

Віруліцидна ефективність льодяників із фіксованою комбінацією цетилпіридинію хлориду та бензидаміну гідрохлориду проти вірусу грипу А

На тлі епідемії коронавірусної інфекції SARS-CoV-2 актуальними стали пошуки ефективних методів лікування та запобігання інфекції. Препаратами, що, з-поміж інших, привернули до себе увагу, стали пероральні антисептики – завдяки своїй здатності до зниження вірусного навантаження в ротовій порожнині та зменшення ризику передачі інфекції. До таких антисептиків належить, зокрема, цетилпіридинію хлорид (ЦПХ), наявні наукові дані щодо якого демонструють найбільш обнадійливі результати з огляду на його широкий спектр антибактеріальної та противірусної дії [1]. За результатами деяких клінічних досліджень, ополіскувачі для ротової порожнини, що містять ЦПХ, здатні знижувати вірусне навантаження SARS-CoV-2, що вказує на потенційні можливості цієї активної речовини в боротьбі з COVID-2019 [2, 3]. ЦПХ як самостійна активна речовина або в комбінації з іншими активними речовинами зазвичай міститься в засобах для місцевого перорального застосування у формі рідини для полоскання ротової порожнини, льодяників і спреїв.

Респіраторні вірусні інфекції є одними з найпоширеніших захворювань у світі. Зазвичай вони проявляються у вигляді таких симптомів, як біль у горлі, кашель, підвищення температури тіла, запалення слизової оболонки носа. Хоча в більшості випадків вірусні інфекції зникають самостійно і не потребують особливого лікування, хворі часто вдаються до самолікування різними препаратами, що полегшують симптоми або усувають причину інфекції [4]. Льодяники з фіксованою комбінацією бензидаміну гідрохлориду (БГ) та ЦПХ мають клінічну ефективність в усуненні симптомів болю в горлі [5]. Результати нещодавнього дослідження *in vitro* також підтвердили їхню віруліцидну дію на вірус SARS-CoV-2 [6]. Віруліцидна ефективність ЦПХ доведена також проти різних штамів вірусу грипу, оскільки дослідження *in vitro* підтвердили руйнування вірусної оболонки під впливом цієї активної речовини [7]. Мета дослідження, проведеного нами

в Інституті мікробіології та імунології медичного факультету в умовах *in vitro*, – підтвердити віруліцидну дію льодяників із фіксованою комбінацією БГ/ЦПХ на вірус грипу А та одночасно порівняти віруліцидну дію ЦПХ та комбінації БГ/ЦПХ у вигляді вільних активних речовин. Метою було також оцінити потенційний вплив на віруліцидну ефективність інших активних речовин (БГ) і допоміжних речовин у складі льодяника.

Методи

Дослідження проводилося відповідно до методів і вимог, встановлених стандартом Словенського інституту стандартизації до оцінки віруліцидної активності лікарських засобів для застосування людиною [8]. Умови дослідження та тривалість експозиції були обрані та пристосовані до фізико-хімічних властивостей ротової порожнини у людини з урахуванням таких чинників, як температура, склад (біологічне навантаження)

і кількість слини, що виділяється в процесі розчинення льодяника, а також динаміки розчинення льодяників (за різної тривалості експозиції).

Виділення та кількісний аналіз вірусу

Досліджуваний ортоміксовірус, тобто вірус грипу А, штам A/Victoria/3/75, підтип гемаглютинин 3, нейрамінідаза 2 (H3N2), був отриманий з Американської колекції типових культур (American Type Culture Collection, ATCC). Попередньо було здійснено розмноження на культурі клітин й визначено кількість вірусу. Використовувалася клітинна лінія MDCK – собача нирка Мадін-Дарбі (*Madin-Darby canine kidney, MDCK*) і найменше основне живильне середовище з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (*fetal bovine serum, FBS*) і трипсину з бичачої підшлункової залози (*trypsin from bovine pancreas, TPCK*) у кінцевій концентрації трипсину 2 мкг/мл.

Концентрацію вірусного ізоляту визначали методом Спірмена – Кербера [9]. Для кожного штаму вірусу визначено розведення вірусу (виражене в одиницях вірусу на 1 мл), за якого вірус інфікує 50% клітин у культурі – медіанна інфікуюча доза для культури тканини (*median tissue culture infectious dose, TCID₅₀/мл*). Вихідна концентрація розмноженого вірусу становила 10^{9.41} TCID₅₀/мл (табл. 1).

