

Противовирусная активность экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в отношении вируса гриппа

И. Н. ЛАВРЕНТЬЕВА, Л. П. СУХОБАЕВСКАЯ, В. В. ЗАРУБАЕВ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

The Antiviral Activity of the Sage-Leaved Rockrose Extract (*Cistus Salviifolius*) Against the Influenza Virus

I. N. LAVRENTIEVA, L. P. SUKHOBAEVSKAYA, V. V. ZARUBAYEV

Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg

Проведено исследование протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) и биологически активной добавки Форцис в культуре клеток MDCK и на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Изученный экстракт ингибировал репродукцию всех использованных вирусов гриппа. Наиболее чувствительными к нему оказались вирусы A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Для них значения IC_{50} составили 0,5; 0,5 и 0,4 мкг/мл, а индексы селективности — 382, 382 и 478, соответственно, что характерно для препаратов с высокой противовирусной активностью. Вирусы гриппа типа В были менее чувствительны к экстракту. Ингибирующая активность экстракта не зависела от чувствительности или устойчивости вирусов к используемым противогриппозным препаратам — осельтамивиру и ремантадину. При гриппозной пневмонии у животных снижение специфической смертности составило 40% по сравнению с группой плацебо. Применение биологически активной добавки Форцис не влияло на инфекционную активность вируса гриппа в ткани легких животных и приводило к умеренному ограничению степени поражения ткани лёгких. Максимальная эффективность биологически активной добавки «Форцис» достигалась при лечебно-профилактическом режиме её использования.

Ключевые слова: противовирусная активность, белые мыши, экстракт ладанника шалфеелистного, Форцис.

A study of the protective activity of the Sage-leaved Rockrose extract (*Cistus salviifolius*) and the biologically active additive Forcys in the MDCK cell culture and on the model of lethal influenza pneumonia in white mice was carried out. The studied extract inhibited the reproduction of all used influenza viruses. The most sensitive to it were the viruses A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), and A/Vladivostok/02/09 (H1N1). The IC_{50} values of the listed viruses were 0.5, 0.5, and 0.4 $\mu\text{g/ml}$, and the selectivity indexes were 382, 382, and 478, respectively, which is characteristic for preparations with high antiviral activity. Type B influenza viruses were less sensitive to the extract. The inhibitory activity of the extract did not depend on the susceptibility or resistance of the viruses to the anti-influenza drugs used, oseltamivir and rimantadine. The reduction in specific mortality with influenza pneumonia in animals was 40% compared with the placebo group. The use of the biologically active supplement Forcys did not affect the infectious activity of the influenza virus in the tissues of the animals lungs and led to a moderate limitation of the degree of damage to lung tissue. The maximum effectiveness of the biologically active supplement Forcys was achieved with the therapeutic and prophylactic regimens of its use.

Keywords: antiviral activity, white mice, Sage-leaved Rockrose extract, Forcys.

Введение

Грипп является наиболее распространённой и опасной респираторной вирусной инфекцией, способной вызывать ежегодные эпидемии и пандемии, приводящие к высокой заболеваемости и смертности населения [1]. Благодаря короткому жизненному циклу и высокой генетической изменчивости, он остаётся трудно контролируемой инфекцией, несмотря на успехи, достигнутые в области химиотерапии и вакцинопрофилактики.

Наиболее эффективным противогриппозным средством является специфическая вакцинация, однако вследствие антигенного дрейфа вируса необходим постоянный мониторинг и разработка новых вакцинных штаммов, соответствующих циркулирующим в человеческой популяции в каждый конкретный эпидемический сезон.

Наряду с вакцинацией для предотвращения и лечения заболевания применяется химиотерапия гриппа. С этой целью в настоящее время в клинике используются этиотропные препараты двух групп, отличающиеся по механизму действия и задействованным мишеням. Препараты первой группы — производные адамантана ремантадин и амантадин — блокируют активность вирусного

© Коллектив авторов, 2017

Адрес для корреспонденции: 197101 Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

ионного канала M2, препятствуя процессу диссоциации вирусных РНП из состава вириона в лизосомальной вакуоли [2]. Препараты второй группы ингибируют вирусную нейраминидазу — фермент, обеспечивающий почкование вирусных частиц и их дальнейшее распространение. К этой группе соединений относятся занамивир (действующее начало препарата Реленца®), осельтамивир (Тамифлю®), перамивир (Рапиваб®) и ланинамивир (Инавир®) [3], последние два в России не зарегистрированы. Кроме того, в Японии, Китае и Корее для лечения гриппа применяется препарат Т-705 (Фавипиравир), являющийся нуклеозидным аналогом [4–6], направленный на вирусную полимеразу и обладающий, помимо вируса гриппа, активностью против широкого круга других вирусов [7].

