

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ АЗОКСИМЕРА БРОМИД НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ *IN VITRO*

Е.И. Исаева¹, Е.Н. Ветрова¹, В.В. Тюшева¹, А.И. Чернышева¹, Л.В. Омельченко², О.В. Морозова¹

¹ – «ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России» г. Москва; Россия.

² – ООО «НПО Петровакс Фарм» г. Москва; Россия.

Целью работы явилась оценка противовирусной активности азоксимера бромид (Полиоксидоний®) в отношении вирусов гриппа человека типов А и В, парагриппа, метапневмовируса, респираторно-синцитиального вируса, коронавируса, аденовируса, риновируса, ротавируса, герпеса I и II, вируса Эпштейн-Барра, энтеровируса и вируса Коксаки на экспериментальных моделях *in vitro*.

Методология работы: исследование проводили в диапазоне концентраций азоксимера бромид от 1000-1,00 мкг/мл на чувствительных к вирусам клетках. Осуществляли титрование препарата в присутствии вирусов при множественности заражения 0,1 или 0,01 ТЦД₅₀/клетка. После проявления достаточного цитопатического эффекта в контроле без препарата, учитывали снижение инфекционного титра вирусов и определяли коэффициент ингибирования (%) цитопатического действия вирусов на клеточный монослой. Также учитывали уровень подавления репликации вирусов (вирусной нагрузки) в инфицированных культурах под действием препарата методом количественной ПЦР. В качестве референс-препарата и сравнительной оценки противовирусной эффективности азоксимера бромид в исследовании использовали интерферон альфа-2b.

Результаты: На основании проведенных исследований на клеточных моделях *in vitro* показано противовирусное действие азоксимера бромид, специфически снижающего репродукцию риновируса, метапневмовируса, вируса гриппа типа А и В, парагриппа при множественности инфицирования клеток 0,01 ТЦД₅₀/клетка. Коэффициент ингибирования цитопатического действия вирусов составил (50,0–69,2%) при применении азоксимера бромид в концентрациях 1000-100 мкг/мл. При этом количество вирусной ДНК/РНК в инфицированных клетках снижалось более чем в 1000 раз (количество геном-эквивалент/мл, определяемое в количественной ПЦР в реальном времени). При увеличении заражающей дозы вируса в 10 раз (0,1 ТЦД₅₀/клетка) азоксимера бромид сохранял противовирусную активность в отношении риновируса. Азоксимера бромид в концентрации 1000 мкг/мл и интерферон альфа-2b в концентрации 53 мкг/мл показали сопоставимый противовирусный эффект.

Заключение: Продемонстрированная противовирусная активность азоксимера бромид в отношении вирусов гриппа человека А и В, парагриппа, метапневмовируса и риновируса в модельной клеточной системе *in vitro* подтверждает установленную в клинических исследованиях эффективность при применении препарата в лечении ОРВИ и гриппа.

Ключевые слова: Вирус гриппа А и В, метапневмовирус, риновирус, парагрипп, ОРВИ, Полиоксидоний, азоксимера бромид

STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF AZOXIMER BROMIDE ON AN EXPERIMENTAL *IN VITRO* MODEL

E.I. Isaeva¹, E.N. Vetrova¹, V.V. Tyusheva¹, A.I. Chernyshova¹, L.V. Omelchenko², O.V. Morozova¹.

¹ – Federal Institution “D.I. Ivanovskiy Research Institute”, Healthcare Ministry of Russia; Moscow, Russia.

² – LLC NPO Petrovax Pharm, Moscow, Russia.

Abstract. The aim of the work was to evaluate the antiviral activity of the immunomodulator azoximer bromide (Polyoxidonium®) against human influenza viruses types A and B, parainfluenza virus, metapneumovirus, respiratory syncytial virus, coronavirus, adenovirus, rhinovirus, rotavirus, herpes types I and II, Epstein-Barr virus, and Coxsackie A virus on experimental model *in vitro*.