Випробування на віруліцидність та контрольні процедури

Досліджувані субстанції розчиняли у жорсткій воді з додаванням «інтерферувальної речовини» (далі – суспензія) з метою створення умов із біологічним навантаженням, що імітує склад слини. Суспензією був розчин бичачого сироваткового альбуміну (*bovine serum albumin, BSA*) 3,0 г/л води з еритроцитами в концентрації 3,0 мл/л. Культури вірусу піддавали дії досліджуваних субстанцій за температури 37 °C протягом 1, 5 та 15 хв, що відповідає середньому часу розсмоктування льодяників (5-10 хв). Застосовували 3 концентрації досліджуваних субстанцій, отримані шляхом розчинення досліджуваної субстанції в 4 (висока), 20 (середня) та 30 мл (низька концентрація) суспензії. Досліджувані субстанції представлені в таблиці 2.

Окрім досліджень з метою оцінки віруліцидної дії кожної досліджуваної субстанції, проводилися також відповідні контрольні процедури: контроль клітин і вірусу, контроль вірусу протягом усього періоду інкубації, пригнічення активності досліджуваної субстанції в крижаному клітинному середовищі, вплив досліджуваної субстанції на чутливість клітини до вірусу та її цитотоксичний ефект на клітині.

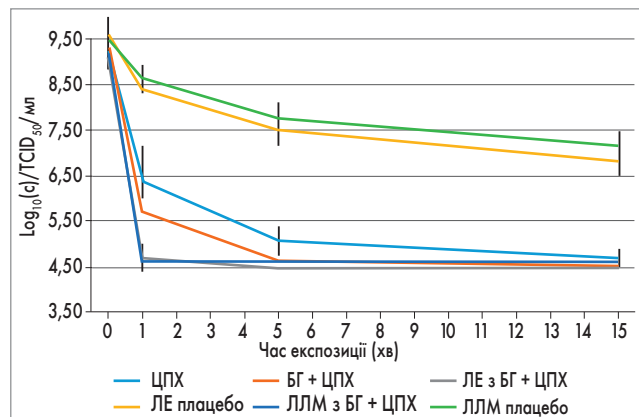


Рис. 1. Експозиція вірусу грипу А в досліджуваній субстанції в найвищій концентрації (еквівалент розчинення одного льодяника у 4 мл суспензії) у трьох різних значеннях часу експозиції

Примітки: TCID₅₀/мл – 50%-ва доза, що інфікує культуру тканини, ЛЕ – льодяник, евкаліпт, ЛЛМ – льодяник, лимон, мед.

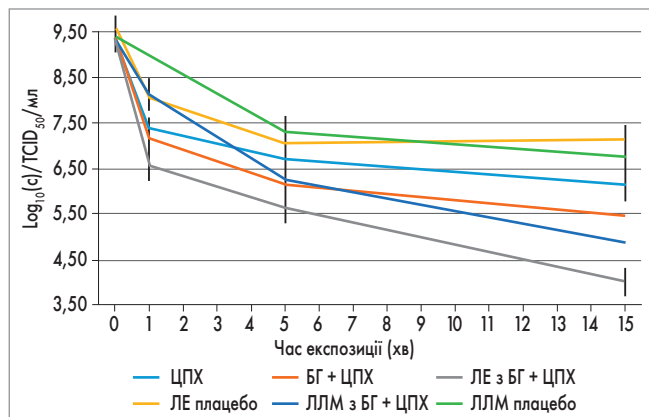


Рис. 2. Експозиція вірусу грипу А в досліджуваній субстанції в середній концентрації (еквівалент розчинення одного льодяника в 20 мл суспензії) у трьох різних значеннях часу експозиції

Примітки: TCID₅₀/мл – 50%-ва доза, що інфікує культуру тканини, ЛЕ – льодяник, евкаліпт, ЛЛМ – льодяник, лимон, мед.

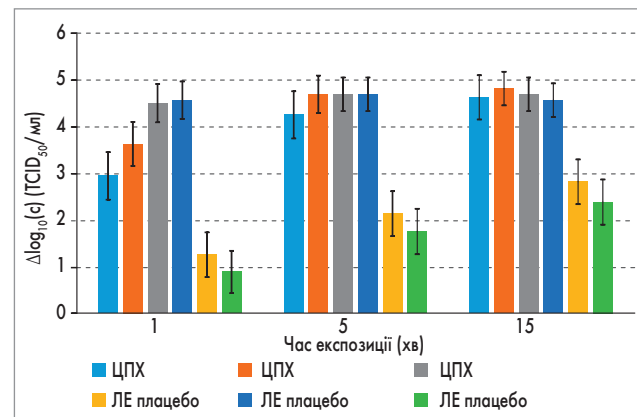


Рис. 3. Порівняння зниження кількості інфекційних вірусів у найвищій концентрації (еквівалент розчинення одного льодяника у 4 мл суспензії) у трьох різних значеннях часу експозиції

Примітки: TCID₅₀/мл – 50%-ва доза, що інфікує культуру тканини, ЛЕ – льодяник, евкаліпт, ЛЛМ – льодяник, лимон, мед.

