

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**АО «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ»
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН**

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук,
профессор, академик НААН РК
Керимжанова Бахытжан
Фазылжановна

БИШКЕК – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ДИССЕРТАЦИИ.....	15
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
ГЛАВА 2 МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
2.1. Методология исследования.....	40
<i>Объекты исследования</i>	41
<i>Предметы исследования</i>	43
2.2. Методы исследования.....	43
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
3.1. Технология размножения вируса гриппа птиц А, изучение биофармацевтической растворимости и проницаемости иодсодержащих лекарственных соединений.....	50
3.1.1. Технология размножения вируса гриппа птиц А <i>in vitro</i> на культуре клеток.....	50
3.1.2. Изучение растворимости и проницаемости иодсодержащих лекарственных соединений.....	52
3.2. Степень фармакологического действия иодсодержащих лекарственных соединений.....	60
3.2.1. Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений <i>in vitro</i> на культуре клеток MDCK.....	60
3.2.2. Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений <i>in vivo</i> в эксперименте на мышах.....	64
3.3. Скрининг наиболее активного иодсодержащего лекарственного соединений, изучение противовирусной активности на модели пандемического вируса гриппа птиц штамм А/FPV/Waybrige/78/H7N7.....	68
3.4. Воздействие иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на вирус гриппа птиц А.....	73
3.4.1. Определение острой токсичности ФС-1 в эксперименте по на крысах.....	73
3.4.2. Определение хронической токсичности ФС-1 в эксперименте на мышах.....	88
3.4.3. Изучение кумулятивного эффекта ФС-1 в эксперименте на мышах.....	89
3.4.4. Фармакокинетика ФС-1 меченного радиоактивным иодом-131 в организме цыплят при однократном пероральном применении.....	92
3.4.5. Воздействие ФС-1 на вирус гриппа А в эксперименте на куриных эмбрионах с различными штаммами: А/FPV/Rostock/34/H7N1,	

/Алматы/5/98(H3N2), А/черноголовый хохотун/Атырау/744/04(H13N6).....	99
3.4.6. Воздействие ФС-1 на вирус гриппа штамм А/FPV/Rostock/34/H7N1 в эксперименте на цыплятах.....	105
3.4.7. Влияние иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на вирус гриппа А штамм H5N1 при заболевании птиц в производственных условиях.....	115
3.5. Моделирование ингибирующего действия ФС-1 на лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А.....	117
3.5.1. Получение мутантных штаммов вируса гриппа А к препаратам римантадин и осельтамивир.....	117
3.5.2. Изучение ингибирующего действия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на полученные в результате селекции лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А.....	126
3.6. Совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов с иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1.....	127
3.6.1. Влияние ФС-1 на токсичность противогриппозных препаратов при комбинированном применении.....	127
3.6.2. Комбинированное применение ФС-1 с противогриппозными препаратами в эксперименте <i>in vitro</i>	134
3.6.3. Комбинированное применение ФС-1 с противогриппозными препаратами в экспериментах <i>in ovo</i>	141
3.6.3 Комбинированное применение ФС-1 с противогриппозными препаратами в экспериментах <i>in vivo</i>	149
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	152
ВЫВОДЫ.....	161
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	163
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	164
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	191
Патент РК на полезную модель.....	191

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей диссертации применяются следующие термины и сокращения с соответствующими определениями:

токсичность – мера вредного воздействия исследуемого материала на организм в условиях однократного или многократного введения;

скрининг – стадия идентификации и отбора лекарственных средств *in vitro*, *in ovo*, *in vivo*;

фармакокинетика – это кинетические закономерности химических и биологических процессов, происходящих с лекарственным соединением в организме млекопитающего;

цитотоксичность – повреждающее действие веществ путем формирования глубоких структурных и функциональных изменений в клетках, приводящих к их гибели;

эмбриотоксичность – способность исследуемого материала при проникновении в организм вызывать гибель эмбрионов;

АЛТ – аланинаминотрансфераза;

АО – акционерное общество;

АСТ – аспаратаминотрансфераза;

БКС – биофармацевтическая система классификации;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ГАЕ – гемагглютинирующая единица;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЕЭС – европейское экономическое сообщество;

ИМиВ – институт микробиологии и вирусологии;

ИК – инфракрасная спектроскопия;

ИК₅₀ – ингибирующая концентрация, концентрация препарата, при которой в культуре наблюдается 50 % подавление инфекционной активности вируса;

ИФН – интерферон;

КОЕ – колониобразующая единица;

КРС – крупный рогатый скот;

ЛД₅₀ – доза вызывающая гибель 50 % животных;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

МНК – максимальная нетоксическая концентрация;

МОН РК – Министерство образования и науки Республики Казахстан;

МПК – максимальная переносимая концентрация;

МТТ – метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид;

НАН РК - Национальная академия наук Республики Казахстан;

НИИ – научно-исследовательский институт;

НИИС МЮ РК – Национальный институт интеллектуальной собственности
Министерства Юстиции Республики Казахстан;

НЦПП – Научный центр противомикробных препаратов;

НЦГНТЭ – Национальный центр государственной научно-технической
экспертизы;

Осельтамивир – противовирусный препарат известен под торговой маркой
«Тамифлю»;

ОК – отрицательный контроль;

ОП – оптическая плотность;

ОРЗ – острые респираторные заболевания;

ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции;

ПВС – поливиниловый спирт;

РАМН – Российская академия медицинских наук;

РГА – реакция гемагглютинации;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ТЦД₅₀ – доза вируса, инфекционная для 50 % клеток (тканевая
цитопатическая доза);

ФС – фармацевтическое соединение;

ЦМВ – цитомегаловирус;

ЦТК₅₀ – цитотоксическая концентрация, при которой гибнет 50 % клеток;

ЭИД₅₀ – доза вируса, инфекционная для 50 % куриных эмбрионов (эмбриональная инфекционная доза);

AUC - Area Under the Curve (площадь под кривой);

DMEM – минимальная среда Игла, модифицированная Дюльбекко;

EMA – European Medicines Agency;

FBS - Fetal bovine serum;

FDA - Food and Drug Administration;

GLP – Good Laboratory Practice (Надлежащая лабораторная практика);

in ovo – проведение эксперимента на курином эмбрионе;

in vitro – проведение эксперимента в пробирочных условиях;

in vivo – проведение эксперимента в условиях живого организма (лабораторные животные);

MDCK – madin darbin canin kidney (клетки почек собаки);

MRT – Mean Residence Time (среднее время пребывания);

NA – нейраминидаза;

NK – natural killer cells (естественные киллеры, натуральные киллеры);

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development (организация экономического сотрудничества и развития);

PBS – Phosphate-buffered saline;

Vero – клетки эпителия почек зеленой мартышки

WHO – World Health Organization (Всемирная организация здравоохранения).

ВВЕДЕНИЕ

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. Анализ ситуации согласно данным литературы, показывает, что возрастает угроза их широкого распространения, приводящая к значительному социальному и экономическому ущербу [1]. Среди вирусных заболеваний с всеобщей и высокой восприимчивостью к инфекции наибольшее распространение имеют грипп, парагрипп, респираторно-синцитиальная инфекция и др. В настоящее время грипп и острые респираторные заболевания остаются лидирующими в мире среди других вирусных инфекций. Грипп сельскохозяйственных животных и птиц – самое коварное и непредсказуемое заболевание для птицеводства и животноводства. Смертность кур и индеек в промышленных стадах от заражения высокопатогенными штаммами вируса достигает 100 %. Вирус крайне контагиозен, способен переноситься по воздуху и быстро мутирует, а выработка вакцин осложняется большой вариативностью штаммов. По требованиям Международного эпизоотического бюро, пораженные стада полностью уничтожаются. В зонах, приближенных к очагам, вводится карантин, а все помещения, оборудование и транспорт обеззараживаются. Кроме того, прекращается реализация продукции птицеводства из пораженных регионов [2-4]. Экономический ущерб от данного заболевания велик в связи с массовой гибелью заболевших птиц, необходимостью проведения жестких карантинных и ветеринарно-санитарных мероприятий, включая уничтожение больной птицы. 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 пандемия птичьего гриппа в мире только в 2005 году нанесла ущерб, оцениваемый в 4 млрд евро [5-7]. Согласно данным ВОЗ, смертность больных среди людей от инфекционных заболеваний занимает второе место в мире после болезней сердечно-сосудистой системы [1].

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 противовирусным 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 [8-13].

Вирус способен переноситься по воздуху, быстро мутировать и характеризоваться большой вариабельностью штаммов. Впервые всеобщее внимание данная проблема привлекла в 1997 году, когда в Гонконге вспыхнула масштабная эпизоотия высокопатогенного гриппа. С тех пор по всему миру неоднократно регистрировались эпизоотии гриппа у домашних и диких птиц. Наиболее значительная эпизоотия была зарегистрирована в 2003–2004 гг. в странах Юго-Восточной Азии, когда в течение нескольких месяцев было уничтожено более 100 миллионов голов домашней птицы. В этот же период заболевания птиц гриппом были установлены в Италии, Голландии, Бельгии и Германии. За время этих вспышек было уничтожено около 50 миллионов голов домашней птицы. С мая 2005 года в странах Юго-Восточной Азии началась новая эпизоотия, вызванная высокопатогенным вирусом гриппа А субтипа H5N1, которая затем распространилась по территории Казахстана, России, Украины, Азербайджана и ряда Европейских стран [14-16].

В ходе широкомасштабных полевых и лабораторных исследований от диких птиц на территории Казахстана в период с 1978 по 2011 гг. выделены более 100 изолятов вируса гриппа А с 13 различными сочетаниями HA и NA – H1N1, H1N2,

H3N6, H3N8, H4N6, H5N1, H5N3, H7N7, H10N5, H11N6, H11N9, H13N6, H16N3. Многие из них депонированы в Национальных коллекциях вирусов Казахстана (РК) и России (РФ). В РК в 1987 г. в период локальной вспышки острой респираторной инфекции среди домашних птиц с 80 % летальностью из проб внутренних органов выделены два вируса гриппа А (H7N1) и А (H7N7). Сведения о возбудителе гриппа А/H7N7 указывают на его большую эпидемиологическую значимость в ряду других разновидностей вируса [14-23].

Так первые вспышки гриппа птиц H5N1 были зарегистрированы в России в июле 2005 г. в Новосибирской области. По данным Россельхознадзора за период с 2005 г. по 2008 г. в России было выявлено в 20 субъектах, 179 очагов высокопатогенного гриппа H5N1, суммарные потери составили – 2,8 млн голов птиц. Три вспышки высокопатогенного гриппа птиц штамм H5N1 отмечены и в 2016 году. А высокопатогенный штамм H5N8 вируса гриппа птиц в 2017 году охватил южные области России: Крымский полуостров, Воронежскую, Ростовскую области и Краснодарский край [17- 26].

В настоящее время грипп птиц остается глобальной проблемой и в медицине. Так 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 [26].

Современные эпизоотический и эпидемический процессы, обусловленные циркуляцией вирусов гриппа А, во многом определяются степенью изменчивости их поверхностных белков - гемагглютининов (НА) и нейраминидаз (НА). С одной стороны, поверхностные белки - НА и НА подвергаются постоянным изменениям, приводящим к постепенному вытеснению ранее циркулировавших штаммов вирусов гриппа. С другой стороны, сегментированная структура генома способствует формированию реассортантов между вирусами гриппа А человека, млекопитающих и птиц, что в свою очередь, может привести к возникновению нового пандемического варианта [27-31]. Участвовавшие в последние годы случаи

инфицирования людей и животных вирусами гриппа птиц А(Н5N1), А(Н7N3), А(Н7N7), А(Н7N9) и А(Н9N2) в странах Южной и Юго-Восточной Азии, а в последнее время и в странах Европы, сопровождающиеся высокой смертностью, могут привести к возникновению пандемического варианта вирусов гриппа птиц А [15–22, 32–39].

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 средств [11, 28–31, 40–43].

В связи с этим в последнее время во всем мире, активизируется процесс создания новых эффективных лекарственных средств и разработки новых технологий их производства. Согласно данным литературы, это связано с целым рядом обстоятельств, наиболее существенные из которых: сравнительно небольшое количество известных природных и синтетических соединений, обладающих прямым противовирусным действием и не проявляющих при этом высокой токсичности, не вызывающих лекарственной устойчивости микроорганизмов, аллергенности или других побочных эффектов для организма животных и человека [11, 44–50].

Одним из основных направлений в разработке противовирусных средств 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 [51-58].

Настоящая работа посвящена изложению полученных результатов исследований воздействия лекарственных средств на вирус гриппа птиц А, синтезированных в АО «Научный центр противоиных 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 противомикробных 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 с иодсодержащим лекарственным соединением, обладающим противовирусным действием, сочетающего в себе низкую токсичность и оказывающего благоприятное воздействие на макроорганизм.

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.

1. 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).

2. Впервые показано снижение токсичности противовирусных препаратов ремантадина, осельтамивира при комбинированном применении с

иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1 в эксперименте *in vitro* на культуре клеток MDCK.

3. Впервые в экспериментах *in vitro*, *in ovo*, *in vivo* разработана технология комбинированного применения иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1, с противовирусными препаратами повышающая фармакологическую активность путем усиления ингибирующего воздействия на вирус гриппа.

4. Разработан «Способ повышения фармакологической активности противовирусных препаратов», защищенный патентом на полезную модель в НИИС МЮ РК № 7196, 2021.

Практическая значимость полученных результатов. Практическая значимость заключается в том, что лекарственное средство ФС-1 обладает выраженным терапевтическим и вирусингибирующим действием против штаммов гриппа птиц А.

Комбинированное применение лекарственного средства ФС-1 с противовирусными препаратами, снижающее токсичность и усиливающее терапевтическую активность может быть использовано в медицине и ветеринарии, как с лечебной, так и профилактической целью.

Получен патент на полезную модель в НИИС МЮ РК № 7196, 2021. «Способ повышения фармакологической активности противовирусных препаратов»; 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. 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; издана монография «Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами».

Экономическая значимость полученных результатов. Экономическая значимость заключается в совершенствовании способа терапии и профилактики применения широко используемых противовирусных препаратов. Однонаправленное действие лекарственного соединения ФС-1 с противовирусными препаратами путем комбинированного применения повышает противовирусную активность, значительно усиливая терапевтическую эффективность против резистентных штаммов гриппа птиц А; снижения лечебной дозы, совокупность которых значительно укорачивает сроки и удешевляет лечение.

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 выполнена 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 противомикробных 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» (. Москва, 2018).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемом журнале, индексируемом в базе данных SCOPUS; 2 статьи в журнале, входящем в список рекомендуемой президиумом НАК ПКР, 2 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 в Монография «Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами».

