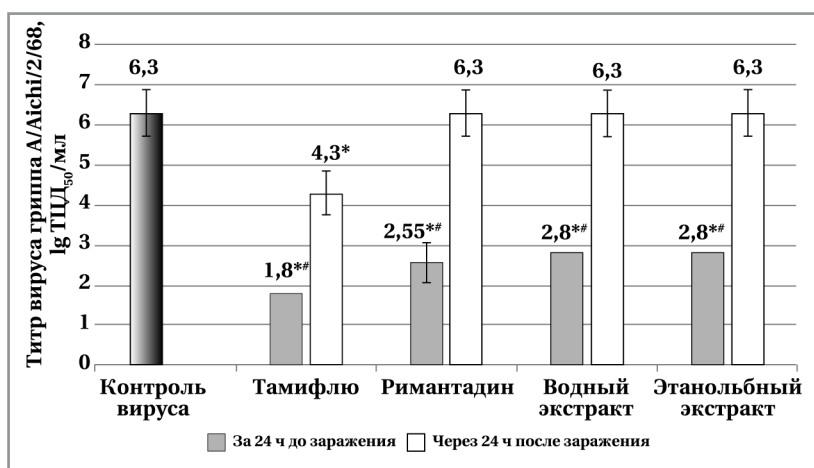


Рис. 1. Титры вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 1. Titers of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) strain in the control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

Примечание. Здесь и на рис. 2–4: * — достоверное отличие при $p \leq 0,05$ от соответствующего контроля (без экстракта) рассчитаны по методу Спирмена–Кербера; # — достоверное отличие титров вируса при внесении экстрактов и препаратов сравнения за 24 ч и через 24 ч после заражения, при $p \leq 0,05$ рассчитаны по методу Спирмена–Кербера.

Note. Here and Fig. 2–4: * — a significant difference at $P \leq 0.05$ from the corresponding control (without the extract) calculated by the Spearman–Karber method; # — a significant difference in the value of virus titers when applying extracts of *Cetraria islandica* and comparison drugs 24 hours before and 24 hours after the infection, with $P \leq 0.05$ calculated by the Spearman–Karber method; — 24 hours before the infection; — 24 hours after the infection.

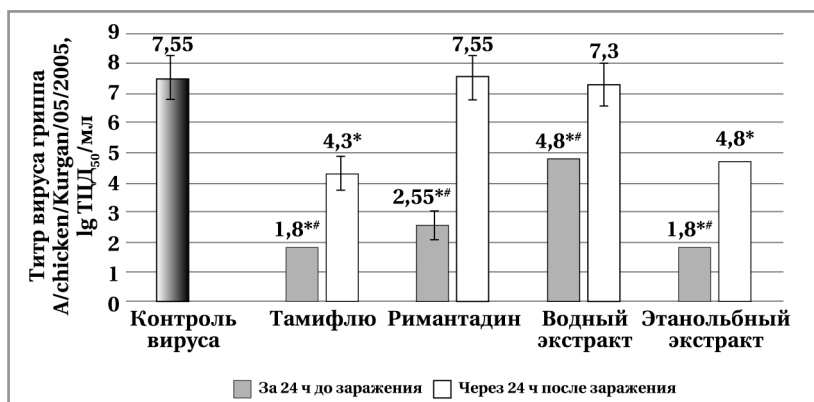


Рис. 2. Титры вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 2. Titers of influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) strain in the control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

белков (в 2,8 раза), сахаров (в 33 раза) и сапонинов (в 8,2 раза). Кроме того, следует предполагать, что этанольный экстракт содержит также и усниновую кислоту, обладающую противогриппозной активностью, поскольку в этиловом спирте она растворяется лучше, чем в воде [15].

В дальнейших исследованиях мы сравнили в профилактической и лечебной схемах эффективность экстрактов лишайника с известными противогриппозными препаратами Римантадином и Тамифлю. Известно, что механизм действия Римантадина основан на способности угнетать раннюю стадию специфической репродукции от проникновения вируса в клетку до начальной транскрипции РНК [16], а механизм действия Тамифлю основан на блокировке активности фермента нейраминидазы, что приводит к прерыванию процесса новообразования вирусов в инфицированных клетках и возможности их проникновения через мембраны здоровых клеток [17].

