

## ПРОТИВОВИРУСНИ И ДРУГИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ СВОЙСТВА НА ЛЕКАРСТВЕНИЯ ПРОДУКТ ИНФЛУЦИД: КРИТИЧЕН ПРЕГЛЕД НА ТЕКУЩИТЕ ДАННИ

*автори: Е.И. Бурцева<sup>1</sup>, А.А. Манукин<sup>1</sup>, Е.А. Гушчина<sup>1</sup>, Н.В. Бреслав<sup>1</sup>, Е.А. Мукашева<sup>1</sup>, О.В. Пянков<sup>2</sup>, С.А. Боднев<sup>2</sup>, М.Ю. Еропкин<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Национален изследователски център по епидемиология и микробиология на името на почетния академик Н.Ф. Гамалея, Институт по вирусология Д.И. Ивановски, Москва, <sup>2</sup>Държавен изследователски център по вирусология и биотехнологии «Вектор» на РосПотребНадзор, Колцово, Новосибирска област, <sup>3</sup>Сморозинцев изследователски институт за инфлуенца, Санкт Петербург, Русия

Като се има предвид широкото разпространение на известни и нови патогени на остри респираторни вирусни инфекции (ОРВИ), е важно да се търсят лекарства, които имат широк спектър на антивирусна активност и допълнително способност да действат патогенетично. Също толкова важно е потвърждаването на терапевтичната активност при лекарства, известни със своята ефективност и безопасност. За да се проследи чувствителността на патогените на ОРВИ към антивирусното лекарство Инфлуцид, беше извършена поредица от *in vitro* проучвания. Материали и методи: Проведени са класически вирусологично контролирани проучвания с използване на настоящи щамове на човешки грипен вирус (А/Москва/225/2019 (H1N1) pdm09 и В/Москва/17/2019) и МДСК клетъчна култура. Антивирусните, цитопротективни (антивирусни, противовирусни и антипиретични лекарства) свойства на Inflicid бяха оценени чрез промяна на логаритъма на тъканната цитопатична инфектираща доза, която причинява увреждане на 50% от клетките (IgTCID<sub>50</sub>), както и чрез промяна на оптичната плътност при използване на тетразолиеви багрила. Резултати и обсъждане: Инфлуцид дозозависимо потисна възпроизводството на епидемични щамове А/Москва/225/2019 (H1N1) pdm09 и В/Москва/17/2019 с 50% при концентрации от 0,34 и 0,69–0,86% об., съответно. Също така Инфлуцид намали възпроизводството на щамове на човешки грипен вирус: А/Нова Каледония/20/99 (H1N1), А/Виктория/35/72, Уисконсин / 67/05 (H3N2) и В/Малайзия/ 2506/04, доведе до намаляване на титрите с 0,5–2,5 IgTCID<sub>50</sub> и вирус на денга DENV-2 / RUS / ТН-Новосибирск02/2012. Инфлуцид упражнява цитопротективен ефект върху клетки, заразени с А/IV-Москва/01/2009 (H1N1) pdm09, увеличавайки дела на оцелелите клетки с 4–52,0%. За клетките, заразени с пандемичен щам А/Калифорния/ 07/09 (H1N1) pdm09, се наблюдава значително намаляване на цитопатичния ефект на вируса до пълна защита с помощта на «превантивната» схема на приложение на лекарството. В допълнение, Инфлуцид защитава клетките от действието на херпесни вируси тип I и II, тип III аденовирус, парагрип вирус, сезонен коронавирус и респираторен синцитиален вирус, токсични дози умифеновир и ремантадин и не повишава цитотоксичността на ацетаминофен и ибупрофен.

**Заклучение:** в комбинация от потвърдена антивирусна активност срещу настоящите щамове на епидемични вируси, цитопротективно действие, способност да упражнява патогенетичен (имуномодулиращ и противовъзпалителен) ефект, както и благоприятен профил на безопасност, Инфлуцид може да бъде подходящо и обещаващо лекарство в арсенала на лекарите.

**Ключови думи:** Инфлуцид, специфична антивирусна активност, респираторни вируси, цитопротекция, вирулицидна активност, човешки грипни вируси.

**Цитация:** E.I. Burtseva, A.A. Manykin, E.A. Gushchina, N.V. Breslav, E.A. Mukasheva, O.V. Pyankov, S.A. Bodnev, M.Yu. Erokin. Antiviral and other pharmacological properties of the drug Инфлуцид: a critical review of current data. Педиатрия n.a. G.N. Speransky. 2020; 99 (4): 177-186.

**Информация за контакта:**

**д-р Елена Ивановна Бурцева** - Началник на Лабораторията по етиология и епидемиология на грипа, заместник-ръководител на Центъра по екология и епидемиология на грипа, Институт по вирусология Д.И. Ивановски, Национален изследователски център по епидемиология и микробиология, на името на почетния академик Н.Ф. Гамалея  
**Адрес:** Русия, 123098, Москва, ул. Гамалея, 18  
**Тел.:** (916) 157-48-14,  
**E-mail:** elena-burtseva@yandex.ru  
Получен на 26 юни 2020,  
Предадена за публикация 14 юли 2020.

Според данни на Министерството на здравеопазването на Руската федерация към 2018 г. в страната са регистрирани почти 3,5 млн. случая на ОРВИ и грип, представляващи повече от 92% от всички случаи на инфекциозни заболявания и 27% от общия процент на заболяемост (заболявания от всички класове, диагностицирани за първи път). Броят на пациентите с ОРВИ и грип през 2018 г. е равен на 20% от общото население на Русия. Данните за педиатричната популация са още впечатляващи: почти 20,5 млн. случая на ОРВИ и грип представляват 45% от всички случаи на заболявания с новоустановена диагноза и 79% от броя на всички деца (отгук нататък се имат предвид деца на възраст до 14 години) [1]. Според груби оценки на РосПотребНадзор икономическата тежест на грипа и ОРВИ през 2018 г. надвишава 520 млрд. рубли [2]. През 2019 г. честотата намалява с 3%, броят на ОРВИ и

случаите на грип сред общата популация на Русия достига приблизително 29,9 милиона случая, а в педиатричната популация - приблизително 19,8 милиона случая [3].

Като се вземе предвид пандемията, свързана с вируса SARS-CoV-2, не без интерес са данните за броя на случаите на ОРВИ в Русия и Москва за първите 4 месеца на 2020 г. в сравнение с 2019 г. През посочения период броят на регистрираните случаи на ОРВИ и грип съставляват 13,5 милиона сред цялото население и 8,3 милиона сред децата, което е дори по-малко от предходната година съответно с 3 и 7%. За най-големия и най-сложен от гледна точка на епидемичната обстановка град на Русия нивата на заболяемост са определени като 1,2 милиона за цялото население („-2%“ спрямо предходната година) и 699 хиляди случая сред деца до 14-годишна възраст („-8%“ в сравнение с 2019 г.).