Methodology: the study was performed in the range of concentrations of Polyoxidonium from 1000-1.00 µg/ml on the virus-sensitive cell lines. The preparation was titrated in the presence of viruses with a multiplicity of infection of 0.1 or 0.01 TCID₅₀/cell. After the sufficient cytopathic effect development was demonstrated in the control without the drug, the reduction of the infectious virus titers was estimated and the virus CPE inhibition rate (%) on the cells monolayer was determined. The suppression level of the viral replication (viral load) in infected cells under the drug action was also estimated by the quantitative PCR method.

Interferon alfa-2b was used as a reference preparation for comparative evaluation of the antiviral efficacy of azoximer bromide in this study.

Based on the performed *in vitro* cell models studies, the antiviral activity of the azoximer bromide was shown with observed specific reducing the reproduction of rhinovirus, metapneumovirus, influenza viruses of type A and B, parainfluenza (in case of multiplicity of infection 0.01 TCD₅₀/cell). The inhibition coefficient of the cytopathic effect of the viruses were (50.0-69.2%) after the use of azoximer bromide in concentration range of 1000-100 µg/ml. At the same time, the copy number of viral DNA/ RNA in infected cells decreased by more than 1000 times (the number of equivalent genome/ml, as was determined in real-time quantitative PCR).

When the infectious dose of the virus was increased by 10 times (0.1 TCID₅₀/cell), Polyoxidonium retained antiviral activity against the rhinovirus. Azoximer bromide at the concentration of 1000 µg/ml and interferon alpha 2b at the concentration of 53 µg/ml showed a comparable antiviral effect. The demonstrated antiviral activity of azoximer bromide regarding to human influenza A and B viruses, parainfluenza, metapneumovirus and rhinovirus in the model cell system *in vitro* confirms the established clinical efficacy when using the drug in the treatment of SARS and influenza.

Key words: Influenza A and B viruses, metapneumovirus, rhinovirus, parainfluenza, ARVI, Polyoxidonium, azoximer bromide.

Введение

Лечение острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) и гриппа остается одной из актуальных проблем современной медицины. Заболеваемость респираторными вирусными инфекциями, обусловленная вирусами гриппа А и В, а также вирусами негриппозной этиологии (вирусы парагриппа, аденовирус, РС-вирус, риновирус) лидирует по частоте случаев в эпидсезон. В большинстве случаев ОРВИ сопровождается острым риносинуситом (ОРС), наиболее частым возбудителем которого является риновирус [1]. Ежегодно Роспотребнадзором осуществляется мониторинг за иммунизацией населения против гриппа и мониторинг заболеваемости ОРВИ для снижения рисков и тяжести заболеваний, так как рецидивирующие респираторные заболевания приводят к повышению сенсibilизации организма и присоединению вторичных инфекций [2,3].

Использование противовирусной и иммуномодулирующей терапии является основной стратегией лечения респираторных вирусных инфекций [4]. В лечении ОРВИ и гриппа широкое применение получил азоксимера бромид, обладающий комплексным действием: иммуномодулирующим, детоксицирующим и противовоспалительным

[5]. Его эффективность в отношении ОРВИ и гриппа была доказана многочисленными исследованиями, в том числе в многоцентровом рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании у детей 3-х лет и старше [6].

Противовирусный иммунный ответ при действии азоксимера бромид, как известно, осуществляется за счет увеличения продукции интерферона альфа, фактора некроза опухоли, повышения активности НК-клеток [7]. Непосредственное влияние азоксимера бромид на репликацию вируса в инфицированных клетках не изучалось. При этом совершенствование методических подходов в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний диктует необходимость более глубокого понимания механизмов противовирусного действия азоксимера бромид, особенно в отношении наиболее распространенных вирусов, которые вызывают ОРВИ и грипп [8].