Все перечисленные соединения имеют свои недостатки. Сюда относятся сравнительно высокая токсичность и узкий спектр действия производных адамантана, высокая стоимость ингибиторов нейраминидазы, а главное — быстрое формирование вирусной устойчивости к препаратам обеих групп. Так, с середины 1990 годов было отмечено резкое возрастание доли ремантадин-устойчивых штаммов, и в настоящее время все изоляты вируса гриппа А, за редким исключением, являются нечувствительными к препаратам адамантанового ряда [8]. Аналогичная ситуация наблюдалась в случае Тамифлю в пределах вируса гриппа подтипа H1N1 в 2007 г., когда в период с ноября 2007 по март 2009 гг. уровень осельтамивир-устойчивости вирусов достиг 100% во всех регионах земного шара [9, 10].

Учитывая перечисленные особенности химиотерапии гриппа, поиск и внедрение новых эффективных средств профилактики и борьбы с этой инфекцией, действующих на принципиально иные мишени и имеющих альтернативный механизм активности, является исключительно важным направлением медицинской науки и здравоохранения в целом. Целью настоящего исследования была оценка протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) в отношении вируса гриппа.

Материал и методы

Вирусы и клетки. В работе использовали следующие вирусы:

- A/California/07/09 (H1N1)pdm09;
- A/Aichi/2/68 (H3N2);
- A/Puerto Rico/8/34 (H1N1);
- A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
- A/Vladivostok/02/09 (H1N1);
- B/Lee/40;
- B/Malaysia/2506/04;
- B/Florida/04/06.

Вирусы пассировали в аллантоисной полости 10–12-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч (вирусы гриппа А) или 72 ч (вирусы гриппа В) при 36°C. Титрование инфекционной активности вирусов проводили на клетках MDCK (ATCC

CCL-34), выращенных на 96-луночных панелях на среде MEM (Биолот, Санкт-Петербург).

Животные. Белых беспородных мышей (самки) массой 16–18 г (возраст 5–6 недель) получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных». National Academy press. — Washington, D.C. 1996, ГОСТ Р 53434-2009, а также с правилами, утверждёнными МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Исследуемые вещества. Для экспериментов *in vitro* использовали сухой экстракт ладанника шалфеелистного в виде сухого коричневого порошка. В качестве препарата сравнения использовали осельтамивира карбоксилат (LaRoche, Швейцария). Для опытов на животных использовали биологически активную добавку «Форцис» в виде таблеток по 500 мг, из которых экстракт ладанника составляет 90 мг. В качестве препарата сравнения использовали Тамифлю (осельтамивира фосфат, LaRoche, Швейцария) в виде капсул по 75 мг.

Изучение цитотоксичности образцов. Для определения цитотоксичности из экстракта ладанника и осельтамивира карбоксилата готовили серию трёхкратных разведений от 1000 до 4 мкг/мл и от 1 до 0,01 мкг/мл, соответственно, на среде MEM (Биолот, Санкт-Петербург). Клетки инкубировали в присутствии образцов в течение 48 ч при 36°C и 5% CO₂, после чего степень разрушения клеточного монослоя оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ) [11]. С этой целью клетки инкубировали 1 ч с раствором МТТ (Calbiochem №475989, 0,5 мкг/мл) в физиологическом растворе. Лунки промывали и заливали 0,1 мл DMSO, после чего оптическую плотность клеток измеряли на микропланшетном ридере Victor² 1420 (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны 535 нм. На основании полученных данных рассчитывали концентрацию препарата в лунке, при которой происходит гибель 50% клеток монослоя (CC₅₀).

Противовирусное действие экстракта *in vitro*. Исследуемые образцы в объеме 100 мкл вносили в лунки планшетов с монослоем клеток MDCK. Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 1 ч. После этого в лунки вносили по 0,1 мл серийных десятикратных разведений соответствующего вируса в среде MEM (10⁻² — 10⁻⁷) и инкубировали в течение 48 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. По завершении экспериментов вирусную продукцию оценивали по реакции гемагглютинации. Для этого культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций с круглым дном, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали при 20°C в течение 1 ч, после чего визуально проводили учёт результатов. Титр вируса в присутствии каждой из концентраций экстракта и препарата сравнения определяли по методу Рида и Менча [12]. Противовирусную активность образцов оценивали по снижению титра вируса в опытных лунках планшетов по сравнению с контрольными. На основании полученных данных для каждого вируса и каждого образца рассчитывали значения 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀), т.е. концентрации вещества, снижающей титр вируса вдвое по сравнению с контролем, индекс селективности (SI) — отношение CC₅₀ к IC₅₀.

Протективная активность экстракта ладанника в опытах на животных. В исследовании был использован штамм вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, адаптированный к мышам. Перед экспериментом таблетки биологически активной добавки Форцис растирали в фарфоровой ступке, смешивали с физиологическим раствором из расчёта 2,5 мл на таблетку и из полученной суспензии готовили необходимые разведения для введения животным. Исследуемые образцы вводили животным перорально раз в день при помощи желудочного зонда в объёме 0,2–0,4 мл по лечебной (через 1, 2, 3, 4 и 5 дней после инфицирования), профилактической (за 24 и

за 1 ч до заражения) или лечебно-профилактической (за 24 и за 1 ч до заражения и через 1, 2, 3, 4 и 5 дней после инфицирования) схеме.