Пиковите нива на месечната честота са регистрирани през февруари 2020 г. за всички обсъждани групи от населението в Москва и в цялата страна. След приемането на строги противоепидемични мерки както в Русия, така и в Москва, беше регистриран значителен спад в броя на съобщените случаи на ОРВИ. В Москва ограниченията бяха приети по-рано, при което още през март 2020 г. беше възможно да се постигне намаляване на честотата на заболяемост сред общото население и децата съответно с 31 и 40% в сравнение с пиковите нива. През април 2020 г. на фона на спазването на санитарния и противоепидемичен режим се забелязва по-нататъшното намаляване на броя на случаите на ОРВИ с 59% от общия брой и с 82% при децата в сравнение с пиковите нива, което надвишава честотата през април 2019 г. с коефициент 1,6 и 2,2. Като цяло в Русия се забелязва ефектът, при който значително намаляване е постигнато само през април 2020 г. (с 55% от общия брой и със 71% сред децата в сравнение с февруарските нива, което надвишава естественото намаляване на тежестта на

заболяванията през април 2019 г. с коефициент 1,2 и 1,7 (изчислено от авторите въз основа на [3] данните).

В съответствие с данните, дадени по-горе, дори много строгите и прецизно контролирани противоепидемични мерки не могат да предотвратят разпространението на ОРВИ, така че въпросът за лечението им продължава да бъде актуален. Ситуацията с COVID-19 показва, че дори на съвременното ниво на науката и при координирани усилия на държавата и водещи изследователски групи, разработването на ново лекарство изисква много време и източници. С това необходимостта от адекватно лечение, не само етиотропно, но и патогенетично, нараства експоненциално. Поради тази причина всички заинтересовани страни обръщат внимание на вече регистрирани лекарства, потвърдили специфична антивирусна активност и известен спектър от фармакологични ефекти. Много важен положителен момент в този случай е, че по отношение на такива лекарства има голям опит в употребата им, коректна оценка на данните за лекарствените взаимодействия и

други аспекти на фармакологичната безопасност в общата популация и в специфични категории, включително при деца. Едно от тези лекарства е Инфлуцид.

Лекарството Инфлуцид е разработено и произведено в Германия от фармацевтичната компания Deutsche Homöopathie-Union DHU-Arzneimittel GmbH & Co. KG. През 1978 г. лекарството преминава международна регистрация и в момента е регистрирано и широко използвано в 25 страни от Европа, Азия, Близкия изток и Южна Америка (по данни на производителя). В Русия лекарството е регистрирано през 1996 г. с индикации за употреба като профилактика и лечение на грип и други ОРВИ (цитирано след инструкцията за медицинска употреба [4]).

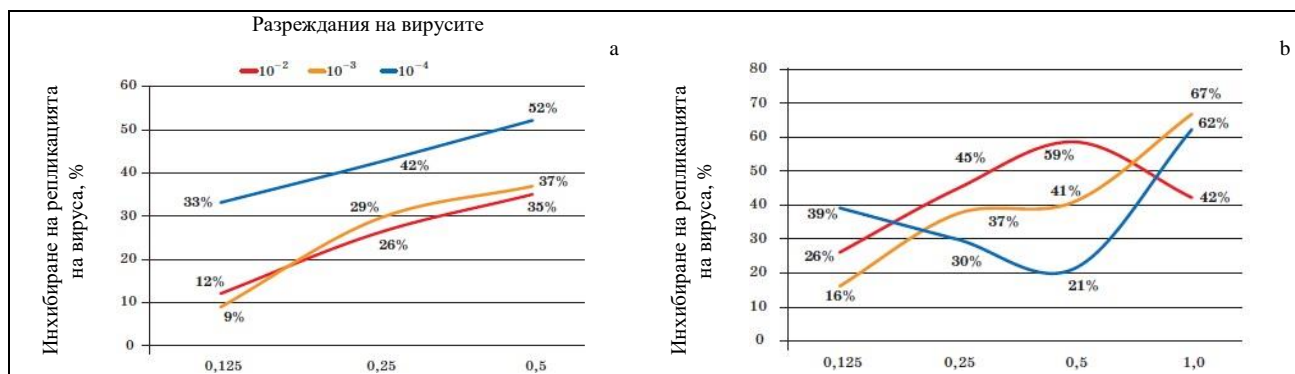
Като активни фармацевтични съставки Инфлуцид съдържа комплекс от фармакологично активни вещества от билков и минерален произход\* в границите, близки до долната граница на фармакологичните концентрации (10<sup>-1</sup>-10<sup>-5</sup> масови фракции). От литературните данни е известно, че лекарството има силен противовъзпалителен ефект и допринася за доказаното намаляване на проявата на синдром на интоксикация (повишаване на телесната температура, адинамия, нарушения на апетита и съня, дразнене, изпотяване, главоболие и мускулни болки) и катарален синдром (възпалено гърло, кашлица, ринит, пресириналоост), приписвани на ОРВИ с различна етиология [5-9]. Известно е, че на фона на широкото използване на антивирусни, както и антибактериални лекарства, може да се образува резистентност към тях [10]. Този факт подкрепя голямото значение на редовното наблюдение на чувствителността на ОРВИ патогените към водещи антивирусни препарати.

## Материали и методи на проучването

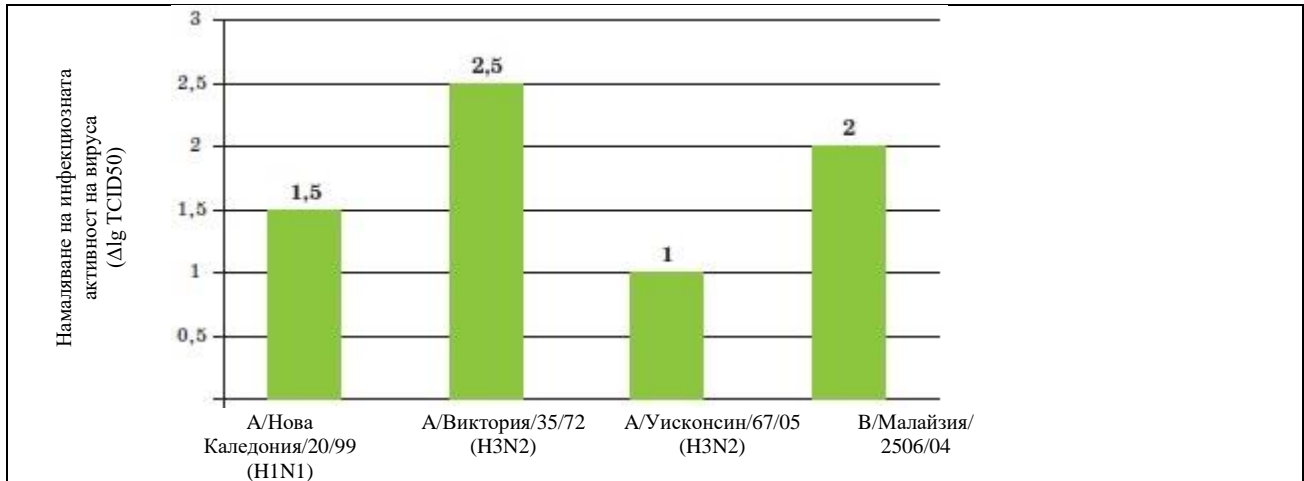
Оценката на чувствителността на грипните вируси към лекарството Инфлуцид беше проведена от Федералната държавна бюджетна институция „Национален изследователски център по епидемиология и микробиология Н. Гамалея“ към Министерството на здравеопазването на Руската федерация в периода от декември 2019 г. до януари 2020 г. В хода на тази процедура служители на Лабораторията по етиология и епидемиология на грипа извършиха неклиничното контролирано проспективно проучване „Изследване на антивирусните свойства на лекарството Инфлуцид срещу циркулиращи щамове на човешки грипни вируси А и В, както и неговите цитопротективни свойства in vitro“. Всички тестове, проведени в рамките на изследването, са проведени с използване на контролни групи (отрицателни и положителни). С оглед на факта, че in vitro проучванията използват ограничен брой наблюдения, не е извършено предварително изчисляване на размера на извадката.