Цель работы: оценить противовирусную активность азоксимера бромид в отношении вирусов гриппа человека типов А и В, парагриппа, метапневмовируса, респираторно-синцитиального вируса, коронавируса, аденовируса, риновируса, ротавируса,

Таблица 1

Клеточные линии, использованные в работе

Вирусы	Наименование клеточной линии (обозначение)	Среда культивирования
Риновирус	Карцинома легкого (A549)	Игла-МЕМ и 199 (1:1) + 10% ЭТС*+10 мМ глутамина
Метапневмовирус	Нормальная конъюнктивa (Chang Conjunctiva, клон 1-5C4)	Игла-МЕМ+ 10% ЭТС*+10 мМ глутамина
Респираторно-синцитиальный вирус, энтеровирус, Коксаки вирус	Эпителиальная карцинома (Нер-2)	Игла-МЕМ и 199 (1:1) + 7% ЭТС*+10 мМ глутамина
Парагрипп	Фибробласты легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ)	DMEM +8%ЭТС*+10 мМ глутамина
Вирус Эпштейна-Барр	В лимфоцитарные клетки человека (Huh)	RPMI-1640+10% ЭТС*+10 мМ глутамина
Грипп А и В	Почки собаки (MDCK)	Игла-МЕМ + 10% ЭТС*+10 мМ глутамина
Коронавирус, аденовирус	Почки обезьяны (Vero)	Игла-МЕМ + 10% ЭТС*+10 мМ глутамина
Ротавирус	Почки эмбрионов крупного рогатого скота (MDBK)	DMEM + 10% ЭТС*+10 мМ глутамина

*ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

герпеса I и II, вируса Эпштейн-Барра, энтеровируса на экспериментальных моделях *in vitro*.

Материалы и методы:

Препараты

В исследование были взяты опытные образцы азоксимера бромид (субстанция Полиоксидоний® (производство ООО «НПО Петровакс Фарм» Россия) и интерферона альфа-2b (производство ЗАО «Фармапарк» Россия).

Исследуемые концентрации азоксимера бромид 1000 мкг/мл, 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, исследуемые концентрации интерферона альфа-2b 53 мкг/мл, 16 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5,3 мкг/мл, 0,1 мкг/мл.

Вирусы

В исследовании противовирусной активности препаратов использовали вирусы: аденовирус 2 типа (Adv), респираторно-синцитиальный вирус А (RSV), метапневмовирус А (hMPV), вирус парагриппа (Piv), коронавирус NL-63 (Cov), риновирус А (RV), вирус гриппа А (H1N1) A/Caliphornia /07/09 pdm, вирус гриппа В В/Brisbane/60/08, вирус герпеса (HSV 1-штамм BH5), вирус герпеса (HSV-2-штамм), EBV-штамм В-95-8), вирус Коксаки А (HCXVштамм А2), энтеровирус

(ENT-штамм EV71), ротавирус А – штамм DS1 (ATCC VR-2104). Все вирусы получены из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского) Минздрава России. Вирусодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из зараженных культур клеток, перmissive для исследуемого вируса. Дозы вируса для инфицирования 0,1 и 0,01 TCID₅₀/клетку.

Клеточные линии

Исследование проводили на перmissive для вирусов перевиваемых клеточных линиях (таблица 1). Все линии были получены из Государственной коллекции культур клеток ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского) Минздрава России.

Оценка цитотоксичности:

Токсичность исследуемых разведений препаратов оценивали по снижению жизнеспособности клеток клеточного монослоя. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах в соответствующей среде (таблица 1) до образования монослоя. Затем к монослою клеток добавляли исследуемые концентрации препаратов и культивировали в течение 72 часов при 37 °С.