Мышей заражали интраназально под лёгким эфирным наркозом вирусом в дозе 5×10^3 TCID₅₀ на мышь в объёме 50 мкл (25 животных в группе). На 3-й день после заражения по 10 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали лёгкие. Лёгкие 5 животных использовали для выделения вируса (замораживали и хранили при -20°C до постановки соответствующих экспериментов), лёгкие остальных 5 животных фиксировали забуференным формалином и использовали для гистологического анализа (см. ниже).

Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали гибель животных в контрольной и опытных группах. На основании полученных данных рассчитывали процент гибели животных в каждой группе, индекс защиты каждого из образцов и среднюю продолжительность жизни животных в каждой из групп эксперимента.

Лёгкие, изолированные на третий день после заражения у 5 животных из каждой группы (см. выше), гомогенизировали с помощью прибора TissueLyserII (Qiagen, США) и определяли в гомогенатах инфекционную активность вируса. Для этого из гомогената лёгочной ткани готовили серию 10-кратных разведений (10^{-1} – 10^{-8}) на среде MEM и вносили их в лунки планшета с клетками MDCK. Планшеты инкубировали в течение 48 ч при 36°C в атмосфере 5% CO₂ и определяли в гомогенатах титр вируса, как описано выше.

Гистологический анализ. Для морфологического исследования лёгкие мышей фиксировали 10% формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, проводили через хлороформ, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилин-эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезжировали в спиртах нарастающей концентрации, проводили через две смены ксилола и заключали в бальзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах пневмонии, а также степень дегенеративных и пролиферативных процессов в ткани легких.

Анализ данных. Расчёт средних значений и ошибки среднего проводили при помощи пакета программ Statistica 8.0. Полученные результаты представляли в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$) или среднего $\pm$ ошибка эксперимента ($M \pm SE$). Нормальность распределения величин проводили при помощи критерия Колмогорова–Смирнова в пакете программ Statistica 8.0. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента в случае нормально распределённых величин и критерия Манна–Уитни при распределении, отличном от нормального. Достоверность различий в титрах вируса в лёгких проводили при помощи критерия Манна–Уитни, в выживаемости животных — при помощи анализа кривых выживаемости Каплана–Мейера по методу Манта–Хансена.

кэта программ Statistica 8.0. Достоверными считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05.

Результаты исследования

На первом этапе исследования для оценки диапазона рабочих концентраций была определена цитотоксичность исследуемого экстракта и препарата сравнения.

На основании полученных данных были рассчитаны 50% токсические концентрации для каждого из тестируемых веществ. Для экстракта ладанника эта величина составила 191 мкг/мл, для препарата сравнения, осельтамивира карбоксилата — >1 мкг/мл.

Результаты изучения противовирусной активности экстракта ладанника в отношении разных типов и подтипов вирусов гриппа суммированы в табл. 1.

Как следует из представленных результатов, препарат сравнения осельтамивира карбоксилат эффективно ингибировал репродукцию всех изученных вирусов за исключением вируса A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Эти данные согласуются с ранее полученными результатами, свидетельствующими об осельтамивир-устойчивости этого штамма и осельтамивир-чувствительности всех остальных использованных вирусов. Изучаемый экстракт в той или иной степени ингибировал все использованные вирусы. Наиболее чувствительными к нему оказались вирусы A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Vladivostok/02/09 (H1N1). Для них значения IC₅₀ составили 0,5; 0,5 и 0,4 мкг/мл, а индексы селективности — 382, 382 и 478, соответственно, что характерно для препаратов с высокой противовирусной активностью. Вирусы гриппа типа В оказались менее чувствительны к действию экстракта. При этом эпидемически актуальные вирусы B/Malaysia/2506/04 и B/Florida/04/06 демонстрировали несколько более высокую чувствительность (SI=23 и 25, соответственно). Наименьшей чувствительностью к экстракту обладал вирус гриппа B/Lee/40 (IC₅₀=27,3 мкг/мл, SI=7).

На следующем этапе была изучена протективная активность экстракта ладанника в составе БАД Форцис на модели летальной гриппозной

Таблица 1. Показатели противовирусной активности химических соединений в культуре клеток MDCK

Вирус	Экстракт ладанника		Осельтамивира карбоксилат	
	IC ₅₀ , мкг/мл	SI	IC ₅₀ , мкг/мл	SI
A/California/07/09 (H1N1)pdm09	0,5	382	0,008	>125
A/Aichi/2/68 (H3N2)	0,6	318	0,013	>77
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	1,0	191	0,003	>333
A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2)	0,5	382	0,012	>83
A/Vladivostok/02/09 (H1N1)	0,4	478	$>0,3$	>3
B/Lee/40	27,3	7	0,091	>11
B/Malaysia/2506/04	8,4	23	0,026	>38
B/Florida/04/06	7,5	25	0,086	>12

пневмонии у белых мышей. Как было показано в ходе исследований, инфицирование вирусом гриппа приводило к развитию у животных патологического процесса. Внешние признаки заболевания проявлялись в ограничении подвижности животных, учащению и поверхностности дыхания, а также снижении потребления корма и воды, приводящему к потере массы тела и гибели животных. Перечисленные признаки являются типичными для гриппозной пневмонии.