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 191 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 42 таблицами и 25 рисунками. Диссертационная работа процитирована 243 источниками литературы, в том числе 119 зарубежных авторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ДИССЕРТАЦИИ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время грипп и острые респираторные заболевания остаются лидирующими в мире среди других вирусных инфекций. Грипп сельскохозяйственных животных и птиц – самое коварное и непредсказуемое заболевание для птицеводства и животноводства. К высокопатогенному гриппу восприимчивы все виды птиц, в том числе куры и индейки. В промышленных производствах заболеваемость птиц гриппом составляет от 80 % до 100 %, а смертность может достигать до 100 %, в зависимости от степени вирулентности и контагиозности штаммов вируса. Так как вариативность штаммов является высокой, вирус быстро мутирует и этим осложняется производство и выпуск вакцин. По требованиям Международного эпизоотического бюро, пораженные стада полностью уничтожаются, вся зараженная птица на предприятиях должна быть полностью уничтожена, а во всех зонах, приближенных к очагам эпидемии вводится карантин. Обеззараживанию подвергается практически все на территории птицеводческих предприятий. Кроме того, прекращается реализация продукции птицеводства из пораженных регионов. В связи с массовой гибелью заболевших птиц, а также необходимостью проведения жестких карантинных и ветеринарно-санитарных мероприятий экономический ущерб от данного заболевания значительно высокий. Напряженная эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц может перейти в панзоотию и нанести огромные экономические потери. Возможные мутации в гене гриппа могут привести к крайне тяжелому состоянию людей, часто заканчивающиеся летальным исходом. По некоторым данным в 2005 году в мире нанесенный ущерб от панзоотии птичьего гриппа составил 4 млрд евро [2-7].

Вирусы птичьего гриппа известны очень давно, первый вирус гриппа был выделен в 1902 году значительно раньше, чем вирус гриппа человека. Возбудитель данной инфекции был очень опасен и куры от него погибали сильнее, чем люди от бубонной чумы. Отсюда данный вирус прозвали вирусом чумы птиц. В 1955 было

установлено, что это вирус птичьего гриппа, а в 50-60-е годы начали выделять не только от домашних, но и диких птиц. Но вариант птичьего гриппа, который может передаваться к человеку и вызывать заболевания появился значительно позже, в 1997 году. Предшественники этого вируса продолжали циркулировать среди диких птиц. Это был вирус птичьего гриппа H5N1, с тех пор птичий грипп способный поражать человека циркулирует непрерывно и широко распространяется [53, 59-65]. Так только в январе 2013 года наблюдалось следующее количество вспышек гриппа птиц H5N1 в таких странах мира как: во Франции – 43, Германии – 24, Польше – 12, Великобритании – 11 и.т.д. Китай в 2013 г. из-за массовой вспышки вируса H7N9 не получил 2,6 % прироста мяса птицы (380 тыс. т в убойной массе). В 2014 г. во Вьетнаме зарегистрирован вирус H5N1 [61, 66-71].

Широкое распространение вируса гриппа птиц явилось источником передачи инфекции человеку. По статистике в период с 2003 по 2013 годы в мире зарегистрировано 648 случаев заражения людей гриппом птиц, из них 384 с летальным исходом. В Мексике из-за свиного гриппа (H1N1) погибли 505 человек. В Китае с марта 2013 г. зарегистрировано 217 случаев заболевания, в том числе 57 – с летальным исходом, в 2014 г. – 28 случаев. В этой же стране возник новый штамм - H10N8, впервые лабораторно были подтверждены два случая заболевания людей [69, 72-77].

Ситуация в Казахстане и России не имеет принципиальных отличий от мировой, когда эпизоотия накрыла почти весь мир: от Юго-Восточной Азии до Африки, Европы и Северной Америки. В 2005–2006 годах болезнь поразила несколько птицефабрик и большое число фермерских и личных подсобных хозяйств Сибири, Урала, Северного Кавказа и юга страны. Тогда заббили более 14 млн домашних птиц, общий экономический ущерб не был оценен. Паника среди населения привела к значительному падению потребления мяса бройлера, затовариванию складов и снижению цен, в результате даже были закрыты отдельные птицеводческие предприятия [78-84].

С началом сезонной миграции птиц осенью-зимой 2016–2017 годов высокопатогенный штамм вируса H5N8, зародившийся в верхней части Северного

полушария, уже поразил стада в Великобритании, Румынии, Франции, Польше, Швеции, Германии, Нидерландах, Хорватии, Швейцарии, Венгрии, Сербии, Украине и даже дошел до Нигерии. Не обошел он Россию и Казахстан, так вспышки были отмечены на подворьях в Калмыкии, на птицефабрике в Астраханской области, в личных хозяйствах и на водоемах Краснодарского края. В конце 2016 года, на одной из площадок одного из крупнейших в стране производителей индейки – ростовского «Евродона» - после выявления вируса было забито 160 тыс. индеек, что привело к потерям около 1 млрд. руб. В распространении птичьего гриппа в районах Каспийского, Азовского и черноморского бассейнов в зимний период играет роль передача не только местной птицы: воронами, галками, воробьям и др., но и огромным количеством перелетных птиц: уток, гусей, лебедей и др.

В весенний период миграции птиц обратно на север может быть источником вспышек в Дагестане, Ставрополе, Ростовской, Волгоградской и Астраханской областях, республиках Северного Кавказа и Крымском полуострове. Не исключены случаи болезни в регионах Восточной и Западной Сибири, где мониторинг неоднократно выявлял вирус у дикой птицы. Как и во всем мире, среди диких водоплавающих птиц, в Казахстане и России циркулируют разные подтипы вируса гриппа А. Выделены и охарактеризованы штаммы вируса гриппа на территории Красноярского края и Республики Хакасии, акватории Каспийского моря, Алтайского края, Новосибирской области, Республики Тыва, Приморского края. Циркуляция вируса гриппа среди диких водоплавающих птиц и близость человека к местам их обитания является потенциальным источником угрозы для здоровья населения. Работы по проведению серологического мониторинга в Казахстане и России весьма немногочисленны. Так, было показано, что в 2005–2007 гг., вскоре после появления высокопатогенного вируса гриппа А подтип H5N1 на территории РФ, в сыворотках крови жителей Западной Сибири не обнаруживались антитела к новому вирусу. В конце сентября 2014 г. в Алтайском крае на двух подворьях установлен высокопатогенный грипп H5N1 у домашней водоплавающей птицы [85-95].

В ходе широкомасштабных полевых и лабораторных исследований от диких птиц на территории Казахстана в период с 1978 по 2011 гг. впервые выделены более 100 изолятов вируса гриппа А с 13-тью различными сочетаниями HA и NA – H1N1, H1N2, H3N6, H3N8, H4N6, H5N1, H5N3, H7N7, H10N5, H11N6, H11N9, H13N6, H16N3. Многие из них депонированы в Национальных коллекциях вирусов Республики Казахстан (РК) и Российской Федерации (РФ) [14-16].

Также среди домашних птиц на территории Казахстана в период локальной вспышки 1987 года острой респираторной инфекции с 80 % летальностью из проб внутренних органов выделены два новых вируса гриппа А/H7N1и А/H7N7. Сведения о возбудителе гриппа А/H7N7 указывают на его большую эпидемиологическую актуальность в ряду других разновидностей [15, 16].

В целом в человеческой популяции уровень инфицирования вирусами А/H7N1 и А/H7N7 может быть гораздо выше, чем предполагалось ранее. Это, в свою очередь, влечет за собой необходимость учитывать потенциал этих вирусов в качестве агентов, способных вызывать очередную пандемию гриппа. Повышенному риску инфицирования вирусом гриппа птиц подвергаются, прежде всего, работники птицеводческих хозяйств, охотники на водоплавающую птицу, особенно с большим охотничьим стажем и лица, занимающиеся забоем птицы. Значительное количество людей могут быть инфицированы вирусом гриппа А подтип H9N2, что представляет потенциальный риск для здоровья всего населения. Еще один фактор риска – купания на общественных пляжах (прудах). Как правило, к прудам имеют свободный доступ и дикие и домашние птицы [70-71, 96-101].

Грипп птиц приводит не только к значительному экономическому ущербу, и представляет опасность для заражения людей. Грипп опасная вирусная инфекция для человека и животных. Вирус гриппа был впервые выделен у человека в 1933 г. С тех пор вирусы гриппа постоянно выделяют от человека и животных. Сегодня Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) разработана и осуществляется программа изучения гриппа [102-115].

Грипп птиц (классическая чума, грипп кур А, экссудативный тиф, голландская чума кур) – болезнь, относится к сильно контагиозной и широко

распространяемой вирусной инфекции, способной свободно распространяться по всей территории земного шара. Источником распространения являются дикие птицы, массовая гибель которых наблюдалась и раньше среди перелетных птиц из Юго-Восточной Азии. С начала XXI в. вспышки высокопатогенного гриппа птиц начали регистрировать во многих странах. Так в 2005 году в китайской провинции Цинхай после вспышки гриппа среди дикой перелетной и водоплавающей птицы, вызванной высокопатогенным вирусом штамма H5N1, инфекция распространилась глобально на территории Южной Африки, Китая, России, Казахстана и т. д.

Учеными выделены этапы, периоды глобального распространения вируса гриппа птиц. Первое широкое распространение вируса птиц H5N1 наблюдалось в период с 2005 по 2007 годы. Следующий этап этого же вируса гриппа наблюдался в период 2009–2010 годы. Последующие эпизоотии были вызваны наряду с H5N1 также вирусом измененного варианта H5N8 в 2014–2016 годах. Эпизоотия продолжается и по сегодняшний день. Заболеваемость гриппом птицы в хозяйствах варьирует от 80 % до 100 %, смертность - от 10 % до 100 % в зависимости от вирулентности вируса и условий содержания птицы [116-121, 2, 17, 26].

Вирусы гриппа относятся к семейству Orthomyxoviridae, подразделяют на три серологических типа: А, В и С. В 2011 году в США впервые выделен вирус гриппа D у свиней. Такое разделение вирусов основано на общебиологических критериях, как репродуктивная изоляция и единство генофонда.

Вирусы типа А были выделены у разных видов животных, в том числе у свиней, лошадей и нескольких видов птиц. Вирус гриппа А имеет огромное количество субтипов. Циркуляция всех субтипов поддерживается среди водоплавающих птиц, которые являются постоянным источником распространения и резервуаром для генетических изменений вируса [122-126].

Вирус типа В вызывает спорадические вспышки более серьезных респираторных инфекций.

Вирус гриппа С широко распространен. Обычно он вызывает бессимптомное или очень легкое респираторное заболевание, и поэтому не является предметом озабоченности ветеринарной службы здравоохранения. Вирус гриппа С является

стабильным вирусом. Вирусы типа С обычно встречаются только у млекопитающих.

Наибольшую тревогу вызывает вирус типа А. Этот вирус мутирует значительно быстрее, чем вирус типа В, что обуславливает большую степень его вариабельности и приспособляемости. Вирус поражает свиней, лошадей, морских млекопитающих и птиц, а также людей. Вирусы гриппа типа А и В вызывают заболевания у человека, и имеют склонность к мутациям [127-133].

Вирусы гриппа на основании типирования по основным антигенам (поверхностным белкам) - гемагглютинуину (Н) и нейраминидазе (N) классифицируются на субтипы. Все они имеют определенное родство, но у разных видов животных заболевания вызывают различные серотипы. Для птиц наиболее патогенны вирусы Н5 и Н7, которые вызывают так называемый высокопатогенный грипп.

Среди диких и домашних птиц могут одновременно циркулировать несколько антигенных разновидностей вируса, свойственных человеку, птицам и домашним животным. Межконтинентальный перенос вирусов, вероятно, происходит за счет хронических и латентных форм инфекции. К обострению инфекции могут приводить стрессовые реакции, возникающие у птиц во время длительных перелетов и изменяющихся климатических условий. В появлении заболевания в хозяйстве промышленного типа определенную роль играет занос возбудителя инфекции с кормами, инвентарем, оборудованием, особую опасность представляет непродезинфицированная мясная и яичная тара.

Два типа вируса гриппа, А и В, отличаются друг от друга внутренними рибонуклеопротеидными антигенами. Эпидемиологическое значение антигенов оболочки и их независимые изменения побудили ввести номенклатуру штаммов, описывающую тип вируса (А или В), время и место его выделения, а также антигены гемагглютенина (Н) и нейраминидазы (N). Так, например, вирус Гонконг обозначается А /Гонконг/1/68 (Н3N2) [127, 134-136].

Вирус гриппа А у человека вызывает ежегодные эпидемии, во время которых поражает от 5 % до 15 % населения земного шара, и уносит от 290000 до 650000

жизней в год. Так по данным ВОЗ в 81 стране мира только за 13 дней 2014 года, с 20 апреля по 03 мая, было лабораторно подтверждено 3739 случаев гриппа, из них 45,4 % составил грипп А и 54,6 % - грипп В [1, 8-9, 137].

В связи с тем, что вирус гриппа А генетически лабилен и подвержен изменчивости с последовательной сменой антигенов и эпизоотическими последствиями существует вероятность возникновения новых вариантов вируса с передачей в человеческую популяцию. Например, эпидемические штаммы вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2 стали нечувствительными к препарату римантадин. Появление новых вариантов вируса, устойчивых к тем или иным препаратам послужили серьезной проблемой не только для медицины, но и ветеринарии, стоящей на страже здоровья человечества. Проблема лечения и профилактики гриппа стала еще более насущной после вспышек так называемого птичьего гриппа, пандемии свиного гриппа в 2009 году. Возникла необходимость поиска новых вариантов вакцин и терапевтических препаратов для эффективной терапии при тяжелых случаях заболевания и возникновения резистентности вирусов к существующим лекарственным средствам [138- 147, 37-38, 8-9].

В настоящее время радикальными фармацевтическими средствами для лечения являются две группы противогриппозных препаратов:

- ингибиторы нейраминидазы, как осельтамивир и занамивир. Препараты данной группы избирательно подавляют активность нейраминидазы вирусов гриппа А и В, что ограничивает проникновение и выход вириона из клетки по окончании цикла размножения и поражение новых клеток.

- блокаторы M2-каналов, препараты амантаминового ряда (амантадин и римантадин) и их аналоги. Они блокируют стадию раздевания вируса, в результате чего нарушается высвобождение рибонуклеопротеидного комплекса в процессе репликации вируса в клетке хозяина. Однако, M2-каналы имеются только у вируса гриппа А, поэтому ингибиторы M2-каналов не эффективны при гриппе В и С. Данные препараты рекомендованы для использования с целью профилактики и лечения гриппа у взрослых и детей во всем мире.

На рынке стран СНГ находится другой препарат, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А и В энисамиум иодид. Иодсодержащий препарат зарегистрирован и макетируется под торговым названием Амизон в Украине, России, Белоруссии, Казахстане и Узбекистане как противовирусное средство против гриппа. Возбудители инфекций чувствительны к иодсодержащим препаратам от природы и формирование приобретённой устойчивости к ним не характерно. Поэтому препараты иода по-прежнему занимают лидирующее место среди современных антисептиков. Иод действует местно и резорбтивно, обладает антимикробными, антивирусными и антимикотическими свойствами, при этом не вызывая лекарственной устойчивости. Проникая в клетку, иод взаимодействует с аминокетуппами белков, подавляя жизненно важные ферментные системы. При взаимодействии иода с водой в клетке образуется активный кислород, который оказывает сильное окисляющее действие [8-9, 37-48, 55-57, 148-149].