Статистическата обработка и анализ на получените данни бяха извършени с помощта на Статистически пакет Statistica 10.0. Поради малкия обем на извадката по време на анализа на находките бяха използвани непараметрични тестове. За оценка на разликите между непрекъснатите променливи, получени в две различни (независими) групи, беше използван U-теста на Ман-Уитни; докато за честотния анализ на 2x2 таблици за непредвидени обстоятелства - тестът  $\chi^2$  (ако очакваните стойности са по-големи от 5) или теста на Фишер (ако една от очакваните стойности е по-малка от 5). Разликите при  $p < 0,05$  се считат за статистически значими.

\* Aconitum napellus, Gelsemium sempervirens, Cephaelis ipecacuanha, Phosphorus, Bryonia, Eupatorium perfoliatum.



Концентрация на Инфлуцид, % Концентрация на Инфлуцид, %  
**Фиг. 1. Ефект на Инфлуцид върху репликацията на вируси при приложение в терапевтичен режим за: а - човешки грипен вирус А/Москва/225/2019 (H1N1) pdm09 и човешки грипен вирус В/Москва /17/2019.**



**Фиг. 2. Потискане на репродукцията на щамове на човешки грип А и В и в клетъчна култура на MDCK по данни на М.Ю. Еропки и кол. [12].**

### Резултати

Използвайки контролиране чрез инвертен микроскоп и колориметричен метод, преди това беше потвърдено, че Инфлуцид в широкия диапазон от концентрации (0,125-1,0%) няма цитотоксичност при продължителна експозиция (48 часа). Този факт напълно съответства на проучванията, проведени от Федералната държавна бюджетна институция „А.А. Смородинцев - Изследователски институт за инфлуенца“ на Министерството на здравеопазването на Руската федерация през 2006-2010 г., в рамките на който беше потвърдена безопасността на Инфлуцид при още по-продължителна експозиция (до 72 часа) [11-13].

Оценка на специфичната антивирусна активност на Инфлуцид срещу щамове на човешки грипни вируси А и В (А/Москва/225/2019 (H1N1) pdm09 и В/Москва/17/2019), проведена през 2020 г. с помощта на ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA). За проучванията са използвани MDCK култури от клетки. Изследвана е способността на Инфлуцид да блокира репликацията на вируси при концентрации от 0,125%; 0,25%; 0,5%; 1,0% по време на терапевтичното му приложение. За тази цел едновременно Инфлуцид и вирусите (при работни дози от 2-5 Ig от тъканната цитопатична инфектираща доза, което причинява увреждане на 50% от клетките - TCID50\*) се добавят към специално подготвените клетки. Антивирусният ефект на Инфлуцид е оценен 24-48 часа по-късно чрез оптична плътност (OD) при 450 nm с помощта на Biotek, Synergy HT спектрофотометър.

Инфлуцид потисна репликацията на изследваните вируси. Въз основа на набора от експериментални данни е направена графика на зависимост от скоростта на репликация на вируса спрямо дозата на лекарството (Фиг.1), която позволява да се изчислят средните стойности на минималната концентрация на лекарството, инхибираща вирусната активност с 50% (MIC50). Антивирусната активност на Инфлуцид зависи от дозата. Потискане на възпроизводството на пандемичния щам на А/Москва/225/2019 (H1N1) pdm09 вирус и епидемичния щам на В/Москва/17/2019 вирус с 50% при концентрации 0,34 и 0,69–0,86 % об. , се наблюдава съответно.

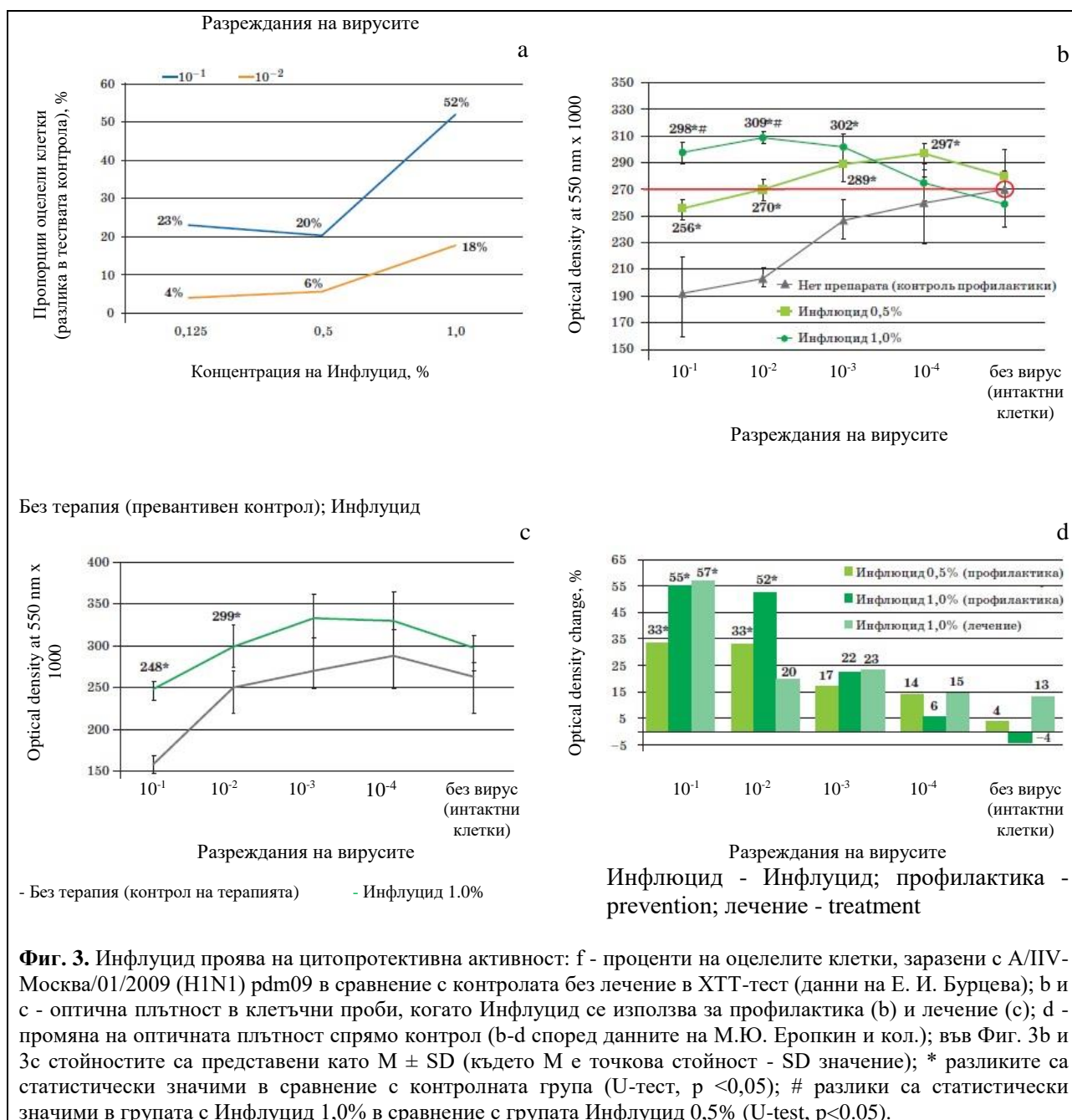
Представените резултати съответстват на данните, получени от проучванията, проведени от Федералната държавна бюджетна институция „А.А. Смородинцев - Изследователски институт аз грипа“ на Министерството на здравеопазването на Руската федерация през 2006-2010 г. Според М.Ю. Еропки и кол., при оценката на антивирусната активност на лекарството, използвайки анализ на хемагутинация (HA) \*\* Инфлуцид инхибира репродукцията на щамове на човешки грипен вирус: А (H1N1) - А/Нова Каледония/20/99 (H1N1), А/Виктория/ 35/72 и Уисконсин/67/05 (H3N2), както и грипен вирус В - Малайзия/2506/04, намалявайки титрите с 0,5–2,5 Ig (Фиг. 2) [12,13].