Полученные данные были подтверждены при помощи анализа динамики гибели животных. Данные о динамике гибели животных в ходе гриппозной пневмонии представлены на рис. 1, а количественные показатели активности изучаемых соединений приведены в табл. 2.

Как следует из полученных результатов, инфицирование использованным вирусом приводило к гибели животных, начиная с 3 суток, достигая к концу эксперимента 67%. Использование препарата сравнения осельтамивира фосфата (Тамифлю) снижало этот показатель до 13,3% ($p=0,0028$), что соответствует индексу защиты (ИЗ) 80% и согласуется с имеющейся информацией о чувствительности использованного вируса к осельтамивиру.

Применение биологически активной добавки Форцис также снижало специфическую смертность животных: в дозе 25 мг/кг — до 53,3% (ИЗ=20%, $p=0,5194$), в дозе 50 мг/кг — до 40% (ИЗ=40%, $p=0,2534$), в дозе 100 мг/кг — также до 40% (ИЗ=40%, $p=0,1451$). Таким образом, не достигая достоверных различий, изучаемый обра-

зец, тем не менее, проявлял тенденцию к дозозависимому протективному эффекту при летальной гриппозной пневмонии. Кроме того, использование биологически активной добавки Форцис в максимальной из изученных доз (100 мг/кг) приводило к повышению продолжительности жизни животных примерно на сутки по сравнению с группой плацебо, что также можно трактовать как проявление той же тенденции.

Для комплексной характеристики противовирусных свойств биологически активной добавки Форцис было изучено её влияние на уровень репродукции вируса в ткани лёгких животных, инфицированных вирусом гриппа. С этой целью по 5 животных из каждой группы были эвтаназированы на 3-и сутки после заражения, и уровень вирусной активности в ткани их лёгких был оценен

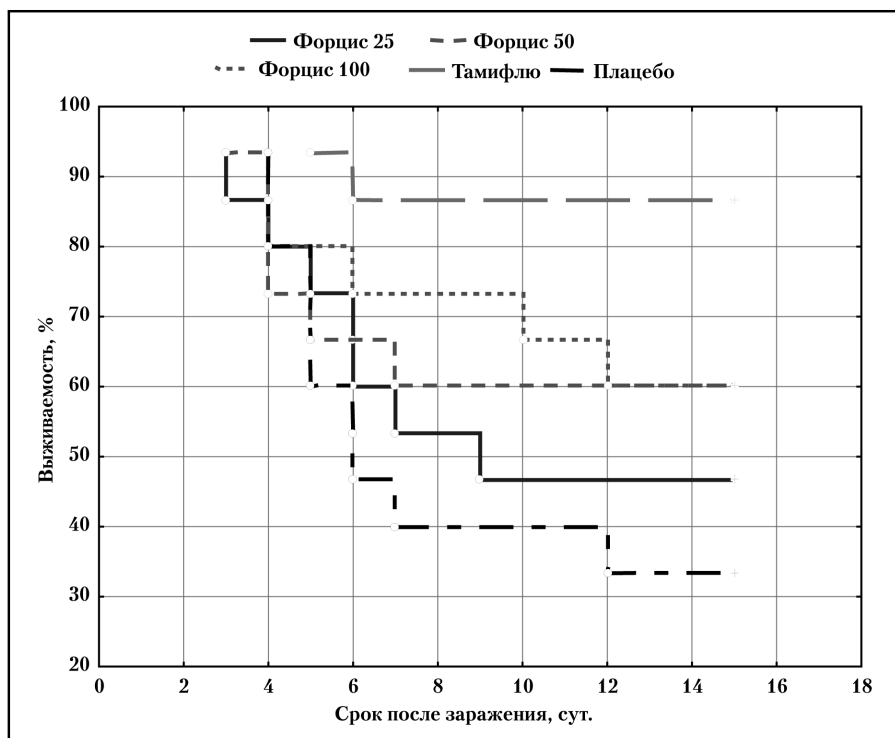


Рис. 1. Динамика гибели белых мышей в ходе экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения препарата Форцис (лечебно-профилактическая схема).

Таблица 2. Показатели протективной активности препарата Форцис (лечебно-профилактическая схема) в ходе экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09

Образец	Гибель животных (пало/заражено)	СПЖ, сут. (M±SE)	Смертность, %	Индекс защиты, %
Плацебо	10/15	5,8±0,8	66,7	0,0
Форцис 25 мг/кг	8/15	5,4±0,7	53,3	20,0
Форцис 50 мг/кг	6/15	4,5±0,6	40,0	40,0
Форцис 100 мг/кг	6/15	6,7±1,4	40,0	40,0
Тамифлю 20 мг/кг	2/15	5,5±0,5	13,3	80,0

Таблица 3. Репродукция вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 ($M \pm SD$) в ткани лёгких лабораторных животных на 3-и сутки после инфицирования в условиях применения биологически активной добавки Форцис.