Оценка противовирусной активности экстрактов лишайника с использованием профилактической (за 24 ч до инфицирования) и лечебной (через 24 ч после инфицирования) схем их внесения на клеточный монослой показала, что достоверное снижение титров вируса гриппа А(Н5N1) и А(Н3N2) происходило при использовании профилактической схемы введения экспериментальных образцов и препаратов сравнения (рис. 1, 2). Индексы подавления продукции вируса гриппа человека А(Н3N2) в профилактической схеме составили для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина 3,5; 3,5; 4,5 и 3,75 lg, соответственно, в то время как при лечебной схеме введения образцов индексы подавления вирусной продукции для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина были 0,0; 0,0; 2,0 и 0,0 lg, соответственно (см. рис. 1). В отношении вируса гриппа птиц А(Н5N1) все исследуемые образцы и препараты сравнения (Тамифлю и Римантадин) также были более активными при профилактической схеме их введения по сравнению с лечебной схемой. Индексы подавления продук-

ции данного вируса в профилактической схеме составили для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина 2,75; 5,75; 5,75 и 5,00 lg, соответственно. При использовании лечебной схемы введения образцов индексы подавления продукции данного вируса были значительно

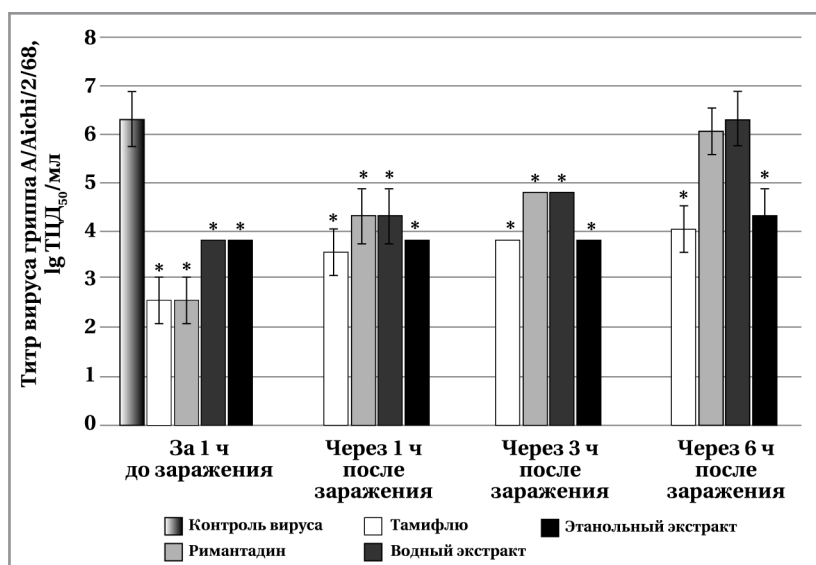


Рис. 3. Титры вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 3. The titers of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) strain in the control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

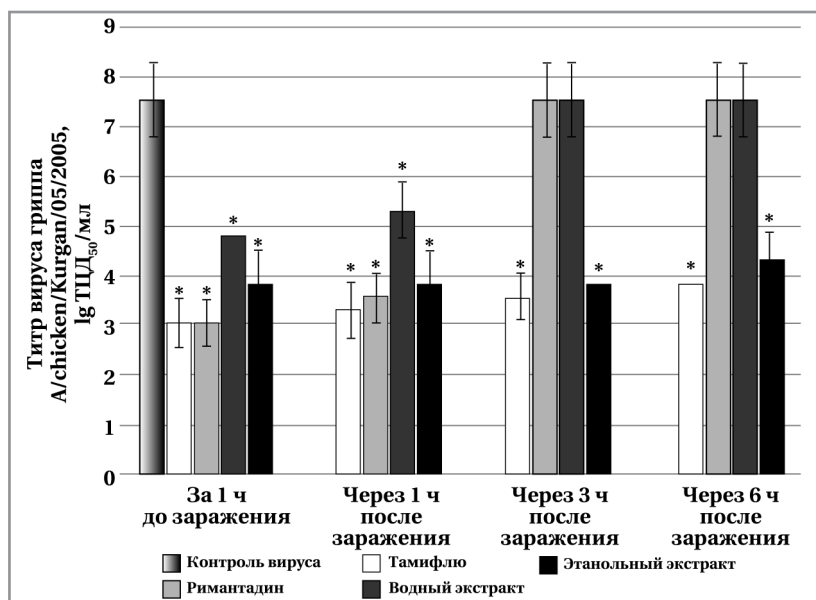


Рис. 4. Титры вируса гриппа штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в контроле (без экстракта) и в присутствии экстрактов *Cetraria islandica* (опыт) до или после инфицирования культуры клеток MDCK.

Fig. 4. Titers of influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) strain in control (without the extract) and in the presence of extracts of *Cetraria islandica* (experiment) before or after the infection of MDCK cell culture.