През 2015-2016 г. в рамките на изследвания и разработки, насочени към търсене на кандидат-етиотропни формули за лечение на пациенти с треска от денга в отдел „Събиране на микроорганизми“ на Държавния изследователски център по вирусология и биотехнология „Вектор“ на РосПотребНадзор с ръководител О.

Пянков, е извършено изследване на получен от „Държавната колекция на инхибиторната активност на лекарството микроорганизмите“ на Държавния Инфлуцид in vitro. В хода на работата беше изследователски център по вирусология и използван щамът на вируса на денга DENV- биотехнологии «Вектор» на РосПотребНадзор. 2/RUS/ TH-Novosibirsk02/2012 (подтип 2),

\* Количество на вируса, която при замърсяване може да предизвика цитопатичен ефект в 50% от изследваните препарати от клетъчна култура / тъкан.

\*\* Поради един от повърхностните протеини (хемаглютинин) грипният вирус може да предизвика аглутинация на еритроцитите (хемаглютинация) и стойността му зависи от концентрацията на вируса.



За да се определи ефектът на Инфлуцид върху инфекциозната способност на вируса, лекарството във вариращи концентрации (0,12-3,75%) се добавя към веро клетките един час след заразяването с вируса на денга. В рамките на 10 дни Инфлуцид е повлиял на жизнения цикъл на вирусите в заразените клетки, след което течността, съдържаща вируса, се използва за вирусологичен анализ.

След въздействието на Инфлуцид беше оценена способността на вируса на денга да причинява цитопатични ефекти (CPE)\* в новоинфектирани култури на веро клетки и титърът беше представен като (TCID<sub>50</sub>/ml) [14].

Според получените данни Инфлуцид намалява CPE, започвайки от концентрацията от

4.69 mg / ml (0.5%) и намалява с 1.61 lg CPE при 18.75 mg / ml (1.9%). Определя се минималната 50% инхибираща концентрация (MIC<sub>50</sub>) на Инфлуцид, която е равна на 2,1 mg / ml (0,21%). Стойностите на IC<sub>90</sub> (инхибиторна концентрация, намаляваща CPE с 1 логаритъм, т.е. с коефициент 10) и IC<sub>99</sub> (намаляване на CPE с 2 логаритма, т.е. със фактор 100) също бяха определени и бяха равни съответно на 9,3 mg / ml (0,93%) и 30,9 mg / ml (3,1%) [12].

Допълнителният метод за потвърждаване на антивирусната активност на Инфлуцид е оценката на способността на лекарството да намалява проявата на цитопатичното действие на грипните вируси. Принципът на метода се състои в използването на специалните тетразолиеви

багрила (МТТ и ХТТ), които могат да се метаболизират от напълно функциониращите живи клетки в процеса на техния жизненоважен живот. В резултат на редуционната реакция клетките се оцветяват. В случай на увреждане от вируси (цитопатогенен ефект, CPGE) или поради токсичен ефект на други вещества като фармацевтични продукти, интензивността на оцветяването намалява, което може да бъде оценено чрез калориметричния метод. Този текст позволява да се оцени както CPGE на вирусите върху клетката, така и способността на лекарствата да предпазват клетките от патогенен ефект на вируси или токсични агенти (цитопротективен потенциал) [15, 16].

Цитопротективните свойства на Инфлуцид срещу MDCK култури на клетки са изследвани в

два независими теста - тест за токсичност с различни багрила: МТТ и ХТТ (Sigma). Един час след инфекция с грипен вирус А/ПВМосква/01/2009 (H1N1) pdm09 (в работна доза от 1-7 lgTCID<sub>50</sub>) изследваното лекарство се добавя към клетките в концентрации от 0,125%; 0,5%; 1,0%, плацебо еквивалент (IglA MEM среда без Инфлуцид) беше добавен към контролните петри. 48 часа след инкубацията беше извършена настройка на колориметричен тест за токсичност съгласно стандартните практики.

При сравнението на контролните и тестовите петри със заразените клетки беше отбелязано, че при «превантивната» схема на приложение на Инфлуцид се наблюдава дозозависимо увеличение на дела на оцелелите клетки (Фиг. 3а).

\* Цитопатичният ефект се проявява като морфологични промени в клетъчната култура, възникващи в процеса на вирусна репликация в клетките (сливане на клетки, клетъчна дегенерация, фокално унищожаване на клетъчната култура, некроза и др.).

**Антивирусен и цитопротективен ефект на "превантивната" схема на приложение на Инфлуцид при концентрации в диапазони in vitro чрез МТТ тест**

| Концентрация на Инфлуцид в културирана среда, % | Разлика lgTCID50 ( $\Delta$ lgTCID50) при култивиране на вирусни патогени на фона на Инфлуцид спрямо контролата |                                      |                                    |                                                         |                                                           |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                                                 | Херпес вирус тип I HSV1/SPb/248/88                                                                              | Херпес вирус тип II HSV2/etalon/2000 | Аденовирус тип III Ad3/etalon/4120 | Пандемичен грипен вирус А/ Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 | Пандемичен грипен вирус А/С - Петербург/05/09 (H1N1)pdm09 |
| 0.5                                             | 0.5*                                                                                                            | 2.55                                 | 0.6*                               | 1.15                                                    | 0.9                                                       |
| 0.25                                            | 2.7                                                                                                             | 3.45                                 | 2.15                               | 1.0                                                     | 0.53                                                      |
| 0.125                                           | 2.8                                                                                                             | 3.58                                 | 3.16                               | Няма данни                                              | Няма данни                                                |

\* Предварителна инкубация с лекарството 1 час, в други случаи - 24 часа.