Таблица 2

Снижение инфекционного титра вирусов группы ОРВИ и гриппа при действии азоксимера бромид при профилактической модельной схеме применения

азоксимера бромид (АБ)					
Вирус	Концентрация азоксимера бромид, мкг/мл	**Инфекционный титр вируса (lg TCID ₅₀)±SD	Подавление инфекционного титра Δlg TCID ₅₀	КИ, %	Снижение кол-ва геном-эквивалент/мл в N раз по сравнению с контролем без АБ в ПЦР в реальном времени
Метапневмовирус	1000	0,95±0,1	1,85	66,10	30,3
	100	1,35±0,2	1,45	51,80	1,11
Вирус гриппа А	1000	2,0±0,6	3,2	61,50	294
	100	2,9±0,7	2,3	44,20	4,4
Вирус гриппа В	1000	1,4±0,4	2,2	61,10	377
	100	2,3±0,7	1,3	36,10	4,89
Парагрипп	1000	2,3±0,3	2,3	50	1500
	100	2,9±0,8	1,7	37,70	62,68
Риновирус	1000	отсутствует*	2,6	100	отсутствует*
	100	0,2±0,1	2,4	92,30	145,6

Примечания: *Отсутствует – Вирусная РНК/ДНК не детектируется в реакции, репродукция вируса полностью подавлена.

** Средние значения показателей представлены по 4 повторам.

На каждое разведение делали по 4 повтора эксперимента. Жизнеспособность клеток по окончании инкубации оценивали с помощью стандартного МТТ-теста.

Определение противовирусной активности.

В опыт брали 96-л планшет с 3-дневным монослоем клеток. Вносили тестируемые разведения азоксимера бромид и интерферона альфа-2b согласно схеме: за 2 часа до заражения клеточных культур вирусами (профилактическая модельная схема) и через два часа после заражения клеточных культур вирусами (лечебная модельная схема). Контакт с вирусом проводили в течение 40 минут и 37 °С в CO₂ инкубаторе. В эксперимент брали вирусный супернатант, содержащий инфицирующую дозу 0,1 и 0,01 TCID₅₀ /клетка.

После проявления вирусной инфекции (24 часа при 37°С для вируса гриппа и парагриппа, 48 часов для Adv, Cov, RV и RSV при

35°С, 3 суток для Rot, 4-5 суток для hMPV в течение 24 часов при 37 °С для HSV 1,48 часов для HSV-2, 5-7 суток для EBV и ENT) определяли инфекционный титр вирусов в опыте (в присутствии препаратов) и контроле (без препаратов, только вирус) в единицах (lg TCID₅₀/мл) по методу Рида и Менча [9]. Для каждого разведения использовали четыре лунки планшета и конечный результат выражали как среднее M±SD. После учета проводили сравнительный анализ падения инфекционного титра вирусов под действием азоксимера бромид или интерферона альфа-2b по сравнению с контролем. Падение инфекционного титра выражали в единицах (ΔlgTCID₅₀). Также определяли коэффициент ингибирования цитопатического действия вируса (КИ) в процентах по стандартной формуле $КИ = [(A_k - A_o) / A_k] \times 100$, где A_k – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питатель-

Таблица 3

Снижение инфекционного титра вирусов при действии азоксимера бромид при лечебной модельной схеме применения

азоксимера бромид (АБ)					
Вирус	Концентрация АБ, мкг/мл	**Инфекционный титр вируса (lg TCID ₅₀)±SD	Подавление инфекционного титра Δlg TCID ₅₀	КИ, %	Снижение кол-ва геном-эквивалент/мл в N раз по сравнению с контролем без АБ в ПцР в реальном времени
Метапневмовирус	1000	0,8±0,1	2,2	71,4	692,8
	100	1,1±0,3	1,7	60,7	17,32
Вирус гриппа А	1000	1,6±0,8	3,6	69,2	2309,52
	100	2,4±0,7	2,8	53,8	1830,18
Вирус гриппа В	1000	1,3±0,3	2,3	63,9	127,77
	100	2,2±0,4	1,4	38,9	2,32
Парагрипп	1000	1,85±0,6	2,7	59,8	500
	100	2,9±0,4	1,7	37	63,63
Риновирус	1000	отсутствует*	2,6	100	отсутствует*
	100	1,0±0,2	1,6	61,5	7,36
Вирус герпеса 1 типа	1000	1,0±0,1	2,0	66,7	621,42
	100	1,9±0,3	1,1	36,7	24,16
Энтеровирус	1000	1,5±0,3	2,1	58,3	176,92
	100	2,5±0,5	1,1	30,6	39,65

Примечания: *Отсутствует – Вирусная РНК/дНК не детектируется в реакции, репродукция вируса полностью подавлена.