В ветеринарии широко используется препарат эндовираза, который относится к группе противовирусных препаратов микробиологического происхождения. Обладает выраженным противовирусным действием – тормозит размножение вирусов путем гидролиза нуклеиновых кислот. Эндовираза применяется для профилактики и лечения вирусных респираторных болезней телят, жеребят и других домашних животных и птицы, вирусных болезней пчёл. При интраназальном и ингаляционном применении эндонуклеаза подвергается адгезии, проникает глубоко внутрь слизистой оболочки дыхательных путей, где оказывает воздействие на вирусы респираторных болезней животных. Незначительная часть всасывается в системный кровоток, где подвергается биотрансформации и выделяется с мочой [150].

Вышеперечисленные препараты уже нашли свое место в медицинской и ветеринарной практике.

Проблема совершенствования систем противозпизоотических мероприятий по профилактике и лечению инфекционных болезней всегда была и остается весьма актуальной. Анализ литературы показывает, что в последнее время во всем мире,

активизируется процесс создания новых эффективных лекарственных препаратов, вакцин и технологий их производства [55]. Несмотря на это, в практике современной ветеринарии используется сравнительно небольшой набор препаратов, обладающих широким спектром противовирусного действия. Это связано с целым рядом обстоятельств, наиболее существенные из которых: сравнительно небольшое количество известных природных и синтетических соединений, обладающих прямым противовирусным действием; не проявляющих при этом высокой токсичности, аллергенности или других побочных эффектов для организма животных; не вызывающих лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Проблема устойчивости у возбудителей вирусных заболеваний к противовирусным препаратам, как в ветеринарии, так и в медицине приобрела глобальный характер. Возникновение лекарственной устойчивости к противовирусным препаратам приводит к снижению или полной потере эффективности проводимой терапии и борьбы с распространением инфекции, а также направляет на изыскание новых противовирусных средств [37-46].

Таким образом, в популяции человека и животных постоянно происходит циркуляция вирусов гриппа птиц. При этом популяционный иммунитет ко многим субтипам отсутствует или очень слабый и не в состоянии защищать окружающую среду от нового вируса. При интродукции вируса гриппа птиц в человеческую популяцию, высока вероятность быстрого распространения патогенна среди людей, что может вызвать как локальную вспышку, так и эпидемию мирового масштаба. Для выявления новых вирусов гриппа среди людей и своевременного принятия необходимых мер противодействия пандемии необходим как постоянный систематический мониторинг циркулирующих штаммов вируса гриппа человека и животных, в первую очередь птиц, так и исследование популяционного иммунитета ко всем потенциально опасным подтипам вируса гриппа А [70-71].

В связи с тем, что вирус гриппа постоянно изменяется на сегодняшний день радикальных средств, для профилактики и лечения, как в медицине, так и в ветеринарии недостаточно.

Вместе с тем, всех противовирусных препаратов, несмотря на различия химической структуры, и механизма действия, объединяет ряд уникальных качеств. Во-первых, мишень (рецептор) противовирусных препаратов находится не в тканях животных, птиц и человека, а в клетке микроорганизма способного к воспроизведению. Во-вторых, их активность не является постоянной, а снижается со временем, что обусловлено формированием подтипов возбудителя инфекции.

Процесс воспроизведения вируса состоит из нескольких этапов. Сначала вирус закрепляется на клетке и проникает внутрь нее. Затем внедряется в синтезируемые процессы клетки-хозяина и создает собственные РНК или ДНК, необходимые для размножения. Клетка переполняется вирусными частицами и погибает, распадается, а вирусы, освобождаясь, ищут новую клетку, чтобы продолжить свое воспроизведение [50, 151-155].

Благодаря достижениям в области изучения механизмов репродукции вирусов, в настоящее время появилась возможность для развития новых подходов к химиотерапии вирусных инфекций. Подобные исследования основаны на направленном получении или синтезе химиопрепаратов, действующих на заведомо известные и уязвимые стадии репродукции вирусов, либо на функции клеток, необходимые на каком-то общем этапе их репродукции.

Направленность действия противовирусных средств может быть различной. Она касается разных стадий взаимодействия вируса с клеткой. Классификация противовирусных средств по механизму действия подразделяется на тех, которые:

1. Угнетают адсорбцию вируса на клетке или проникновение его в клетку, а также процесс высвобождения вирусного генома (адамантина гидрохлорид, амантадин, римантадин);
2. Угнетают синтез «ранних» вирусных белков-ферментов (гуанидин);
3. Угнетают синтез нуклеиновых кислот (зидовудин, ацикловир, видарабин, идоксуридин);
4. Угнетают «сборку» вирионов (метисазон);
5. Повышают резистентность клетки к вирусу (интерфероны).

По строению противовирусные средства делятся на: производные адамантана (амантадин, римантадин), аналоги нуклеозидов (зидовудин, ацикловир, видарабин, идоксуридин), производные индолкарбоновой кислоты (арбидол), производные тиосемикарбазона – метисазон, биологические вещества, продуцируемые клетками микроорганизма (интерфероны) [151]. Большинство их является веществами, угнетающими активность ферментов, участвующих в реакциях сборки вирусных белков. Но поскольку аналогичные ферменты участвуют и в синтезе белков в клетке-хозяине, то не исключено токсическое действие этих средств. Степень токсического действия зависит от скорости связывания противовирусного средства с ферментом [156-159]. Например, ацикловир фосфорилируется вирусной дезокситимидинкиназой и в виде трифосфата угнетает ДНК-полимеразу вируса простого герпеса (в большей степени, чем ДНК-полимеразу клетки). Кроме того, это соединение встраивается в ДНК вируса, поэтому у него более выражена противовирусная активность и относительно низкая токсичность [160]. Рибавирин действует по иному принципу в виде 5-трифосфата, он специфически угнетает РНК-полимеразу транскриптазу ДНК вирусов [156, 159-160].

Первый препарат, предложенный в качестве специфического противовирусного средства, был тиосемикарбазон описанный Г. Домарком (1946). Препарат обладал противовирусной активностью, но недостаточно эффективен.

Еще в 1966 году в медицинскую практику был введен гидрохлорид 1-аминоадамантана в качестве антивирусного средства. В медицине это соединение часто называется мидантаном или амантадином, однако, его фирменное название «симметрел». Механизм действия симметрела состоит в том, что аминокислота адамантан и его производные «вмешиваются» в ранние этапы репродукции вирусов, а их ингибирующее действие связано с латентным периодом – началом репликации и синтеза вирусспецифических РНК. Этот процесс происходит за счет блокирования М2 каналов оболочки вируса на этапе «раздевания» вирусных частиц, что препятствует изменению рН среды внутри эндосом и дальнейшему инфекционному процессу гриппа [155, 161-162].

В 1970 годы для широких эпидемиологических испытаний были предложены препараты бонафтон, флореналь и оксолин для наружного применения. Оксолин действует на внеклеточные вирионы. Исследования показали, что он обладает вирулицидным действием в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов. Бонафтон и флореналь подавляют репродукцию вируса в пораженных клетках. Резко угнетают синтез макромолекул (РНК и белка) [161].

Основной группой химических соединений, способных подавлять репродукцию вирусов на этой стадии, являются аналоги адамантана. Адамантан – трициклический углеводород состава $C_{15}H_{28}NCl$, молекула которого состоит из трех циклогексановых колец [163-164].

Зная механизм размножения вирусов, легко понять высокую профилактическую эффективность противогриппозного средства римантадина (препарат римантадин). Это соединение препятствует проникновению вируса внутрь клетки, поэтому его применение позволяет бороться с вирусом еще до того, как он начнет размножаться. Таким образом, римантадин снижает заболеваемость и выраженность симптомов проявления гриппа.

Римантадин проявляет себя как специфический ингибитор процесса депротенинизации репродукции вируса гриппа и влияет на стадию «почкования» вирусных частиц в инфицированных клетках [164-166]. Если амантадин не проявляет антивирусного эффекта через один – два часа после заражения, то римантадин существенно ингибирует синтез вирусоспецифических белков через два часа после начала инфекции [164]. Считается, что римантадин более активен, чем амантадин. Оба препарата эффективно подавляют репликацию вируса гриппа А, блокируя вирусный М2 белок и его ионный канал, в результате чего снижается уровень рН у инфицированных клеток. В процессе применения возможно развитие резистентности, частота, которой к пятому дню лечения может достигать 30 %. Среди диких штаммов устойчивость к препаратам возникает редко, однако от больных, принимающих их, выделяются устойчивые штаммы [161, 164].

Антивирусный препарат рибавирин является аналогом гуанозина и имеет незавершенное пуриновое кольцо. Рибавирин весьма близок амантадину, равен ему

по эффективности, реже дает побочные эффекты, подавляет размножение вирусов гриппа А и В. Имеет широкий спектр активности *in vitro*. Эффективно подавляет такие инфекционные заболевания, как вирус гепатита С, парагрипп, респираторный синцитиальный вирус, корь. Рибавирин ингибирует репликацию новых вирионов, что обеспечивает снижение вирусной нагрузки, селективно ингибирует синтез вирусной РНК, не подавляя синтез РНК в нормально функционирующих клетках [167-170].

Этот этап репродукции вирусов является самым сложным и успешно блокируется тремя основными группами соединений: аналогами нуклеотидов, ингибиторами РНК полимераз и ингибиторами посттрансляционных модификаций белков.

Механизм действия аналогов нуклеотидов состоит в том, что они ингибируют синтез нуклеиновых кислот по принципу антиметаболизма. Антиметаболическое действие большинства этих соединений в клетке начинается на стадии фосфорилирования вирусоспецифической тимидинкиназой (вирусы герпеса и оспы), которая обладает большим сродством к аналогам нуклеотидов, чем к тимидину. К классу аналогов нуклеозидов относятся как тимидиновые, так и пуриновые аналоги: видарабин, ацикловир, бромвинилдезоксиуридин, идоксуридин, трифлуоротимидин и некоторые другие.

Установлено, что противовирусный препарат ацикловир наиболее эффективен при лечении вируса простого герпеса типа 1 и 2, Варицелла-Зостер, а также в случае цитомегаловирусной инфекции. Препарат является аналогом 2'-дезоксигуанозина, противовирусный эффект после метаболического превращения вещества определяет соединение ацикловир-трифосфат, ингибирующее синтез вирусной ДНК при конкуренции с 2'-дезоксигуанозином за субстрат для вирусной ДНК-полимеразы. На этой стадии ацикловир включается в репликацию и синтез вирусной ДНК останавливается.

Ганцикловир – это также ациклический гуанинсодержащий нуклеозид, отличающийся от ацикловира добавлением гидроксиметильной группы в 3'-позиции с ациклической стороны цепи [171, 172].

За последние десятилетия были разработаны и внедрены в практику здравоохранения противовирусные препараты для системного применения: арбидол, дейтифорин, адапромин и некоторые другие. Арбидол – этиотропный противовирусный препарат для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ. Исследования показали, что высокая эффективность арбидола является результатом разнообразия его биологической активности и обусловлена, помимо специфического действия на вирусную репродукцию, также способностью индуцировать интерферон (ИФН), иммуностимулирующим эффектом, антиоксидантной активностью. Быстрое нарастание синтеза ИФН может оказывать профилактическое действие при приеме препарата до начала заболевания гриппом. У препарата отсутствует штаммовая специфичность (в культурах клеток он подавляет репродукцию вируса гриппа А на 80 %, вируса гриппа В – на 60 % и вируса гриппа С – на 20 %, а также воздействует на вирус птичьего гриппа, но слабее, чем на репродукцию человеческих штаммов вируса гриппа) [173-178].

Завершающим этапом репродукции вируса является выход вирионов из инфицированной клетки. Одним из механизмов блокирования этого этапа репродукции вируса является использование ингибиторов ферментативной активности вируса, участвующей в почковании вируса. Разработка препаратов группы ингибиторов вирусного фермента нейраминидазы (NA) является успешным целевым достижением современной науки последних лет – «рационального лекарственного дизайна», так как при синтезе были использованы современные знания третичной структуры NA как антигена и фермента.

Препараты с антинейраминидазным действием «имитируют» структуру натуральных субстратов каталитического сайта NA, что «привлекает» вирус к большему взаимодействию с ними.

Осельтамивир или тамифлю применяют для лечения и профилактики гриппа на завершающей стадии развития инфекции. Осельтамивир является неактивным предшественником, который в организме превращается в активный метаболит – осельтамивира карбоксилат. Активный метаболит осельтамивир блокирует способность нейраминидазы расщеплять остатки сиаловой кислоты на поверхности

инфицированной клетки, тем самым ингибируя освобождение вирионов из инфицированных клеток. Происходит агрегация вирусов на поверхности клетки и замедляется их распространение.

Профилактический прием осельтамивира в период эпидемий снижает заболеваемость как вакцинированных противогриппозной вакциной, так и не вакцинированных. При лечении гриппа этим препаратом выздоровление наступает на одни – двое суток раньше, а количество бактериальных осложнений снижается на 40-50 %.

Осельтамивир ингибирует вирусную нейраминидазу и уменьшает продукцию цитокинов (интерлейкина-1, фактора некроза опухоли), препятствуя развитию местной воспалительной реакции и ослабляя системные проявления вирусной инфекции (лихорадка и др.) [179-190].

Занамивир – препарат, который не подвергается метаболизму, при этом создаются условия распределения активного вещества в высоких концентрациях: до 90 % в верхних дыхательных путях, от 10 % до 20 % в легких. Исследователи указывают на два неоспоримых достоинства занамивира, способствующие предупреждению формирования резистентных мутантов вирусов гриппа к препарату. Первое – концентрация, создаваемая на протяжении респираторного тракта, превышает необходимость для подавления репродукции вируса как минимум в два раза. И второе – противовирусное действие занамивира начинается в течение 10 секунд после его введения. Помимо этого, молекуле занамивира не требуется конформационных изменений для связывания с вирусной нейраминидазой [188-192].

Другой не менее интересной группой химических соединений, подавляющих адсорбцию вирусов, можно назвать тритерпеновые сапонины и стероидные соединения, которые в силу своих структурных особенностей связываясь с холестерином мембраны, способны изменять пространственную структуру ее мембраны клетки [193]. Установлено, что наличие у подобных препаратов трех сахарных остатков 3-О-β-хакотриозила увеличивает противовирусную активность соединений.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что чаще всего наибольшей биологической активностью обладают сесквитерпеновые лактоны, содержащие в своей структуре экзоциклическую метиленовую группу, находящуюся в сопряжении с лактонной карбонильной группой. Эффективность этих веществ определяется также наличием двух потенциальных алкилирующих функциональных групп: ненасыщенный лактон и эпоксидная, или α -ненасыщенная карбонильная функция [194].

Многочисленные исследования в области использования биологически активных растительных препаратов свидетельствуют о перспективности и значительной актуальности данного направления в наши дни. Имеется достаточное количество публикаций, посвященных противовирусной активности растительных препаратов на различных вирусных моделях [195]. Рядом авторов установлено, что противовирусный эффект в отдельных случаях характерен для препаратов, полученных из березы, юкки отогнутолистной, зеленой кожуры грецких орехов, экстрактов из листьев вишни, сливы, персиков, винограда [196-197].