ниже по сравнению с таковыми в профилактической схеме и составили для водного, этанольного экстрактов, Тамифлю и Римантадина 0,25; 2,75; 3,25 и 0,0 lg, соответственно (см. рис. 2).

В экспериментах по изучению влияния экстрактов *Cetraria islandica* на титры вируса гриппа в культуре клеток MDCK в зависимости от вре-

мени их внесения (до и после заражения) нами было выявлено, что этанольный экстракт снижает инфекционность вируса гриппа человека A(H3N2) и птиц A(H5N1) как при его внесении за 1 ч до, так и через 1, 3 и 6 ч после заражения вирусом гриппа (рис. 3, 4). В то время как водный экстракт снижает инфекционность вируса гриппа человека A(H3N2) в культуре клеток MDCK за 1 ч до, и через 1, 3 ч после заражения данным штаммом (см. рис. 3), а вируса гриппа птиц A(H5N1) — за 1 ч до, и через 1 ч после заражения этим штаммом (см. рис. 4).

Из полученных данных (рис. 3, 4) видно, что этанольный экстракт лишайника *Cetraria islandica* влияет на репродукцию вируса гриппа в течение такого же периода времени (6 ч), что и референс-препарат Тамифлю, что позволяет указывать на схожесть механизма действия этих препаратов. В то время как водный экстракт влияет только на стадии адсорбции и ранние стадии вирусного цикла использованных штаммов вируса гриппа А в культуре клеток MDCK, что даёт нам возможность предположить, что механизм действия данного экстракта сравним с механизмом действия используемого в эксперименте второго референс-препарата Римантадина.

Таким образом, экспериментальные образцы препаратов в виде водного и этанольного экстрактов лишайника *Cetraria islandica* имеют высокую противовирусную активность, которая проявляется в том, что они ингибируют репродукцию вируса гриппа в культуре клеток MDCK. Следует отметить, что этанольный экстракт показал более высокую эффективность по сравнению с водным экстрактом.

Исходя из этого, можно сделать вывод о высоком потенциале этанольного экстракта, полученного

из лишайника *Cetraria islandica*, для использования его в качестве основы для новых высокоэффективных лекарственных препаратов для профилактики и лечения гриппа.

Работа выполнена в рамках государственного задания №30/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Отсутствие конфликта интересов.

Участие авторов. Е. В. Макаревич — выполнение методик, получение данных для анализа, интерпретация результатов, написание текста, редактирование; М. А. Проценко — вы-