**Средние значения показателей представлены по 4 повторам.

ную среду изучаемого средства ($\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$) и A_0 – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду и изучаемого средства ($\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$)

После оценки инфекционного титра отбирали пробы клеточной культуры и замораживали при -70°C для последующей постановки ПЦР в реальном времени.

Полимеразная цепная реакция

Для выделения РНК и ДНК вирусов применяли коммерческую тест-систему «Рибо-преп» (производство Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию для получения кДНК проводили при помощи коммерческого набора «Реверта-L» (производство Россия) по инструкции производителя. Постановку амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» осуществляли с помощью тест-систем «Ампли СенсиОРВИ-FL», «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL», «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL», «АмплиСенс Enterovirus-FL» (Россия), «АмплиСенс HSV I, II-FL», «АмплиСенс EBV скрин/монитор-FL» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя на амплификаторе планшетного типа ДТ-32 или ДТ-96. Определяли количество ДНК/РНК вируса в геном-эквивалентах в 1 мл пробы супернатанта (геном-эквива-

лент/мл) согласно инструкции производителя тест-системы и методическим указаниям для каждого из наборов согласно рекомендациям производителя.

Статистический анализ результатов

Проведен с применением ПО Microsoft Excel. Использовались критерий Стьюдента; различия считали достоверными при $p \leq 0,05$, высоко достоверными при $p < 0,001$, недостоверными при $p > 0,05$. Для всех проб считали средние арифметические значения (M) и стандартное отклонение (SD).

Критерии оценки степени противовирусного действия:

В соответствии с Рекомендациями Фармакологического комитета РФ [10] выявленный *in vitro* противовирусный эффект азоксимера бромид считали терапевтически значимым если:

- Наблюдали снижение инфекционного титра $\Delta \lg \text{TCID}_{50} \geq 2,0$
- Коэффициент ингибирования вирусной инфекции (КИ) $\geq 50\%$ (не менее 50% клеток монослоя защищено от цитопатического действия вируса)
- Снижение вирусной нагрузки (количества геном-эквивалент/мл) в опыте по сравнению с контролем без препарата, подтверждённое в ПЦР в реальном времени.

Результаты и обсуждения:

Таблица 4

Противовирусная эффективность азоксимера бромид при действии на вирусы группы ОРВИ и гриппа в сравнении с интерфероном альфа-2b при профилактической модельной схеме применения

Вирус	азоксимера бромид			интерферон альфа-2b		
	Концентрация, мкг/мл	$\Delta \lg \text{TCID}_{50}$	КИ, %	Концентрация, мкг/мл	$\Delta \lg \text{TCID}_{50}$	КИ, %
Метапневмовирус	1000	1,85	66,10	53	1,8	64,30
	100	1,45	51,80	16	1,5	53,60
Вирус гриппа А	1000	3,2	61,50	53	3,7	71,20
	100	2,3	44,20	16	3,4	65,40
Вирус гриппа В	1000	2,2	61,10	53	2,2	61,10
	100	1,3	36,10	16	1,4	38,90
Парагрипп	1000	2,3	50	53	2,7	58,70
	100	1,7	37,70	16	2	43,50
Риновирус	1000	2,6	100	53	2,6	100
	100	2,4	92,30	16	2,6	100

Для выбора тестируемого диапазона разведений на первом этапе определяли цитотоксичность взятых разведений для всех клеточных линий.

Для азоксимера бромид концентрация 1000 мкг/мл оказалась максимально переносимой для клеток MDBK и ФЛЭЧ (наблюдаемый цитопатический эффект на монослой не превышает 30%). На клетки других линий азоксимера бромид не оказывал ЦПЭ в этой концентрации.