Растительный препарат иммунал применяют для профилактики вирусных инфекций и ОРВИ у детей. Содержащиеся в соке биологически активные вещества относятся к неспецифическим стимуляторам иммунной системы. Основные активные компоненты иммунала: цикориеновая кислота и ее эфиры, алкиламидамы, гидрофильные полисахариды. При этом препарат не обладает побочным эффектом и снижает риск развития вирусных инфекций в один – три раза [198-200].

Важной группой неспецифических ингибиторов репликации вирусов являются интерфероны и их индукторы. Прикрепляясь к клеточным рецепторам, интерфероны запускают многочисленные вторичные процессы, которые могут подавлять практически любой этап размножения вирусов.

Основной механизм действия интерферонов заключается в индукции синтеза протеинкиназы, участвующей в инициации трансляции [201, 202].

В результате многолетнего целенаправленного скрининга удалось выявить несколько весьма перспективных для медицины индукторов интерферона,

имеющих высокий химиотерапевтический индекс и пригодных для профилактики и лечения вирусных инфекций и ряда других заболеваний [203].

Для индукторов интерферонов характерна бифункциональность. Они обладают широким диапазоном противовирусной активности (этиотропный эффект) и выраженными иммуномодулирующими свойствами.

Циклоферон, как препарат этиотропного действия, положительно зарекомендовал себя в качестве противовирусного препарата для экстренной профилактики в организованных коллективах во время уже начавшегося эпидемического подъема заболеваемости гриппом и ОРВИ и, вместе с тем, обладает выраженным иммунокорректирующим эффектом. Циклоферон хорошо сочетается с другими препаратами, традиционно используемыми для лечения гриппа и ОРВИ, и не вызывает побочных явлений.

Циклоферон активизирует стволовые клетки костного мозга, стимулируя образование гранулоцитов. Активирует Т-лимфоциты и естественные киллерные клетки. Нормализует баланс между субпопуляциями Т-хелперных и Т-супрессорных клеток [204-206].

Для лечения и профилактики респираторных инфекций, вызванных вирусами парагриппа, риновирусами, аденовирусами, вирусом гриппа, возможно применение другого синтетического низкомолекулярного индуктора ИФН – амиксина, относящегося к классу флуоренонов. Способностью индуцировать продукцию интерферона он в три раза превосходит известные аналогичные препараты. Попадая в организм, амиксин стимулирует образование интерферонов I (α , β) и II (γ) типов. Препарат также стимулирует синтез эндогенного интерферона с максимальной продукцией через 4–24 часа, что обеспечивает быстрый лечебный и профилактический эффект [207-209]. Важнейшей особенностью амиксина является его способность стимулировать выработку позднего ИФН и поддерживать терапевтические концентрации сывороточного ИФН в крови в течение длительного времени, что препятствует развитию вирусной инфекции. Кроме того установлено, что препарат увеличивает продукцию активных форм кислорода фагоцитами, а также количество противовоспалительных цитокинов [210].

Гриппферон – препарат для профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций ОРЗ, ОРВИ и гриппа. Он разрешен к применению даже детям до года, включая новорожденных и беременным женщинам. Основным действующим началом гриппферона является высокоактивный рекомбинантный, полученный генно-инженерным способом интерферон α -2. Основным механизмом противовирусного действия гриппферона является его способность к активации синтеза ряда клеточных белков, обладающих противовирусной активностью, в частности ферментов протеинкиназы блокирующей синтез ранних вирусных белков в клетке, и 2'5'-олигоденилатсинтетазы инициирующей разрушение вирусной РНК [210]. Активный компонент препарата – интерферон, действуя через систему регуляции синтеза нуклеиновых кислот, активизирует ферменты и ингибиторы, блокирующие трансляцию или приводящие к деградации чужеродной генетической информации вируса. При этом непосредственного контакта интерферона с вирусом не происходит, что не позволяет выработать вирусу резистентность к действию гриппферона. Помимо этого, входящий в состав препарата интерферон оказывает прямое противовирусное действие (путем торможения прикрепления вируса и его «раздевания», индукции внутриклеточных белков и рибонуклеидов) и усиления специфического (цитотоксические Т-лимфоциты) и неспецифического НК-клетки ответа [203, 210].

К специфическим факторам блокирования адсорбции вируса на клетке можно отнести многочисленные варианты использования аналогов рецепторов, позволяющих «увести» вирусную частицу от поверхности клетки, и противовирусные антитела, связывающиеся с вирусными рецепторами.

Все вышеуказанные препараты уже нашли свое место в противовирусной терапии, но клиническая практика сталкивается с серьезной проблемой появления новых вариантов вируса, устойчивых к тем или иным препаратам, против которых терапевтическое действие существующих не эффективно.

Поэтому создание новых противовирусных препаратов на сегодняшний день является главной и сложной задачей. При этом поиск направлен на разработку лекарственных веществ, которые одновременно сочетали бы в себе такие свойства,

как селективность действия в отношении патогенна, низкую токсичность в живом организме и способность выводить продукты гибели патогенна из живого организма [55].

В последние десятилетия микроэлемент иод привлекает внимание ученых как перспективное средство для синтезирования новых противoinфекционных лекарственных препаратов с последующим широким использованием их в практической медицине и ветеринарии [55-58]. Возбудители инфекций чувствительны к иодсодержащим препаратам и формирование приобретенной устойчивости к ним не характерно, поэтому препараты иода по-прежнему занимают лидирующее место среди современных антисептиков. Однако проблема использования иода ограничена тем, что в высокой концентрации иод раздражает кожу и слизистую оболочку, а однократное введение двух-трех граммов иода для человека смертельно. Вместе с тем установлено, что в комплексе с полисахаридами и полимерами иод в значительной мере теряет токсичность, действует более медленно, сохраняя при этом антивирусные и антимикробные свойства [58, 211].

Разработка методов получения новых видов лекарственных препаратов на основе иода, сегодня, является актуальной проблемой. Иод – уникальное лекарственное вещество. Он определяет высокую биологическую активность и разностороннее действие лекарственных препаратов, используется в основном для изготовления различных лекарственных форм [58]. Известно, что молекулярный иод с легкостью проходит через билипидные клеточные мембраны микроорганизмов и проникает внутрь клетки. Способность иода с легкостью проникать через клеточные мембраны делает его применение особо ценным при тех инфекциях, основное развитие которых разворачивается во внутриклеточных структурах (туберкулез, бруцеллез, хламидиоз, вирусные гепатиты, грипп и т. д.) [211]. Он активно участвует в обменных процессах организма: повышает лецитин-холестериновый коэффициент, липопротеиназную и фибринолитическую активность крови, замедляет свертываемость крови, снижает уровень холестерина и бета-липопротеинов [47]. Особенно важно участие иода в синтезе гормонов щитовидной железы – тироксина и трийодтиронина [212, 213].

Различают несколько групп препаратов иода:

- 1) содержащие элементарный иод,
- 2) неорганические иодиды,
- 3) органические вещества-гормоны,
- 4) органические вещества, отщепляющие иод,
- 5) органические вещества, прочно связывающие иод.

Содержащие элементарный иод препараты (5 % и 10 % спиртовой раствор, раствор Люголя с глицерином, иодистая мазь) в основном применяют лишь наружно как антисептики или раздражающие, отвлекающие средства преимущественно при воспалительных заболеваниях наружного покрова, миозите и невралгии.

Неорганические иодиды калий и натрий, таблетки антиструмин, противоастматическая микстура не содержат в составе свободный иод и поэтому не обладают антимикробными и раздражающими свойствами при местном использовании. Кроме того, попадая внутрь, они быстро разлагаются, и высвобождающийся элементарный иод выделяется через легкие, оказывая муколитический эффект. Их использование ограничено многочисленными тяжелыми побочными реакциями (иододерма, иодизм).

Естественные и синтетические гормоны (тиреоидин, трийодтироксина гидрохлорид, тиреокмб, тиреотом, иодтироксин) часто и широко назначают в эндокринологической практике при недостаточной функции щитовидной железы (в малых дозах) и избыточной функции гипофиза (в больших дозах).

В комплексе с такими органическими веществами, как полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, иод не только не теряет ценные свойства, наоборот, приобретает ряд новых. Описано антибактериальное и фунгицидное действие иодированного полистерена [214-219]. Такие полимеры не высвобождают активный иод и проявляют антимикробную активность лишь при контакте с инфектом. При введении иода в полиуретановые полимеры отмечена эффективная инактивация ВИЧ. Высвобождение иода из комплекса с полиуретаном посредством десорбции способствует быстрой (в течение 15-30 мин) инактивации ВИЧ [220].

Препараты иода (кальцийодин, иодиол, иоданат, иодовидон, повидон-иод, иодопирон, иодоформ, хиниофон) применяют для орошения миндалин при хроническом тонзиллите, гнойном отите, синусите, кератите, фурункулезе, периодонтите, конъюнктивите, для обработки ран и операционного поля в хирургии. Типичным иодоформом является повидон-иод (9–10 % доступного иода, иммобилизованного на поверхности полимера). Обычно применяют разбавленные растворы – 1 % активного иода). Повидон-иод активен в отношении многих резистентных штаммов микроорганизмов, спор, кандид, аденовирусов, вируса герпеса и ВИЧ. Лигандом является синтетический линейный полимер 1-этиленпирролидин-2 [220, 221].

Вирулицидность продемонстрирована в суспензионных опытах *in vitro*. Описана инактивация вирусов иодоформом, а также водными растворами иода и хлора. Особого внимания заслуживает информация о внутривенном использовании 5-иод-2-дезоксисуридин (ЙДУР) при генерализованной герпетической инфекции в суточной дозе 50–100 мг/кг в течение четырех – пяти суток [217].

Иодантипирин (1-фенил-2.3-диметил-4-иодпирозолон) применяется для экстренной профилактики клещевого энцефалита как препарат выбора. Иодантипирин используют для лечения геморрагической лихорадки с почечным синдромом и заболеваний, вызванных не полиомиелитными энтеровирусами Коксаки и Enteric Cytopathic Human Orphan (ECHO), гриппа, вирусами герпеса, цитомегаловирусом. Эффективен иодантипирин и при бактериальных инфекциях – туберкулезе, хламидиозе. Изучение защитного механизма иодантипирина показало, что одним из ведущих факторов его профилактического действия является выраженная стимуляция выработки α - и β -интерферонов. Уже через четыре часа после приема препарата уровень этих противовирусных белков у большинства людей увеличивается в десятки, а через 12 и 24 ч – в сотни и тысячи раз. При этом происходит значительная стимуляция клеточного и гуморального иммунитета. В дополнение к этому препарат мало токсичен, не обладает мутагенным, эмбриотоксическим, иммунотоксическим и аллергенным действием. Что касается его применения, то он используется для индукции α и β – интерферонов, при

вирусных заболеваниях, а также в качестве противовоспалительного и иммуномодулирующего средства [221].

Иодофоры, в которых иод иммобилизован на полимерах или солюбилизован с помощью поверхностных активных веществ, позволяют устранить побочные эффекты иода, повысить стабильность препарата при его длительном хранении, сохранив при этом его антимикробные свойства. Наиболее широко используемый иодофор – комплекс с поливинилпирролидоном, содержащий 9–12 % масс иода. Этот комплекс (повидон-иод или иодоповидон) [222] входит в состав многих наружно применяемых лекарственных средств (например, йокс).

Разработаны и синтезированы композиции лекарственных средств на полимерной основе (Ильин А. И. и др. 1998, 2006, 2011). Созданы такие лекарственные препараты как «Йодомидол», «Галомилон», «Коксиван», «Ценнавит» и др., защищенные авторскими свидетельствами, патентами на изобретения. На данные препараты разработаны и утверждены нормативно-технические документации для производства и внедрения в практику. Они прошли широкую апробацию на большом поголовье животных и получили признание практических специалистов в борьбе с заразными болезнями, наносящих значительный ущерб животноводству. Препараты «Коксиван», кормовая добавка «Ценнавит» вошли в реестр ветеринарных лекарственных средств Республики Казахстан и применяются в настоящее время.

Иодомидол содержащий иод, иодид калия, синтетический водорастворимый полимер (моно и полисахарид), обладает бактерицидным и вирулицидным действием. Недостатком его является высокая токсичность.

Коксиван жидкость для профилактики и лечения вирусных и бактериальных инфекций, повышающий иммунный статус организма животных. Коксиван снижает вирусиндуцированное цитопатогенное действие. Лечебный эффект сопровождается электронномикроскопической картиной интерферонообразования в макрофагах и нейтрофилах исследуемых тканей.

Ценнавит-А суспензия, порошок (гранул) кормовая добавка используется в качестве профилактического средства. Применение кормовой добавки Ценнавит-А существенно снижает заболеваемость и смертность поголовья после отъема от груди. Для промышленного свиноводства особенно важно то, что при применении кормовой добавки на 10–15 % увеличивается прирост массы, на 10–20 % снижается смертность поросят после отъема от груди.

Разработка противовирусных средств и препаратов ведется по нескольким перспективным направлениям. Это поиск препаратов с прямым действием на белки вируса гриппа (ингибиторы нейраминидазы, гемагглютинина, полимеразного комплекса). Это и препараты, защищающие клетки человека и животных от вируса гриппа путем удаления рецепторов, к которым прикрепляется вирус. И, наконец, это лекарственные средства, способные активировать неспецифические механизмы противовирусной защиты (например, разные иммуномодуляторы).

Безусловно, разработанные вакцины, как для ветеринарии, так и для медицины, доказали свою противоэпизоотическую и противоэпидемическую эффективности во время эпизоотии и эпидемий гриппа. Но возможное несоответствие штаммового состава вакцины и циркулирующей на данный момент разновидности вируса, а также значительный период, необходимый для разработки клинически доступной вакцины против нового вирусного штамма могут приводить к развитию эпизоотии и эпидемии с высоким уровнем заболеваемости и смертности, а иногда и пандемии. Поэтому наряду с вакцинацией необходимо иметь возможность применения эффективных противовирусных средств для немедленного лечения инфекции.

Другим моментом, является широкая циркуляция вирусной микст-инфекции, поскольку в этом случае необходимы препараты, которые эффективно действуют не только на вирусы гриппа, но и на другие вирусы, поражающие респираторный тракт. Кроме того, понятно, что следует разрабатывать и внедрять лекарственные средства с разными механизмами противогриппозного действия, а не только ингибиторы нейраминидазной активности. Тогда появится возможность применения комбинированной терапии и, потенциально, значительного снижения

частоты осложнений при гриппозной инфекции не только в медицине, но и в ветеринарии.

В настоящее время поиск новых лекарственных средств ведется по следующим основным направлениям:

1. Эмпирическое изучение фармакологической активности различных веществ, полученных химическим путем. Отбирают наиболее активные вещества и устанавливают степень их фармакологической активности и токсичности в сравнении с существующими лекарственными средствами.

2. Отбор соединений с определенным видом фармакологической активности.

3. Модификация структур существующих лекарственных средств.