Образец	Титр вируса ($\lg TCID_{50}/0,2 \text{ mL}$) ($M \pm SD$)	p
Форцис 25 мг/кг	$6,7 \pm 0,6$	0,6761
Форцис 50 мг/кг	$5,9 \pm 1,0$	0,1745
Форцис 100 мг/кг	$5,8 \pm 0,7$	0,0758
Тамифлю 20 мг/кг	$4,9 \pm 0,7$	0,0163
Плацебо	$6,8 \pm 0,8$	1,0000

Примечание. p – уровень достоверности при анализе при помощи критерия Манна–Уитни.

при помощи титрования на клетках. Данные по инфекционной активности вируса суммированы в табл. 3.

Как видно из представленных результатов, модельный вирус A/California/07/09 (H1N1)pdm09 эффективно размножался в ткани лёгких белых мышей, достигая через 72 ч после инфицирования титров $10^{6,8} TCID_{50}/0,2 \text{ мл}$. Применение препарата сравнения осельтамивира фосфата (Тамифлю) достоверно снижало этот показатель на 1,9 порядка, что согласуется с данными о чувствительности использованного вируса к осельтамивиру и свидетельствует о корректности использованной модели вирусной инфекции.

В лёгких мышей, получавших биологически активную добавку Форцис, активность вируса была заметно снижена лишь при использовании максимальной дозы образца. В этом случае снижение вирусной активности достигало 1 порядка, при этом достоверных отличий от группы плацебо не было обнаружено, хотя значения и были близки к ним ($p=0,0758$).

Для дополнительной характеристики влияния биологически активной добавки Форцис на патогенез гриппозной инфекции было проведено морфологическое исследование ткани лёгких животных в контрольных и опытных группах. В ходе исследований было показано, что лёгкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, клетки его выглядели интактными — в них не отмечалось признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических включений. В просветах бронхов не отмечалось экссудата и клеточного детрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели воздушными, альвеолярные стенки не были утолщены, из клеток инфильтрата в лёгочной паренхиме отмечались отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаруживалось (рис. 2).

У заражённых животных, не получавших лечения, морфологические изменения лёгочной ткани на 3-и сутки после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений

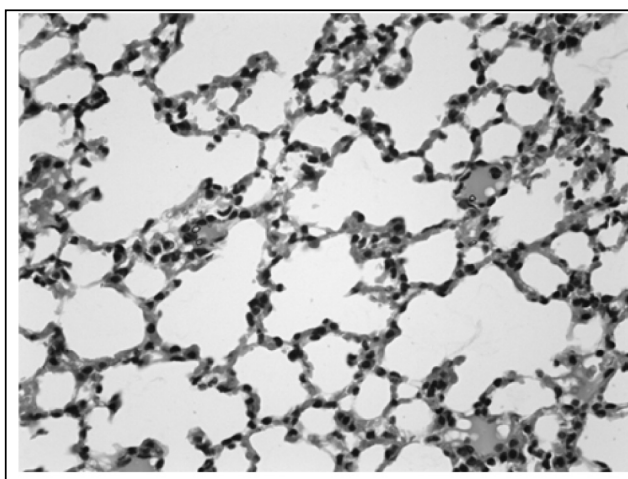


Рис. 2. Лёгкие интактной мыши.

Поражения эпителия и воспалительные инфильтраты отсутствуют, меальвеолярные перегородки тонкие. Гематоксилин-эозин, $\times 40$.

нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением пораженных клеток в просвет бронха. Базальная мембрана при этом обнажалась, что способствовало повышению её проницаемости и миграции в просвет бронхов и альвеол клеточных элементов. Эти процессы приводили к интенсивному серозному интерстициальному отёку, появлению очагов геморрагического отёка, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширением сосудов и спадением альвеол (рис. 3). Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии, и степень их выраженности, в частности степень дегенерации клеток бронхиального эпителия, может служить критерием для оценки тяжести процесса.

При использовании Тамифлю отличия морфологической структуры лёгких животных, прошедших лечение, от контрольной группы были сходными. Основное отличие от группы животных, не получавших лечения, заключалось в ограничении признаков вирусспецифического и реактивного поражения ткани лёгких на острой стадии грип-