Для интерферона альфа-2b концентрация 53 мг/мл оказалась максимально переносимой для клеточных линий Vero, MDBK и ФЛЭЧ. На клетки других линий Интерферон альфа-2b в концентрации 53 мг/мл не оказывал цитотоксического действия. В более низких концентрациях не было обнаружено влияния на клеточный монослой как в случае с интерфероном альфа-2b, так и с азоксимера бромид.

В проведенных экспериментах прямая противовирусная активность азоксимера бромид была обнаружена для следующих вирусов: метапневмовируса, вируса гриппа А, вируса гриппа В, парагриппа, риновируса,

вируса герпеса I типа и энтеровируса. Для остальных вирусов, взятых в исследование, противовирусный эффект был слабо выражен и не удовлетворял критериям оценки.

Противовирусный эффект оказывали концентрации азоксимера бромид 1000-100 мкг/мл при применении как в профилактической модельной схеме (внесение разведений до заражения клеточного монослоя), так и в лечебной модельной схеме (внесение разведений после заражения клеточного монослоя).

Применение по профилактической модельной схеме выявило подавление репродукции, подтвержденное ПЦР в реальном времени, при $\Delta lg \geq 2$ и $КИ \geq 50\%$ для вирусов группы ОРВИ и гриппа (таблица 2) при эффективной концентрации азоксимера бромид 1000 мкг/мл.

Применение по лечебной модельной схеме оказалось более эффективным. Подавление репродукции, подтвержденное ПЦР в реальном времени, наблюдали для вирусов группы ОРВИ и гриппа, (таблица 3) при концентрациях азоксимера бромид 1000-100 мкг/мл и заражающей дозе 0,01 TCID₅₀/клетку. (для

Таблица 5

Противовирусная эффективность азоксимера бромид при действии на исследуемые вирусы в сравнении с интерфероном альфа-2b при лечебной модельной схеме применения

Вирус	азоксимера бромид			интерферон альфа-2b		
	Концентрация, мкг/мл	Δlg TCID ₅₀	КИ, %	Концентрация, мкг/мл	Δlg TCID ₅₀	КИ, %
Метапневмовирус	1000	2,2	71,4	53	2,2	78,6
	100	1,7	60,7	16	2,1	75
Вирус гриппа А	1000	3,6	69,2	53	3,8	73,1
	100	2,8	53,8	16	3,6	69,2
Вирус гриппа В	1000	2,3	63,9	53	2,5	69,4
	100	1,4	38,9	16	1,6	44,4
Парагрипп	1000	2,7	59,8	53	3,1	67,4
	100	1,7	37	16	2,5	54,3
Риновирус	1000	2,6	100	53	2,6	100
	100	1,6	61,5	16	2,6	100
Вирус герпеса 1 типа	1000	2	66,7	53	2,2	73,3
	100	1,1	36,7	16	1,7	56,6
Энтеровирус	1000	2,1	58,3	53	1,8	50
	100	1,1	30,6	16	0,9	25

метапневмовируса, вируса гриппа А и В и парагриппа $\Delta \lg \text{ТЦД}_{50} \geq 2,0$ КИ (50,0 – 69,2)% и для риновируса $\Delta \lg \text{ТЦД}_{50} \geq 2,0$ КИ (48,9 – 100)%. В концентрации азоксимера бромид 1000 мкг/мл наблюдали также подавление репродукции энтеровируса и герпеса 1 типа ($\Delta \lg \text{TCID}_{50}$ (2,0-2,6) и КИ% (50,0-73,8%).

Противовирусный эффект азоксимера бромид был сопоставим с противовирусной активностью интерферона альфа-2b: при концентрациях 1000–100 мкг/мл для азоксимера бромид и 53–16 мкг/мл (10–3 млн МЕ/мл) для интерферона альфа-2b при профилактической (таблица 4) и лечебной (таблица 5) схемах внесения разведений.