Наиболее распространенным направлением поиска новых препаратов является последнее направление. Химики-разработчики заменяют в существующем соединении один радикал другим, вводят в состав исходной молекулы другие химические элементы или проводят другие модификации. Данный путь позволяет увеличить активность лекарственного препарата, сделать его действие более избирательным, а также уменьшить его токсичность. Далее к избирательному основному активному веществу добавляют различные радикалы, которые способствуют растворению вещества в липидах и воде одновременно для всасывания в кровь, прохождения через гематотканевые барьеры в ткани и клетки, затем вступить в связь с клеточными мембранами или проникнуть через них внутрь клетки и соединения с молекулами ядра и цитозоля. Целенаправленный синтез фармакологических веществ труднее вести в химических классах соединений ввиду отсутствия необходимых первоначальных сведений о связи фармакологической активности со структурой вещества. В этом случае необходимы данные о пользе вещества или элемента.

Разработанное лекарственное соединение ФС-1 представляет собой сложное по химическому составу многокомпонентное иодсодержащее координационное соединение. Активный центр ФС-1 состоит из полимерного комплекса низкомолекулярных α -декстрина с молекулярным иодом, который координируется с галогенидами калия, лития, натрия и амидными группами белкового компонента.

Такая структура координированного йодсодержащего лекарственного соединения защищает молекулярный йод от взаимодействия с биоорганическими соединениями после перорального потребления и сводит к минимуму токсические эффекты йода в организме человека. Основным механизмом действия ФС-1 заключается в мембранной литической активности, а также исследуемый препарат влияет на экспрессию генов в бактериях.

Вместе с тем, в доступной литературе отсутствуют работы, в которых изложены результаты исследований йодсодержащих координационных соединений с противовирусными свойствами, сочетающих в себе низкую токсичность и оказывающих благоприятное воздействие на макроорганизм.

Целью настоящей работы является совершенствование технологии применения противогриппозных препаратов, йодсодержащего лекарственного соединения и изучение его противовирусного действия.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методология исследования

Исследования выполнены на базе следующих учреждений: лаборатории физико-биологической химии, фармакологии и токсикологии, лаборатории вирусологии, лаборатории радиохимии и радиобиологии АО «Научного центра противоинфекционных препаратов» Комитета индустриального развития Министерства индустрии и инфраструктурного развития Республики Казахстан, в лаборатории противовирусной защиты Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Институт микробиологии и вирусологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, в Национальном центре заразных и паразитарных болезней (г. София), Болгария.

При проведении экспериментов учтены предложения, изложенные в методических рекомендациях: «Правилах доклинической оценки безопасности фармакологических средств» [GLP, 1992]; «Доклинические испытания лекарственных средств», Фармакологического Государственного Комитета РК [Алматы, 1997]; руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под редакцией Р. У. Хабриева [2005] и А. И. Миронова [2012], «Droganov M. Cell cultures. Theory and technique» [2004], «Current Protocols in Microbiology Influenza: Propagation, Quantification, and Storage. Atlanta: Influenza Branch, Centers for Disease, Control and Prevention» [2006]. Соблюдены принципы биоэтики, методические подходы к контролю качества экспериментов и мониторинга здоровья лабораторных животных. 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 $p \leq 0,05$). Применение GLP принципов к компьютеризированным системам OCDE/GD (95)115. Исследования проведены в

соответствии со Стандартными Операционными Процедурами и Методическими Процедурами.

Объекты исследования. Объектами исследования служили иодсодержащие лекарственные соединения, названные фармацевтическими соединениями (ФС) – координационные соединения, образованные полипептидами, карбогидратами, солями щелочных и щелочноземельных металлов интеркалированные иодом, синтезированные сотрудниками лаборатории физической и биоорганической химии АО «Научный центр противоинфекционных препаратов».

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 представляют собой комплексы иода с ассоциатами синтетических водорастворимых гелеобразующих полимеров и природных моно-, олиго- и полисахаридов. Активной субстанцией комплексов является иодно-полимерный комплекс, выполняющий роль матрицы, из которой постепенно выделяется активная молекула иода.

Тест – система:

– перевиваемая клеточная линия MDCK – клетки почки собаки (Madin-Darby canine kidney). Перевиваемая линия клеток получена из Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности МОН РК, Отар;

– перевиваемая клеточная линия VERO – клетки почки африканской зеленой мартышки (African green monkey kidney cells). Перевиваемая линия клеток получена из Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности МОН РК, Отар.

В работе были использованы следующие штаммы вирусов гриппа птиц А:

- штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7);
- штамм А /FPV/Rostock/34 (H7N1);
- штамм А /черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6);
- штамм А /крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3);
- штамм А /голубая чернеть/Актау/1455/06 (H4N6);
- штамм А /Astana RG/6:2/2009 (H5N1);
- штамм А /Swine/Iowa/15/30 (N1H1);

– штамм А /Алматы/5/98 (H3N2) вирус гриппа человека.

Все штаммы вирусов гриппа предоставлены лабораторией противовирусной защиты ИМиВ МОН РК. В качестве вирусодержащего материала использовали инфицированную аллантаоисную жидкость или культуральную жидкость. Инфекционный титр вирусов определяли методом десятикратных разведений по Reed и Muench [223].

Лабораторные животные и куриные эмбрионы. В качестве подопытных животных использовали семидневных цыплят массой 250-350 г, полученных из СП «БЕНТ – АНАК», а также половозрелых беспородных белых двух-трех месячных мышей обоего пола массой 18-24 г и двух-трех месячных белых беспородных крыс массой 160-230 г прошедшие карантин в течение 14 суток. Кормление и содержание животных осуществляли в соответствии с правилами ухода за лабораторными животными. Протокол исследования был одобрен этической комиссией АО «Научного центра противоинфекционных препаратов». Эвтаназию проводили методом цервикальной дислокации на основании Директивы Совета Европы 86/609 ЕЭС [224].

В работе использовали 7–18 дневных развивающихся куриных эмбрионов, полученных от кур несушек, которые не подвергались вакцинации против вирусных инфекций, инкубировали куриные эмбрионы в термостате ТС-80М при 37 °С и относительной влажности 90–100 %.

Контрольные противовирусные препараты:

– римантадин (remantadinum Hydrochloridum J05A C02) производство Merck, (США);

– рибавирин (ribavirin) 1-β-D-ribofuranosyl-1-2-4 triazole-3-carboxamide, Sigma R-9644 50 mg. Lot 111 K4034, C₈H₁₂N₄O₅. FM 244.2;

– амиксин IC (amixin IC), производство Merck, (США);

– рибазол (ribazol) Владелец регистрационного удостоверения: GETZ PHARMA, (Pvt.) Limited (Пакистан);

– осельтамивир (tamiflu) производство Hoffman–La–RocheLtd, (Швейцария);

– амизон (amizon) производство Фармак (Украина).

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

В процессе проведения исследований нами использовано следующее оборудование, прошедшее поверку и аттестацию: аналитические весы BL 120S (Sartorius, США), технические весы LA 3200S (Sartorius, США), pH-метр PB11 (Sartorius, Германия), CO₂-инкубатор INCO 153 (Mettler, Германия), настольная среднескоростная многофункциональная центрифуга 5804R, «Eppendorf», инвертированный микроскоп с фазовым контрастом DM1 3000, «LEICA», оптический микроскоп LEICA DM6000.

В проведении исследований использовали стандартные растворы, питательные среды и реактивы:

– для изучения биологических свойств лекарственных соединений использовали: 0.25 % раствор трипсина – версена; МТТ – краска [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] с концентрацией исходного раствора - 7.5 mg/ml (Sigma); рабочий раствор 0,75 мг/мл, среда DMEM с двойным набором аминокислот; содержащая HEPES буфер (Applichem); фетальная телячья сыворотка (FBS; BioWhittaker); антибиотики (Penicillin, Sigma), среда 199; PBS (фосфатный буферный раствор pH 7.2 – 7.4); лизирующий раствор DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma) и этиловый спирт (Sigma) (1:1); гидролизат лактальбумина; сыворотка крупного рогатого скота (КРС); агароза; глутаровый альдегид; фосфорновольфрамовая кислота; фармфар; какодилатный буфер; тетраоксид осмия; этиловый спирт; ацетон; метиленовый синий; азур-2; основной фуксин; уранилацетат; цитрат свинца.

2.2. Методы исследования

Физико-химический анализ лекарственных соединений:

-определение биорастворимости лекарственных соединений, эксперименты 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 средств» [225].

Технология размножения культур клеток и вируса гриппа птиц А:

– культивирование культур клеток MDCK, Vero и вирусов гриппа птиц А проводили в монослое с использованием среды DMEM и добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота (Applichem, Sigma, USA). Пересев клеток проводили через 72 ч, снимая монослой 0,25 % раствором трипсин-ЭДТА. Размножение вирусов гриппа осуществляли на семи – девятисуточных куриных эмбрионах путем введения 0,2 мл вируса в аллантоисную полость и на культуре клеток MDCK путем заражения клеточного монослоя. Аллантоисную и культуральную жидкости собирали в отдельные пробирки с последующим их титрованием в реакции гемагглютинации (РГА). Инфекционный титр вируса определяли в РГА по Reed & Muench [223].

Определение фармако-токсикологических свойств лекарственных соединений:

– цитотоксичности лекарственных соединений в опытах *in vitro* путем использования МТТ-теста. Принцип метода основан на реакции восстановления соли тетразолия (МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромида) митохондриальными дегидрогеназами живых, метаболически активных клеток с образованием кристаллов формазана, дающих при растворении в ДМСО фиолетовое окрашивание;

– противовирусной активности проводили в перевиваемой культуре клеток MDCK, в аллантоисной жидкости путем заражения клеточного монослоя и аллантоисной жидкости вирусом гриппа птиц А, результаты учитывали по степени подавления репродукции вируса гриппа птиц штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) различными концентрациями иодсодержащих лекарственных соединений;

– острой токсичности лекарственных соединений проводили на половозрелых беспородных белых двух-трехмесячных мышах обоего пола весом 18–24 г согласно «Методических указаний по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [226, 227]. Для исследования острой токсичности на мышах 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 разводили стерильной дистиллированной водой и вводили внутривентрально опытному животному в объеме по 1,0 мл. Используемые дозы для мышей: 0,6; 2,7; 5,8; 8,9; 13,4 мл/кг. Общая продолжительность наблюдения за животными составила 14 дней. Регистрировали поведенческие реакции у животных, активность, летальность. Острую токсичность учитывали по проценту погибших животных;

– острой токсичности на крысах комплекса ФС-1 проводили согласно «Методических указаний по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [226, 227], на двух – трехмесячных белых беспородных крысах массой 160–230 г обоего пола прошедших карантин в течение 14 суток. Протокол исследования был одобрен этической комиссией Научного центра, эвтаназию проводили методом цервикальной дислокации на основании Директивы Совета Европы 86/609 ЕЭС. Исследуемые дозы для крыс: 124,1; 248,3; 397,2; 496,5; 596,0; 794,4; 993,0; 1191,6; 1390,0 мг/кг. Острую токсичность учитывали по проценту погибших животных;

– хронической токсичности на мышах комплекса ФС-1 проводили на мышах согласно «Методических указаний по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [226, 227] с использованием доз: 1/10 ЛД¹₅₀ (5,8 мл/кг), 1/25 ЛД¹₅₀ (2,32 мл/кг), 1/50 ЛД¹₅₀ (1,16 мл/кг). Срок наблюдения составил три месяца;

– расчет коэффициента кумуляции проводили исходя из показателей токсичности ФС-1 при его однократном введении ЛД¹₈₄, ЛД¹₅₀, ЛД¹₁₆ и показателей токсичности при многократном введении ЛДⁿ₈₄, ЛДⁿ₅₀, ЛДⁿ₁₆ согласно «Методических указаний по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [226, 227];

– эмбриотоксичности комплекса ФС-1 проводили на 10, 12 и 18-дневных куриных эмбрионах в дозах: 52,5; 26,3; 13,1; 6,6; 3,3; 1,6; 0,8 мг/мл. На каждое разведение использовали по 10 куриных эмбрионов. Всего в эксперименте использовали 220 куриных эмбрионов. В хорион-аллантаоисную полость вводили по 0,2 мл ФС-1. Контролем служил фосфатно-солевой буферный раствор без добавления препаратов. Наблюдение вели 14 дней после введения ФС-1. Эмбриотоксичность учитывали по проценту погибших эмбрионов;

- острой токсичности иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 проводили в эксперименте на семидневных цыплятах в количестве 170 голов, прошедших акклиматизационный период, согласно рекомендациям OECD (Guidelines for the testing of chemicals. 223 Avian Acute Oral Toxicity test) по тестированию химических соединений. Использовали два способа введения ФС-1: подкожный и пероральный. в объеме по 1,0 мл. Срок наблюдения составил 14 дней. Для оценки острой токсичности исследуемого ФС-1 использовали семь концентраций: 52,5; 26,3; 13,1; 6,6; 3,3; 1,6; 0,8 мг/кг из расчета на кг веса живой массы. В качестве контроля использовали введение физиологического раствора цыплятам. Результаты острой токсичности учитывали по проценту погибших животных;

– фармакокинетики иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на цыплятах проводили путем перорального введения меченного радиоактивным иодом-131 ФС-1. В дальнейшем производили убой животных через определенный промежуток времени: через 30 мин, час, 3 ч, 6 ч, 12 ч и 24 ч. Для замера радиоактивного изотопа ¹³¹I использовали кровь и органы: легкие, печень, селезенка, почки, желудок и кишечник;

– биохимических показателей крови экспериментальных животных проводили на двух – трехмесячных белых беспородных крысах массой 160–230 г обоего пола. Забор крови для биохимического анализа осуществляли утром до кормления крыс из сонной артерии в количестве десяти мл с использованием гепарина в качестве антикоагулянта. После охлаждения кровь центрифугировали на протяжении 15 мин (при 3000 об/мин). Определяли

содержание общего билирубина, общего белка, мочевины, креатинина, холестерина, глюкозы, АЛТ, АСТ, ЛДГ, щелочной фосфатазы по общепринятым методикам на автоматическом анализаторе Konelab-60i («Konelab» Финляндия);

– противовирусной активности иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 проводили в экспериментах с вирусами гриппа штамм А /FPV/Rostock/34 (H7N1), штамм А /черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6) и штамм А /Алматы/5/98 (H3N2), штамм А /FPV/ Waybrige/78 (H7N7) на десятидневных куриных эмбрионах путем нейтрализации вируса 100 инфекционных доз/0,2 мл экспериментальными концентрациями;

– противовирусной активности иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 проводили на модели вируса гриппа А в эксперименте на цыплятах согласно руководству по доклиническому исследованию [228, 229]. В эксперименте использовали вирус гриппа птиц штамм А /FPV/Rostock/34/ (H7N1), штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7). Цыплят заражали вирусосодержащей жидкостью, срок наблюдения составил 14 дней. Результаты учитывали по проценту погибших животных;

– чувствительности вируса гриппа А к препаратам римантадин и осельтамивир определяли по снижению титра инфекционности обработанного вируса в реакции гемагглютинации по отношению к контролю;