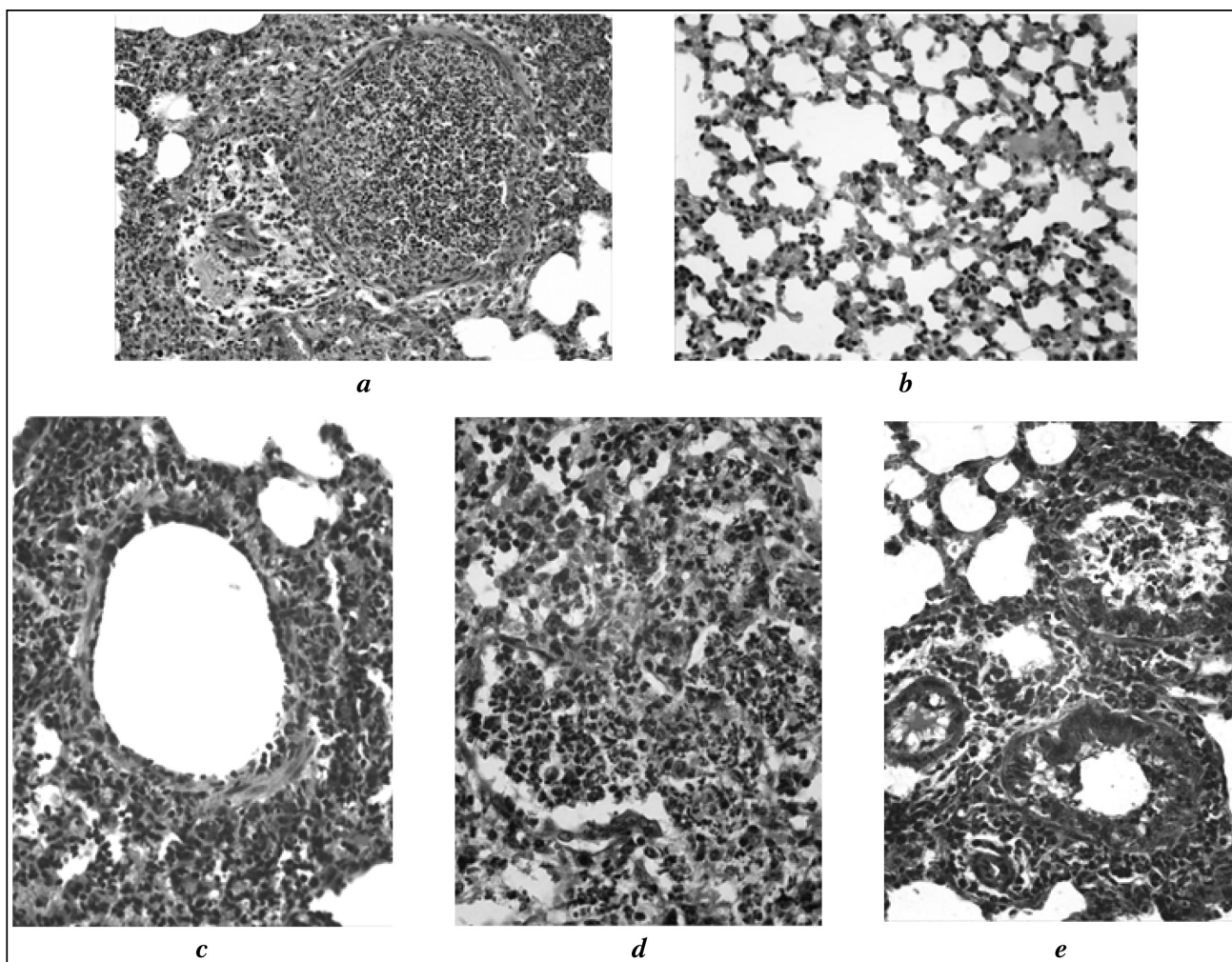


Рис. 3. Очаги гриппозной пневмонии в лёгком мышей на 3-и сутки после инфицирования вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 без лечения (а) и в условиях применения Тамифлю (b), и биологически активной добавки Форцис в дозе 25 (с), 50 (d) и 100 (е) мг/кг.

Гематоксилин-эозин, $\times 240$.

позной пневмонии. Клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными (см. рис. 3, б), в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных животных. Сами очаги воспаления занимали меньшую по сравнению с контролем площадь. Альвеолярные стенки выглядели несколько утолщенными, клеток воспалительного инфильтрата практически не наблюдалось.

Применение биологически активной добавки Форцис приводило к умеренному ограничению степени поражения ткани лёгких, что проявлялось в некотором снижении степени воспалительной инфильтрации и клеточного распада, а также в уменьшении количества клеточного детрита в просветах бронхов (рис. 3, с—е).

На следующей стадии экспериментов была изучена активность биологически активной добавки Форцис в зависимости от режима применения. На данном этапе исследований *in vivo* использовался комбинированный (лечебно-профилактический), профилактический (за 24 и за 1 ч до заражения) и лечебный (через 1, 2, 3 и 4 сут после заражения) режимы при дозе образца 100 мг/кг в пересчёте на экстракт ладанника. Данные по оценке эффективности изученного образца в зависимости от режима применения суммированы в табл. 4 и представлены на рис. 4.

Анализ представленных результатов показал, что максимальная эффективность биологически активной добавки Форцис достигалась при комбинированном, лечебно-профилактическом, режиме её использования (ИЗ=37,5%, $p=0,1768$). Профилактический режим практически не приводил к протективному действию (ИЗ=12,5%, $p=0,9781$), при лечебном режиме отмечалось незначительное снижение гибели животных (ИЗ=25%, $p=0,3485$). Данные по инфекционной активности вируса в соответствующих группах животных суммированы в табл. 5.