полнение методик, написание текста; редактирование; О. Ю. Мазурков — выполнение методик; Е. И. Филиппова — получение данных для анализа; Н. А. Мазуркова — постановка проблемы, анализ и интерпретация результатов, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=11308&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>.
2. Watts J. Asian nations step up action to curb spread of avian influenza. *Lancet*. 2004; 363 (9406): 373. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15475-5.
3. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия: Учебник. — М.: Медицина; 2022. [Murav'eva D.A., Samylina I.A., Yakovlev G.P. Farmakognoziya: Uchebnik. Moscow: Meditsina; 2022. (in Russian)]
4. Вичканова С.А. Изучение листьев облепихи и создание на их основе отечественного противовирусного средства «Гипорамин». V Международный съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения»; 2001; Санкт-Петербург. [Vichkanova S.A. Izuchenie list'ev oblepikhi i sozdanie na ikh osnove otechestvennogo protivovirusnogo sredstva «Giporamin». (Conference proceedings) V Mezhdunarodnyi sezd «Aktual'nye problemy sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov prirodnogo proiskhozhdeniya»; 2001; Sankt-Peterburg. (in Russian)].
5. Штро А.А. Исследование активности производных усниновой кислоты в отношении вируса гриппа: дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 2014. [Shtro A.A. Issledovanie aktivnosti proizvodnykh usninovoi kisloty v otnoshenii virusa grippa. [dissertation]. Sankt-Peterburg; 2014. (in Russian)].
6. Патент РФ на изобретение № 2464033/ 20.10.2012. Бюл. №29. Соколов Д.Н., Лузина О.А., Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Киселев О.И., Зарубаев В.В., Штро А.А. Усниновая кислота и ее окисленное производное в качестве ингибиторов репродукции вируса гриппа [Patent RUS №2464033/ 20.10.2012. Byul. №29. Sokolov D.N., Luzina O.A., Polovinka M.P., Salakhutdinov N.F., Kiselev O.I., Zarubaev V.V., Shtro A.A. Usninovaya kislota i ee okislennoe proizvodnoe v kachestve ingibitorov reproduksii virusa grippa. (in Russian)]
7. Проценко М.А. Разработка технологии экспериментальных образцов препаратов из высших базидиомицетов: дис. ... канд. биол. наук. Кольцово; 2016. [Protsenko M.A. Razrabotka tekhnologii eksperimental'nykh obraztsov preparatov iz vysshih bazidiomitsetov. [dissertation] Kol'tsovo; 2016. (in Russian)]
8. Кукушкина Т.А., Зыков А.А., Обухова Л.А. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств. Материалы УП Международного Съезда Фитофарм 2003. «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». СПб.: Пушкин, 03–05 июля 2003; 64–69. [Kukushkina T.A., Zykov A.A., Obukhova L.A. Manzheta obyknovennaya (*Alchemilla vulgaris* L.) kak istochnik lekarstvennykh sredstv. Materialy UP Mezhdunarodnogo S'ezda Fitofarm 2003. «Aktual'nye problemy sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov prirodnogo proiskhozhdeniya». SPb.: Pushkin, 03–05 iyyulya 2003; 64–69. (in Russian)]
9. Проценко М.А., Мазуркова Н.А., Филиппова Е.И., Кукушкина Т.А., Лобанова И.Е., Пшеничкина Ю.А., Высочина Г.И. Противогриппозная активность экстрактов растений семейства Lamiaceae. Химия растительного сырья. 2021; 2: 181–190. doi: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021028744>. [Protsenko M.A., Mazurkova N.A., Filippova E.I., Kukushkina T.A., Lobanova I.E., Pshenichkina Yu.A., Vysochina G.I. Anti-influenza activity of plant extracts of the Lamiaceae family. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ya*. 2021; 2: 181–190. doi: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021028744>. (in Russian)]
10. Государственная фармакопея Российской Федерации: Вып. 4, 14-е изд. М.: Медицина, 2018; 3262. [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federatsii: Vyp. 4, 14-e izd. Moscow: Meditsina, 2018; 3262. (in Russian)]
11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254.
12. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Модификация антронового метода количественного определения углеводов и его применение для анализа растительного сырья, содержащего полисахариды. Бюллетень сибирской медицины. 2006; 2: 118–119. [Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. Modifikatsiya antronovogo metoda kolichestvennogo opredeleniya uglevodov i ego primenenie dlya analiza rastitel'nogo syr'ya, soderzhashchego polisakharidy. *Bjulleten' Sibirskoj Meditsiny*. 2006; 2: 118–119. (in Russian)]
13. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. [Zaks L. Statistical evaluation. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)]
14. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Р. У. Хабриев (ред.). М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005; 832. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. R. U. Khabriev (ed.). Moscow: OAO «Izdatel'stvo «Meditsina», 2005; 832.
15. Sokolov D.N., Luzina O.A., Salakhutdinov N.F. Usnic acid: preparation, structure, properties and chemical transformations. *Russian Chemical Reviews*. 2012; 81 (8): 747–768. doi: <https://doi.org/10.1070/RC2012v081n08ABEH004245>.
16. Tsunoda A., Maassab H.F., Cochran K.W., Eveland W.C. Antiviral activity of alpha-methyl-1-adamantanemethylamine hydrochloride. *Antimicrob Agents Chemother* (Bethesda). 1965; 5: 553–60. doi: 10.1128/AAC.5.6.553.
17. Jefferson T., Jones M.A., Doshi P., Del Mar C.B., Hama R., Thompson M.J. et al. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 4: CD008965.

Информация об авторах

Макаревич Елена Викторовна — научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5146-8979

Проценко Мария Анатольевна — к. б. н., старший научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1995-7588

Мазурков Олег Юрьевич — к. б. н., научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Госу-

About the authors

Elena V. Makarevich — researcher at the Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0002-5146-8979

Mariya A. Protsenko — Ph. D. in Biology, Senior researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0002-1995-7588

Oleg Yu. Mazurkov — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnol-

дарственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8164-4091
Филиппова Екатерина Игоревна — к. б. н., научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9554-4462
Мазуркова Наталья Алексеевна — д. б. н., ведущий научный сотрудник отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия. ORCID ID: 0000-0002-1896-2684

ogy VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0001-8164-4091
Ekaterina I. Filippova — Ph. D. in Biology, Researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0001-9554-4462
Natalia A. Mazurkova — D. Sc. in Biology, Leading researcher, Department of Prevention and Treatment of Especially Dangerous Infections, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. ORCID: 0000-0002-1896-2684.