– влияния иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на токсичность коммерческих противогриппозных препаратов при моно и комбинированном применении проведены по методу Chou-Talalay, при помощи программного обеспечения CompuSyn 10.1 [233];

– получение устойчивых мутантов проводили путем культивирования (пассажа) штаммов вирусов гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7), А /Swine/Iowa/30 (H1N1) с последовательным увеличением содержания противовирусных препаратов осельтамивира и римантадина. Осельтамивир в среде начинали с концентрации 0,009; 0,019; 0,038; 0,075; 0,150; 0,300 мг/мл. Начальная концентрация римантадина составила 0,0031; 0,0063; 0,013; 0,025; 0,050; 0,100 мг/мл;

– определение нейраминидазой активности вирусов проводили стандартным тиобарбитуровым методом по Aminoff с использованием в качестве субстрата фетуина. Об активности фермента судили по способности расщеплять субстрат с образованием окраски, дающей поглощение при длине волны 549 нм;

– определение термочувствительности гемагглютинина проводили путем приготовления аликвоты штаммов вируса гриппа А подтип H1N1 и H7N7. Пробирки инкубировали в термошейкере при 56 °С в течение 15, 30, 60, 90 и 120 мин. Термочувствительность белка гемагглютинина (НА) определяли по изменению титра в РГА. Термостабильными считались штаммы, которые сохраняли способность вызывать агглютинацию эритроцитов человека (I группа) после прогревания при 56 °С в течение 30 мин;

– выделения РНК. Суммарную РНК выделяли из 200 мкл вирусосодержащей культуральной жидкости, используя набор для экстракции РНК «РИБО-сорб-12» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), согласно методическим рекомендациям производителя;

– секвенирования ДНК. Полноразмерное секвенирование генов NA и MP штаммов вируса гриппа проводили на секвенаторе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). ДНК библиотека была получена путем фрагментирования кДНК генов NA и MP с использованием набора Ion Xpress Plus Fragment Library kit (Life Technologies, США). Баркодирование полученной ДНК библиотеки проводили при помощи набора Ion Xpress Barcode Adapters (Life Technologies, США) согласно инструкции производителя. Загрузку полученной баркодированной ДНК библиотеки осуществляли на Ion 314 Chip с последующим секвенированием на аппарате Ion Torrent PGM;

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 $p \leq 0,05$).

ГЛАВА 3. 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, определена противовирусную активность иодсодержащего лекарственного соединения на примере штаммов вируса гриппа птиц А в эксперименте *in vitro*, *in ovo* и *in vivo* на лабораторных животных, выявлена эффективность иодсодержащего лекарственного соединения при сочетанном применении с противовирусными препаратами. Лекарственные соединения представляют собой координационные комплексы 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 девяти иодсодержащих лекарственных соединений, 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 иодсодержащих лекарственных соединений

3.1.1. Технология размножения вируса гриппа птиц А *in vitro* на культуре клеток

Вирусы гриппа размножают для лабораторной диагностики вирусных инфекций, изучения патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях, а также для получения вакцин и диагностических препаратов, на культурах перевиваемых линий клеток (тканей), а также в куриных эмбрионах как традиционном субстрате.

Использование культуры клеток для решения целого ряда актуальных задач, стоящих перед медициной и биологией, основано на сохранении жизнеспособности клеток, выделенных из живого организма, возможности выращивать клетки, ткани, небольшие органы (или их части) животного, включая человека, или растения вне организма (*in vitro*).

Культуры перевиваемых линий клеток MDCK (Madin-Darby canine kidney) и Vero (African green monkey kidney cells) рассматриваются ВОЗ (WHO manual on influenza diagnosis and surveillance. 2011), как весьма перспективные для размножения вируса гриппа.

Клеточные линии MDCK, Vero поддерживались культивированием в среде DMEM (Sigma, USA) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика-антимикотика (Applichem, Sigma, USA). Клетки выращивали в культуральных флаконах (Sarstedt, Германия или Thermo, США) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Размножение пяти штаммов вируса гриппа А (А /Rostock/34 (H7N1), А /Алматы/5/98 (H3N2), А /черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6), штамм А /Astana RG/6:2/2009 (H5N1), А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А А /Swine/Iowa/15/30 (N1H1) осуществляли на клеточных линиях MDCK и Vero.

Изучение влияния различных концентраций концентрации трипсина (0,5 мкг/мл) и инфекционной дозы заражения (1, 10 и 100 ТЦД₅₀/0,2 мл) на титр вируса гриппа А проводили с использованием 96-луночных планшетов и питательной среды DMEM. Результаты исследования представлены на рисунке 3.1.

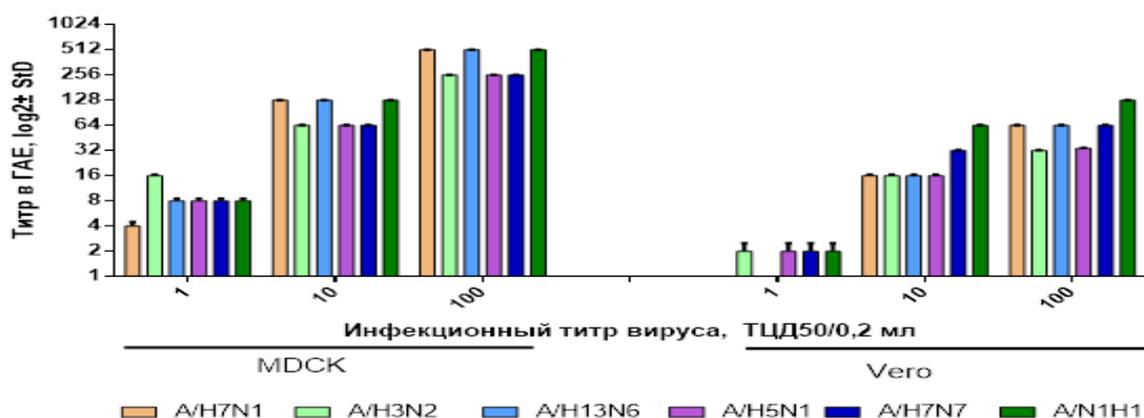


Рисунок 3.1. - Размножение вирусов гриппа на культуре клеток MDCK, Vero

Согласно полученных результатов видно, 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 гемагглютинина 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 иодсодержащих лекарственных соединений

Тест сравнительной растворимости и проницаемости применяется для оптимизации состава разрабатываемой лекарственной формы, оценки однородности, стабильности, биодоступности и биоэквивалентности лекарственных соединений. Важнейшей стадией при этом является поведение лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте. Известно, что абсорбция лекарственных соединений происходит через эпителиальную стенку кишечника, который является основным барьером на пути поступления лекарственного соединения в системный кровоток, поэтому процесс растворения и проницаемость лекарственного соединения имеют большое значение в биодоступности биофармацевтической классификационной системы [225-229]. При этом фармакопейная (классическая) растворимость отражает количество граммов вещества, способных раствориться в 100 мл растворителя при комнатной температуре 20 °С. Под биофармацевтической растворимостью понимают способность действующего вещества полностью растворяться при внутреннем применении. Поэтому биофармацевтическую растворимость определяли в диапазоне рН 1,2; 4,5; 6,8; соответствующей физиологическим жидкостям желудочно-кишечного тракта.

Характеристикой биофармацевтической растворимости позволяющей описать лекарственное вещество являлось отношение дозы к растворимости (Dose/Solubility Ratio, D/S). Если значение $D/S \leq 250,0$ мл, то вещество характеризовали с «высокой растворимостью» в данном растворе. Концентрацию содержания иодид-ионов в исследуемых лекарственных соединениях иода определяли методом капиллярного электрофореза (Agilent 1600). Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007 путем расчета среднего

значения растворившегося комплекса и относительного стандартного отклонения. Степень проникновения лекарственного соединения через мембраны клетки, т. е. проницаемость действующего вещества проводили согласно ЕМА (Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency 2010) и ВОЗ (Методические рекомендации, М. 2010). Критерием «высокой проницаемости» лекарственного соединения через мембраны клетки служила биодоступность более 85–90 % согласно данным ЕМА и ВОЗ.

Исследования определения проницаемости иодсодержащего лекарственного соединения через клеточные мембраны проводили на культуре клеток MDCK. Концентрацию иодид-ионов исследуемого лекарственного соединения определяли методом капиллярного электрофореза (Agilent 1600). Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007.

Нами были проведены исследования как фармакопейной, так и биофармацевтической растворимости. Изучена растворимость девяти иодсодержащих лекарственных соединений в зависимости от времени и pH среды. Для определения фармакопейной растворимости навеску 250,0 мг лекарственной субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 500,0 мл, растворяли в 100,0 мл воды. Эксперимент в трехкратной повторности проводили при температуре 20 °С.

Для определения биофармацевтической растворимости навеску 250,0 мг лекарственной субстанции комплекса помещали в мерную колбу вместимостью 500,0 мл, растворяли в 250,0 мл соответствующей среды растворения (согласно требованиям ВОЗ, руководству FDA). Растворение проводили при температуре 37 °С и постоянном перемешивании до полного насыщения раствора в течение 12 часов. Характеристикой биофармацевтической растворимости позволяющей описать лекарственное соединение является отношение дозы к растворимости (Dose/Solubility Ratio, D/S). Если значение $D/S \leq 250,0$ мл, то вещество характеризуется «высокой растворимостью» в данном растворе.

При помощи капиллярного электрофореза Agilent 1600 определяли концентрацию иодид-ионов исследуемых иодсодержащих лекарственных соединений. Статистическую обработку результатов эксперимента осуществляли с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007. Результаты оценки фармакопейной и биофармацевтической растворимости иодсодержащих лекарственных соединений приведены в табл. 3.1–3.4 и на рис. 3.2–3.5.

Таблица 3.1 – Концентрация иодсодержащих лекарственных соединений, в воде в зависимости от времени растворения

Иодсодержащие лекарственные соединения	Концентрация лекарственного соединения (мкг/мл) в воде, в зависимости от времени растворения, (мин)							
	0,5	1	3	5	10	15	30	60
ФС-1	0,032	0,078	0,089	0,097	0,124	0,160	0,159	0,161
ФС-1.1	0,003	0,010	0,012	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
ФС-1.2	0,007	0,019	0,024	0,038	0,039	0,039	0,039	0,039
ФС-1.3	0,039	0,044	0,068	0,079	0,079	0,079	0,079	0,079
ФС-1.4	0,035	0,041	0,068	0,070	0,071	0,071	0,071	0,072
ФС-1.5	0,133	0,325	0,370	0,408	0,516	0,666	0,662	0,667
ФС-1.6	0,124	0,297	0,315	0,367	0,375	0,376	0,384	0,384
ФС-1.7	0,032	0,068	0,079	0,097	0,124	0,160	0,159	0,161
ФС-1.8	0,232	0,569	0,649	0,708	0,793	1,157	1,167	1,167

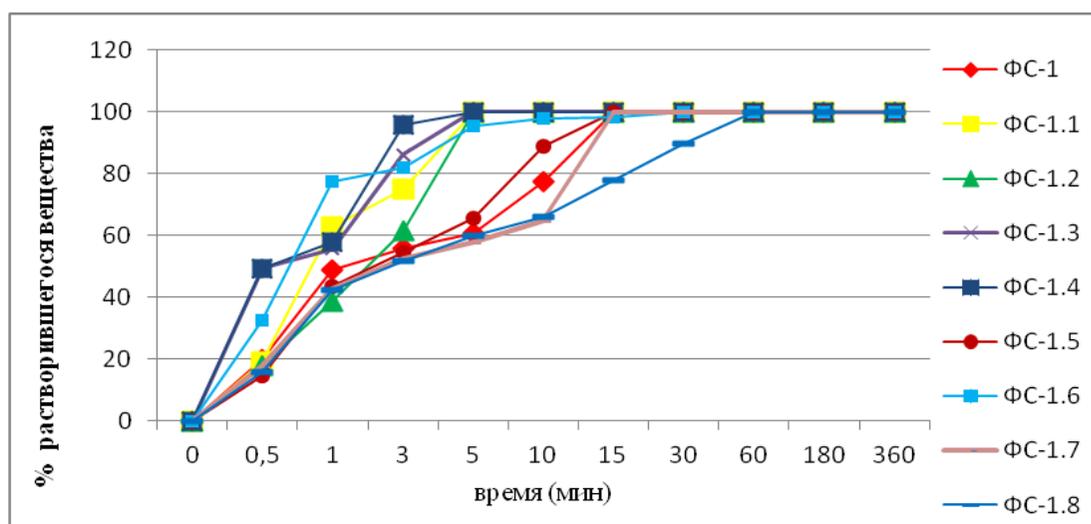


Рисунок 3.2. - Процент фармакопейной растворимости иодсодержащих лекарственных соединений в воде

Таблица 3.2 – Концентрация иодсодержащих лекарственных соединений в буферном растворе с рН равном 1,2 в зависимости от времени растворения

Иодсодержащие лекарственные соединения	Концентрация лекарственного соединения (мкг/мл) в буферном растворе с рН равном 1,2 в зависимости от времени, (мин)							
	0,5	1	3	5	10	15	30	60
ФС-1	0,030	0,080	0,099	0,110	0,127	0,159	0,159	0,160
ФС-1.1	0,002	0,007	0,012	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018
ФС-1.2	0,006	0,018	0,024	0,035	0,035	0,035	0,036	0,035
ФС-1.3	0,035	0,042	0,066	0,077	0,078	0,077	0,077	0,077
ФС-1.4	0,032	0,039	0,063	0,068	0,068	0,069	0,068	0,068
ФС-1.5	0,135	0,330	0,377	0,428	0,536	0,668	0,668	0,668
ФС-1.6	0,120	0,292	0,310	0,364	0,375	0,380	0,388	0,388
ФС-1.7	0,034	0,088	0,092	0,099	0,132	0,161	0,161	0,161
ФС-1.8	0,235	0,571	0,652	0,710	0,798	1,159	1,169	1,169

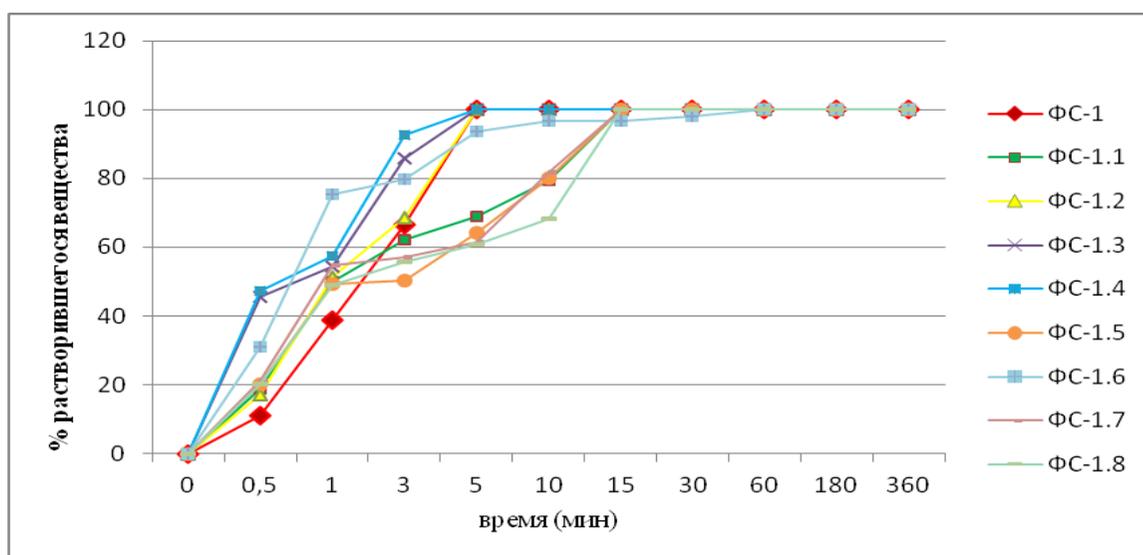


Рисунок 3.3. - Процент фармакопейной растворимости иодсодержащих лекарственных соединений в буферном растворе с рН равном 1,2