Как видно из представленных результатов, лишь применение препарата сравнения осельта-

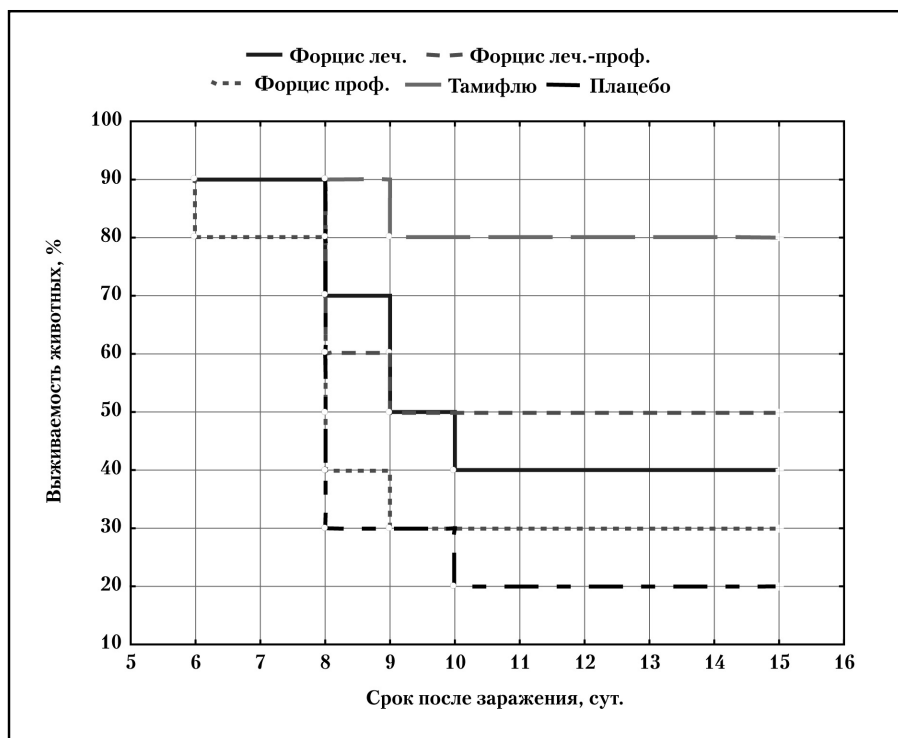


Рис. 4. Динамика гибели белых мышей в ходе экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения биологически активной добавки Форцис в зависимости от режима применения.

мивира фосфата (Тамифлю) достоверно снижало уровень репродукции вируса в ткани лёгких. Ни в одном случае использования биологически активной добавки Форцис достоверных отличий этого показателя от группы плацебо зафиксировано не было.

Таким образом, в результате проведённых исследований показан высокий уровень и широкий

спектр противогриппозной активности экстракта ладанника в клеточной культуре и его способность к снижению специфической смертности животных при гриппе примерно на 40%. Основным компонентом экстракта ладанника являются природные полифенольные соединения. На сегодняшний день известно более 8000 веществ этой группы [13]. Известно, что такие группы растительных полифенолов, как флавоны, катехины, флавононы, изофлавоны, антиоцианиды и другие классы флавоноидов (бифлавоны, халконы, ауруны, кумарины) [14], проявляют широкий спектр биологической активности. Сюда, в первую очередь, следует отнести антиоксидантное действие большинства соединений этого класса и их противовоспалительную актив-

Таблица 4. Показатели протективной активности препарата Форцис при экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, в зависимости от режима применения

Образец	Гибель животных (пало/заражено)	СПЖ, сут (M±SE)	Смертность, %	Индекс защиты, %
Плацебо	8/10	8,3±0,3	80,0	0,0
Форцис леч.	6/10	8,3±0,6	60,0	25,0
Форцис леч.-проф.	5/10	8,2±0,2	50,0	37,5
Форцис проф.	7/10	7,6±0,4	70,0	12,5
Тамифлю	2/10	8,5±0,5	20,0	75,0

Таблица 5. Репродукция вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (M±SD) в ткани лёгких лабораторных животных на 3-и сутки после инфицирования в условиях применения биологически активной добавки Форцис в зависимости от режима использования

Образец	Титр вируса (lgTCID ₅₀ /0,2 mL) (M±SD)	p
Форцис леч.	6,0±0,8	0,1779
Форцис леч.-проф.	6,0±1,1	0,2963
Форцис проф.	7,1±0,4	0,6015
Тамифлю	5,4±0,7	0,0367
Плацебо	6,7±0,9	1,0000

Примечание. p — уровень достоверности при анализе при помощи критерия Манна—Уитни.

