

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

3 (315)

**МАМЫР – МАУСЫМ 2016 ж.
МАЙ – ИЮНЬ 2016 г.
MAY – JUNE 2016**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

**АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK**

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

Ж. А. Арзықұлов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к ең е с і:

Абжанов Архат (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

Ж. А. Арзыкулов

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**, доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахисhev**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

Абжанов Архат (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov,
academician of NAS RK

Editorial board:

N.A. Aitkhozhina, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

Abzhanov Arkhat (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.
ISSN 2224-5308

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 118 – 126

**THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC ACTIVITIES
OF THE NEW ANTIVIRAL PLANT ORIGIN PREPARATION
“FLAVOVIR” IN VITRO AND IN VIVO**

A. S. Turmagambetova, E. S. Omirtaeva, M. S. Alexyuk, A. P. Bogoyavlenskiy, V. E. Berezin

Institute of microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: aichyck@mail.ru

Key words: flavonoids, influenza virus, antiviral preparations, suppression of infectivity.

Abstract. Viruses are pathogens of more than 60% of infectious diseases of humans, animals and plants. In current migratory mobility of the population outbreak in one part of the world could be seen as a threat to any other region. One of the most actual problems of modern virology is the creation of new antiviral therapeutic and prophylactic preparations. It is believed that the plant preparations possess a wide spectrum of biological activity and are able to affect to different stages of virus-cell interaction. High anti-viral activity in a number of compounds of terpenoid and flavonoid nature, isolated from the plants of the flora of Kazakhstan was established. Prophylactic and therapeutic efficacies of antiviral plant origin preparation “Flavovir” were studied. High therapeutic activity of this preparation is shown in model experiments in vitro and in vivo. It is shown that the therapeutic activity of “Flavovir” exceeds the therapeutic activity of commercial drugs “Relenza” and “Rimantadine”. Therapeutic activity of “Flavovir” is comparable to the activity of commercial anti-influenza drug “Tamiflu”. Moderate prophylactic activity of the “Flavovir” to influenza virus subtype H3N2 and pronounced prophylactic activity against drug-resistant influenza virus antigen subtype H5N3 showed in vitro. High prophylactic activity of “Flavovir” in relation to the epidemiologically significant strain of influenza virus (H3N2) established in experiments in vivo. The residual infectivity of influenza virus (H3N2) in the lungs of infected mice after intranasal administration of “Flavovir” at a dose of 200.0 mkg/mice decreased by 0.5 lg, which was comparable to the activity of commercial preventive antiviral drugs “Relenza” and “Rimantadine”.

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ «ФЛАВОВИР» IN VITRO И IN VIVO

А. С. Турмагамбетова, Э. С. Омиртаева, М. С. Алексюк,
А. П. Богоявленский, В. Э. Березин

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: флавоноиды, вирус, грипп, противовирусные, препараты, подавление инфекционности.

Аннотация. Вирусы являются возбудителями более 60% инфекционных заболеваний человека, животных и растений. При современной миграционной подвижности населения вспышка заболевания в одной части земного шара может рассматриваться как угроза для любого другого региона. Одной из наиболее актуальных проблем современной вирусологии является создание новых противовирусных лечебных и профилактических препаратов. Считается, что растительные препараты обладают широким спектром биологической активности и способны оказывать воздействие на различные этапы взаимодействия вируса с клеткой. Установлена высокая противовирусная активность у ряда соединений терпеноидной и флавоноидной природы, выделенных из растений флоры Казахстана. В работе изучалась профилактическая и терапевтическая активность противовирусного препарата растительного происхождения «Флавомир». Установлена высокая терапевтическая активность данного препарата при испытании в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что терапевтическая активность препарата «Флавомир» превосходит терапевтическую активность коммерческих препаратов «Реленза» и «Ремантадин» и сопоставима с активностью импортного коммерческого противогриппозного препарата «Тамифлю». В опытах *in vitro* показана умеренная профилактическая активность препарата «Флавомир» по отношению к вирусу гриппа подтипа H3N2 и выраженная профилактическая активность по отношению к резистентному вирусу гриппа антигенного подтипа H5N3, устойчивому к действию коммерческих противовирусных препаратов. В опытах *in vivo* установлена высокая профилактическая активность препарата «Флавомир» по отношению к эпидемически значимому штамму вируса гриппа H3N2, сравнимая с профилактической активностью коммерческих противовирусных препаратов «Реленза» и «Ремантадин».

Введение. Вирусы являются возбудителями более 60% инфекционных заболеваний человека, животных и растений. При этом доля особо опасных и наиболее массовых вирусных инфекций человека и животных составляет не менее половины от известных инфекционных заболеваний, а число вновь открываемых вирусов ежегодно увеличивается. Вирусные инфекции являются одной из основных причин смертности среди людей, как в развитых странах, так и странах со слабой экономикой. В случае развития массовых вспышек вирусных инфекций, таких как оспа, геморрагические лихорадки, бешенство, гепатит, СПИД, грипп и многих других, обществу наносится невосполнимый социальный и экономический урон [1].

При современной миграционной активности населения вспышка заболевания в одной части земного шара может рассматриваться как угроза для любого другого региона. Например, появившийся весной 2009 г. в Мексике новый мутантный штамм «свиного» гриппа H1N1 уже спустя 6 месяцев был зарегистрирован в подавляющем числе стран мира. Чрезвычайно велик и экономический ущерб от вспышек вирусных инфекций. Так, потери в сельском хозяйстве, связанные только с двумя возбудителями – вирусом гриппа птиц и вирусом болезни Ньюкасла, ежегодно оцениваются более чем 200 миллиардов долларов США. Затраты на медицинскую помощь во время крупномасштабных эпидемий гриппа, связанные с расходами на стационарное лечение, потери от временной нетрудоспособности населения, лечение постгриппозных осложнений и т.д. также исчисляются сотнями миллиардов долларов [2-4].

Борьба с вирусными инфекциями осуществляется по двум направлениям: 1 – диагностика, мониторинг и контроль; 2 – профилактика и лечение. Своевременное выявление новых очагов вирусных инфекций и мониторинг существующих, эффективная диагностика и обнаружение вирусов

на ранних стадиях распространения позволяют предупредить или значительно сократить ущерб от вспышек вирусных инфекций. Если все же началось развитие эпидемического процесса на первое место, помимо карантинных мероприятий, выходит противовирусная терапия, позволяющая ускорить процесс выздоровления и облегчить течение вирусного заболевания [5].

Отрасль биоиндустрии, связанная с разработкой и производством медицинских и ветеринарных противовирусных препаратов, относится к числу наиболее быстро растущих и прибыльных в мире. Общий объем биотехнологической продукции, имеющий отношение к противовирусным препаратам, оценивается более чем в триллион долларов в год. Для Казахстана интенсивное развитие собственной фармацевтической промышленности и рынка биопрепаратов на сегодняшний день является стратегической задачей, позволяющей решить многие проблемы, включая улучшение здоровья населения, рост экономического благополучия государства и обеспечение биологической безопасности страны.

Одной из наиболее актуальных проблем современной вирусологии является создание новых противовирусных лечебных и профилактических препаратов. Расширение знаний о биохимическом строении, свойствах вирусов, а также механизмах их взаимодействия с клетками, позволило определить основные направления поиска противовирусных химиотерапевтических средств. Вместе с тем, создание антивирусных препаратов, специфически блокирующих вирусную инфекцию, но не повреждающих клетки организма, является весьма сложной задачей, поэтому результаты многолетних поисков антивирусных веществ оказались весьма скромными и увенчались открытием лишь единичных химиопрепаратов. Большое значение также придается разработке таких препаратов, которые были бы способны не только блокировать процесс репродукции вируса, но и стимулировать природную иммунную защиту организма от вирусных инфекций [5].

Растительные препараты обладают широким спектром биологической активности и могут воздействовать на различные пути взаимодействия вируса с клеткой. Установлена высокая антивирусная активность у ряда соединений терпеноидной и флавоноидной природы, выделенных из растений флоры Казахстана [6-9]. Ранее нами был получен новый противовирусный препарат «Флавомир» на основе флавоноидов растительного происхождения [10]. Лабораторные испытания этого препарата продемонстрировали его высокую активность в отношении широкого спектра вирусов, в том числе высокопатогенных штаммов вируса гриппа человека, животных и птиц. Показано отсутствие токсических свойств у данного препарата в терапевтических концентрациях. Препарат «Флавомир» является весьма перспективным в качестве лечебного противовирусного средства и его производство может быть организовано в Казахстане из доступного растительного сырья.

Целью данной работы являлось изучение терапевтической и профилактической активности противовирусного препарата «Флавомир» в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Препарат «Флавомир» получали путём водно-спиртовой экстракции растительного сырья. Ткани растений измельчали до размера частиц 2-3 мм. Для удаления липидов измельчённое сырьё двукратно, в течение четырёх часов обрабатывали 5-кратным объёмом этилового эфира уксусной кислоты. Экстракцию осуществляли 5-кратным объёмом 80% этилового спирта в течение четырёх часов. Полученный экстракт отфильтровывали и высушивали при температуре не выше 56°C. Суспензию и растворы препарата «Флавомир» готовили на фосфатно-солевом буфере, pH 7,2.

В качестве объектов исследования использовали вирусы гриппа с различной антигенной формулой, штаммы: А/Алматы/8/98 (H3N2), А/Aichi/2/68 (H3N2) и А/крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3).

Вирусы выращивали в аллантоисной полости 10-11-дневных куриных эмбрионов (КЭ) в течение 36-48 ч. при 37°C. Инфекционный титр определяли на куриных эмбрионах методом предельных разведений. О наличии вируса судили по реакции гемагглютинирующей активности. Титр инфекционности вирусов высчитывали по методу Рида и Менча [11] и выражали в lg ЭИД₅₀/мл. Титр вируса в аллантоисной жидкости составлял 10^7 - 10^9 ЭИД₅₀/мл.

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике с использованием 0,75% взвеси куриных эритроцитов [12].

Терапевтическую и профилактическую активность *in vivo* препарата «Флавовир» изучали на белых беспородных мышах обоего пола массой 19-21 грамм. В экспериментах использовали животных, на которых ранее не проводили никаких испытаний. За 2 часа до проведения исследований исключали возможность потребления животными корма и воды. Каждая экспериментальная группа содержала по 7 животных.

При изучении терапевтической активности препарата «Флавовир» животных заражали вирусом гриппа, штамм, A/Aichi/2/68, адаптированным к мышам. Предварительно вирус выращивали в аллантоисной полости 10-11 дневных куриных эмбрионов и затем пассировали на мышах. Мышей инфицировали интраназально вирусом в дозе 100 ЭИД₅₀. После инфицирования животным также интраназально вводили препарат «Флавовир» в дозе 10,0 мг/кг (200 мкг/мышь). Препарат применяли через 24, 48, 72 и 96 часов после заражения.

При изучении профилактической активности мышам на протяжении 4 дней интраназально вводили препарат «Флавовир» в дозе 10,0 мг/кг. Контрольные группы мышей получали коммерческие противовирусные препараты в профилактических дозах: «Ремантадин» (5,0 мг/кг), «Реленза» (10 мг/кг) и «Тамифлю» (10 мг/кг), а также изотонический раствор хлорида натрия (плацебо). На 5 сутки животных заражали интраназально вирусом гриппа, A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 100 ЭИД₅₀, как описано выше. Наличие профилактической активности у исследуемого препарата оценивали по остаточной инфекционной активности вируса в легких мышей через 7 дней после заражения.

Терапевтическое действие препарата «Флавовир» *in vitro* изучали на модели 10-11 дневных куриных эмбрионов. КЭ заражали вирусом гриппа, штаммы А/крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3) и А/Алматы/8/98 (H3N2), в дозе 10 ЭИД₅₀. Через 3 часа после заражения в хорион-аллантоисную полость КЭ однократно вводили исследуемый препарат в дозе 0,2 мг и 1,0 мг на КЭ. Контрольной группе в хорион-аллантоисную полость однократно вводили изотонический раствор хлорида натрия (плацебо). Активность размножения вируса гриппа в КЭ оценивали путем измерения количества ампликонов матричного гена методом ПЦР в реальном времени. При этом сравнивали способность подавлять репродукцию вируса гриппа у экспериментального и коммерческих противовирусных препаратов.

Аналогичным образом *in vitro* изучали профилактическое действие препарата «Флавовир». В хорион-аллантоисную полость КЭ однократно вводили «Флавовир» в дозе 0,2 мг и 1,0 мг на куриный эмбрион. Контрольной группе в хорион-аллантоисную полость однократно вводили изотонический раствор хлорида натрия. Через 8 часов после введения препарата КЭ заражали вирусом гриппа в дозе 10 ЭИД₅₀. Профилактическую активность изучаемого препарата оценивали по его способности подавлять репродукцию вируса гриппа при предварительном применении.

Суммарную РНК выделяли из 200 мкл вирусосодержащей аллантоисной жидкости с помощью набора для экстракции РНК Rneasy Mini Kit («QIAGEN, GmbH», Германия) согласно методическому руководству с небольшими модификациями.

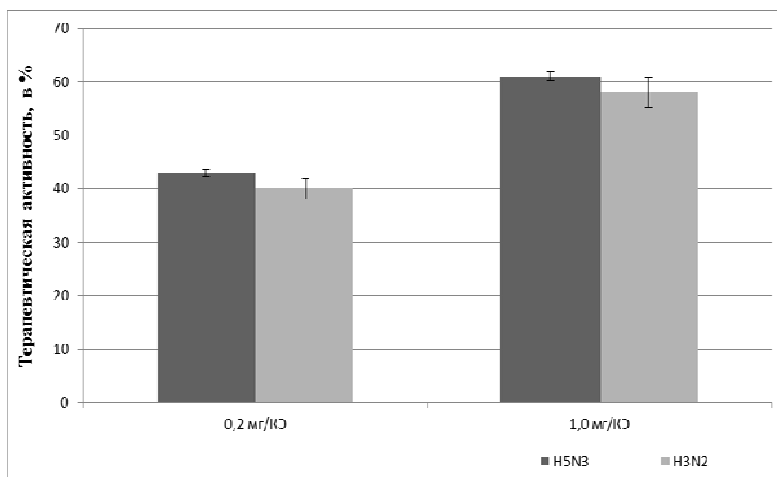
Обратную транскрипцию осуществляли с помощью M-MLV («Promega», США) в 5 мкл реакционной смеси (2,7 мкл РНК (50 нг), 0,84 мкл воды, 1 мкл 5x буфера для обратной транскриптазы («Promega», США), 0,19 мкл 2 мМ смеси dNTPs, 0,25 мкл 20 pmol праймера Uni-12 5'-gca aaa gca gg-3' и 0,125 мкл M-MLV (1U/мкл). Реакцию проводили при 37⁰С в течение 60 мин.

ПЦР 45 циклов проводили в 20 мкл реакционной смеси (4 мкл ДНК матрицы, 8 мкл SybrGreen, по 1 мкл 20 pmol прямого и обратного праймеров, вода) на термоциклере «PicoReal» (Финляндия) при следующих режимах: 94⁰С – 1 мин, 48⁰С – 1 мин, 72⁰С – 3 мин. Динамику накопления ампликонов изучали с использованием фрагмента гена матричного белка (праймеры M+5 5'-aag cag gta gat att gaa ag-3' и M-1027 5'-agt aga aac aag gta gt-3').

Обработку данных производили в программе Microsoft Office Excel 2003. Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [13].

Результаты исследования

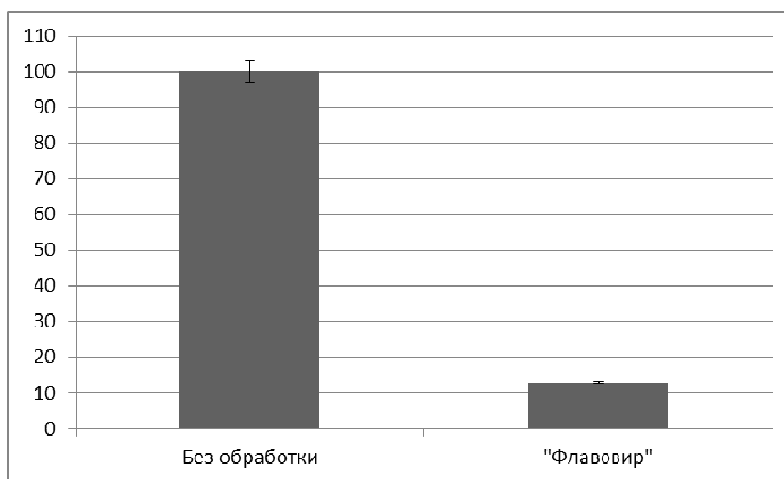
Терапевтическую активность препарата «Флавовир» исследовали в опытах *in vitro* на модели куриных эмбрионов с использованием вирусов гриппа птиц и человека: А/крячка/Южная Африка/1/61 (H5N3) и А/Алматы/8/98 (H3N2). Установлено, что при терапевтическом применении препарата «Флавовир» в дозе 0,2 мг/КЭ активность размножения вируса гриппа снижалась на 40%, а при увеличении дозы до 1,0 мг/КЭ подавление размножения вируса достигало 60% (рисунок 1).



Примечание. По оси ординат % ампликонов гена М белка вируса гриппа.

Рисунок 1 – Изучение терапевтического действия препарата «Флавовир» *in vitro* на модели вируса гриппа

Определение терапевтических свойств препарата «Флавовир» *in vitro* методом ПЦР в режиме реального времени также выявило существенное подавление репликативной активности вируса гриппа после обработки данным препаратом. Показано, что внесение препарата «Флавовир» снижало интенсивность репродукции вируса гриппа не менее чем в 8 раз (рисунок 2).



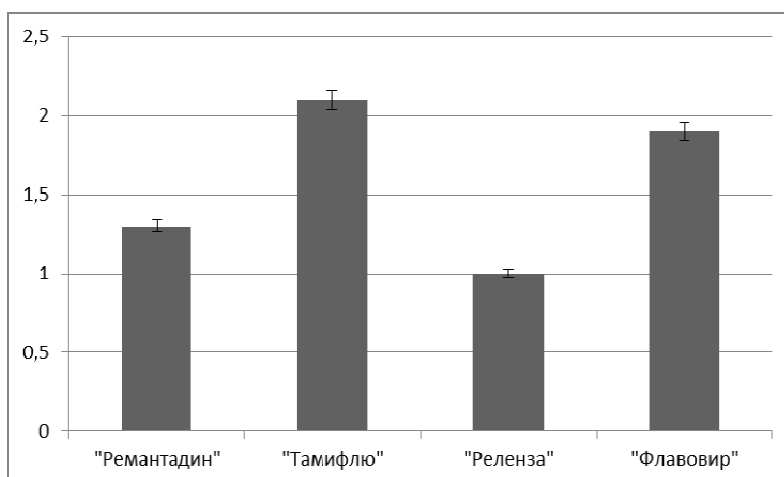
Примечание. По оси ординат % ампликонов гена М белка вируса гриппа.

Рисунок 2 – Количество ампликонов гена М белка вируса гриппа до и после обработки куриных эмбрионов препаратом «Флавовир» в дозе 1,0 мг/КЭ

Таким образом, установлено, что терапевтическая активность препарата «Флавовир» в дозе 1,0 мг/КЭ составляла не менее 60% для обоих изученных вирусов гриппа. Следует отметить, что для анализа были выбраны вирусы гриппа двух различных антигенных подтипов: H5N3 и H3N2, а также относящиеся к вирусам гриппа птиц (штамм А/крячка/Южная Африка/1/61) и гриппа человека (штамм А/Алматы/8/98).

Также было проведено изучение терапевтической активности препарата «Флавомир» в опытах *in vivo*. Для этих экспериментов был использован вирус гриппа, штамм A/Aichi/2/68 (H3N2), вызывающий смертельную пневмонию у мышей. Терапевтическую активность препарата «Флавомир» определяли путем измерения остаточной инфекционности вируса в легких зараженных мышей и анализа динамики изменения массы тела мышей после заражения вирусом и терапевтического приема препарата. Группы мышей по 7 особей заражали вирусом гриппа, штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 100 ЭИД₅₀ (50 мкл/мышь). Через 24, 48, 72 и 96 часов после заражения мышам интраназально вводили препарат «Флавомир» в дозе 200 мкг/мышь. Контрольные группы мышей через аналогичные интервалы времени получали коммерческие противовирусные препараты в терапевтических дозах: «Ремантадин» 100,0 мкг/мышь, «Реленза» 200 мкг/мышь и «Тамифлю» 200 мкг/мышь, а также изотонический раствор хлорида натрия (плацебо) перорально в объеме 100 мкл/мышь.

Как показали результаты проведенных экспериментов, применение разработанного противовирусного препарата «Флавомир» приводило к заметному снижению активности инфекционного процесса в легких мышей (рисунок 3). Так, остаточная инфекционность вируса гриппа в легких зараженных мышей после применения препарата «Флавомир» сокращалась на 1,9 lg. Это было сопоставимо с подавлением инфекционности вируса в легких мышей после применения наиболее сильного из известных коммерческих антигриппозных препаратов «Тамифлю» (2,1 lg) и заметно превосходило активность других коммерческих противогриппозных препаратов «Ремантадин» (1,3 lg) и «Реленза» (1,0 lg).



Примечание. По оси ординат разница титра инфекционности (lg) в легких мышей между группами мышей, получавшими препарат и не получавшими препарат.

Рисунок 3 – Изучение терапевтического действия препарата «Флавомир» в опытах *in vivo* при заражении мышей вирусом гриппа, штамм A/Aichi/2/68 (H3N2)

Полученные результаты свидетельствуют о высокой терапевтической активности разработанного противовирусного препарата растительного происхождения «Флавомир» при испытании *in vivo* в модельных экспериментах на животных.

В другой серии экспериментов *in vitro* и *in vivo* было проведено изучение профилактической активности препарата «Флавомир».

Профилактическое действие препарата «Флавомир» в отношении вируса гриппа птиц A/краска/Южная Африка/1/61 (H5N3) и вируса гриппа человека A/Алматы/8/98 (H3N2) в опытах *in vitro* изучали на модели 10-11 дневных куриных эмбрионов. Профилактическую активность препарата оценивали по его способности подавлять репродукцию вируса гриппа. Как показали результаты опытов, профилактическое действие препарата «Флавомир» имело дозо-зависимый характер. При введении препарата «Флавомир» в дозе 0,2 мг/КЭ уровень защиты от заражения составлял 20% для вируса гриппа H5N3 и 11% для вируса гриппа H3N2. При введении препарата в дозе 1,0 мг/КЭ уровень защиты от заражения возрастал до 40% для вируса гриппа H5N3 и до 20% для вируса гриппа H3N2 (рисунок 4).

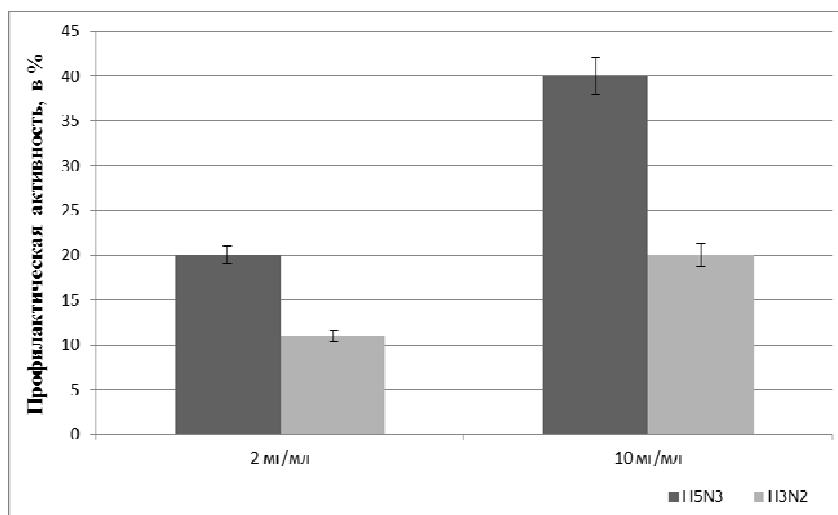
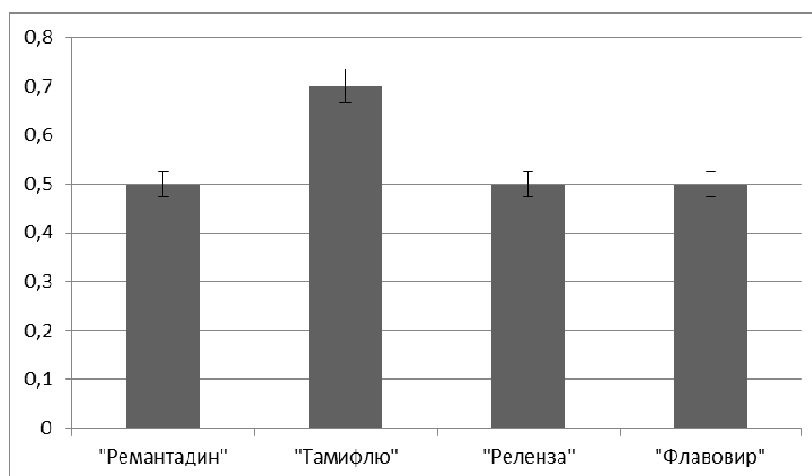


Рисунок 4 – Изучение профилактического действия препарата «Флавовир» in vitro на модели вируса гриппа двух подтипов (H5N3 и H3N2)

Профилактическую активность препарата «Флавовир» в опытах in vivo оценивали при заражении мышей вирусом гриппа A/Aichi/2/68. Профилактическое действие определяли в соответствии с результатами измерения остаточной инфекционности вируса гриппа в легких мышей и определения массы тела зараженных животных, предварительно получавших противовирусный препарат. Результаты исследования представлены на рисунке 5.



Примечание. По оси ординат разница титра инфекционности (lg) в легких мышей между группами мышей, получавшими препарат и не получавшими препарат.

Рисунок 5 – Изучение профилактического действия препарата «Флавовир» в опытах in vivo при заражении мышей вирусом гриппа, штамм A/Aichi/2/68 (H3N2)

Показано, что остаточная инфекционность вируса гриппа в легких зараженных мышей после профилактического применения препарата «Флавовир» в дозе 200,0 мкг/мышь уменьшалась на 0,50lg, что было сопоставимо с профилактической активностью коммерческих противовирусных препаратов «Реленза» и «Ремантадин», и незначительно уступало профилактической активности противовирусного препарата «Тамифлю» (0,7 lg).

Закключение. Растения являются богатым источником для получения различных лекарственных средств, в том числе препаратов, обладающих противовирусной активностью. Достоинством противовирусных препаратов растительного происхождения является их широкий спектр биологической активности и способность воздействовать на различные этапы репродукции вируса.

Ранее была показана высокая антивирусная активность у ряда соединений терпеноидной и флавоноидной природы, выделенных из растений флоры Казахстана [6-9]. Одним из перспективных препаратов является «Флавомир» – противовирусное средство на основе флавоноидов растительного происхождения [10].

В настоящей работе было проведено изучение профилактической и терапевтической активности препарата «Флавомир» в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что терапевтическая активность препарата «Флавомир» превосходит терапевтическую активность коммерческих препаратов «Реленза» и «Ремантадин» и сопоставима с активностью импортного коммерческого противогриппозного препарата «Тамифлю».

Анализ профилактических свойств препарата «Флавомир» показал его способность защищать от инфекции, вызываемой вирусом гриппа различных антигенных подтипов. При этом профилактическая активность противовирусного препарата «Флавомир» была сравнима с профилактической активностью известных коммерческих противогриппозных препаратов «Ремантадин», «Реленза» и «Тамифлю». Важно, что данный препарат растительного происхождения был способен блокировать размножение эпидемически значимых штаммов вируса гриппа, а также штаммов, обладающих резистентностью к коммерческим противовирусным препаратам. Полученные результаты позволяют считать перспективной дальнейшую разработку противовирусного препарата «Флавомир» в качестве эффективного лекарственного средства для лечения и профилактики гриппозной инфекции.

Благодарности. Работа выполнена в рамках программы исследований 0113PK00473, финансируемой Министерством образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Nelson K., Williams C. Infection disease epidemiology: theory and practice. “Jones and Bartlett Learning”. – Burlington. – USA, 2014. – 940 p.
- [2] Woodland D.L. Chronic viral infections // *Viral immunology*. – 2014. – Vol. 27, N 1. – P. 1-15.
- [3] Chin T., Mac Gowan A., Jacobson S., Donati. Viral infections in pregnancy: advice for healthcare workers // *Journal of Hospital Infection*. – 2014. – Vol. 87, N 1. – P. 11-24.
- [4] Toohar R., Collins J., Street J., Braunack-Mayer, Marshall H. Community knowledge, behaviors and attitudes about the 2009 H1N1 influenza pandemic: a systematic review // *Influenza and other respiratory viruses*. – 2013. – Vol. 7, N 6. – P. 1316-1327.
- [5] Tlaxca J., Ellis S., Remmele R. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2014. – N 1. – P. 14-23.
- [6] Bogoyavlenskiy A., Turmagambetova A., Uzunzhasova A., Babenko A., Zaitceva I., Alexyuk M., Sokolova N., Korulkin D., Alexyuk P., Berezin V. Antiviral activity of quercetin and its derivatives//25th Annual Meeting of the Society for Virology, Bochum, Germany, 2015. – P. 310.
- [7] Жанымханова П.Ж., Тойгамбекова Н.Н., Есмаганбетова А.М. и др. Изучение противовирусной активности некоторых флавоноидов и их производных // Доклады НАН РК. – 2015. – № 3. – С. 179-184.
- [8] Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Березин В.Э. Противовирусные препараты растительного происхождения // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 6 (часть 5). – С. 1141-1146.
- [9] Соколова Н.С., Турмагамбетова А.С., Зайцева И.А., Алексюк М.С., Анаркулова Э.И., Аканова К.С., Молдаханов Е.С., Богоявленский А.П., Березин В.Э. Соединения с циклогексановым углеродным скелетом как ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа // *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. – 2013. – № 3/2(59). – С. 425-426.
- [10] Турмагамбетова А.С., Богоявленский А.П., Березин В.Э., Зайцева И.А., Соколова Н.С., Алексюк М.С., Алексюк П.Г. Композитное противовирусное средство растительного происхождения «Флавомир» – инновационный патент Республики Казахстан, № 30638, опубл. 15.12.2015г.
- [11] Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Amer. J. Hyg.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- [12] Закстельская Л.Я., Шендерович С.Ф. Метод удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации из диагностических и постинфекционных сывороток // *Вопросы вирусологии*. – 1979. – № 5. – С. 560-561.
- [13] Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 296 с.

REFERENCES

- [1] Nelson K., Williams C. Infection disease epidemiology: theory and practice. “Jones and Bartlett Learning”, Burlington, USA, 2014, 940 p (in Eng.).
- [2] Woodland D.L. Chronic viral infections. *Viral immunology*, 2014, Vol. 27, N 1. P. 1-15 (in Eng.).
- [3] Chin T., Mac Gowan A., Jacobson S., Donati. Viral infections in pregnancy: advice for healthcare workers. *Journal of Hospital Infection*, 2014, Vol. 87, N 1. P. 11-24 (in Eng.).
- [4] Toohar R., Collins J., Street J., Braunack-Mayer, Marshall H. Community knowledge, behaviors and attitudes about the 2009 H1N1 influenza pandemic: a systematic review. *Influenza and other respiratory viruses*, 2013, Vol. 7, N 6. P. 1316-1327 (in Eng.).

- [5] Tlaxca J., Ellis S., Remmele R. Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2014**, N 1. P. 14-23 (in Eng.).
- [6] Bogoyavlenskiy A., Turmagambetova A., Uzunzhasova A., Babenko A., Zaitceva I., Alexyuk M., Sokolova N., Korulkin D., Alexyuk P., Berezin V. Antiviral activity of quercetin and its derivatives. *25th Annual Meeting of the Society for Virology, Bochum, Germany*, **2015**, P. 310 (in Eng.).
- [7] Zhanymanova P.Zh., Tojgambekova N.N., Esmaganbetova A.M. et al. *Issues of the NAS of the RK*, **2015**, N 3, P. 179-184 (in Russ.).
- [8] Bogoyavlenskiy A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.E. *Fundamental'nye issledovaniya*, **2013**, N 6 (part 5). P. 1141-1146 (in Russ.).
- [9] Sokolova N.S., Turmagambetova A.S., Zaitceva I.A., Alexyuk M.S., Anarkulova E.I., Akanova K.S., Moldakhanov E.S., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E. *KazNU BULLETIN, Biology series*, **2013**, №3/2 (59), P. 425-426 (in Russ.).
- [10] Turmagambetova A.S., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E., Zaitceva I.A., Sokolova N.S., Alexyuk M.S., Alexyuk P.G. *Innovative patent of the Republic of Kazakhstan*, № 30638, from. **15.12.2015** (in Russ.).
- [11] Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer.J.Hyg.*, **1938**, Vol. 27, P. 493-497 (in Eng.).
- [12] Zakstel'skaja L.Ja., Shenderovich S.F. *Voprosy virusologii*, **1979**, №5, C. 560-561 (in Russ.).
- [13] V.Ju. Urbah. *Moscow: Meditsina*, **1975**, 296 p. (in Russ.).

**IN VITRO ЖӘНЕ IN VIVO ЖАҒДАЙЫНДА ӨСІМДІК ТЕКТІ ЖАҢА
ВИРУСҚА ҚАРСЫ «ФЛАВОВИР» ПРЕПАРАТЫНЫҢ ТЕРАПИЯЛЫҚ
ЖӘНЕ ПРОФИЛАКТИКАЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІН БАҒАЛАУ**

А. С. Тұрмағамбетова, Э. С. Омиртаева, М. С. Алексюк, А. П. Богоявленский, В. Э. Березин

ҚР БҒМ ҒК Микробиология және Вирусология институты РМК, Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: флаваноидтар, тұмау вирусы, вирусқа қарсы препараттар, жұқпалықты басу.

Аннотация. Вирустар адамдардың, жануарлардың және өсімдіктердің жұқпалы ауруларының 60% қоздырғышы болып табылады. Қазіргі кездегі халықтың көпші-қон жылжымалығына байланысты жер шарының бір бөлігінде бұрқ пайда болған аурудың кез келген басқа аймағына қауіп ретінде қарастырылуы мүмкін. Қазіргі заманғы вирусологияның өзекті мәселелердің бірі жаңа вирусқа қарсы, емдік және профилактикалық препараттар өңдеу болып табылады. Өсімдік текті препараттар кең ауқымды биологиялық белсенділікке және вирустың клеткамен өзара іс-қимылдарының әр түрлі кезеңдеріне әсер ету қабілетіне ие болып саналады. Қазақстан өсімдік флорасынан бөлініп алынған терпенді және флаваноид текті қосылыстардың жоғары вирусқа қарсы белсенділігі анықталды. Жұмыста өсімдік текті вирусқа қарсы «Флавомир» препараттың профилактикалық және терапиялық белсенділіктері зерттелді. In vitro және in vivo жағдайындағы модельді тәжірибесін сынау кезінде осы препараттың жоғары терапиялық белсенділігі анықталды. «Флавомир» препараттың терапиялық белсенділігі «Реленза» мен «Ремантадин» коммерциялық препараттарының терапиялық белсенділігінен асып түседі және импорттық коммерциялық «Тамифлю» тұмауға қарсы препараттың белсенділігімен сәйкес келетіні көрсетілді. In vitro тәжірибелерде «Флавомир» препараттың H3N2 кіші түр тұмау вирусына қатысты орташа профилактикалық белсенділікті және коммерциялық вирусқа қарсы препараттарға төзімді H5N3 антигенді кіші түрдегі резистентті тұмау вирусына айқын профилактикалық белсенділікті көрсетті. In vivo тәжірибелерде «Реленза» мен «Ремантадин» коммерциялық препараттарының профилактикалық белсенділігімен салыстырғанда, эпидемиялық маңызды тұмаудың H3N2 штаммына қатысты «Флавомир» препараттың жоғары профилактикалық белсенділігі анықталды.

Поступила 04.05.2016 г.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 24.05.2016.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
9,5 п.л. Тираж 300. Заказ 3.