Таблица 3.3 – Концентрация иодсодержащих лекарственных соединений в буферном растворе с рН равном 4,5 в зависимости от времени растворения

Иодсодержащие лекарственные соединения	Концентрация лекарственного соединения (мкг/мл) в буферном растворе с рН равном 4,5 в зависимости от времени, (мин)							
	0,5	1	3	5	10	15	30	60
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ФС-1	0,029	0,082	0,097	0,112	0,129	0,162	0,162	0,162
ФС-1.1	0,003	0,006	0,011	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017
ФС-1.2	0,007	0,017	0,026	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038
ФС-1.3	0,033	0,045	0,067	0,079	0,079	0,079	0,079	0,079

Продолжение таблицы 3.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
ФС-1.4	0,031	0,036	0,064	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069
ФС-1.5	0,134	0,335	0,374	0,426	0,537	0,666	0,666	0,666
ФС-1.6	0,122	0,294	0,317	0,369	0,377	0,389	0,389	0,389
ФС-1.7	0,035	0,085	0,091	0,100	0,133	0,163	0,163	0,163
ФС-1.8	0,234	0,576	0,655	0,718	0,784	1,166	1,166	1,166

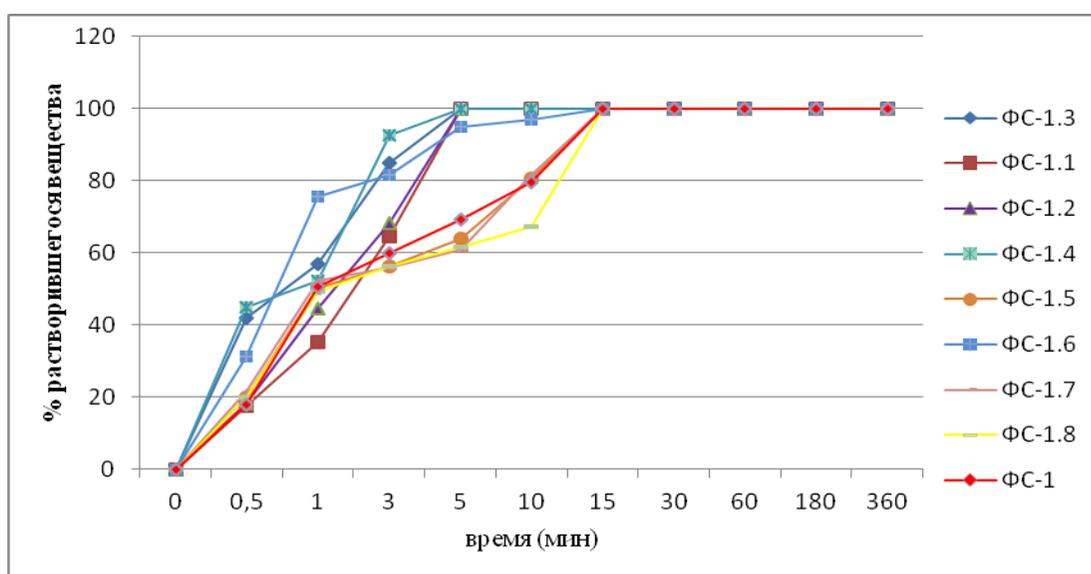


Рисунок 3.4. - Процент фармакопейной растворимости иодсодержащих лекарственных соединений в буферном растворе с рН равном 4,5

Таблица 3.4 – Концентрация иодсодержащих лекарственных соединений в буферном растворе с рН равном 6,8 в зависимости от времени растворения

Иодсодержащие лекарственные соединения	Концентрация лекарственного соединения (мкг/мл) в буферном растворе с рН равном 6,8 в зависимости от времени, (мин)							
	0,5	1	3	5	10	15	30	60
ФС-1	0,033	0,084	0,090	0,097	0,124	0,160	0,160	0,160
ФС-1.1	0,003	0,005	0,015	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
ФС-1.2	0,006	0,015	0,022	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039
ФС-1.3	0,037	0,045	0,067	0,079	0,079	0,079	0,079	0,079
ФС-1.4	0,033	0,044	0,061	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070
ФС-1.5	0,099	0,291	0,365	0,437	0,655	0,667	0,667	0,667
ФС-1.6	0,123	0,295	0,311	0,361	0,375	0,376	0,384	0,384
ФС-1.7	0,028	0,068	0,083	0,092	0,103	0,160	0,160	0,161
ФС-1.8	0,233	0,563	0,645	0,704	0,766	0,910	1,165	1,165

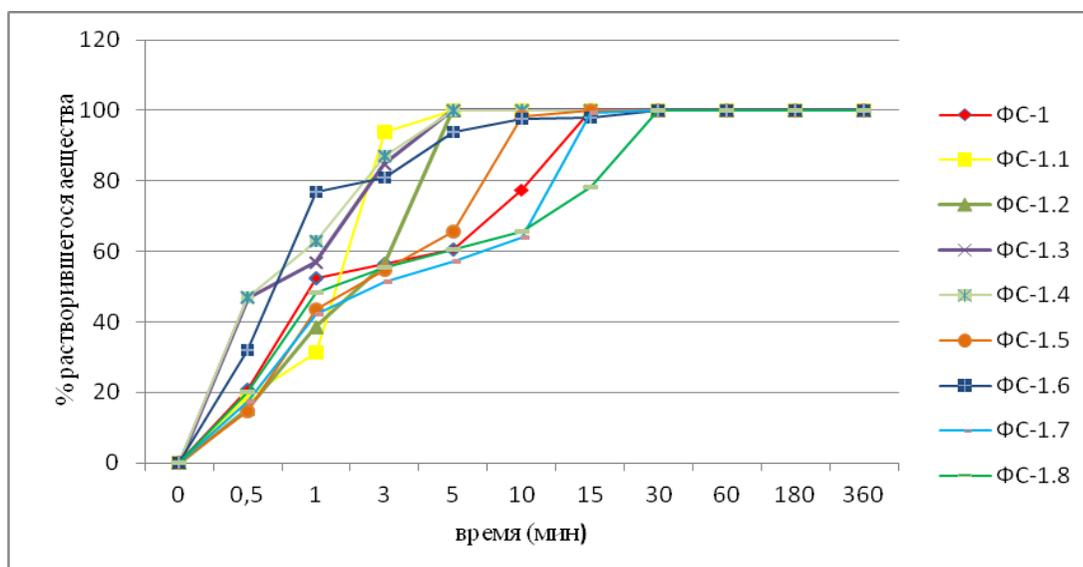


Рисунок 3.5. - Процент фармакопейной растворимости иодсодержащих лекарственных соединений в буферном растворе с pH равном 6,8

Согласно полученных результатов исследований представленных в вышеуказанных таблицах определения фармакопейной и биофармацевтической растворимости иодсодержащих лекарственных соединений установлено, что все комплексы растворялись в воде и буферных растворах с pH равной 1,2; 4,5; 6,8. Так через 30 с растворимость ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.5, ФС-1.7 и ФС-1.8 в воде и буферных растворах составила 11,1 – 21,5 %. Тогда как у комплексов ФС-1.3, ФС-1.4 и ФС-1.6 растворимость установлена в пределах от 30,9 % до 49,3 %. Через мин растворимость всех иодсодержащих лекарственных соединений увеличилась и составила 31,3–77,3 %, а на третьей мин – 51,5–95,8 %. Полная растворимость ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3 и ФС-1.4 100 % отмечена через пять мин.

Иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1, ФС-1.7, ФС-1.5 через 15 мин растворились на 100 %, а ФС-1.6, ФС-1.8 полностью растворились 100 % только через 30 мин, что свидетельствует о несколько замедленной скорости растворения. В тоже время был установлен распад всех исследуемых девяти лекарственных соединений при определении биофармацевтической растворимости в буферном растворе с pH равным 8,4.

Исследования определения проницаемости иодсодержащих лекарственных соединений проводили на культуре клеток MDCK. Клетки рассеивали в 96-луночные плашки в концентрации 2×10^5 клеток в 1 мл. Плашки культивировали в термостате при 37 °С, 5 % CO₂. Из лунок планшета через 24 ч инкубации удаляли ростовую среду, и вносили по 0,2 мл среды DMEM, содержащей исследуемые вещества в концентрации 0,5 мг/мл. Инкубация исследуемого вещества на культуре клеток MDCK составляла 24 ч. Эксперимент проводили в трехкратной повторности. По окончании исследования клеточные экстракты собирали в отдельные пробирки, разбавляли пробы дистиллированной водой и определяли концентрацию иодид-ионов исследуемого лекарственного соединения при помощи капиллярного электрофореза Agilent 1600.

В качестве контрольного препарата для сравнения использовали препарат энисамиум иодид, которое зарегистрировано и макетируется под торговым названием Амизон и используется как иодсодержащее противовирусное средство против гриппа. Полученные результаты исследований по определению проницаемости представлены в табл. 3.5 и 3.6.

Таблица 3.5 – Концентрация иодид-иона в зависимости от времени инкубации на культуре клеток MDCK

Иодсодержащие лекарственные соединения	Доза соединения, мг/мл	Концентрация иодид-иона в супернатанте, (мкг/мл) в зависимости от времени инкубации в культуре клеток MDCK, (мин)						
		0	15	30	60	180	360	1440
ФС-1	0,5	0,119	0,118	0,117	0,114	0,112	0,109	0,087
ФС-1.1	0,5	0,016	0,016	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007
ФС-1.2	0,5	0,039	0,038	0,038	0,037	0,036	0,035	0,028
ФС-1.3	0,5	0,064	0,064	0,063	0,062	0,061	0,059	0,047
ФС-1.4	0,5	0,088	0,087	0,087	0,086	0,078	0,066	0,059
ФС-1.5	0,5	0,623	0,613	0,608	0,593	0,590	0,570	0,460
ФС-1.6	0,5	0,368	0,364	0,359	0,350	0,341	0,333	0,267
ФС-1.7	0,5	0,161	0,159	0,157	0,154	0,151	0,146	0,124
ФС-1.8	0,5	1,147	1,131	1,124	1,100	1,077	1,046	0,837

Таблица 3.6 – Процент проницаемости лекарственных соединений в эпителиальные клетки MDCK, в зависимости от времени инкубации на культуре клеток MDCK

Иодсодержащие лекарственные соединения	Процент проницаемости лекарственных соединений в зависимости от времени инкубации на культуре клеток MDCK, (мин)						
	0	15	30	60	180	360	1440
ФС-1	0	0,9	1,7	4,2	5,9	8,5	26,9
ФС-1.1	0	0	6,3	18,8	31,3	43,8	56,3
ФС-1.2	0	2,6	2,6	5,1	7,7	10,3	28,2
ФС-1.3	0	0	1,6	3,1	4,7	7,8	26,6
ФС-1.4	0	0,5	1,0	2,3	11,0	25,0	32,9
ФС-1.5	0	1,6	2,4	4,8	5,3	8,5	26,2
ФС-1.6	0	1,2	2,4	4,9	7,4	9,5	27,4
ФС-1.7	0	1,3	2,5	4,2	5,9	8,5	23,0
ФС-1.8	0	1,4	2,0	4,1	6,1	8,8	27,0
Энисамиум иодид	0	0	0	0,003	0,01	0,03	0,08

Из табл. 3.5 и 3.6 видно, что степень проницаемости на культуре клеток MDCK используемых в эксперименте иодсодержащих лекарственных соединений изменяется в зависимости от времени инкубации исследуемого лекарственного соединения. Проницаемость через 15 мин инкубации иодсодержащих лекарственных соединений на культуре клеток MDCK отмечена в пределах от 0 % до 2,6 %, через 30 мин от 1,0 % до 6,3 %. Максимальное количество проникшего вещества через час инкубации находится в пределах от 2,3 % до 18,8 %. Через 3 и 6 ч процент проницаемости на культуре клеток составил от 4,7 % до 43,8 %. По прошествии 24 ч исследования установлено, что иодсодержащие лекарственные соединения проникают в культуру клеток MDCK в пределах от 23,0 % до 56,3 % от исходной. Проницаемость контрольного вещества энисамиум иодид, широко используемого в качестве противовирусного препарата через 24 ч инкубации на культуре клеток MDCK обладал низкой проницаемостью, которая составила всего 0.08 %.

Таким образом, 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 комплекса, растворившегося в течение 5 мин из твердой субстанции, составило от 80 % до 100 %. Степень проницаемости всех

исследуемых иодсодержащих лекарственных соединений определена «низкой», количество проникшего вещества в культуру клеток MDCK составило от 23,0 % до 56,6 %, от исходной, что меньше 85 %. Изучение биофармацевтических свойств всех иодсодержащих лекарственных соединений на основании степени их растворимости в воде, буферных растворах с pH 1,2; 4,5; 6,8 и проницаемости на культуре клеток MDCK соответствуют III классу БКС [189]. К III классу БКС относятся вещества с «высокой» растворимостью и «низкой» проницаемостью.

Установленные особенности химического состава разработанных иодсодержащих лекарственных соединений стали основанием для дальнейшего изучения их биологических свойств.

3.2. Степень фармакологического действия иодсодержащих лекарственных соединений

3.2.1. Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений *in vitro* в культуре клеток MDCK

Безопасность (цитотоксичность) иодсодержащих лекарственных соединений *in vitro* определяли, с использованием МТТ-теста [229, 230]. Исследуемые концентрации иодсодержащих лекарственных соединений были получены путем последовательного разведения в 2,0 раза. Исследования проводили на культуре клеток MDCK. Инкубация исследуемого вещества на культуре клеток составляла 48 ч и 72 ч.

Клетки рассевали в 96-луночные плашки «BD Biosciences», Германия в концентрации 2×10^5 клеток в 1 мл. Плашки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂. Из лунок планшета через 24 ч инкубации удаляли ростовую среду, и вносили по 200 мкл среды, содержащей исследуемые вещества. В лунки с отрицательным контролем вносили по 200 мкл питательной среды DMEM.