На основании проведенных исследований на клеточных моделях *in vitro* показано, что азоксимера бромид в концентрации (1000-100) мкг/мл снижал инфекционный титр на 2,0 lg и более при действии на РНК-содержащие вирусы – метапневмовирус, гриппа А и В парагрипп ($\Delta \lg \text{ТЦД}_{50} \geq 2,0$ КИ (50,0 – 69,2)%) и риновируса ($\Delta \lg \text{ТЦД}_{50} \geq 2,0$ КИ (48,9 – 100)%) при заражающей дозе вирусов $\text{TCID}_{50}/\text{клетка}$ 0,01. Данный противовирусный эффект был сопоставим с таковым для интерферона альфа-2b в концентрации (53-16) мкг/мл (10-30 млн. МЕ/мл) для метапневмовируса, гриппа А и В парагриппа – $\Delta \lg \text{ТЦД}_{50} \geq 2,0$ КИ (53,6 – 78,6)% и риновируса $\Delta \lg \text{ТЦД}_{50} \geq 2,0$ КИ (90,4– 100)%. Наиболее эффективной оказалась модельная лечебная схема: внесение разведений через 2 часа после инфицирования клеток вирусами. В концентрации 1000 мкг/мл при лечебной схеме внесения тестируемых разведений азоксимера бромид снижал инфекционный титр и вирусную нагрузку в отношении энтеровируса и герпеса 1 типа ($\Delta \lg \text{TCID}_{50}$ (2,0-2,6) и КИ% (50,0-73,8%).

Снижение инфекционного титра при действии азоксимера бромид в сравнении с референс препаратом явилось прямым следствием подавления репродукции исследованных вирусов в клетках. Количество геном/эквивалент вируса, измеренное количественной ПЦР в реальном времени снижалось в 10–1000 раз по сравнению с контрольной группой без азоксимера бромид, что удовлетворяло критериям достоверности наблюдаемого противовирусного эффекта.

При более высокой заражающей дозе вирусов 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{клетка}$ азоксимера бромид сохранял высокую противовирусную активность в отношении риновируса, однако в отношении других исследуемых вирусов противовирусный эффект не удовлетворял критериям приемлемости и был не выражен ($\Delta \lg \text{ТЦД}_{50} < 2,0$ КИ < 50%). Полученные результаты для азоксимера бромид, который успешно применяется в терапии пациентов с ОРВИ и гриппом, имеют большое практическое значение.

Заключение:

Показанный противовирусный эффект азоксимера бромид против риновируса, размножение которого происходит преимущественно на слизистой носоглотки [11], обосновывает местное применение азоксимера бромид (интраназально или подъязычно) в стартовой терапии ОРВИ, сопровождающейся катаральными явлениями в области носоглотки. Активность в отношении метапневмовируса, парагриппа, гриппа А и В, обладающих высокой тропностью к слизистой оболочке нижних отделов респираторного тракта [12], обосновывает применение парентеральных, пероральных и ректальных лекарственных форм азоксимера бромид, обеспечивающих системный эффект. Системное действие препарата также оправдано при выраженной интоксикации и частых рецидивирующих инфекциях, а в случае невозможности применения пероральных форм, например при рвоте на фоне интоксикации, обоснован прием азоксимера бромид в виде суппозиторий.

Таким образом, азоксимера бромид, наряду с ранее известными детоксицирующим, противовоспалительным, иммуномодулирующим свойствами, обладает также выраженным противовирусным действием в отношении вирусов гриппа А и В и риновируса, а также снижает инфекционный титр и вирусную нагрузку метапневмовируса, парагриппа, энтеровируса и герпеса 1 типа. Данные свойства объясняет его клиническую эффективность и обоснованность применения при ОРВИ и гриппе.