**Фиг. 4. Антивирусен и цитопротективен ефект на «превантивната» схема на приложение на Инфлуцид при концентрация от 0,125% срещу ДНК- и РНК-съдържащи вируси.**

В тест с МТТ багрило умереният цитопротективен ефект на Инфлуцид се проявява при инфекция с вируса в количество 2,0-3,0 lgTCID50 (4-19%). В теста с ХТТ цитопро-тективният ефект се проявява в случай на клетъчна инфекция с вируса при количества от 1,0-2,0 lgTCID50 (увеличение на дела на оцелелите клетки съответно с 23-52% и 4-18%). Констатациите, получени от това проучване, потвърждават, че Инфлуцид има силна способност да защитава клетки, заразени с различни вируси и са съвместими с констатациите от проучванията, проведени от Федералната държавна бюджетна институция „А.А. Смородинцев - Изследователски институт за инфлуенца“ на Министерството на здравеопазването на Руската федерация с ръководител М.Ю. Еропки. При оценката на оптичната плътност в МТТ теста беше установено силното цитопротективно действие на Инфлуцид срещу клетките, заразени с пандемичен шам А/Калифорния/07/09 (H1N1)

pdm09. Значително намаляване на CPGE на вируса е отбелязано не само при „превантивно“ приложение (инкубация на клетки с Инфлуцид в рамките на един час преди заразяването им с вируса), но и при „терапевтичен“ вариант: Инфлуцид, добавящ час след заразяване на клетките с вируса ( Фиг. 3b, c). При „превантивната“ схема цитопротективният ефект на лекарството се характеризира със силната дозозависимост - Инфлуцид при концентрация 1,0% определено има по-силен ефект, отколкото при концентрация 0,5% (Фиг. 3b). В проби, третиран с Инфлуцид 1,0%, е установена оптична плътност на нивото на напълно живи и здрави клетки (Фиг. 3b) [12, 13].

Нещо повече, Инфлуцид намали значително CPGE на херпесни вируси тип I и II, аденовирус тип II, парагрипен вирус, сезонен коронавирус и респираторен синцитиален вирус\* при оценка на цитопатичната реакция чрез МТТ теста и с „превантивната“ схема на приложение на лекарството (Таблица 1, Фиг. 4)\*\* [13].

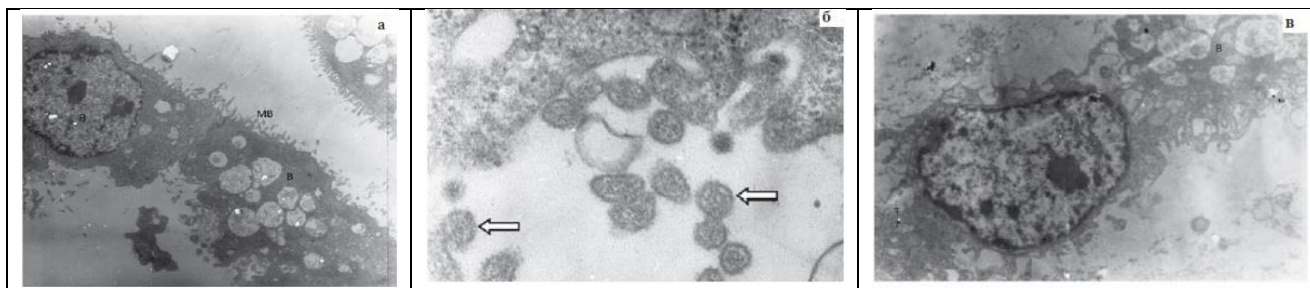


В хода на научните изследвания беше изследван ефектът на Инфлуцид при концентрации от 0,125 и 0,5% върху морфологичните промени в клетките на културата на MDCK, заразени с пандемичния щам на човешкия грип A/IV-Москва/01/2009 (H1N1) pdm09 по метода на трансмисионната електронна микроскопия (ТЕМ). По време на изследването на ултратънкия участък от клетки са установени вирусни частици, както в плазмената мембрана, така и в междуклетъчното пространство (Фиг. 5а, б). Клетките MDCK са заразени с грипен вирус и са

третиран с разтвор на Инфлуцид от 0,125 об.%, Най-често те запазват своята ултраструктура, като в същото време не са открити вирусни частици в клетките (Фиг. 5с). Известно е, че както *in vivo*, така и *ex vivo* Инфлуцид има способността да индуцира производството на интерферони (IFN) при бели опитни мишки на ниво, сравнимо с известните синтетични индуктори на IFN. Продукционните нива *in vivo* са съответно 40-160 U / ml и до 80-320 U / ml 24 и 48 часа след приложение, а *ex vivo* - в титъра 64-128 U/ml [17, 18].

\* Аденовирус - щам HAdV3 / etalon / 4120, причиняващ ОРВИ, фебрилен фарингит и фарингоконюнктивална треска; парагрип тип III е свързан с бронхиолит и пневмония, щам HPIV-3/2235; сезонен коронавирус - щам HCoV-1p / 3482; респираторен синцитиален вирус - щам RSV / 4317; Херпес вирус тип I - щам HSV1 / SPb / 248/88; Херпес вирус тип II, свързан със състояния на имунна недостатъчност и отговорен за чести рецидиви, често резистентен на прилагано етиотропно лечение - щам HSV2/ еталон/2000.

\*\* Данни за грипни вируси, получени от клетъчна култура MDCK, за адено- и херпесни вируси от клетъчна култура L-41 (човешка клетъчна линия от макрофаги с произход от моноцитен и левкоцити), останалите - от култура A-549 (епителиодна линия от човешкия белодробен карцином).



а - а, б - б, в - в - с.

**Фиг. 5. Образи, направени от ТЕМ:** а - ултраструктура на непокътнатите клетки, монослой на културата на тъканите MDCK; б - ултраструктура на цитоплазмената зона и плазмената мембрана с изпъкнали частици на грипния вирус и вириони в междуклетъчното пространство (маркирани със стрелки); с - ултраструктура на клетката на тъканната култура MDCK, заразена с грипния вирус с приложение на 0,125 об. Инфлуцид. Общ изглед на клетката с вакуолизирана цитоплазма, множество израстъци върху променената плазмена мембрана. Вирусни частици в цитоплазмата или плазмената мембрана не са открити. МВ [MV] - микровили, Я [N] - ядро, В [V] - вакуола.