Таблиця 1. Вихідні концентрації вірусу, що використовувався у дослідженні				
Досліджуваний вірус	Позначення штаму	Перший день ізоляції	log ₁₀ (с)	95% ДІ
Вірус грипу А, підтип H3N2	A/Victoria/3/75	03.05.2021	9,41	±0,67

Примітки: ДІ – довірчий інтервал, H3N2 – гемаглютинин 3, нейрамінідаза 2.

Таблиця 2. Досліджувані субстанції, що використовувалися у дослідженні	
Досліджувана субстанція	Склад досліджуваної субстанції
Льодяник із БГ та ЦПХ, евкаліпт (льодяник Септолете® тотал)	3 мг БГ, 1 мг ЦПХ, олія евкаліпту, левоментол, кислота лимонна (Е 330), сукралоза (Е 955), ізомальт (Е 953), діамантовий блакитний FCF (Е 133)
Льодяник плацебо, евкаліпт	Олія евкаліпту, левоментол, кислота лимонна (Е 330), сукралоза (Е 955), ізомальт (Е 953), діамантовий блакитний FCF (Е 133)
Льодяник із БГ та ЦПХ, лимон, мед (льодяник Септолете® тотал)	3 мг БГ, 1 мг ЦПХ, олія м'яти перцевої, левоментол, сукралоза (Е 955), кислота лимонна (Е 330), ізомальт (Е 953), ароматизатор лимона, ароматизатор меду, барвник куркумін (Е 100), натрію бензоат (Е 211)
Льодяник плацебо, лимон, мед	Олія м'яти перцевої, левоментол, сукралоза (Е 955), кислота лимонна (Е 330), ізомальт (Е 953), ароматизатор лимона, ароматизатор меду, барвник куркумін (Е 100), натрію бензоат (Е 211)
ЦПХ у вигляді вільної активної речовини	1 мг ЦПХ
БГ та ЦПХ у вигляді вільних активних речовин	3 мг БГ, 1 мг ЦПХ

Примітки: Е – Європа, FCF – барвник для фарбування харчових продуктів (for coloring food).

Таблиця 3. Досліджувані субстанції зі значеннями рН та зниженням концентрації інфекційних частинок вірусу грипу А з огляду на концентрацію та час експозиції						
	ЦПХ у вигляді вільної активної речовини	ЦПХ + БГ у вигляді вільної активної речовини	Льодяники з БГ і ЦПХ, евкаліпт	Льодяники плацебо, евкаліпт	Льодяники з БГ і ЦПХ, лимон, мед	Льодяники плацебо, лимон, мед
Висока концентрація (розчин у 4 мл суспензії)						
Значення рН	7,86	8,06	3,27	3,14	2,73	2,69
Час (хв)	Δlog ₁₀ (с) ± 95% ДІ					
1	-2,94±0,51	-3,63±0,47	-4,50±0,41	-1,25±0,48	-4,57±0,40	-0,88±0,45
5	-4,25±0,47	-4,69±0,40	-4,69±0,36	-2,13±0,48	-4,69±0,36	-1,75±0,49
15	-4,63±0,41	-4,82±0,36	-4,69±0,36	-2,82±0,48	-4,57±0,36	-2,38±0,48
Середня концентрація (розчин у 20 мл суспензії)						
Значення рН	7,92	7,93	4,45	4,61	3,72	3,55
Час (хв)	Δlog ₁₀ (с) ± 95% ДІ					
1	-2,06±0,42	-1,63±0,49	-2,88±0,49	-1,50±0,45	-1,25±0,48	-0,56±0,47
5	-2,75±0,48	-3,19±0,50	-3,81±0,49	-2,50±0,47	-3,13±0,47	-2,06±0,47
15	-3,31±0,51	-3,75±0,47	-5,44±0,45	-2,44±0,45	-4,50±0,44	-2,62±0,48
Низька концентрація (розчин у 30 мл суспензії)						
Значення рН	7,85	7,97	5,33	5,21	4,00	4,04
Час (хв)	Δlog ₁₀ (с) ± 95% ДІ					
1	-0,62±0,34	-1,19±0,47	-1,50±0,44	-1,00±0,45	-1,26±0,47	-0,75±0,45
5	-1,87±0,32	-1,63±0,44	-2,25±0,47	-1,32±0,47	-2,00±0,47	-1,19±0,47
15	-2,62±0,34	-3,38±0,47	-3,32±0,41	-1,94±0,47	-3,00±0,43	-2,13±0,40