Литература

1. Autio T.J. et al. The role of microbes in the pathogenesis of acute rhinosinusitis in young adults // *The Laryngoscope*. 2015. Т. 125. № 1. С. E1–E7.
2. Деева Э.Г., Мельникова Т., Киселев О.И. Химиопрепараты для лечения гриппа – современное состояние // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013. № 5.
3. Лусс Л.В. Современные взгляды на иммуномодулирующую терапию при респираторных инфекциях у взрослых и детей: преимущества Полиоксидония // *Эффективная фармакотерапия*. 2015. № 48. С. 24–32.
4. Петров Р.В. и др. Полиоксидоний – иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. 1999. № 3. С. 3–6.
5. Пинегин Б.В. Полиоксидоний – новое поколение иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом действия // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. 2000. Т. 1. С. 27–28.
6. Харит С.М., Галустян А.Н. Азоксимера бромид – безопасный и эффективный препарат при лечении острых респираторных инфекций верхних дыхательных путей у детей: обзор результатов двойных слепых плацебо-контролируемых рандомизированных клинических исследований II-III фазы. С // *Consilium Medicum. Педиатрия*. 2017. Т. 2.
7. Стручко Г.Ю. и др. Т-зависимые иммунорегуляторные эффекты полиоксидония и имунофана (обзор литературы) // *Вестник Чувашского университета*. 2010. № 3.
8. Учайкин В.Ф. К вопросу о расширении показаний применения иммуномодулирующего препарата в лечении и профилактике гриппа и острых респираторных инфекций у детей раннего возраста // *Детские инфекции*. 2017. Т. 16. № 3.
9. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American journal of epidemiology*. 1938. Т. 27. № 3. С. 493–497.
10. Хабриев Р.У. и др. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // 2005.
11. Blaas D., Fuchs R. Mechanism of human rhinovirus infections // *Mol Cell Pediatr*. 2016. V. 3 № 1. P. 21.
12. Yu, W. C., Chan, R. W., Wang, J., Travanty, E. A., Nicholls, J. M., Peiris, J. S., Mason, R. J., Chan, M. C. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses // *Journal of virology*. V. 85. № 14. P. 6844–6855.

References:

1. Autio T.J. et al. The role of microbes in the pathogenesis of rhinosinusitis in young adults // *The Laryngoscope*. 2015. V. 125. № 1. S. E1 – E7.
2. Deeva E.G., Melnikova T., Kiselev O.I. Chemotherapy for the treatment of influenza - current state // *Epidemiology and infectious diseases*. 2013. № 5 (in Russian).
3. Luss L.V. Modern views on immunomodulating therapy for respiratory infections in adults and children: the benefits of Polyoxidonium // *Effective pharmacotherapy*. 2015. № 48. P. 24–32 (in Russian).
4. Petrov R.V. Polyoxidonium - immunomodulator of the last generation: the results of three-year clinical use // *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. 1999. № 3. P. 3–6 (in Russian).
5. Pinegin B.V. Polyoxidonium - new generation of immunomodulators with a known structure and mechanism of action // *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*. 2000. V. 1. P. 27–28 (in Russian).
6. Kharit S.M., Galustyan A.N. Azoximer bromide - a safe and effective drug in the treatment of acute respiratory infections of the upper respiratory tract in children: a review of the results of double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trials of phase II-III. С // *Consilium Medicum. Pediatrics*. 2017. V. 2 (in Russian).
7. Struchko G.Yu. et al. T-dependent immunoregulatory effects of polyoxidonium and immunofan (literature review) // *Chuvash University Bulletin*. 2010. № 3 (in Russian).
8. Uchaykin V.F. On the issue of expanding indications for the use of an immunomodulating drug in the treatment and prevention of influenza and acute respiratory infections in children of young age // *Pediatric infections*. 2017. V. 16. № 3 (in Russian).
9. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American journal of epidemiology*. 1938. V. 27. № 3. P. 493–497.
10. Khabriev P.U. et al. Manual of experimental (preclinical) study of new pharmacological substances // 2005 (in Russian).
11. Blaas D., Fuchs R. Mechanism of human rhinovirus infections // *Mol Cell Pediatr*. 2016. V. 3 № 1. P. 21.
12. Yu, W. C., Chan, R. W., Wang, J., Travanty, E. A., Nicholls, J. M., Peiris, J. S., Mason, R. J., Chan, M. C. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses // *Journal of virology*. V. 85. № 14. P. 6844–6855.