В същото време в литературата няма данни за способността на Инфлуцид да има директен увреждащ ефект върху респираторните вируси. Този факт стана основа за изследване на вирицидното действие на Инфлуцид срещу пандемичен грипен вирус A/IVМосква/01/2009 (H1N1) pdm09. Оценката на способността на лекарството да инхибира грипния вирус в разтвор се извършва чрез сравняване на резултатите от инфекциозната активност на вируса, изложен на Инфлуцид при концентрации 1,0%, 5,0%, 10% за 3 часа и 24 часа с отрицателен контрол (интактен вирус). С оглед на факта, че формулата на Инфлуцид (капки) съдържа етилов алкохол, едновременно с това беше извършен контрол на реакцията с етилов алкохол в концентрации, еквивалентни на концентрациите на лекарството, избрани за теста (положителна контрола), за да се вземат предвид възможните инхибиращи ефекти на етилов алкохол върху жизнеспособността на вируса. Инфекциозният титър на вируса се определя в реакцията на хемагутинация.

Според данните, получени в 1-ви и 2-ри инкубационен режим, Инфлуцид намалява инфекциозните титри във всички изследвани концентрации, започвайки от 0,5 lgTCID<sub>50</sub> при концентрация 1,0%. Максимално намаляване на инфекциозния титър в сравнение с отрицателната контрола (1,6 lgTCID<sub>50</sub>) може да бъде постигнато при инкубация за 24 часа при концентрация на Инфлуцид от 10,0%. В сравнение с ефекта на еквивалентните концентрации на алкохол в положителната контрола разликата е 1,6-1,8 lg TCID<sub>50</sub> върху експозицията на Инфлуцид при концентрация не по-малка от 5%.

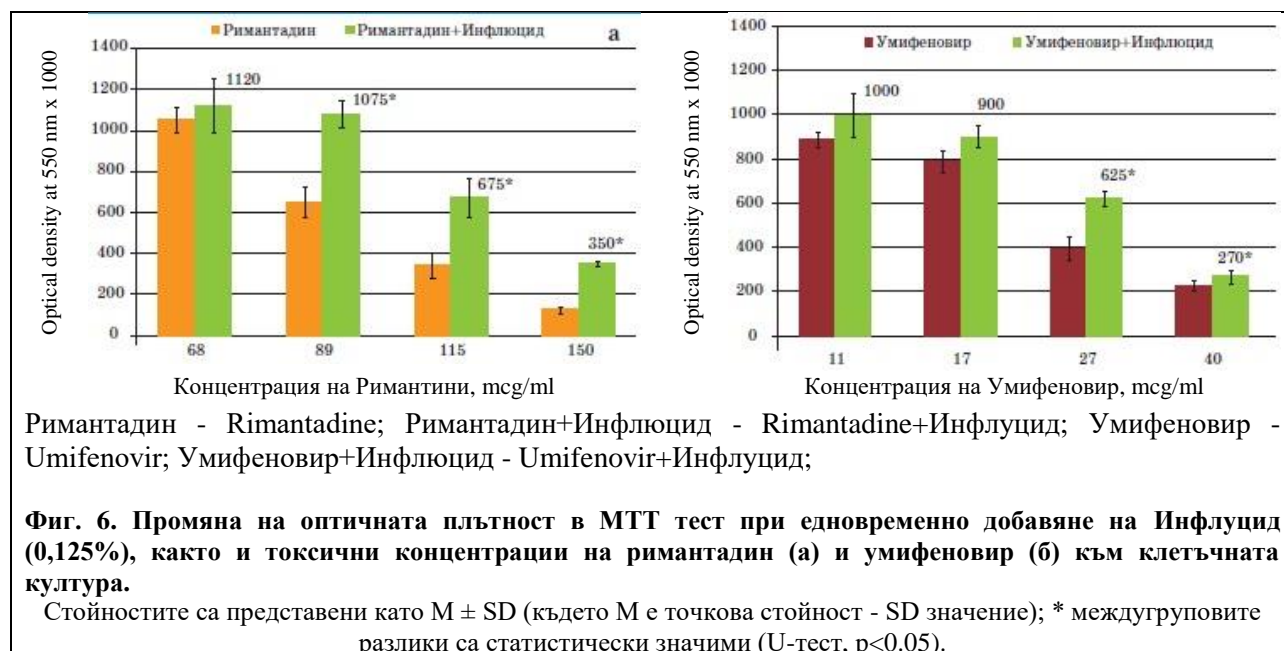
Вземайки предвид показанията цитопротективен ефект на Инфлуцид, ние изследвахме лекарствения ефект върху жизнените характеристики на клетките, когато лекарството се прилага едновременно с редица други лекарства, най-често използвани като терапия за ОРВИ и грип.

Във Федералната държавна бюджетна институция „А.А. Смородинцев - Изследователски институт за инфлуенца“ на Министерството на здравеопазването на Руската федерация, използвайки фотометричен метод, включващ МТТ и вариосканиращ анализатор с характерната дължина на вълната 550 nm, беше изследван цитопротективният ефект на Инфлуцид (0,125%) срещу токсичния клетъчен отговор в културата до високите дози на антивирусните препарати на Римантадин (L-41 клетки) и Умифеновир (A-549 клетки). Според получените данни при граничните концентрации на Римантадин и Умифеновир, Инфлуцид в режима на лечение защитава клетките срещу дисфункция и смърт - оптичната плътност в пробите, засегнати от Инфлуцид, е статистически по-висока, отколкото в пробите, засегнати само от цитотоксичните концентрации на антивирусните препарати (Фиг. 6).

Използвайки теста за токсичност с багрилото МТТ (Sigma), беше изследвана токсичността при едновременната употреба на Инфлуцид с антипиретични лекарства, препоръчани за педиатрична употреба, като парацетамол (ацетаминофен) и ибупрофен. Въз основа на резултатите от търсенето в литературата използвахме концентрации в рамките на 0,03-1,0 и 0,045-1,0 mcg / ml съответно за ацетаминофен и ибупрофен [19].

Във всички серии тестове при едновременен ефект върху клетките на антипиретичните лекарства и Инфлуцид не са открити

цитотоксични ефекти (нито визуално под обрнат микроскоп, нито при колориметричния тест). Това може да се дължи на факта, че



Инфлуцид е характерен с висока сигурност и липса на цитотоксичност, дори при най-високата концентрация (1,0%) не усилва токсичния ефект на антипиретичните лекарства, използвани при максимални цитотоксични концентрации (1.0 mcg/ml).

### Обсъждане

Тази статия е написана по време на разгара на първата вълна от зараза, причинена от новия за вируса на човешката популация - SARS-CoV-2. В началото на юни 2020 г. при търсене в PubMed\* с използване на ключова дума „COVID-19“ сред заглавия или резюмета на статии за последната година са отчетени 19 001 публикации. При по-фокусирано търсене, използвайки комбинации „терапия с COVID-19 +“ и „лечение с COVID-19 +“, бяха намерени 1050 и 2598 резултата, или около 20% от всички публикации бяха посветени на различните аспекти на лечението на тази инфекция. За сравнение, при търсенето на публикации за 2009-2010 г. с използване на комбинация от ключове „пандемия H1N1“ бяха намерени 2275 резултата, от които с добавяне на „терапия“ и „лечение“ бяха намерени общо 113 резултата (4% от общия брой).