Таблиця 4. Результати випробувань віруліцидної дії на вірус грипу А

[illegible]

Результати контрольних процедур

В умовах дослідження вірус залишався стабільним протягом усього періоду дослідження. значного зниження концентрації інфекційних вірусних частинок не спостерігалось. Було продемонстровано інгібуючий вплив крижаного середовища на дію досліджуваної субстанції у високій концентрації (досліджувана субстанція, розведена в 4 мл середовища). Титр вірусу до і після експозиції істотно не відрізнявся і не перевищував різницю в 1-log_{10} (с) від значення концентрації, встановленого як граничне значення згідно зі стандартними рекомендаціями.

Жодна з досліджуваних субстанцій у найвищій нецитотоксичній концентрації не вплинула на чутливість клітин до вірусу. Спостерігалися лише дуже незначні, але прийнятні відхилення.

Цитотокичність досліджуваних субстанцій у високій концентрації перевіряли в розведеннях від 10^{-1} до 10^{-11} . Цитотоксичність з деформацією або руйнуванням клітинного шару досліджуваних субстанцій ЦПХ, комбінації БГ і ЦПХ у вигляді вільних активних речовин, льодяників із БГ і ЦПХ зі смаком евкаліпта та льодяників плащебо зі смаком евкаліпта виявили в розведеннях 10^{-1} та 10^{-2} . Проте для льодяників зі смаком лимона та мелу з БГ і ЦПХ та льодяників плащебо зі смаком лимона та мелу цитотоксичність виявили лише в розведенні 10^{-1} . З огляду на це визначили межу для встановлення цитопатичного ефекту вірусу. Рівень цитотоксичності відносно розведення вірусу в досліджуваній суспензії наведено в таблиці 4.

Результати ефективності досліджуваних субстанцій на інактивацію вірусу

Вірус піддавався впливу кожної концентрації шляхом проведення двох аналізів у різні дні. Кінцевий результат відображено як середнє значення результатів обох аналізів. Результати експозиції в числовій формі представлені в таблицях 3 та 4, а в графічній – на рисунках 1-3.

Віруліцидна дія була сильно вираженою при найвищій концентрації, що еквівалентно розчиненню одного людянина в 4 мл суспензії. При середній концентрації, що еквівалентно розчиненню одного людянина в 20 мл суспензії, віруліцидна дія була вираженою, але зі змінною динамікою, оскільки подібні ефекти спостерігалися лише через 15 хв.

Результати демонструють помітну різницю між віруліцидною дією льодяників, що містять активні речовини, та льодяників плацебо. Така різниця є найбільш помітною при високих і середніх концентраціях, але також спостерігається і при низьких концентраціях.

Обговорення

Віруліцидність ІПТХ на вірус грипу вже була досліджена й підтверджена раніше в деяких інших дослідженнях [7]. Проведене нещодавно дослідження *in vitro* продемонструвало віруліцидну дію на вірус SARS-CoV-2 людзяників із комбінацією БГ та ІПТХ. Концентрація вірусу в суспензії з найвищою концентрацією вже за хвилину знизилася на $4 \log_{10}$ [6].

Це дослідження, як очікувалося, продемонструвало подібні тенденції віруліцидної активності льодяників із комбінацією БГ та ЦПХ щодо вірусу

грипу А, оскільки в обох випадках використані *in vitro* віруси з оболонкою, на які, як передбачається, ЦПХ має пряму дію [6, 7]. Дослідження проводилося за однаковим протоколом і за таких же умов, як і дослідження з вірусом SARS-CoV-2.

Істотною відмінністю був лише трипсин у підтримувальному середовищі, додавання якого потрібно для забезпечення інфекційності вірусу грипу. У зв'язку з надзвичайно низькою концентрацією трипсину в живильному середовищі його дію на досліджувану субстанцію не перевіряли, оскільки початкова інкубація вірусу з активною речовиною була без цієї добавки. Трипсин додавали лише в те середовище, в якому були приготувані розведення досліджуваної субстанції з вірусом, перед нанесенням на культури клітин.

Найвища віруліцидна дія усіх досліджуваних субстанцій, як очікувалося, спостерігалася в суспензії з високою концентрацією, де було доведено, що концентрація інфекційних вірусів вже через 5 хв знижується більше ніж на $4 \log_{10}$ (с) (зниження у 10 000 разів, або на 99,99 %). Льодяники з комбінацією БГ і ЦПХ (зі смаком евалліпта, лимона та меду) досягли зниження на $4 \log_{10}$ (с) вже через 1 хв (рис. 1, 3). Зважаючи на всі контрольні процедури, результати свідчать про високу віруліцидну ефективність досліджуваних субстанцій. Віруліцидна дія льодяників плацебо (зі смаком евалліпта, лимона та меду) значно нижча за дію льодяників із комбінацією БГ та ЦПХ, як показано на рисунках 1, 3 та в таблиці. 4. Льодяники з комбінацією БГ і ЦПХ досягли відповідного зниження концентрації інфекційних вірусів на $4 \log_{10}$ (с) також у суспензії із середньою концентрацією. Враховуючи всі параметри динаміки розчинення льодяника та слиновиділення (приблизно від 4,0 до 5,0 мл/хв при стимуляції, наприклад, розсмоктуванні льодяника), вони найбільше наблизилися до передбачуваної концентрації, яка могла б бути досягнута при фактичному вживанні льодяника, припускаючи, що на його розчинення потрібно 5-10 хв [10]. ЦПХ і комбінація БГ/ЦПХ у вигляді вільних активних речовин також наблизилися до межі зниження на $4 \log_{10}$ (с).

Як і в попередньому дослідженні *in vitro* із SARS-CoV-2, так і в дослідженні штаму вірусу грипу досліджували субстанції в низьких концентраціях не продемонстрували зниження на $4 \log_{10}$ (с) навіть через 15 хв [6]. Чітка тенденція до зниження кількості вірусу спостерігалася протягом 15 хв контакту із суспензіями досліджуваних субстанцій при всіх концентраціях (за винятком льодяників плацебо).

Як льодяники з комбінацією БГ та ЦПХ, так і БГ та ЦПХ у вигляді вільних активних речовин продемонстрували чітку динаміку віруліцидної активності – найвишдше ефекти виявлялися при найвищій концентрації, а швидкість дії знижувалася зі зменшенням концентрації. Крива зниження концентрації вірусів із часом ставала все більш пласкою при середній, а ще більше – за найнижчої концентрації (рис. 1, 2). Така динаміка не спостерігалася з льодяниками плацебо (з обома смаками), щодо яких через 15 хв спостерігався постійний ефект зниження концентрації інфекційних вірусів від 1,94 до 2,82 $\log_{10}$ (с). Як було встановлено під час досліджень *in vitro* з вірусом SARS-CoV-2, чинником інактивації

вірусів, ймовірно, є також низьке значення рН, аналогічне до значення у льодяників із комбінацією БГ і ЦПХ [6].

Однією з найважливіших властивостей, які повинен мати пероральний антисептик, є стійкість у місці нанесення. Відомо, що стійкість ЦПХ висока (від 3 до 5 год), завдяки чому його ефективність проти вірусу може бути більш високою та тривалішою [1].

Крім того, досягненню вищої ефективності може сприяти також лікарська форма. Лікарськими формами для місцевого полегшення болю в горлі є ополіскувачі для ротової порожнини, спреї та льодяники. Було доведено, що після застосування

Септолете®

ТОТАЛ

Твоє горло – твоя сила.

Потрійна сила – швидка дія.

Налаштуй хворе горло!

Септолете тотал. Комбінація місцевого НПЗЗ та антисептику. БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИД + ЦЕТИЛПІРИДИНІЮ ХЛОРИД

- **Знеболювальна дія**
- **Протизапальна дія**
- **Антисептична дія**

www.septolete.ua

Наші високі технології та знання для створення ефективних та безпечних препаратів найвищої якості.

Септолете тотал. Містить бензидаміну гідрохлорид та цетилпіридинію хлорид. Застосовується для симптоматичного лікування інфекцій горла та ротової порожнини. Побічні реакції: порушення з боку шлунково-кишкового тракту, реакції підвищеної чутливості. Інформація призначена для професійного використання медичними та фармацевтичними працівниками.

ТОВ «КРКА УКРАЇНА», 01015, Україна, м. Київ, вул. Старонаводницька, 13, секція «В-Г», офіс 127, п/с 42.
Тел.: +380 44 354-26-68, факс: +380 44 354-26-67, e-mail: info.ua@krka.biz, вебсайт: www.krka.ua