многоколосника морщинистого *Agastache rugosa*, подавляет *in vitro* активность широкого спектра пикорнавирусов, включая риновирусы, коксакивирусы и полиовирусы [16]. 3-метилкверцетин (3-MQ), выделенный из экстракта молочая *Euphorbia grantii*, оказался противовирусным агентом, который подавлял репликацию полио-, коксаки- и риновирусов в концентрации ниже 10 мкг/мл. При дозе 20 мг/кг соединение защищало мышей от летальной инфекции вирусом Коксаки В4. Другие флавоноиды, экстрагированные из медицинских растений, включая 3-метилкемпферол и 3,4'-диметилкемпферол из *Psidia dentata*, подавляют синтез полиовирусной (+) РНК, а флавоноид из *Pterocaulon sphacelatum* обеспечивает защиту от ЦПД, вызванного полиовирусом [17, 18].

Ранее группой исследователей [19] было показано, что экстракт родственного растения, ладанника критского (*Cistus incanus*), ингибирует размножение вируса гриппа подтипа H5N1, блокируя процесс проникновения вириона в клетку. Было продемонстрировано, что такое действие достигается благодаря связыванию компонентов экстракта с гемагглютинином вируса. Этими же учёными [20] была показана протективная активность экстракта *Cistus incanus* на модели гриппозной инфекции у животных, причем наивысшие показатели защиты (порядка 50% снижения смертности) были достигнуты при аэрозольном применении экстракта. При пероральном способе применения показатели гибели животных не отличались от группы плацебо. Полученные данные позволили предполагать, что инаktivация вируса экстрактом ладанника происходит посредством связывания

полифенольных соединений с поверхностными гликопротеидами вируса, что препятствует нормальному взаимодействию их с клеточными рецепторами. Результаты исследования послужили основой для клинического исследования экстракта, в котором была показана его патогенетическая активность у пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей [21].

В нашем исследовании на животных был использован именно пероральный способ применения экстракта, при котором показатели защиты составили 40%. При этом инфекционная активность вируса в ткани лёгких не снижалась по сравнению с группой плацебо. Можно предполагать, что в этом случае основной протективный эффект обусловлен не прямой противовирусной активностью полифенольных соединений, а их противовоспалительным или антиоксидантным действием, т.е. их активностью как средств патогенетической терапии. Известно, что для многих растительных полифенолов, в частности, флавоноидов, характерен низкий уровень биодоступности [22], что может препятствовать полному проявлению *in vivo* вирусингибирующих свойств, обнаруженных в опытах на клетках. Дальнейшие исследования в этом направлении могут дать более полное представление о механизмах противовирусной активности подобных композиций и способах их оптимального применения в профилактике и терапии гриппа. В частности, перспективным может оказаться оценка терапевтической и профилактической эффективности этой добавки в комбинации с другими этиотропными и патогенетическими препаратами, применяемыми при терапии гриппозной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- Ahmed R., Oldstone M.B., Palese P. Protective immunity and susceptibility to infectious diseases: lessons from the 1918 influenza pandemic. *Nat Immunol* 2007; 8: 1188–1193.
- Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res* 1998; 37: 83–95.
- Fiore A.E., Fry A., Shay D. et al. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza. *Recomm Rep* 2011; 60: 1–26.
- Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y. et al. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 882–887.
- Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M. et al. *In vitro* antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2517–2524.
- Smee D.F., Hurst B.L., Wong M.H. et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 126–133.
- Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K. et al. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res* 2009; 82: 95–102.
- Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza drug resistance. *Semin Respir Crit Care Med* 2011; 32: 409–422.
- Hauge S.H., Dudman S., Borgen K. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 155–162.
- Thorlund K., Awad T., Boivin G., Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 134.
- 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.
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493–497.
- Papaefthimiou D., Papanikolaou A., Falara V. et al. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem* 2014; 2: 35.
- Conti C., Mastromarino P., Goldoni P. et al. Synthesis and anti-rhinovirus properties of fluoro-substituted flavonoids. *Antivir Chem Chemother* 2005; 16: 267–276.
- Iranshahi M., Rezaee R., Parhiz H. et al. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci* 2015; 137: 125–132.
- Tait S., Salvati A.L., Desideri N., Fiore L. Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses. *Antiviral Res* 2006; 72: 252–255.
- Desideri N., Conti C., Sestili I. et al. *In vitro* evaluation of the anti-picornavirus activities of new synthetic flavonoids. *Antivir Chem Chemother* 1995; 6: 298–306.
- Desideri N., Olivieri S., Stein M.L. et al. Synthesis and anti-picornavirus activity of homo-isoflavonoids. *Antivir Chem Chemother* 1997; 8: 545–555.
- Ehrhardt C., Hrincius E.R., Korte V. et al. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 338–347.
- Droebner K., Ehrhardt C., Poetter A. et al. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 1–10.

21. *Kalus U., Grigorov A., Kadecki O. et al.* Cistus incanus (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res* 2009; 84: 3: 267—271.

22. *Manach C., Scalbert A., Morand C. et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727—747.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лаврентьева Ирина Николаевна — д.м.н., заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Сухобаевская Лариса Петровна — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Зарубаев Владимир Викторович — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург