

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ ГОРНОЙ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

Диссертационный совет Д 03.23.680

На правах рукописи
УДК 578.1:606(572.2)(043)

**Иванова Людмила Николаевна
ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОДСОДЕРЖАЩЕГО
КОМПЛЕКСА ФС-1 НА ВИРУС ГРИППА ПТИЦ А И
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ
ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

03.01.06 – биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

БИШКЕК – 2024

Работа выполнена в лаборатории вирусологии Института биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики и в Акционерном Обществе «Научный центр противоиных препаратов» Министерства здравоохранения Республики Казахстана

Научный руководитель: **Керимжанова Бахытжан Фазылжановна**
доктор ветеринарных наук, профессор, академик Национальной Академии Аграрных наук, Член-корреспондент Российской Академии Естествознания, заместитель начальника отдела международного сотрудничества Акционерное общество «Научный центр противоиных препаратов» Республики Казахстан, г. Алматы.

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится _____ года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 03.23.680 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора (кандидата) биологических наук при Институте биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики, соучредитель Институт горной физиологии и медицины Национальной академии наук Кыргызской Республики по адресу: 720071, г. Бишкек, пр. Чуй, 265а, 303 ауд. Ссылка доступа к видеоконференции защиты диссертации:

С диссертацией можно ознакомиться в центральной научной библиотеке Национальной академии наук Кыргызской Республики, по адресу: г. Бишкек, пр. Чуй, 265а и на сайте

Автореферат разослан _____ года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А. А. Казыбекова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Несмотря на научные открытия прошлого века и инновационные исследовательские направления в области разработки новых лекарственных препаратов, проблема инфекционных заболеваний остается актуальной во всех без исключения странах мира [WHO, 2015]. Среди вирусных заболеваний с всеобщей и высокой восприимчивостью к инфекции наибольшее распространение имеют грипп, парагрипп, респираторно-синцитиальная инфекция и др.

Высокопатогенный агент болезни – вирус гриппа птиц типа А вызывает инфекцию как среди диких, так и домашних птиц, и может передаваться человеку, быть источником широкого распространения инфекции. При ослаблении профилактических мер борьбы с гриппом птиц и карантинных ветеринарно-санитарных мероприятий эпизоотия может перейти в панзоотию с нанесением значительных экономических потерь, а в случае мутации вируса гриппа – массовому заболеванию людей с летальным исходом. Так панзоотия птичьего гриппа в мире только в 2005 году нанесла ущерб, оцениваемый в 4 млрд евро.

Во время ежегодных эпидемий гриппом заболевает от 5 до 15 % населения Земли, а во время пандемий гриппа это число может возрасти в 4–6 раз. По данным экспертов ВОЗ, ежегодно в мире только тяжелыми формами гриппа заболевает до 5 млн человек, а погибает от 290 000 до 650 000 человек. Эпидемии гриппа наносят также огромный экономический ущерб обществу в целом [Гулькин М. И.; Воронин Е. С., 2007, WHO 2018].

Экономический ущерб от данного заболевания велик в связи с массовой гибелью заболевших птиц, необходимостью проведения жестких карантинных и ветеринарно-санитарных мероприятий, включая уничтожение всего поголовья больной птицы.

Актуальность проблемы борьбы с гриппом как среди людей, так и птиц, являющихся основным источником распространения, заключается в том, что вирусы гриппа А обладают уникальной особенностью к изменению антигенной структуры. Проблема устойчивости к противогриппозным лекарственным веществам в настоящее время приобрела глобальные масштабы. За последнее десятилетие в мире произошло несколько вспышек гриппа и, более того, развиваются такие новые заболевания, как атипичная пневмония и птичий грипп, требующие принципиально новых подходов и решений при их лечении [Покровский В.И., 2000; Мазнев Н.И., 2004; Онищенко Г. Г., 2010].

Проблема устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам приобрела глобальный характер. Возникновение лекарственной устойчивости у возбудителей вирусных заболеваний к противовирусным

препаратам приводит к снижению или полной потере эффективности проводимой терапии и борьбы с распространением инфекции, а также направляет на изыскание новых медикаментозных соединений [Гендон Ю. З., 1995; Носков Ф. С., 2002].

Одним из основных направлений в разработке противовирусных соединений является синтез аналогов из известных препаратов. Так иодсодержащие препараты, применяемые в ветеринарии и медицине, проявляют высокую биологическую активность и разностороннее фармакологическое действие, не вызывая устойчивости у возбудителя [Мохнач В. О., 1984; Антипов В. А., 2011; Головки Ю. С., 2012].

Настоящая работа посвящена изложению полученных результатов исследований, направленных на усиление действия противогриппозных препаратов при комбинированном применении с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1, синтезированным в АО «Научный центр противоиных инфекционных препаратов».

Связь темы диссертации с приоритетными научными направлениями, крупными научными программами (проектами), основными научно-исследовательскими работами, проводимыми образовательными и научными учреждениями. Диссертационная работа выполнена в рамках утвержденной научно-технической программы «Разработка новых противоиных инфекционных препаратов» в рамках бюджетной программы «Прикладные научные исследования технологического характера в области промышленности» согласно Постановлению Правительства Республики Казахстан от 25.06.2004 г. № 703 на периоды 2004–2023 годы.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов, иодсодержащего лекарственного соединения и изучение его противовирусного действия.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести скрининг иодсодержащих лекарственных соединений, обладающих противовирусной активностью с определением безвредности и токсичности.
2. Определить противовирусную активность иодсодержащего лекарственного соединения на примере штаммов вируса гриппа птиц А в эксперименте *in vitro*, *in ovo* и *in vivo* на лабораторных животных.
3. Определить эффективность иодсодержащего лекарственного соединения при сочетанном применении с противовирусными препаратами: осельтамивир, римантадин, рибазол и амиксин.

Научная новизна полученных результатов. Впервые установлена противовирусная активность иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в отношении вирусов гриппа птиц разных штаммов (А/FPV/Rostock/34/H7N1, А/FPV/Waybrige/78/H7N7, А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04/H13N6) в т. ч. резистентных (вируса гриппа птиц штамм А/FPV/Waybrige/78/H7N7 и вируса свиного гриппа штамм А/Swine/Iowa/30/H1N1).

Впервые в экспериментах *in vitro*, *in ovo*, *in vivo* разработана технология комбинированного применения противогриппозных препаратов с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1, повышающая фармакологическую активность путем усиления ингибирующего воздействия на вирус гриппа. Получен Патент на полезную модель в НИИС МЮ РК №2021/1124.2. «Способ повышения фармакологической активности противогриппозных препаратов».

Впервые показано снижение токсичности противовирусных препаратов римантадин, осельтамивир при комбинированном применении с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1 в эксперименте *in vitro* на культуре клеток MDCK.

Разработаны Методические Рекомендации: «Методы проведения исследований иодсодержащих соединений на антивирусную активность в отношении гриппа птиц» с включением новых методов исследования, отдельно рекомендуемых наряду с широко распространенными методами исследований иодсодержащих лекарственных соединений для работающих в области клеточной биологии, микробиологии и биотехнологии.

Издана монография «Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами».

Практическая значимость полученных результатов. Практическая значимость и экономическая эффективность заключается в совершенствовании способа применения широко используемых противовирусных препаратов. Однонаправленное действие лекарственных соединений путем комбинированного применения повышает противовирусную активность, значительно усиливает терапевтическую эффективность против высокопатогенных штаммов гриппа птиц А.

Значительное усиление терапевтической эффективности противовирусных препаратов под воздействием ФС-1 может быть использовано в практической ветеринарии и медицине, как с лечебной, так и профилактической целью.

Подготовлены и изданы Методические Рекомендации: «Методы проведения исследований иодсодержащих соединений на антивирусную

активность в отношении гриппа птиц» (МИИР РК, Алматы, 2020. – 64с). Представленный комплекс стандартизированных методов фармакологических характеристик иодсодержащих лекарственных соединений рекомендуется для специалистов лабораторий ветеринарных и медицинских организаций всех форм собственности, научных сотрудников и студентов вузов соответствующего медико-ветеринарного профиля. В методических рекомендациях показана последовательность (порядок) проведения исследований физико-химических характеристик, безопасности и эффективности иодсодержащих лекарственных соединений, что позволит повысить эффективность проводимых исследований иодсодержащих противовирусных препаратов, добиться воспроизводимости, сопоставимости и правильной интерпретации полученных результатов исследований.

Экономическая значимость полученных результатов.

Экономическая значимость заключается в совершенствовании способа терапии и профилактики применения широко используемых противовирусных препаратов. Однонаправленное действие лекарственных соединений путем комбинированного применения повышает противовирусную активность, значительно усиливает терапевтическую эффективность против высокопатогенных штаммов гриппа птиц А.

Значительное усиление терапевтической эффективности противовирусных препаратов под воздействием ФС-1 может быть использовано в практической медицине и ветеринарии, как с лечебной, так и профилактической целью.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Противовирусная активность иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на примере вируса гриппа птиц А.

2. Фармакологическая активность противовирусных препаратов при комбинированном применении с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1.

3. Степень снижения токсичности противовирусных препаратов противовирусных препаратов при комбинированном применении с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1 в эксперименте *in vitro* на культуре клеток MDCK на примере вируса гриппа птиц А.

Личный вклад соискателя. Весь базовый и экспериментальный материал исследования собран и обработан при личном участии автора: на этапах постановки цели и задач, проведения исследования в результате чего получены основные заключения. Статистическая обработка и анализ полученных данных был выполнен автором лично. Работа проведена в лаборатории вирусологии АО «Научный центр противоинфекционных препаратов». Отдельные фрагменты работы проведены на базе РГП

«Институт микробиологии и вирусологии» Комитета науки МОН РК (г. Алматы, Казахстан) и Национального центра заразных и паразитарных болезней (г. София, Болгария).

Апробации результатов исследований. Основные материалы диссертации доложены: на заседаниях научного совета в АО «Научный центр противоифекционных препаратов» (2007-2023 гг.); на Втором международном конгрессе студентов и молодых ученых «Мир науки» (Алматы, 2008); на 52-ой международной научной студенческой конференции (г. Новосибирск, 2014); на XXVIII международной научно-практической конференции, XVI международной научно-практической конференции (г. Москва, 2016); на XXXI Международной Научно-практической конференции «Вопросы современной науки: проблемы, тенденции и перспективы» (г. Москва, 2018).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемом журнале, индексируемом в базе данных SCOPUS; Импакт-фактор 0.283, 1.2, 4.5, 0.469, 2 статьи в журнале, входящем в список рекомендуемой президиумом НАК ПКР, 3 статьи в журнале входящем в список рекомендуемых КОКСОН МОН Республики Казахстан, получен патент на изобретение РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» Министерства юстиции Республики Казахстан, изданы Методические Рекомендации: «Методы проведения исследований иодсодержащих соединений на антивирусную активность в отношении гриппа птиц» (МИИР РК, Алматы, 2020. – 64с), выпущена Монография «Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами».

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 163 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав, методологии и методов исследования, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка использованной литературы и приложений. Работа иллюстрирована 41 таблицей и 35 рисунками. Диссертационная работа процитирована 233 источниками литературы, в том числе 119 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении диссертации раскрыта актуальность научной работы, определены цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов исследования, представлены основные положения диссертации, выносимые на защиту, личный вклад соискателя,

апробация результатов и полнота отражения результатов диссертации в публикациях, а также структура и объем диссертации.

В главе 1 «Обзор литературы» представлены и анализированы отечественные и зарубежные литературные источники в области актуальности проблем гриппа и вирусных заболеваний приводящих к социальному и экономическому ущербу, проблем устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам, в области разработки новых лекарственных противовирусных препаратов, создании новых эффективных лекарственных препаратов и разработки новых технологий их производства.

Глава 2 «Методология и методы исследования» приведены объекты исследования, дана характеристика материалов, реактивов, оборудования. Представлены методы исследования научных работ и методы статистического анализа.

Объектами исследования являлись иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.4, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8; тест-система: культуры клеток MDCK, Vero; штаммы вируса гриппа птиц А: H7N7, H7N1, H13N6, H5N3, H3N2, N1H1, H5N1; лабораторные животные (крыс, мыши), куриные эмбрионы; контрольные противовирусные препараты: ремантадин, рибавирин, амиксин, рибазол, осельтамивир, амизон.

Предметы исследования: Характеристика воздействия иодсодержащего комплекса ФС-1 на вирус гриппа птиц а и совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов.

2.2 Методы исследования. При выполнении диссертационной работы были использованы следующие методы: физико-химический анализ, фармакологические, микробиологические, биохимические, патологоанатомические, молекулярно-генетические.

2.2.1 Технология размножения вируса гриппа птиц А

В опытах размножения вируса гриппа А использованы монослойная перевиваемая линия культур клеток почки собаки MDCK (Madin Darby Canine Kidney), перевиваемая линия культур клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero).

2.2.2 Изучение растворимости и проницаемости иодсодержащих лекарственных соединений

Определение растворимости иодсодержащих лекарственных соединений проводили согласно биофармацевтической классификационной системы (БКС) в воде, этиловом спирте и буферных растворах с различной рН, с последующим определением при помощи капиллярного электрофореза Agilent 1600 концентрации иодид-ионов исследуемых комплексов.

Определение проницаемости проводили на культуре клеток MDCK согласно требованиям Методических Указаний Минздравсоцразвития России «Оценка биоэквивалентности лекарственных соединений»

2.2.3 Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений *in vitro*, *in vivo*. Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений проводили на культуре клеток MDCK в 96-луночных плашках путем МТТ-теста, путем восстановления соли тетразолия (МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид) митохондриальными дегидрогеназами живых, метаболически активных клеток с образованием кристаллов формазана, дающих при растворении в ДМСО фиолетовое окрашивание. Эффективность метода оценена цитотоксической концентрацией (ЦТК₅₀), вызывающей гибель 50 % клеток.

Безопасности *in vivo* на лабораторных животных (мышях), оценивали путем определения летальной дозы (ЛД₅₀) лекарственных соединений, вызывающей гибель 50 % животных.

2.2.4 Изучение кумулятивного эффекта, определение хронической токсичности в экспериментах на мышах, определение острой токсичности ФС-1 в эксперименте на крысах. Изучение кумулятивного эффекта определение хронической токсичности, острой токсичности ФС-1 в опытах *in vivo* проводили путем перорального введения лекарственного соединения лабораторным животным (мышам, крысам). Острую, хроническую токсичность, кумулятивный эффект оценивали путем определения летальной дозы (ЛД₅₀) соединения, вызывающей гибель 50 % животных.

2.2.5 Изучение фармакокинетики иодсодержащего лекарственного соединения проводили путем перорального введения, меченого радиоактивным иодом-131 иодсодержащего лекарственного соединения цыплятам. Для замера радиоактивного изотопа ¹³¹I использовали кровь, органы цыпленка.

2.2.6 Изучение влияния иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на вирус гриппа птиц А

Противовирусную активность проводили путем заражения культуры клеток, куриных эмбрионов, цыплят. Заражение животных вирусом проводили путем интраназального введения вируса. Эффективность методов оценена и путем учета подавления репродукции вируса гриппа птиц в реакции гемагглютинации, путем снижения титра инфекционности вируса методом Reed and Muench.

2.2.7 Моделирование ингибирующего действия, получение мутантных штаммов. Получение устойчивых мутантов проводили путем культивирования (пассажа) штаммов вирусов гриппа А/Н7N7, А(Н1N1) с

последовательным увеличением содержания препаратов осельтамивира и римантадина. Эффективность метода оценивали путем зависимости противовирусного действия от концентрации (доза-ответ) определением значения инфекционной концентрации (ИК₅₀). Выделение нуклеиновых кислот, получение кДНК, секвенирование ДНК, сборку контигов проводили для выявления специфических замен в структуре нуклеиновых кислот М гена, ответственного за формирование фенотипа устойчивости к препаратам риманатадину и осельтамивиру.

2.2.8 Комбинированное применение иодсодержащего лекарственного соединения с противогриппозными препаратами *in vitro*, *in ovo*, *in vivo* проводили совместно на модели культуры клеток, куриных эмбрионах и на цыплятах. Оценку противовирусной активности определяли в реакции гемагглютинации по степени подавления агглютинации эритроцитов.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерных программ «Microsoft Office Excel», Graph Pad Prism 6. Дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для достоверной оценки наличия и значимости основных эффектов и взаимодействий. Достоверность отличия средних значений проверяли по t-критерию Стьюдента (уровень значимости $p \leq 0,05$).

В главе 3 представлены результаты собственных исследований. С момента разработки до момента регистрации лекарственного соединения проводят ряд комплексных мер, направленных на оценку эффективности, безвредности и безопасности. В ходе выполнения настоящей работы нами проведен скрининг веществ, обладающих выраженным противовирусным действием из группы синтезированных иодсодержащих лекарственных соединений. Лекарственные соединения представляют собой координационные соединения на полимерной основе, содержащие в своем составе молекулярный иод, координированный полипептидами, карбогидратами и галогенидами щелочных и щелочноземельных металлов.

Синтез лекарственных соединений осуществляли в соответствии с опытно-промышленным регламентом, разработанным согласно Положениям о технологических регламентах производства лекарственных соединений, выпускаемых фармацевтическими производственными предприятиями РК. Приказ Министерства Здравоохранения Республики Казахстан № 371 от 30.07.97 года. На основе синтезированных из карбогидратов, белков, иода, галогенидов щелочных и щелочноземельных элементов получено девять иодсодержащих лекарственных соединений. В настоящей работе изложены результаты проведенных исследований определения их качественных и

количественных параметров, а также оценки фармакологической активности и их эффективности.

3.1. Технология размножения вируса гриппа птиц А, изучение биофармацевтической растворимости и проницаемости подсодержащих лекарственных соединений

3.1.1. Технология размножения вируса гриппа птиц А *in vitro* на культуре клеток. Вирусы гриппа размножали в организме лабораторных животных, развивающихся куриных эмбрионах, на культурах клеток (тканей). на клеточных линиях MDCK и Vero.

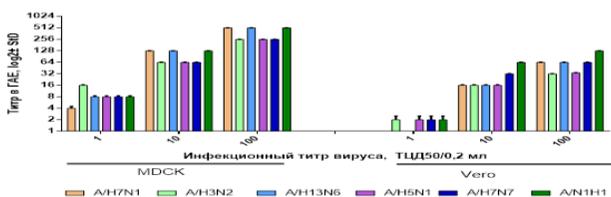


Рис. 1. Размножение вирусов гриппа на культуре клеток MDCK, Vero

Согласно полученных результатов установлено, что размножения штаммов вирусов гриппа птиц различных серотипов в культурах перевиваемых линий клеток MDCK и Vero (множественность заражения, время инкубации и концентрация трипсина) являются неодинаковыми для исследованных штаммов вируса гриппа птиц. При этом перевиваемые линии клеток MDCK более чувствительны к вирусам гриппа птиц в сравнении с линией клеток Vero, добавление трипсина в концентрации 0,5 мкг/мл и изменение времени культивирования не значительно повысили репродукцию изучаемых вирусов по анализу титров гемагглютинаина в культуре клеток Vero.

Исходя из того, что по данным ВОЗ неоспоримое лидерство принадлежит клеткам почки собаки линии MDCK (Madin Darby Canine Kidney) обладающей высокой чувствительностью к репродукции вирусов гриппа всех подтипов А, В, С (Madin S., 2008) все дальнейшие исследования нами проведены на клеточной линии MDCK с использованием питательной среды DMEM с содержанием 10 % фетальной сыворотки и раствором антибиотика-антимикотика в соотношении 1:1000. Линия клеток MDCK получена из Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности МОН РК, Отар.

3.1.2. Изучение растворимости и проницаемости подсодержащих лекарственных соединений. Результаты оценки фармакопейной и биофармацевтической растворимости соединений показали, что все

соединения растворялись в воде и буферных растворах с рН равной 1,2; 4,5; 6,8. Полная растворимость лекарственных соединений ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3 и ФС-1.4 100 % отмечена через 5 мин. Лекарственные соединения ФС-1, ФС-1.7, ФС-1.5 полностью растворились через 15 мин, тогда как соединение ФС-1.6, ФС-1.8 растворились на 100 % только через 30 мин, что свидетельствует о несколько замедленной скорости их растворения. Было установлено, при определении биофармацевтической растворимости, разложение всех исследуемых девяти лекарственных соединений в буферном растворе с рН равным 8,4.

Определение проницаемости иодсодержащих лекарственных соединений проводили на культуре клеток MDCK методом капиллярного электрофореза. Степень проницаемости на культуре клеток MDCK, используемых в эксперименте соединений, изменялась в зависимости от времени их инкубации.

В результате проведенных исследований изучения проницаемости иодсодержащих лекарственных соединений, установлено, что через 15 мин инкубации культуры клеток в среде, содержащей вещества, проницаемость составила от 0 до 2,6 %, через 30 мин от 1,0 % до 6,3 %, через час находилась в пределах от 2,3 % до 18,8 %. Через 3 и 6 ч процент проницаемости составил от 4,7 % до 43,8 %. По прошествии 24 ч исследования установлено, что максимальное количество вещества проникло в культуру клеток MDCK в пределах от 23,0 % до 56,3 %. Контрольное соединение энисамиум иодид (амизон), широко используемое в качестве иодсодержащего противовирусного препарата, через 24 ч инкубации на культуре клеток MDCK обладал низкой проницаемостью и составил всего 0,08 %. При растворении иодсодержащих лекарственных соединений, в воде, и буферных растворах с рН 1,2, 4,5 и 6,8 равновесная растворимость была классифицирована как «высокая». Среднее значение количества исследуемого соединения, растворившегося в течение 5 мин из твердой субстанции, составило от 80 % до 100 %.

Степень проницаемости всех исследуемых иодсодержащих лекарственных соединений, хотя она определена согласно БКС «низкой», количество проникшего вещества в культуру клеток MDCK составило от 23,0 % до 56,6 %, что меньше 85 %. Однако это значение в 70 раз больше, чем у контрольного препарата энисаниума иодида (амизон).

Изучение биофармацевтических свойств иодсодержащих лекарственных соединений на основании степени их растворимости в воде, буферных растворах с рН 1,2; 4,5; 6,8 и проницаемости на культуре клеток MDCK соответствуют III классу БКС [1995]. К III классу БКС относятся вещества с «высокой» растворимостью и «низкой» проницаемостью.

3.2. Степень фармакологического действия иодсодержащих лекарственных соединений

3.2.1. Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений *in vitro* на культуре клеток MDCK. Безопасность или цитотоксичность иодсодержащих лекарственных соединений определяли *in vitro*, с использованием МТТ-теста. Инкубация исследуемого вещества на культуре клеток составляла 48 ч и 72 ч.

Согласно полученным данным, иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.3, ФС-1.4 являются низко токсичными. ЦТК₅₀ ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.3, ФС-1.4 через 48 ч культивирования находится в концентрациях: 45,5; 42,8; 12,5 24,1 мг/мл соответственно и через 72 ч в концентрациях: 50,0; 20,0; 10,0; 20,0 мг/мл соответственно. Иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1.2, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8 обладали умеренной токсичностью, ЦТК₅₀ их составляла от 0,39 до 2,13 мг/мл через 48 ч инкубирования в культуре клеток MDCK и от 0,20 до 1,77 мг/мл через 72 ч инкубирования в культуре клеток MDCK.

Наименьшая цитотоксичность отмечена у соединений ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.3 и ФС-1.4, умеренная цитотоксичность отмечена у соединений ФС-1.2, ФС-1.4, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8. Полученные результаты были положены в основу определения максимально переносимых концентраций у исследуемых соединений, для изучения противовирусной активности.

3.2.2. Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединения *in vivo* в эксперименте на мышах. Определение острой токсичности иодсодержащих лекарственных соединений проводили *in vivo* в эксперименте на двух-трехмесячных мышах при однократном способе введения животным. Полученные результаты ЛД₅₀ составили: для ФС-1 - 117,74 мг/мл; для ФС-1.1 - 1,01 мг/кг; для ФС-1.2 - 14,50 мг/кг; ФС-1.3 - 6,06 мг/кг; ФС-1.4 - 27,27 мг/кг; ФС-1.5 - 50,70 мг/кг; ФС-1.6 - 51,00 мг/кг; ФС-1.7 - 15,18 мг/кг; ФС-1.8 - 110,70 мг/кг.

Проведенными исследованиями установлено, что введение животным всех иодсодержащих лекарственных соединений: ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.4, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8, кроме ФС-1, в диапазоне доз от 1,12 до 2472,3 мг/кг вещества вызывают токсический эффект в нарастающем порядке. Токсический эффект по всем изучаемым параметрам развивался по нейротоксическому типу: нарушение координации, общее торможение, судороги нижних конечностей при визуальном осмотре животных. В то же время для исследуемого соединения ФС-1 в дозах менее 117,74 мг/кг не наблюдаются выраженные токсические действия: при визуальном осмотре животных и патологоанатомическом вскрытии, не выявили каких-либо видимых внешних изменений и отсутствие изменений во внутренних органах

животных при патологоанатомическом вскрытии, что свидетельствует о безопасности данного соединения. В дозах выше 117,74 мг/кг токсический эффект проявляется по нейротоксическому типу.

Следующий этап исследования направлен на изучение биологической активности и безопасности иодсодержащих лекарственных соединений на модели вируса гриппа птиц А.

3.3. Скрининг наиболее активного иодсодержащего лекарственного соединения, изучение противовирусной активности на модели пандемического вируса гриппа птиц штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7). Определение противовирусной активности иодсодержащих лекарственных соединений проводили на культуре клеток MDCK по отношению к вирусу гриппа птиц А/FPV/Waybrige/78 (H7N7). Выбор исследуемых концентраций иодсодержащих лекарственных соединений для определения противовирусной активности соединений основывался на результатах экспериментов по определению цитотоксичности.

На основании проведенных исследований установлено, что иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.8 не проявили значимой активности в отношении вируса гриппа птиц штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7), поскольку снижение титра вируса составило 0–2,0 log. Наибольшая антивирусная активность из числа исследованных соединений отмечена у ФС-1, ФС-1.4 и ФС-1.7, которые снижали титр вируса гриппа птиц штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) на 5,0–8,0 log. Однако соединения ФС-1.7 и ФС-1.4 показали высокую токсичность в эксперименте на животных.

Резюмируя результаты проведенных экспериментов по определению токсичности и противовирусной активности, наименее токсичным и обладающим противовирусной активностью оказалось иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1. Данное соединение в концентрации 25,0 мг/мл он обладало выраженным противовирусным действием на вирус гриппа птиц А штамм FPV/Waybrige/78 (H7N7). При внутрижелудочном введении мышам в дозах от 0,6 мл/кг до 2,7 мл/кг летального эффекта не наблюдалось.

В тоже время соединения ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.4, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8 проявляли себя высокотоксичными и малоактивными лекарственными соединениями в отношении вируса гриппа птиц А.

Дальнейшие наши исследования были направлены на изучение противовирусной активности иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в отношении вируса гриппа птиц А в экспериментах на куриных эмбрионах, цыплятах, определения фармакологической активности в опытах *in vitro*, *in ovo*, *in vivo*.

ФС-1 – это сложное по химическому составу многокомпонентное лекарственное соединение, содержащие молекулярный иод, галогениды калия и лития, хлорид магния, α -декстрины и полипептиды. По своим физико-химическим свойствам ФС-1 – это коллоидно-полимерный водный раствор солей металлов (LiCl(I) , MgCl_2), молекулярного иода и его ионизированных форм. Внутри декстриновой спирали расположены два активных центра- комплекс молекулярного иода с галогенидом лития, биядерный комплекс магния и лития, содержащий молекулярный иод, триодид и триодид. Такая структура координированного иодсодержащего лекарственного соединения защищает молекулярный иод от взаимодействия с биоорганическими соединениями после перорального потребления и сводит к минимуму токсические эффекты иода в организме человека. Основным механизмом действия ФС-1 заключается в мембранной литической активности, а также исследуемый препарат влияет на экспрессию генов в бактериях.

Активные центры ФС-1 защищены от взаимодействия с биоорганическими лигандами, входящими в состав цитоплазмы клетки α -декстриновой спиралью и взаимодействием с полипептидами. Только нуклеотиды ДНК могут конкурировать с полипептидами за комплексообразование с молекулярным иодом, входящим в состав активного центра ФС-1. Образование комплекса между нуклеотидом ДНК и активным центром ФС-1 является ключевым моментом в механизмах противовирусного и антибактериального действия препарата. В этой структуре молекулярный иод оказывается труднодоступным для взаимодействия с компонентами крови и доносится до клетки патогена в неизменном виде, т. к. конкурировать с полипептидами за комплексообразования с иодом могут только нуклеотиды ДНК клетки патогена [Юлдашева Г. А., 2011–2012; Ильин А. И., 2014].

3.4. Воздействия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на вирус гриппа птиц А

3.4.1. Изучение кумулятивного эффекта ФС-1 в эксперименте на мышцах. Изучение кумулятивного эффекта проводилось в эксперименте на двух-трехмесячных мышах обоего пола весом 18-24 г, прошедших акклиматизационный период. Определение острой токсичности на мышах при однократном введении ФС-1, позволило рассчитать летальные дозы ЛД^{1}_{84} , ЛД^{1}_{50} , ЛД^{1}_{16} методом наименьших квадратов с использованием пробит-анализа на основании данных вводимых дозировок иодсодержащего лекарственного соединения и количества погибших животных. ЛД^{1}_{84} составила 8,47 мл/кг (171,94 мг/кг), ЛД^{1}_{50} – 5,8 мл/кг (117,74 мг/кг), ЛД^{1}_{16} – 2,41 мл/кг (48,92 мг/кг). Коэффициент кумуляции ФС-1 рассчитывали исходя из показателей токсичности при его однократном введении (ЛД^{1}_{50}) и показателей токсичности при многократном введении (ЛД^n_{50}).

В результате многократного введения исследуемого вещества установлено, что 100 % гибель животных наступила на седьмой неделе, когда доза иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 составила 13,22 мл/кг. Исходя из динамики гибели животных и введения ФС-1, были рассчитаны летальные дозы многократного введения $ЛД^{n}_{84}$, $ЛД^{n}_{50}$ и $ЛД^{n}_{16}$ необходимые для вычисления коэффициента кумуляции: $ЛД^{n}_{84} = 6,87$ мл/кг (139,46 мг/кг), $ЛД^{n}_{50} = 3,80$ мл/кг (77,14 мг/кг), $ЛД^{n}_{16} = 1,96$ мл/кг (39,79 мг/кг).

Таким образом, коэффициент кумуляции ($K_{кум}$) в эксперименте на мышах составил 1,45, что по международной шкале оценки токсичности препаратов ФС-1 соответствует параметрам препаратов, со слабовыраженным кумулятивным эффектом [ГОСТ 12.1.007–76].

3.4.2. Определение хронической токсичности ФС-1 в эксперименте на мышах. В результате проведенных исследований по определению хронической токсичности установлено, что введение животным ФС-1 в дозе 0,58 мл/кг привело к проявлению судорог пароксизмального характера. По окончании второго месяца общее число погибших животных в данной группе, составило 25 %. Отмечено снижение массы тела у оставшихся животных, изменений со стороны внутренних органов не было установлено. Дозы ФС-1 0,232 и 0,116 мл/кг, введенные животным, показали их безопасность.

Не удалось выявить каких-либо изменений визуально и при патологоанатомическом вскрытии у животных, подвергнутых воздействию на протяжении двух месяцев. А также следует отметить, что в течение последующих тридцати дней наблюдения, по окончании эксперимента, никаких патогенетических изменений в состоянии животных, и их гибели не наблюдали. Это свидетельствует об оценке безопасности применения животным при многократном введении (24 раза), то есть об отсутствии хронической токсичности.

3.4.3. Определение острой токсичности ФС-1 в эксперименте на крысах. Проведенные исследования определения хронической токсичности установили, что дозы 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг не приводили к смерти животных. Группа животных, получавшая дозу 596,0 мг/кг вызвала падеж двух крыс, в группе вводившей дозу 794,4 мг/кг пали три животных, в группе от дозы 993,0 мг/кг пали четыре крысы. Максимальное количество павших животных наблюдали при введении доз 1191,6 и 1390,0 мг/кг, погибло восемь и девять животных соответственно.

Показатели соматических реакций после приема ФС-1 отмечены в первые сутки наблюдений. Через 7–14 дней наблюдения за животными общее физиологическое состояние организма у крыс опытной группы мало

отличались от таковых проявлений у контрольных, не подвергавшихся воздействию ФС-1.

Результаты биохимических исследований при пероральном введении ФС-1 крысам в дозах 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг не нарушали ни белкового, ни углеводного обмена. Также установлено, что введение ФС-1 крысам, не оказывало повреждающего действия на функцию почек и не нарушало электролитный обмен, т. е. не вызывал изменений содержания ионов K^+ и Na^+ в сыворотке крови животных.

В тоже время введение препарата в концентрациях 596,0; 794,4 и 993,0 мг/кг вызывало незначительное повышение уровня перечисленных выше биохимических показателей крови. А при введении концентраций 1191,6 и 1390,0 мг/кг повышались все биохимические показатели в крови, кроме холестерина. Холестерин был снижен и составил 0,8 ммоль/л, что указывает на функциональные нарушения организма животного. На 14 день исследования крови у выживших животных отмечено восстановление уровня холестерина до 1,6 ммоль/л.

Таким образом, проведенные исследования по определению острой токсичности на крысах показали, что пероральное введение ФС-1 позволило рассчитать эффективные дозы, действующие в 50 % случаев и токсические (летальные) дозы, равные LD_{16} – 571 мг/кг, LD_{50} – 922 мг/кг, LD_{84} – 1273 мг/кг, LD_{100} – 1449 мг/кг.

В соответствии со шкалой токсичности веществ введенных *per os* [Hodg G., Gleason S., 1975; С. А. Куценко, 2002], исследуемое соединение ФС-1 можно отнести к умеренно токсичным веществам или к третьему классу опасности [ГОСТ 12.1.007–76].

3.4.4. Фармакокинетика ФС-1, меченного радиоактивным иодом-131, в организме цыплят при однократном пероральном применении. Исследование фармакокинетики меченного радиоактивным иодом-131 ФС-1 после перорального введения проводили на семидневных цыплятах. Уже через 30 мин. обследования было отмечено наличие препарата в крови и во всех исследуемых органах. Концентрация ФС-1, в крови через 30 мин составила 0,53 мкг/г, через 3 ч она увеличилась в 1,5 раза и соответствовала 1,4 мкг/г. В последующий период времени наблюдалось его снижение и составило 0,15 мкг/г к концу 24 часам исследования. Наибольшее содержание препарата через 30 мин отмечено в желудке и составило 9,38 мкг/г и через час в кишечнике 1,99 мкг/г.

Препарат достаточно быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта и максимальные значения его концентраций в легких, печени и селезенке, так же наблюдаются через 3 ч и составляют: в легких 2,78 мкг/г, печени 0,43 мкг/г, селезенке 0,39 мкг/г.

Через 30 мин. после введения ФС-1 в организм, количественное содержание в почках составило 2,54 мкг/г с последующим повышением. Максимальная концентрация препарата в почках была определена через 3 ч после однократного введения препарата и составила 16,67 мкг/г. Но к 6 ч отмечено его снижение до 5,33 мкг/г, в последующем наблюдается его снижение до 1,36 мкг/г к 24 часам.

Поскольку метод введения ФС-1 был пероральный, естественно максимальное количество в первые 30 мин от начала введения отмечалось в желудке. Следует отметить, что уже через час содержание меченного ФС-1 в желудке резко снизилось в 5,8 раз. Вместе с тем его содержание в этот период времени, т. е. через час, было максимально повышено в почках и кишечнике, что свидетельствовало об отсутствии у него кумулятивных свойств.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что процесс распределения накопления и выведения ФС-1 при однократном введении в организм цыплят, подчиняется законам линейной кинетики, т. е. скорости и закономерности протекания химических процессов во времени, через которое система переходит из начального состояния в конечное (начальное – исходные вещества, конечное – продукты реакции).

3.4.5. Воздействие ФС-1 на примере вируса гриппа в эксперименте на куриных эмбрионах с различными штаммами: А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/Алматы/5/98 (H3N2), А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6). Изучение противовирусной активности исследуемого ФС-1 проводили в экспериментах с вирусами гриппа с различными штаммами: А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/Алматы/5/98 (H3N2), А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6), на десятидневных куриных эмбрионах, путем нейтрализации вируса в дозе 100 ЭИД₅₀ экспериментальными концентрациями.

При определении противовирусной активности лекарственного соединения на 10 дневных куриных эмбрионах выявлено, что ФС-1 уже в концентрации 0,39 мг/мл подавляет репродукцию вируса гриппа А на 2,0 log, а в концентрации 6,6 мг/мл полностью подавляет репродукцию исследуемых А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/Алматы/5/98 (H3N2), А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6). вирусов гриппа А независимо от их антигенной структуры. Полученные в эксперименте данные показали высокую противовирусную активность данного соединения, в отношении возбудителей вируса гриппа А разных штаммов. Тогда, как все контрольные эмбрионы, зараженные вирусами гриппа А и не получавшие ФС-1, пали 100 %.

Дальнейшие исследования были посвящены сравнительному изучению вирусингибирующей активности ФС-1 в концентрации равной 6,6

мг/мл, в сравнении с противовирусными препаратами римантадин в концентрации 0,5 мг/мл и рибаверином в концентрации 1,0 мг/мл. Эксперименты так же проводили с различными штаммами вируса гриппа А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/Алматы/5/98 (H3N2), А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6) на десятидневных куриных эмбрионах, путем нейтрализации вируса 100 ЭИД₅₀.

При проведении сравнительного анализа ФС-1 с противовирусным препаратом римантадин и рибаверином установлено, что ФС-1 в концентрации 6,6 мг/мл полностью подавляет репродукцию исследуемых вирусов. Противовирусный препарат римантадин в концентрации равной 0,5 мг/мл способен подавлять репродукцию данных вирусов на 20-60 %. Рибаверин в концентрации равной 1,0 мг/мл подавляет размножение вируса гриппа А/FPV/Rostock/34 (H7N1) на 20 %, вируса гриппа А/Алматы/5/98 (H3N2) на 55 % и не обладает противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6).

Таким образом, в наших исследованиях было установлено, что ФС-1 в концентрации 0,39 мг/мл подавляет репродукцию вирусов на 2,0 log. А при 6,6 мг/мл способен полностью подавлять репродукцию 100 ЭИД₅₀ вируса гриппа А независимо от штамма возбудителя. Полученные в эксперименте данные позволяют заключить о высокой противовирусной активности данного соединения в отношении возбудителей вируса гриппа А разных штаммов: А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6), А/Алматы/5/98 (H3N2).

3.4.6. Воздействие ФС-1 на вирус гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) в эксперименте на цыплятах. Определение противовирусной активности ФС-1 проводили в эксперименте на семидневных цыплятах. Оценка противовирусной активности показала, что эффективность защиты после приема профилактической дозы ФС-1 у зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) цыплят в концентрациях 6,6; 13,1 и 26,3 мг/кг составила 100 %. Концентрация 3,3 мг/кг ФС-1 проявила наименьшую профилактическую эффективность и составила 42 %. В то же время профилактическая эффективность препарата римантадина у цыплят от инфекции составила только 28 %. Все контрольные цыплята, зараженные вирусом, не получавшие препараты погибли (100 % смертность).

Терапевтическая доза ФС-1 при ежедневном приеме соединения ФС-1 в течение семи дней в концентрации 26,3 мг/кг привела к 100 % сохранению поголовья зараженных вирусом гриппа цыплят, тогда как при приеме противовирусного препарата римантадина в эти же сроки выживаемость

цыплят составила только 43 %. Прием ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг на протяжении семи дней показал меньшую терапевтическую эффективность в сравнении с противовирусной активностью первой группы (78 %), доза 6,6 мг/кг эффективность ФС-1 составила 43 %, что аналогично эффективности применяемого противовирусного препарата. Цыплята, зараженные вирусом, но не получавшие препаратов погибли от гриппозной инфекции. Смертность составила 100 %.

Таким образом, изучение противовирусной активности ФС-1 в эксперименте на цыплятах, зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1), путем проведенных исследований на выживаемость, показали высокую терапевтическую эффективность, более чем в два раза, превышающую активность в сравнении с контрольным противовирусным препаратом римантадин и выраженную профилактическую активность в дозах, превышающую почти в три раза активность противовирусного препарата римантадин.

3.4.7 Влияние иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на вирус гриппа А штамм H5N1 при заболевании птиц в производственных условиях. Изучение влияния лекарственного соединения ФС-1 в виде биологической кормовой добавки «Эвритал» на вирус гриппа А штамм H5N1 в производственных условиях проведено на обособленной группе птиц во время вспышки вируса гриппа на базе Бишкульской птицефабрики Северо-Казахстанской области Республики Казахстан.

Эксперимент проводили совместно с компанией по производству лекарственных препаратов для ветеринарии ТОО «Казфармаком». Противовирусную активность препарата оценивали динамике по выживаемости птицы. Расчет выживаемости птицы брали за несколько дней до применения «Эвритал», во время применения и спустя четыре дня после применения.

Согласно полученных результатов изучения противовирусной активности применения препарата «Эвритал» в эксперименте на птицах, зараженных вирусом гриппа птиц H5N1, показало, что лекарственное соединение в виде кормовой добавки проявляет противовирусную активность, способствуя снижению гибели птицы в опытных корпусах на 91,9–98,9 %.

3.5. Моделирование ингибирующего действия ФС-1 на лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А

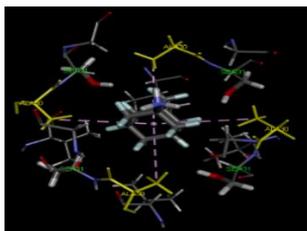
3.5.1. Получение мутантных штаммов вируса гриппа А к препаратам римантадин и осельтамивир. Мутантные штаммы вируса гриппа А устойчивые (резистентные) к препаратам римантадин и осельтамивир получены при последовательных длительных пассажах под

воздействием данных препаратов. При этом лекарственная устойчивость исходных штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (N1H1) к препаратам несколько различалась в количестве пассажей. Так лекарственная устойчивость к препарату римантадин вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) произошла в течение 12 последовательных пассажей, а вируса гриппа штамм A/Swine/Iowa/30 (N1H1) в течение 15 последовательных пассажей при тех же условиях (диапазон концентраций препарата составил от 0,0030 до 0,1000 мг/мл). К препарату осельтамивиру лекарственная устойчивость произошла за 15 последовательных пассажей при постоянном содержании и последовательном увеличении концентрации препарата от 0,009 до 0,300 мг/мл. Таким образом, в результате длительных последовательных пассажей *in vitro* получены варианты лекарственно устойчивых штаммов названных FPV_RRim, Sw_RRim, FPV_RTam, Sw_RTam.

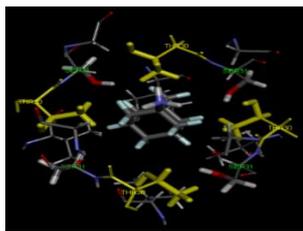
Молекулярно-генетический анализ резистентных штаммов вируса гриппа А

M1: Sequence Data Explorer	
Data Display Search Highlight Statistics Help	
Q1:FPVwt	V S L L T E Y E F F T R N G W E I C S C S S E E D P L V I R A A A S I I I L R F T
Q2:FPVRR	V S L L T E Y E F F T R N G W E I C S C S S E E D P L V I R A A A S I I I L R F T
Q3:SwSw	V S L L T E Y E F F T R N G W E I C S C S S E E D P L V I R A A A S I I I L R F T
Q4:FPVrtam	V S L L T E Y E F F T R N G W E I C S C S S E E D P L V I R A A A S I I I L R F T
Q5:SwRta	V S L L T E Y E F F T R N G W E I C S C S S E E D P L V I R A A A S I I I L R F T
Q6:Swwt	V S L L T E Y E F F T R N G W E I C S C S S E E D P L V I R A A A S I I I L R F T

M1: Sequence Data Explorer	
Data Display Search Highlight Statistics Help	
Q1:FPVRRim	A K A M E Q M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R D M V G A M R T V G I
Q2:FPVwt	A K A M E Q M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R D M V G A M R T V G I
Q3:FPVrtam	A K A M E Q M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R D M V G A M R T V G I
Q4:SwRtam	A K A M E Q M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R D M V G A M R T V G I
Q5:SwRRim	A K A M E Q M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R D M V G A M R T V G I
Q6:Swwt	A K A M E Q M A G S S E Q A A E A M E V A S Q A R D M V G A M R T V G I

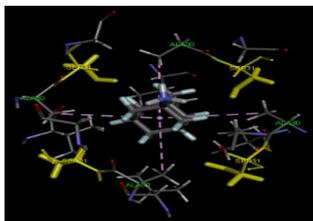


ALA30 (GCA)

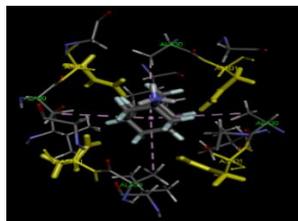


THR30 (ACA)

a



SER31 (AGT)



ASN31 (AAT)

б

Рис. 4. (а, б) Анализ аминокислотных замен в структуре M2 белка вируса гриппа.

а – активный центр белка M2 штамма FPV_RRim;

б – активный центр белка M2 штамма Sw_RRim.

Представленные наблюдения подтверждаются данными полученных результатов исследования методом молекулярно-генетического анализа резистентных штаммов вируса гриппа А, проведенных научными сотрудниками лаборатории вирусологии. Проведено секвенирование участка гена М, ответственного за резистентность к препаратам осельтамивир и римантадин. Сравнительные исследования основных молекулярно-генетических свойств резистентных к ингибиторам мутантов и исходных штаммов вируса гриппа А позволили выявить характерные специфические замены в структуре нуклеиновых кислот (НК) гена М, ответственных за формирование фенотипа устойчивости к препаратам осельтамивиру и римантадину.

3.5.2. Изучение ингибирующего действия содержащего лекарственного соединения ФС-1 на полученные в результате селекции лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А. Исследования направленные на изучение ингибирующего действия лекарственного соединения ФС-1 на полученные в результате селекции лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А FPV_RTam, Sw_RTam FPV_RRim, Sw_RRim проводили путем воздействия на них ФС-1 в концентрациях равных 25,0 мг/мл (1/2 ЦТК₅₀), 12,5 мг/мл (1/4 ЦТК₅₀) и 6,2 мг/мл (1/8 ЦТК₅₀).

Полученные результаты показали 100 % подавление репликации мутантных штаммов лекарственным соединением ФС-1 в концентрации равной 25,0 мг/мл. Исследуемые концентрации ФС-1 12,5 и 6,2 мг/мл ингибируют репликацию мутантных штаммов вируса на 2,0–6,0 log. Титр

остаточного вируса положительного контроля A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) составил 8,0 log, A/Swine/Iowa/30 (H1N1) 7,0 log.

Таким образом получены резистентные штаммы FPV_RTam, FPV_RRim, Sw_RTam и Sw_RRim вируса гриппа А к противовирусным препаратам адамантанового ряда римантадин и ингибитору нейраминидазы осельтамивир. Показано изменение биологических свойств основных поверхностных белков у полученных мутантных вариантов.

Анализ данных, полученных методом молекулярно-генетического исследования, подтвердил проявление резистентности у исходных штаммов A/FPV/Waybrige/78 (H7N7), A/Swine/Iowa/30 (H1N1) вируса гриппа под воздействием противовирусных препаратов римантадин и осельтамивир путем длительных пассажей на культуре клеток MDCK.

3.6. Совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1.

3.6.1. Влияние ФС-1 на токсичность противогриппозных препаратов при комбинированном применении. Изучение влияния иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на токсичность коммерческих противогриппозных препаратов при моно и комбинированном применении проведены *in vitro* с помощью нейтрального красного на культуре клеток MDCK по методу Chou-Talalay, при помощи программного обеспечения CompuSyn 10.1.

Доза комбинированного эффекта ФС-1 с римантадин, ингибирующая рост клеток на 50 %, составила 0,507 мг/мл активного вещества. Результат показывает снижение токсичности одного вещества за счет другого, токсичность препарата римантадин снизилась в 10 раз, а ФС-1 в 1,2 раза в отношении к монодействию препаратов.

Доза комбинированного эффекта препарата осельтамивир ингибирующая рост клеток на 50 % при комбинации с ФС-1 составила 4,130 мг/мл активного вещества. Сравнительная характеристика токсичности препарата осельтамивир и иодсодержащего лекарственного средства ФС-1 показала значительное его снижение при комбинированном применении препаратов по сравнению с монодействием - в 27,7 раз ниже токсичности осельтамивир и в 9,6 раз ниже токсичности ФС-1.

Доза комбинированного эффекта ФС-1 с ацетилсалициловой кислотой составила 1,300 мг/мл активного вещества, изменения токсичности комбинации не наблюдалось, но по отношению к монодействию снизилась токсичность ФС-1 в 3 раза.

Использование иодсодержащего лекарственного средства ФС-1 совместно с противогриппозными препаратами римантадин и осельтамивир

в экспериментах *in vitro* показало, что комбинационный индекс (CI) для всех комбинаций составляет больше единицы - $CI > 1$, для комбинации ФС-1-римантадин $CI = 2,018$; для комбинации ФС-1-осельтамивир $CI = 13,726$ и для комбинации ФС-1-АSА $CI = 1,518$. Количественное определение взаимодействия противовирусных лекарственных препаратов $CI > 1$ указывает на эффект антагонизма желательного при изучении токсичности, где одно вещество способно устранять и предупреждать развитие нежелательных эффектов другого, сохраняя главное действие препарата согласно фармакодинамическому взаимодействию лекарственных веществ [Bijnsdorp, I.V., 2011].

Полученные значения индекса снижения дозы (DRI) в результате проведенных исследований показали во сколько раз может быть снижена доза противовирусных препаратов в комбинации для достижения эффекта индивидуального действия каждого препарата по отдельности. DRI для комбинации: ФС-1-римантадин составил 9.9:1, для комбинации: ФС-1-осельтамивир DRI 3.4098:1 и для комбинации ФС-1-АSА 1:2.67.

Суммируя полученные результаты проведенных исследований, следует заключить, что комбинированное применение лекарственного соединения ФС-1 влияет на токсичность противовирусных препаратов. Из данных полученных результатов установлено, что применение ФС-1 в комбинации снижает дозы противовирусных препаратов римантадин и осельтамивир, проявляя выраженный антагонистический эффект.

Таким образом, исследования, полученные научными методами, оценка безопасности, качества иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на этапе доклинических экспериментальных исследований в условиях *in vitro* на культуре клеток MDCK показывает, что комбинированное применение ФС-1 с противовирусными препаратами римантадин, осельтамивир и препаратом ацетилсалициловой кислотой значительно снижает их токсические свойства. Анализ воздействия ФС-1 на препараты римантадин и осельтамивир в эксперименте *in vitro* на культуре клеток MDCK показал, что комбинационный индекс для всех составил больше единицы - $CI > 1$, что указывает на проявление антагонизма желательного при изучении токсичности.

3.6.2. Комбинированное применение ФС-1 с противовирусными препаратами в эксперименте *in vitro*. Изучение комбинированного действия ФС-1 проводили совместно с противовирусными препаратами на модели культуры клеток MDCK при экспериментальной гриппозной инфекции высокопатогенным вирусом гриппа штаммом А/FPV/Waybrige/78 (H7N7). Оценку противовирусной активности определяли в реакции гемагглютинации по степени подавления агглютинации эритроцитов. Учет

результатов производили через 72 часа инкубации смеси препаратов и вируса с клетками. Результаты действия ФС-1 на противовирусные препараты в отношении вируса гриппа в опытах *in vitro* при вирусингибирующей схеме внесения образцов представлены на рис. 5

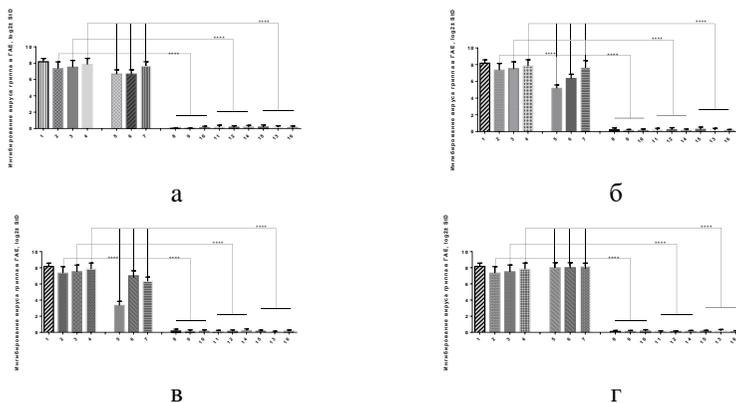


Рис. 5. Ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) ФС-1 с противогриппозными препаратами в вирулицидной схеме воздействия на культуре клеток MDCK

а) – ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,12 мг/мл; 0,06 мг/мл; 0,03 мг/мл в комбинации с препаратом римантадин в концентрациях 0,0028 мг/мл; 0,0014 мг/мл; 0,0007 мг/мл. б) – ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,12 мг/мл; 0,06 мг/мл; 0,03 мг/мл, в комбинации с препаратом осельтамивир в концентрациях 0,0017 мг/мл; 0,0009 мг/мл; 0,0005 мг/мл. в) – ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,12 мг/мл; 0,06 мг/мл; 0,03 мг/мл, в комбинации с препаратом рибавирин в концентрациях 0,00175 мг/мл; 0,00087 мг/мл; 0,00044 мг/мл. г) – ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,12 мг/мл; 0,06 мг/мл; 0,03 мг/мл, в комбинации с препаратом амиксин в концентрациях 0,0014 мг/мл; 0,0007 мг/мл; 0,0005 мг/мл.

Из представленных рисунков видно, что применение иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 совместно с римантадином, осельтамивиром, рибавирином и амиксином усиливает фармакологический эффект, полностью ингибируя размножение вируса гриппа. Резюмируя полученные результаты, установлено, что комбинированное применение иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 с препаратами римантадин, осельтамивир, рибавирин и амиксин в исследуемых концентрациях оказывает выраженное фармакологическое действие на вирус гриппа, повышая противовирусную активность на культуре клеток MDCK.

Таким образом, следует отметить, что иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 обладает синергетическим действием усиливая терапевтическую активность широко используемых на практике противогриппозных препаратов: римантадин, осельтамивир, рибазол и амиксин против вируса гриппа.

3.6.3. Комбинированное применение ФС-1 с противогриппозными препаратами в экспериментах *in ovo*. Изучение противовирусного комбинированного действия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 и противогриппозных препаратов осельтамивира, рибазола, римантадина и амиксина осуществляли на куриных эмбрионах с использованием вируса гриппа штамм A/Waybrige/78 (H7N7). Результаты воздействия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на противогриппозные препараты против вируса гриппа в опытах *in ovo* представлены на рис. 6. Оценку противовирусной активности проводили по вирусингибирующей схеме внесения образцов.

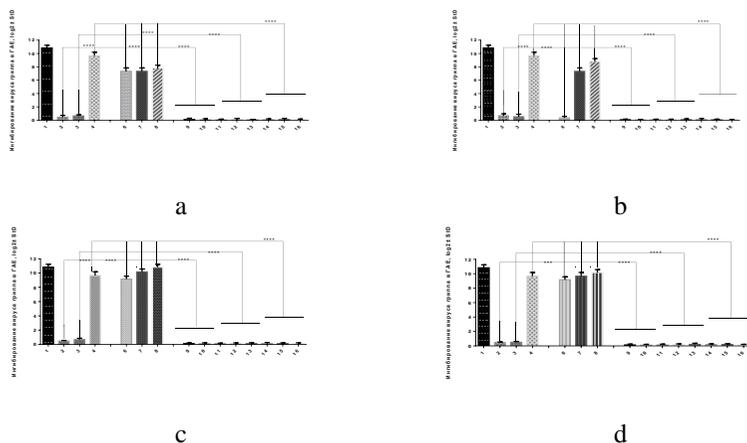


Рисунок 6. Ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) ФС-1 с противогриппозными препаратами в вирулицидной схеме воздействия в куриных эмбрионах

a) – ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,27 мг/мл; 0,14 мг/мл; 0,07 мг/мл в комбинации с препаратом римантадин в концентрациях 2,5 мг/мл; 1,25 мг/мл; 0,625 мг/мл. b) – ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,27 мг/мл; 0,14 мг/мл; 0,07 мг/мл, в комбинации с препаратом осельтамивир в концентрациях 0,312 мг/мл; 0,156 мг/мл; 0,078 мг/мл. c) – ингибирование вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,27 мг/мл; 0,14 мг/мл; 0,07 мг/мл, в комбинации с препаратом рибазол в концентрациях 2,5 мг/мл; 1,25 мг/мл; 0,625 мг/мл. d) – ингибирование вируса гриппа штамм

A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) препаратом ФС-1 в концентрациях 0,27 мг/мл; 0,14 мг/мл; 0,07 мг/мл, в комбинации с препаратом амиксин в концентрациях 2,5 мг/мл; 1,25 мг/мл; 0,625 мг/мл.

Совместное действие препаратов римантадин, рибазол и амиксин в концентрациях 2,50; 1,25 и 0,625 мг/мл с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1 в концентрациях 0,27; 0,14 и 0,07 мг/мл приводили к полному подавлению репродукции вируса гриппа, что указывает на высокие терапевтические свойства изучаемых комплексов, когда препарат римантадин при моно действии на вирус гриппа в концентрациях 2,50 и 1,25 мг/мл снижал титр вируса гриппа на 3,6 log, а в концентрации 0,625 мг/мл на 3,2 log, препарат рибазол при индивидуальном действии в концентрациях 2,50; 1,25; 0,625 мг/мл снижал репликацию вируса на 1,0-2,0 log, а препарат при амиксин при моно воздействии в концентрациях 2,50; 1,25 и 0,625 мг/мл снижал репликацию вируса на 1,0-1,8 log.

Полученные результаты проведенных исследований в опытах *in ovo* в куриных эмбрионах в отношении вируса гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) установлено, что ФС-1 в комбинации с противогриппозными препаратами римантадин, осельтамивир, рибазол и амиксин обладает высоким синергетическим действием в отношении широко используемых на практике противовирусных препаратов.

На основании проведенных экспериментов показано, что применение в комбинации с противогриппозными препаратами иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 проявляет синергетическое действие, повышающее их фармакологическую активность и усиление ингибирующего действия на вирус гриппа А.

3.6.4. Комбинированное применение ФС-1 с противогриппозными препаратами в экспериментах *in vivo*. В эксперименте изучения комбинированной активности ФС-1 с препаратом римантадин на цыплятах использовали вирус гриппа птиц штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7).

Совместное действие ФС-1 с римантадин в исследуемых концентрациях на вирус гриппа птиц штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7), приводило к полному подавлению репродукции. Полученные результаты в эксперименте *in vivo* на цыплятах указывают на высокие фармакологические свойства лекарственного вещества ФС-1 в композиции с противовирусным препаратом римантадин. Тогда как зараженные вирусом гриппа цыплята, получавшие только препарат римантадин в концентрациях 8,33 и 4,16 мг/кг выживали только от 10 % до 43 %, а при введении ФС-1 в концентрации 13,1 и 6,6 мг/кг выжило от 43 % до 78 %. Установлено, что титр в РГА остаточного вируса положительного контроля (зараженные и не леченые цыплята) составил 8,0 lg TCID₅₀/мл. Все исследуемые дозы ФС-1 в композиции с противовирусным

препаратом римантадин полностью подавляют репродукцию вируса гриппа. У цыплят, зараженных вирусом и получавших препарат римантадин титр инфекционности вируса составил $6,52 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. У цыплят зараженных вирусом и получавших ФС-1 титр инфекционности составил $4,37 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

Таким образом, лекарственное соединение ФС-1 обладает выраженным противовирусным действием совместно с представленными коммерческими препаратами

ВЫВОДЫ

1. Исследуемые иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.4, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8 на основании изучения биофармацевтической характеристики по степени растворимости, проницаемости и интенсивности метаболизма относятся к III классу согласно биофармацевтической системе классификаций.

2. Скрининг иодсодержащих лекарственных соединений по биодоступности, цитотоксичности на культуре клеток MDCK, острой токсичности на мышах, изучении противовирусной активности на примере высокопатогенного вируса гриппа птиц штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) показал наиболее эффективную композицию ФС-1 из числа исследованных.

3. Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 проявляет выраженную противовирусную активность в экспериментах *in vitro*, *in ovo* и *in vivo* к разным штаммам вируса гриппа птиц: A/FPV/Waybrige/78 (H7N7), A/FPV/Rostock/34 (H7N1), A/Алматы/5/98 (H3N2), A/черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6), A/Astana RG/6:2/2009 (H5N1).

4. Летальная доза LD_{50} иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 при однократном пероральном введении составила для мышей $117,74 \text{ мг/кг}$, а для крыс – $922,0 \text{ мг/кг}$.

5. В соответствии со шкалой токсичности веществ, иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 относится к умеренно токсичным веществам, к третьему классу опасности ГОСТ 12.1.007–76. При этом его коэффициент кумуляции составил 1,45, что соответствует по международной шкале оценки токсичности параметрам препаратов со слабовыраженным кумулятивным эффектом, сочетающих в себе низкую токсичность и оказывающих благоприятное воздействие на макроорганизм.

6. Динамика распределения, накопления и выведения ФС-1 меченого радиоактивным иодом-131 при однократном введении в организм цыплят подчиняется законам линейной кинетики: лекарственное соединение достаточно быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта в кровь и

через 30 минут определяется во всех органах, а максимальное значение его концентрации достигается в течение первых трех часов.

7. Терапевтическая доза ФС-1 при ежедневном приеме соединения ФС-1 в течение семи дней в концентрации 26,3 мг/кг привела к 100 % сохранению поголовья зараженных вирусом гриппа цыплят, тогда как при приеме коммерческого препарата римантадина в эти же сроки выживаемость цыплят составила только 43 %. В полученных образцах от цыплят, принимавших ФС-1 в дозе 26,3 мг/кг, показало, что соединение ФС-1 подавляет репродукцию вируса на 8,0 log. Тогда как у цыплят, зараженных вирусом и получавших препарат римантадин подавление репродукции вируса отмечено только на 2,0 log. Титр в РГА остаточного вируса положительного контроля (зараженные и не леченые цыплята) составил 8,0 log.

8. Впервые показано снижение токсичности противовирусных препаратов римантадин, осельтамивир и препарата ацетилсалициловая кислота при комбинированном применении с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1 в эксперименте *in vitro* на культуре клеток MDCK с количественной оценкой по методу Чоу-Талалая. Комбинационный индекс (CI) для всех комбинаций препаратов составляет больше единицы – $CI > 1$: для комбинации ФС-1 – римантадин $CI = 2,018$; для комбинации ФС-1-осельтамивир $CI = 13,726$, для комбинации ФС-1-ASA $CI = 1.518$. Установлены индексы снижения дозы (DRI) для комбинации: ФС-1 – римантадин составил 9,9:1; для комбинации: ФС-1 – осельтамивир DRI составил 3,4098:1 и для комбинации ФС-1-ASA 1:2.67. А также графические изображения уравнений медианного эффекта и изоболограммы демонстрируют выраженный эффект снижения дозы токсичности противогриппозных препаратов римантадин и осельтамивир.

9. Установлено, что применение иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в экспериментах *in vitro*, *in ovo* и *in vivo* на высокопатогенный штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) вируса гриппа птиц при в комбинации с противогриппозными препаратами - осельтамивир, римантадин, рибазол, амиксин оказывает синергетическое действие, характеризующееся повышением их фармакологической активности, усилением ингибирующего действия на вирус. Комбинированное применение ФС-1 сокращает продолжительность болезни и повышает сохранность животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основе данных скрининга лекарственных соединений отобрано иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1, обладающее противовирусной активностью.

Ежедневный прием в эксперименте на цыплятах данного соединения ФС-1 в течение семи дней в дозе 26,3 мг/кг обеспечивает 100 % сохранение поголовья зараженных вирусом гриппа, свидетельствующий о терапевтической эффективности.

Выявленная синергетическая активность иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в отношении лекарственных препаратов, применяемых в противогриппозной терапии, позволила получить Патент № 7196 на полезную модель «Способ повышения фармакологической активности противогриппозных препаратов» РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» Республики Казахстан.

На основании используемых в исследовании методов составлены и изданы Методические Рекомендации «Методы проведения исследований иодсодержащих соединений на антивирусную активность в отношении гриппа птиц», МИИР РК, Алматы, 2020. – 64с. ISBN 978-601-278-941-6.

Выпущена Монография «Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами».

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. И. С. Коротецкий. Характеристика мутантных штаммов H1N1 и H7N7 вируса гриппа устойчивых к коммерческим противовирусным препаратам [Текст] / [Коротецкий И. С., Зубенко Н. В., Шилов С. В. И др]. Журнал «Биотехнология Теория и практика». – Алматы, 2015. – С. 47-56. DOI:10.11134-btp.4.2015.6.

2. М. Е. Кулманов. Антигриппозное действие лекарственного вещества ФС-1 в эксперименте на цыплятах [Текст] / [М.Е. Кулманов, Л. Н. Иванова, Н. Н. Соколова и др]. Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – Алматы, 2015. – № 5(311). – С. 27-35. ISSN 2224-5308.

3. Л. Н. Иванова. Противовирусная активность лекарственного средства ФС-1 в опытах *in ovo* [Текст] / [Л. Н. Иванова] Журнал Известия НАН КР. Раздел Медицина. – Бишкек, 2015. – № 4. – С 34-41. ISSN 0002-3221

4. М. Е. Кулманов. Биофармацевтические свойства комплексов иода [Текст] / М.Е. Кулманов, Б. Ф. Керимжанова, И.С. Коротецкий, Л. Н. Иванова. Сборник статей по материалам LVI международной научно-практической конференции. Научная дискуссия: Инновации в современном мире. – Москва, 2016. – № 12 (55). – С. 144-157. ISSN 2309-1959

5. А. И. Ильин. Противовирусная активность лекарственного средства ФС-1 в отношении вируса гриппа штамма А [Текст] / [А. И. Ильин, Б. Ф. Керимжанова, Л. Н. Иванова и др]. Журнал Известия НАН КР. – Бишкек, 2016. – № 1. – С 43-51. ISSN 0002-3221

6. Л. Н. Иванова. Антивирусная активность ионных наноструктурированных комплексов *in vitro* [Текст] / Л. Н. Иванова, Б. Ф. Керимжанова, А. И. Ильин. Сборник статей по материалам XLVIII международной научно-практической конференции. Часть II Научная дискуссия: Инновации в современном мире. – Москва, 2016. – № 4 (47). – С. 89-96. ISSN 2309-1959

7. А. И. Ильин. Цитотоксичность ионных наноструктурированных комплексов *in vitro* [Текст] / А. И. Ильин, Л. Н. Иванова, Б. Ф. Керимжанова, Н. Н. Соколова. Сборник статей по материалам XLVIII международной научно-практической конференции. Часть II Научная дискуссия: Инновации в современном мире. – Москва, 2016. – № 4 (47). – С. 96-105. ISSN 2309-1959

8. Б. Ф. Керимжанова. Фармакокинетика лекарственного соединения ФС-1 при однократном пероральном применении в организме цыплят [Текст] / Б. Ф. Керимжанова, Л. Н. Иванова, А. И. Ильин. Сборник статей по материалам XLVIII международной научно-практической конференции. Часть II Научная дискуссия: Инновации в современном мире. – Москва, 2016. – № 4 (47). – С. 109-118. ISSN 2309-1959

9. А. И. Ильин. Физико-химическая характеристика качественного и количественного состава новых синтезированных наноструктурированных комплексов, определение их противовирусной активности и токсичности [Текст] / А. И. Ильин, Б. Ф. Керимжанова, Л. Н. Иванова. Сборник статей по материалам XLVIII международной научно-практической конференции. Часть II Научная дискуссия: Инновации в современном мире. – Москва, 2016. – № 4 (47). – С. 118-131. ISSN 2309-1959

10. Б. Ф. Керимжанова, Оценка эффективности иодсодержащего комплекса в борьбе с гриппом птиц А [Текст] / Б. Ф. Керимжанова, Л. Н. Иванова, А. И. Ильин. Известия НАН РК. Серия аграрных наук. – Алматы, 2019. – № 5. ISSN 2224-526X. DOI:10.32014/2019.2224-526X.57. UDS 619.9:615.2.014

11. Патент на полезную модель № 2021/1124.2 «Способ повышения фармакологической активности противогриппозных препаратов».

12.. Методические рекомендации «Методы исследований иодсодержащих соединений на антивирусную активность в отношении гриппа птиц». Б. Ф Керимжанова., Парецкая Н.А., Коротецкий И.С., Иванова Л. Н., Зубенко Н. В., Шилов С. В., КузнецоваТ. В. МИИР РК, Алматы, 2020. – 64с.

13. Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами. [Текст] / А. И. Ильин, Б. Ф. Керимжанова, И. С. Коротецкий, Л. Н. Иванова / Монография. - Алматы, «Service Press», 2023. – 188 с.

14. Iliya S. Korotetskiy. Complete Genome Sequences of Gram-Positive Opportunistic Pathogens Isolated from Hospitals in Almaty, Kazakhstan. [Text] / Iliya S. Korotetskiy. Ardak B. Jumagazieva, Bahkytzhan F. Kerimzhanova et al]. ASM Journals Microbiology Resource Announcements, 2022. Vol. 11, No.4. – С. 1-3. DOI:10.1128-mra.00093-22 ISSN:2576-098X.

15. Iliya S. Korotetskiy. Whole genome sequence data of *Stenotrophomonas maltophilia* SCAID WNDI-2022(370). [Text] / Iliya S. Korotetskiy. Ardak B. Jumagazieva, Bahkytzhan F. Kerimzhanova et al]. Data in Brief, 2022. Vol. 45, 108694. – С.1-9. DOI: 10.1016-j.dib.2022.108694.

16. Iliya S. Korotetskiy. Analysis of Whole-Genome Sequences of Photogenic Gram-Negative Isolated from the Same Hospital Environment to Investigate Common Evolutionary Trends Associated with Horizontal Gene Exchange, Mutations and DNA Methylation Patterning. [Text] / Iliya S. Korotetskiy, Sergey V. Shilov, Tatyana V. Kusnetsova, et al]. Microorganisms, 2023, 11(2), 323; – С. 1-25. DOI: 10.3390/microorganisms11020323.

17. I. S. Korotetskiy. Analysis of the qualitative and quantitative diversity of mouse intestinal virome after treatment of drug-resistant pneumonia with a

coordination compound. [Text] / [I. S. Korotetskiy T.V. Kuznetsova., O.N.Reva., et al]. МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ, 2023 No (40). ISSN 2304-585X www.imv-journal.kz doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.05. IRSTI: 34.15.31, 34.25.15I.S.

18. Lyudmila N. Ivanova. Influence of iodine-containing complex on the toxicity of drugs used for the treatment of ARVI and Influenza virus in combined application [Text] / [Lyudmila N. Ivanova, Ilya S. Korotetskiy, Bahkytzhana F. Kerimzhanova. Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research JPPRes-24-2038.

Иванова Людмила Николаевнаының 03.01.06 – биотехнология адистиги боюнча биология илимдеринин кандидаты илимий даражасын алуу үчүн « Канаттуулардын тумоосунун А вирусуна йоддун жаңы координациялык кошумчасынын ФС-1 таасиринин мүнөздөмөсү жана гриппке каршы препараттарды колдонуунун технологиясын өркүндөтүү» деген темадагы диссертация.

РЕЗЮМЕСИ

Негизги сөздөр: дары-дармектер, скрининг, канаттуулар тумоосунун А вирусу, йод, синергетикалык, фармакологиялык, вируска каршы активдүүлүк.

Изилдөө объектилери: полипептиддер, углеводдор, йод менен аралашкан щелочтуу жана жер щелочтуу металлдардын туздарынан түзүлгөн тогуз ФС препараты.

Изилдөө ыкмалары: микробиологиялык (вирусологиялык) жана гистологиялык изилдөө ыкмалары.

Иштин максаты:

Изилдөө ыкмалары:

Алынган натыйжалар жана алардын жаңылыктары: Тогуз иштелип чыккан дарылардын биоэкиваленттүүлүгү жана биоэквиваленттүүлүгү изилденген. Дары-дармектерди текшерүү жүргүзүлдү. Жаңы синтезделген ФС-1 препаратынын in vitro, in ovo жана курч уулуулугу in vivo изилденип, вируска каршы активдүүлүгү аныкталган.

Синтезделген ФС-1 препараты канаттуулардын А тумоосуна каршы антивирустук активдүүлүккө ээ экендиги биринчи жолу аныкталган.

Биринчи жолу in vitro, in ovo, in vivo, ФС-1 препаратын кеңири колдонулуучу вируска каршы дарылар менен айкалыштыруу аркылуу гриппке каршы дарылардын таасирин күчөтүүчү ыкма түзүлдү, бул аны

түзүүгө мүмкүндүк берди. жана ойлоп табууга табыштаманы КР МЖ НИИСге берүү, 2021, өтүнмөнүн № 2021/1124.2.

Колдонуу буюнча сунуштар: Даярдалган жана жарыяланган Методикалык сунуштар: "Канаттуулар тумоосуна каршы антивирустук активдүүлүк үчүн йод камтыган кошулмаларды изилдөө ыкмалары", 64-бет, Алматы 2020.

2021-жылы № 1124.2 үчүн Казакстан Республикасынын ойлоп табууга өтүнмө берилген.

«ФС-1 жаны препаратынын вируска каршы дарылар менен айкалыштырып колдонуудагы синергетикалык эффекти» деген монография даярдалып, жарыкка чыкты. Алматы, «Service Press», 2023. – 256.

Практикалык мааниси жана экономикалык эффективдүүлүгү кеңири колдонулган вируска каршы препараттарды колдонуу ыкмасын жакшыртууда. Комплекстүү колдонуу аркылуу дарылардын бир багыттуу аракетин вируска каршы активдүүлүктү жогорулатат, канаттуулар тумоосунун А жогорку патогендүү штамдарына каршы терапиялык эффективдүүлүгүн олуттуу жогорулатат.

ФС-1 таасири астында вируска каршы препараттардын терапиялык эффективдүүлүгүнүн олуттуу жогорулашы практикалык ветеринарияда жана медицинада дарылоо жана профилактикалык максаттарда да колдонулушу мүмкүн.

Колдонуу жааты: биотехнология, вирусология, ветеринария, медицина

РЕЗЮМЕ

диссертации Ивановой Людмилы Николаевны на тему «Характеристика воздействия иодсодержащего комплекса ФС-1 на вирус гриппа птиц А и совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по специальности 03.01.06 – биотехнология

Ключевые слова: лекарственные соединения, скрининг, вирус гриппа птиц А, иод, синергетическая, фармакологическая, противовирусная активность,

Объекты исследования: девять разработанных лекарственных соединения ФС, образованных полипептидами, карбогидратами, солями щелочных и щелочноземельных металлов интеркалированных иодом.

Предметы исследования: Характеристика воздействия йодсодержащего комплекса ФС-1 на вирус гриппа птиц А и совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов.

Цели исследования: Совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов с лекарственным соединением, обладающим противовирусным действием, сочетающего в себе низкую токсичность и оказывающего благоприятное воздействие на макроорганизм.

Методы исследования: микробиологические (вирусологические) и гистологические методы исследования.

Полученные результаты и их новизна: Изучены биодоступность и биоэквивалентность девяти разработанных лекарственных соединений. Проведен скрининг лекарственных соединений. Изучена токсичность *in vitro*, *in ovo* и острая токсичность *in vivo* вновь синтезированного лекарственного соединения ФС-1 и определена противовирусная активность.

Впервые установлено, что синтезированное лекарственное соединение ФС-1 обладает противовирусной активностью против гриппа птиц А.

Впервые *in vitro*, *in ovo*, *in vivo* установлен способ, усиливающий действие противогриппозных препаратов путем комбинированного применения лекарственного соединения ФС-1 с широко используемыми противовирусными препаратами.

Впервые показано снижение токсичности противовирусных препаратов римантадин, осельтамивир и препарата ацетилсалициловая кислота при комбинированном применении с лекарственным соединением ФС-1 в эксперименте *in vitro* на культуре клеток MDCK.

Рекомендации по использованию: Подготовлены и изданы Методические Рекомендации: «Методы исследований йодсодержащих соединений на антивирусную активность в отношении гриппа птиц», с.64, Алматы 2020 г.

Получен Патент на полезную модель в НИИС МЮ РК №2021/1124.2. «Способ повышения фармакологической активности противогриппозных препаратов».

Подготовлена и выпущена Монография «Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами». Алматы, «Service Press», 2023. – 256 с.

Практическая значимость и экономическая эффективность заключается в совершенствовании способа применения широко используемых противовирусных препаратов. Однонаправленное действие лекарственных соединений путем комбинированного применения повышает противовирусную активность, значительно усиливает терапевтическую эффективность против высокопатогенных штаммов гриппа птиц А.

Значительное усиление терапевтической эффективности противовирусных препаратов под воздействием ФС-1 может быть использовано в практической ветеринарии и медицине, как с лечебной, так и профилактической целью.

Область применения: биотехнология, ветеринария, медицина.

SUMMARY

Dissertation by Ivanova Lyudmila Nikolaevna on the topic " Characteristics of the effect of the new coordination compound of iodine FS-1 on the avian influenza A virus and improvement of the technology for the use of anti-influenza drugs " for the scientific degree of candidate of biological sciences, on the specialty 03.01.06 - biotechnology

Keywords: drugs, screening, avian influenza virus A, iodine, synergistic, pharmacological, antiviral activity.

Objects of research: nine developed drugs FS drugs formed by polypeptides, carbohydrates, salts of alkaline and alkaline earth metals intercalated iodine.

Subject of research:

Purpose of the work:

Research methods: microbiological (virological) and histological research methods.

The results obtained and their novelty: Bioavailability and bioequivalence of nine developed drugs have been studied. Screening of medicines was carried out. The toxicity in vitro, in ovo and acute toxicity in vivo of the newly synthesized drug FS-1 was studied, and the antiviral activity was determined.

It was established for the first time that the synthesized drug FS-1 has antiviral activity against avian influenza A.

For the first time in vitro, in ovo, in vivo, a method has been established that enhances the effect of anti-influenza drugs by the combined use of the drug FS-1 with widely used antiviral drugs, which made it possible to draw up and file an application for an invention at the NIIS MJ RK, 2021, application number 2021/1124.2.

Recommendation for use: Implementation degree, practical significance, and economic efficiency: Prepared and published Methodological Recommendations: "Methods of research of iodine-containing compounds for antiviral activity against avian influenza", p.64, Almaty 2020.

A patent for a utility model was received at the NIIS of the Ministry of Justice of the Republic of Kazakhstan No. 2021/1124.2. "A method for increasing the pharmacological activity of anti-influenza drugs."

A monograph “Synergistic effect of the new drug FS-1 when combined with antiviral drugs” was prepared and published. Almaty, “Service Press”, 2023. – 256 p.

The practical significance and economic efficiency lie in improving the method of using widely used antiviral drugs. The unidirectional action of drugs through combined use increases the antiviral activity, significantly enhances the therapeutic efficacy against highly pathogenic strains of avian influenza A.

A significant increase in the therapeutic efficacy of antiviral drugs under the influence of FS-1 can be used in practical veterinary medicine and medicine, both for therapeutic and prophylactic purposes.

Application area: biotechnology, virology, veterinary medicine, medicine.

Формат 60x84/16. Печать офсетная.
Объем 1,75 п.л. Тираж 20 экз.