Както се вижда от предоставените данни, дори след като светът вече е изправен пред пандемичната заплаха от 2009 г., появата на нова

и доста опасна инфекция постави пред нас необходимостта да намерим не само индивидуални ефективни етиотропни лекарства, но и стратегически важна задача за разработване пълен комплекс от лечението. В рамките на тази задача се обръща специално внимание на комбинацията от ефективност и безопасност не само с оглед на директните токсични ефекти, но и потенциал за използване при различни популации пациенти, възможност за комбиниране с други видове лечение, лекота на употреба, проблеми на патогенната резистентност и т.н. При тези обстоятелства от значение са не само новоразработените терапевтични решения, но вече добре познати лекарствени продукти. Във връзка с такива лекарствени продукти се натрупва значително по-голям обхват от знания. И това, което е особено важно, освен данните, получени в хода на добре контролирани клинични проучвания, има голям опит в рутинната употреба, който в значителна степен актуализира общата база от знания за използване при различна популация пациенти и информация за безопасността от лечението.

Според резултатите, представени в този преглед, Инфлуцид показва качества за специфично антивирусно действие срещу

грипните вируси. Важно е през последното десетилетие лекарството да има стабилна антивирусна активност и широк спектър на действие срещу грип, включително срещу най-новите щамове до момента - А/Москва/225/2019 (H1N1) pdm09 и В/Москва/17/2019.

Известно е, че Инфлуцид наред с другите си фармакологични свойства е индукторът на IFN с активност, сравнима с най-често срещаните синтетични лекарствени продукти: Тилорон (Амиксин), Меглумин акридон ацетат (Циклоферон), Натриев рибонуклеат (Ридостин) [18]. В същото време МДСК клетките, които са IFN-чувствителни сами по себе си не произвеждат споменатите цитокини. Във връзка с това съвсем основателно е твърдението, че фармакологичната активност на Инфлуцид по-пълно и ясно може да бъде призната по време на

проучвания *in vivo*. Резултатите от такива проучвания свидетелстват, че коефициентът на безопасност лабораторните гризачи в контекста на експериментална грипоподобна инфекция е бил средно 1,7, а индекс на защита - 41% [11] и въз основа на констатациите на другите изследователи, тези стойности са дори по-високи - съответно 3 и 80% [18].

Въз основа на данните, представени в тази статия, става ясно, че интензивността на специфичното антивирусно действие не може да се обясни само с умерения противовирусен потенциал на Инфлуцид. В същото време трябва да се отбележи, че широката гама от патогени (РНК-вируси: грип, парагрип, коронавирус, вирус на Денга, ДНК-вируси: аденовирус, херпесни вируси тип I и II), срещу които е показана активност,

\* Информацията е извлечена от най-голямата библиографска база от статии по медицински науки е създадена от Националната медицинска библиотека на САЩ, със свободен достъп: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

позволява да се обособи цитопротективната активност от спектъра на фармакологичните свойства на Инфлуцид. Това конкретно свойство е доказано в многобройни проучвания с вируси и допълнително потвърдено в експерименти, използващи цитотоксични концентрации на серия от антивирусни и антипиретични лекарства. Ясно е, че този ефект се прилага поради неспецифични механизми, които могат да формират основата за отсъствието на признаци за образуване на щамове, устойчиви на Инфлуцид [11, 13].

Друг важен аспект на фармакологичните свойства на Инфлуцид е че лекарството има сложно имуномодулиращо и противовъзпалително действие, доказани от редица клинични проучвания. Използването на Инфлуцид в комплексната терапия на морбили и варицела при деца в рамките на сравнителните клинични проучвания позволи да се намали продължителността на треската с 2,8 дни, катаралният синдром - с 5,4 дни и да се подобри хиперактивацията на интерферогенезата по-бързо, особено при връзка с IFN  $\gamma$ , както и дисбаланса на основните провъзпалителни и противовъзпалителни цитокини (IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ ) [20, 21]. В групи деца с ОРВИ, които са получавали Инфлуцид като част от комплексната терапия, продължителността на заболяването е значително намалена с 2-3 дни, статистически е намалена честотата и продължителността на употребата на антипиретици (парацетамол), муколитици (амброксол) и деконгестанти (оксиметазолин), с по-рядка необходимост от използване на антимикробни лекарства, което позволява да се намалят рисковете от полипрагмазия и да се подобри безопасността на ОРВИ и грипната терапия [5-7]. В допълнение при приложението на Инфлуцид подобряването на хормоналния и медиаторния баланс протича по-бързо, по-специално възстановяването на функционалната активност на надбъбречната кора [9]. Във всички проведени клинични проучвания всички участници (лекари, пациенти и техни представители) отбелязват високата безопасност и добра поносимост на Инфлуцид както при възрастни, така и при деца.

Трябва да се отбележи, че когато се наблюдава антивирусната активност на Инфлуцид през 2019–2020 г., бяха проведени всички тестове върху клетъчни култури, които, както бе споменато по-горе, може да не разкрият напълно антивирусния потенциал на лекарството, което е известно ограничение. Авторите вярват, че по-нататъшното *in vivo* изследване на антивирусната и цитопротективната активност на лекарството ще се разгърне.

#### Изводи

1. Инфлуцид има специфичната антивирусна активност срещу широкия спектър на грипните вируси и също така е активен срещу редица РНК- и ДНК-съдържащи вируси на ОРВИ и други инфекции, което е доказано в хода на проучванията, проведени в три водещи изследователски центъра в Русия .
2. Специфичната антивирусна активност на Инфлуцид срещу грипни вируси е доказана през последните 14 години, по-специално Инфлуцид е активен срещу настоящите щамове на грипния вирус през сезона 2019-2020.
3. Инфлуцид има свойствата да предпазват клетките от патогенно действие на грипните вируси и други ОРВИ патогени (цитопротективно действие).
4. Инфлуцид не повишава токсичността на антипиретичните лекарства на основата на ибупрофен и ацетаминофен, широко използвани по-специално в педиатрията, и предпазва клетките от патогенното влияние на токсичните дози на редица антивирусни лекарства (Римантадин, Умифеновир).
5. Освен че има качествата да комбинира антивирусна активност, цитопротективно действие, способност да упражнява патогенетичен (имуномодулиращ и противовъзпалителен) ефект, както и благоприятен профил на безопасност, Инфлуцид може да бъде подходящо и обещаващо лекарство в арсенала на практикуващите лекари.

**Признателност:** авторите изразяват благодарност на колеги, които подкрепиха и взеха активно участие в изследванията: Лисицин Ф. В., Спиридонова А. С., Зайковская А. В., Коновалова Н. И., Даниленко Д. М., Еропкина Е. М., Брызжикова Т.С.

**Приноси на авторите:** всички автори допринесоха еднакво за този ръкопис, преработиха окончателната му версия и се съгласиха с окончателния вариант на публикацията.

**Финансиране:** спонсор по договори за научни изследвания, резултатите от които са представени от авторите в тази статия, е Alrep Pharma LLC (изследване на Националния изследователски център по епидемиология и микробиология Н.Ф. Гамалея и Държавния изследователски център по вирусология и биотехнологии «Вектор») и представителство на фармацевтичната компания Deutsche Hotoopathie-Union DHU Arzneimittel GmbH & Co. KG. в Русия (поредица от изследователски проучвания в Изследователския институт за

инфлуенца). Инфлуцид е произведен от фармацевтичната компания Deutsche Hotoopathie-Union DHU-Arzneimittel GmbH & Co. KG.

**Конфликт на интереси:** всички автори декларират, че нямат конфликт на интереси.

**Бележка на издателя:** Педиатрия АД остава неутрален по отношение на искове по отношение на публикувани материали и организационни взаимоотношения.

Burtseva E.I. 0000-0003-2518-6801

Gushchina E.A. 0000-0002-3039-6144

Breslav N.V. 0000-0002-6946-5119

Mukasheva E.A. 0000-0002-5688-5309

Ryankov O.V. 0000-0003-3340-8750

Eropkin M.Yu. 0000-0002-3306-847X

## Литература

1. Healthcare in Russia. 2019: Statistical compendium. [editorial staff: I.N. Shapoval (introduction) et al.] Rosstat. M., 2019: 170.
2. On the State of the Sanitary and Epidemiological Welfare of the Population in the Russian Federation in 2018: State Report. M.: Rospotrebnadzor, 2019: 254. [https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosud\\_arstvennyy-doklad-o-sostoyaniisanitarno\\_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniyav-rossiyskoyfederatsii-v-2018-godu.pdf](https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosud_arstvennyy-doklad-o-sostoyaniisanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniyav-rossiyskoyfederatsii-v-2018-godu.pdf).
3. Infectious disease incidence according to the Federal Service for Supervision in Healthcare. <http://iminfin.ru/areas-of-analysis/health/perechen-zabolevanij?territory=1>.
4. Instruction for medical use of the medicinal product Инфлуцид. [http://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=af3131a1-3667-41df-8077-a26381c6cf90&t=](http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=af3131a1-3667-41df-8077-a26381c6cf90&t=)
5. Maidannyk V.G., Ababkov V.V., Klement P., Mityuryaeva I.O., Burkart Yu., Molochek N.V. Effectiveness of use of the homeopathic combination drug in treatment of upper respiratory tract infection in pre-school children. *International Journal of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology*. 2017; 11 (3): 67-78.
6. Thinesse-Mallwitz M, Maydannik V, Keller T, Klement P. A Homeopathic Combination Preparation in the Treatment of Feverish Upper Respiratory Tract Infections: An International Randomized Controlled Trial. *Forsch. Komplementarmedizin* 2015; 22 (3): 163-170.
7. vanHaselen R, Thinesse-Mallwitz M, Maidannyk V, et al. The Effectiveness and Safety of a Homeopathic Medicinal Product in Pediatric Upper Respiratory Tract Infections With Fever: A Randomized Controlled Trial. *Glob. Pediatr. Health*. 2016; 3:2333794X16654851. doi: 10.1177/2333794X16654851.
8. Abramovich M.L., Budakovskaya A.V., Gorelov A.V., Ploskireva A.A. Homeopathic medicines in therapy of acute respiratory infections in children. *Praktika pediatria [Paediatrician practice]*. 2013; 2: 59-63.
9. Sitnikov I.G., Moryakova N.V. Clinical and pathogenetic mechanisms of the action of the drug Инфлуцид in acute respiratory viral infections in children. *Infektsyonnye bolezni [Infectious diseases]*. 2010; 8 (1): 44-47.
10. Temi Lampejo T. Influenza and Antiviral Resistance: An Overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 13: 1–8. doi:10.1007/s10096-020-03840-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7223162/>
11. Eropkin M.Yu., Grigoryeva V.A., Gudkova T.M., Kononova I.I., Lobova T.G., Baybus D.M., Yaglovskaya I.B. Activity of the drug Инфлуцид against influenza viruses in the model systems. *Medline-Express*. 2007; 6: 23-26.
12. Eropkin M.Yu., Gudkova T.M., Danilenko D.M., Kononova N.I., Grigoryeva V.A., Smirnova T.S., Ivanova A.V., Bryazhzykova T.S., Eropkina E.M., Shchekanova S.M. Pandemic influenza 2009 in Russia: origin, antigenic, biological properties of the virus and sensitivity to antiviral drugs. *Russkiy meditsynskiy zhurnal [Russian Medical Journal]*. 2010; 18 (7): 410-415.
13. Eropkin M.Yu., Bryazhzykova T.S., Eropkina E.M. Opportunities to improve the efficiency of antiviral therapy and prevention of ОРВИ. New experimental data on cell cultures. *Russkiy meditsynskiy zhurnal [Russian Medical Journal]*. 2011; 19 (18): 1151-1155.
14. Ryankov O.V., Bodnev S.A., Zayakovskaya A.V., Kazakov V., Schmidt G. Inhibition of the Dengue virus replication using the drug Инфлуцид in vitro. *Antibiotiki i khimioterapiya [Antibiotics and Chemotherapy]*. 2019; 64(5-6): 3-8.
15. Sylvester P.W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol. Biol.* 2011; 716: 157-168. doi: 10.1007/978-1-61779-012-6\_9.
16. Jiang W, Akagi T, Suzuki H, Takimoto A, Nagai H. A new diatom growth inhibition assay using the XTT colorimetric method. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2016; 185-186: 13-19. doi: 10.1016/j.cbpc.2016.02.004.
17. Garashchenko T.I., Ilyenko L.I., Garashchenko M.V., Ershov F.I., Popov V.V. Experience in organization of non-specific prevention of influenza and ОРВИ in school groups. *Педиатрия. Журнал Named After G.N. Speransky*. 2015; 94(4):122-127.

18. *Garashchenko T.I., Garashchenko M.V., Mezentseva M.V.* Clinical and immunological justification of homeopathic medicines in prevention and treatment of influenza and ОРВИ. *Russkiy meditsynskiy zhurnal [Russian Medical Journal]*. 2005; 13 (21): 1432-1438.

19. *Parolini M, Binelli A, Cogni D, Riva C, Provini A.* An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicol. In Vitro*. 2009 Aug; 23 (5): 935-942. doi: 10.1016/j.tiv.2009.04.014.

22.

20. *Kramarev S.A., Vygovskaya O.V., Shpak I.V., Voronov A.A., Doroshenko V.O., Vesna V.N., Melnikov O.F.* State of some cytokines in measles in children. *Aktualnaya infektologiya [Current Infectology]*. 2019; 7 (4): 196-213.

21. *Kramarev S.A., Deev V.V., Vygovskaya O.V., Melnikov O.F., Kaminskaya T.N., Voronov A.A., Moshchich A.P.* Interferon and cytokine status in chickenpox in children. *Педиатрия. Vostochnaya Evropa [Pediatrics. Eastern Europe]*. 2014; 1 (5): 77-87.

### **Педиатрия LLC**

Россия, 115054, Москва-54, ПК 32

Редакционен телефон/факс: (495) 959-88-22

E-mail: [info@pediatrijournal.ru](mailto:info@pediatrijournal.ru)

Формат 60x84 1/8. Тираж 1.000

Отпечатано в печатница Tverskoye Pechatnyy Dvor АД

170518, Твер, Николское, 26

Телефон: (4822) 370-555

E-mail: [info@tpd-print.ru](mailto:info@tpd-print.ru)