Через 48 ч и 72 ч среду с веществом удаляли из лунок, и добавляли 200 мкл свежей питательной среды и 50 мкл рабочего раствора МТТ, плашку инкубировали три часа при 37 °C. После окончания срока инкубации удаляли

надосадочную жидкость. В каждую лунку вносили по 100 мкл DMSO. Оптическую плотность в лунках измеряли на микропланшетном ридере Tecan Sunrise RC.4, Австрия, при длине волны основного фильтра 490 нм и референс – фильтра 620 нм. Средняя арифметическая величина оптической плотности (\bar{Y}) для отрицательного контроля высчитывался по формуле (3.1):

$$\bar{Y} = \frac{y_1 + \dots + y_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i, \quad (3.1)$$

где y_i – результат измерения оптической плотности у каждого объекта группы; n – число объектов в группе.

Рассчитывали процент выживших клеток для каждой повторности каждой концентрации исследуемого вещества по формуле (3.2):

$$\% \text{ жизнеспособности клеток} = \frac{Y_i}{\bar{Y}_{NC}} \times 100\%, \quad (3.2)$$

где Y_i – результат измерения ОП для каждой группы; \bar{Y}_{NC} – средняя арифметическая величина ОП (\bar{Y}) для ОК.

ЦТК₅₀ (концентрация веществ, при которой происходит гибель 50 % клеток) для каждого исследуемого вещества вычисляли по формуле (3.3):

$$\text{ЦТК}_{50} = \left[\frac{X1 - 50}{X1 - X2} \times (Mx2 - Mx1) \right] + Mx1, \quad (3.3)$$

где $X1$ – > 50 % выживших клеток; $X2$ – < 50 % выживших клеток; $Mx1$ – концентрация вещества, в котором выжило > 50 %; $Mx2$ – концентрация вещества, где выжило < 50 %.

В ходе экспериментов были определены ЦТК₅₀ – концентрация, при которой происходит гибель 50 % клеток и МНК – максимально нетоксическая

концентрация, показывающая 100 % выживаемость клеток. Результаты цитотоксичности соединений на культуре клеток MDCK представлены в табл. 3.7 и на рисунках 3.5 и 3.6.

Таблица 3.7 – Результаты МТТ-теста на клеточной линии MDCK для иодсодержащих лекарственных соединений

Иодсодержащие лекарственные соединения	Значение ЦТК ₅₀				Значения МНК			
	после 48 ч инкубации		после 72 ч инкубации		после 48 ч инкубации		после 72 ч инкубации	
	Разведение	Концентрация, мг/мл	Разведение	Концентрация, мг/мл	Разведение	Концентрация, мг/мл	Разведение	Концентрация, мг/мл
ФС-1	1:20	45,47	1:20	50,0	1:80	12,5	1:80	12,5
ФС-1.1	1:50	42,84	1:50	20,0	1:100	10,0	1:100	10,0
ФС-1.2	1:640	2,66	1:800	1,25	1:1800	0,67	1:3200	0,31
ФС-1.3	1:80	12,5	1:100	10,0	1:180	5,6	1:200	5,0
ФС-1.4	1:40	24,12	1:50	20,0	1:4300	0,24	1:6400	0,16
ФС-1.5	1:1280	1,21	1:1460	0,68	1:2560	0,39	1:3200	0,31
ФС-1.6	1:2560	0,39	1:5063	0,19	1:4000	0,24	1:6000	0,17
ФС-1.7	1:320	3,13	1:565	1,77	1:1200	0,83	1:1500	0,67
ФС-1.8	1:2560	0,48	1:3637	0,27	1:5600	0,19	1:6400	0,16

По данным табл. 3.7 видно, что соединения ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.3, ФС-1.4 являются низко токсичными. ЦТК₅₀ иодсодержащих соединений 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 и через 72 ч в концентрациях: 50,0; 20,0; 10,0; 20,0 мг/мл соответственно. Токсичность ФС-1, не увеличивается в зависимости от продолжительности культивирования, так как концентрации этого иодсодержащего соединения практически не снижается, остаются на одном уровне.

Иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1.2, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8 обладают умеренной токсичностью, ЦТК₅₀ их находятся в

пределах от 0,39 до 2,13 мг/мл, через 48 ч инкубирования и от 0,2 до 1,77 мг/мл, через 72 ч инкубирования в культуре клеток MDCK.

На рисунках. 3.6, 3.7 представлены данные динамики выживаемости клеток на 48-й и 72-й ч после воздействия ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.4, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8 в различных разведениях на культуру клеток MDCK.

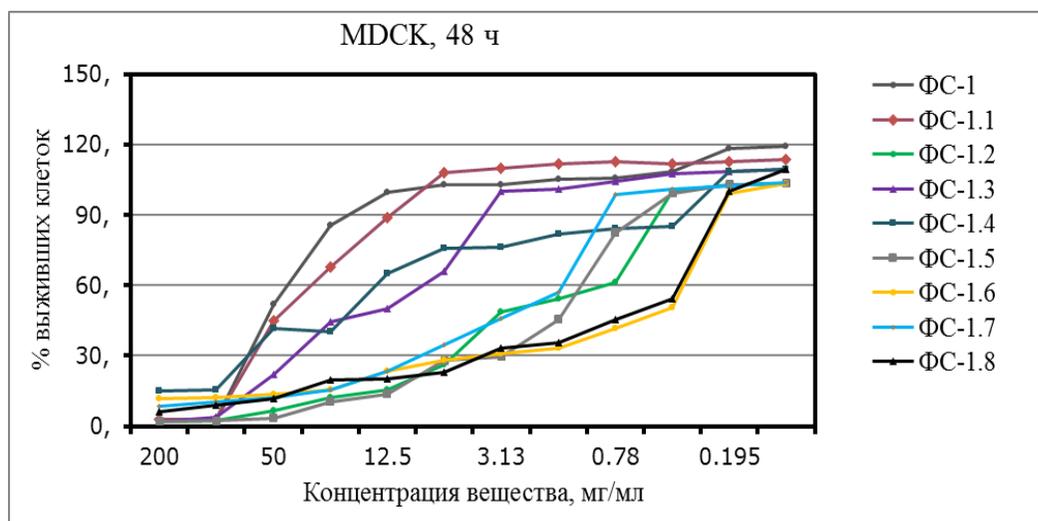


Рисунок 3.6. - Действие иодсодержащих лекарственных соединений на выживаемость линии клеток MDCK через 48 часов инкубации

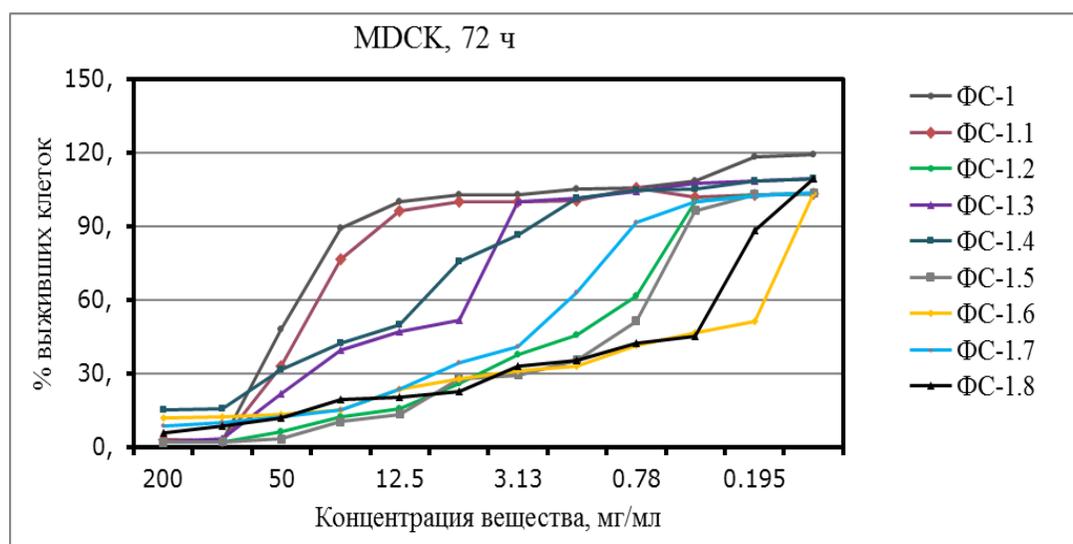


Рисунок 3.7. - Действие иодсодержащих лекарственных соединений на выживаемость линии клеток MDCK через 72 часа инкубации

Из рис. 3.6 и 3.7 видно, что при определении токсичности на культуре клеток MDCK все изученные вещества можно разделить на две группы. Первая группа ФС-1 и ФС-1.1, ФС-1.3, ФС-1.4 низко токсичные комплексы, ЦТК₅₀ ФС-1 через 72 ч инкубации с веществом составляет 50,0 мг/мл, ФС-1.1, ФС-1.4 – 20,0 мг/мл, а ФС-1.3 – 10,0 мг/мл. Вторая группа ФС-1.2, ФС-1.4, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8 умеренно токсичные комплексы, ЦТК₅₀ этих веществ через 72 ч находятся в пределах от 0,27 до 1,77 мг/мл (см. табл. 3.7).

Таким образом, установлено, что исследуемые нами иодсодержащие лекарственные соединения обладают различной цитотоксичностью. Наименьшая цитотоксичность отмечена у иодсодержащих лекарственных соединений ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.3 и ФС-1.4 высокая 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 комплексов для изучения антивирусной активности.

3.2.2. Изучение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений *in vivo* в эксперименте на мышах

В данном разделе настоящей работы изложены результаты токсикологических исследований по определению степени токсичности, выявления побочных нежелательных эффектов у лекарственных соединений [229].

Определение безопасности или острой токсичности иодсодержащих лекарственных соединений нами проведено на половозрелых беспородных белых двух – трехмесячных мышах обоего пола весом 18–24 г. Животные были размещены на 10 групп по 10 животных в каждой. Иодсодержащие лекарственные соединения разводили стерильной дистиллированной водой и вводили внутрибрюшинно опытным животным в объеме по 1,0 мл. Используемые дозы для мышей: 0,6; 2,7; 5,8; 8,9; 13,4 мл/кг. Общая продолжительность наблюдения за животными после введения комплексов составила 14 дней. Регистрировали поведенческие реакции у животных, их

активность и летальность. Острую токсичность учитывали по проценту погибших животных. Полученные результаты исследований представлены в табл. 3.8.

Таблица 3.8 – Определение острой токсичности иодсодержащих лекарственных соединений в эксперименте на мышах при внутрибрюшинном введении

Доза, мл/кг	Кол-во животных, гол	Кол-во выживших животных, гол								
		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
0,6	10	10	6	7	6	7	4	4	3	1
2,7	10	8	4	4	2	6	1	0	1	0
5,8	10	5	3	1	0	3	0	0	1	0
8,9	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0
13,4	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль, без препарата	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Как следует из данных табл. 3.8 при введении животным дозы равной 0,6 мл/кг наименее токсичным оказался ФС-1, выживаемость животных составила 100 %. Соединения ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3 и ФС-1.4 обладают средней токсичностью, выживаемость животных, получавших дозу 0,6 мл/кг, составила 60–70 %. Иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7 и ФС-1.8 – высокотоксичные соединения, количество выживших животных в дозе 0,6 мл/кг соответствовало 20–40 %. При введении ФС-1 в дозе 2,7 мл/кг количество павших животных составило 20 %, тогда как в группе животных, подвергнутых воздействию ФС-1.1 и ФС-1.2 в дозе 2,7 мл/кг количества павших животных увеличилось в три раза (по сравнению с ФС-1), и составило 60 %. Гибель животных употреблявших ФС-1.4 в дозе 2,7 мл/кг составило 40 %. Высокотоксичными соединениями в дозе 2,7 мл/кг оказались ФС-1.3, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7 и ФС-1.8 гибель животных составила 90 %. Воздействие 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 организм животных в дозе 5,8 мл/кг вызывали гибель от 70–90 %, тогда как доза 5,8 мл/кг для ФС-1 пало 50 % животных. Самое высокое токсическое

воздействие на организм животных наблюдалась при дозах от 8,9 до 13,4 мл/кг. Гибель животных достигла 100 %.

Наблюдения за поведением животных показали, что впервые часы после введения животные становились малоактивными, вялыми и заторможенными. Отмечены нарушения координации движений с последующим развитием общего торможения. Так при введении доз 5,8 мл/кг двигательная активность была низкой, а при введении высоких доз 8,9 и 13,4 мл/кг животные через два часа были практически неподвижны. Кроме этого, у животных наблюдались судороги нижних конечностей пароксизмального характера, частота которых усиливалась в зависимости от дозы препарата.

Анализ реакции животных на раздражители показал, что при воздействии вводимых доз лекарственных соединений 2,7 и 5,8 мл/кг у животных исчезала реакция на звуковые и тактильные раздражители, а при дозах 8,9 и 13,4 мл/кг и еще на болевые раздражители.

Глубина движения диафрагмы увеличивалась в зависимости от увеличения дозы вводимого соединения. При этом происходило снижение частоты дыхательных движений до 14 раз в минуту при дозе вводимого препарата 13,4 мл/кг.

Анализ ритма сердечных сокращений показал достоверное снижение частоты сокращений сердца при дозе лекарственного соединения 2,7 мл/кг. При введении соединений в дозах от 5,8 до 13,4 мл/кг у животных развивалась брадикардия. Так, частота сердечных при дозе 13,4 мл/кг снижалась более чем в три раза.

При воздействии дозы соединений от 5,8 до 13,4 мл/кг у животных выявлялась незначительная потливость, а также покраснение слизистых оболочек и выделения из носа. У животных также развивалась диарея. Окраска мочи была в норме, однако ее объем превышал норму. Потребление корма и воды снижалось вплоть до полного отсутствия при введении препарата в дозе 13,4 мл/кг.

Определение изменения массы выявило, что введение иодсодержащего лекарственного соединения в дозах от 5,8 до 13,4 мл/кг животные резко теряли в весе.

Таблица 3.9 – Используемая концентрация мл/кг иодсодержащих лекарственных соединений 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 в эксперименте на мышах при внутрибрюшинном введении, мг/кг

Иодсодержащие лекарственные соединения	Количество вещества				
	Исследуемые концентрации				
	0,6	2,7	5,8	8,9	13,4
ФС-1	12,18	54,81	117,74	180,67	272,02
ФС-1.1	1,12	5,45	11,70	17,98	27,10
ФС-1.2	3,0	13,5	29,0	44,5	67,0
ФС-1.3	6,06	27,2	58,6	89,9	135,3
ФС-1.4	6,06	27,2	58,6	89,9	135,3
ФС-1.5	50,7	228,2	490,0	752,1	1132,3
ФС-1.6	50,7	228,2	490,0	752,1	1132,3
ФС-1.7	18,18	81,81	175,74	269,67	406,02
ФС-1.8	110,7	489,15	1070,1	1942,1	2472,3

Исходя, из данных табл. 3.9 произвели расчет летальных доз ЛД₅₀ иодсодержащие лекарственные соединения при однократном парентеральном способе введения, результаты представлены в табл. 3.10.

Таблица 3.10 – Результаты острой токсичности (ЛД₅₀, мг/кг) соединений 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 в эксперименте на мышах при внутрибрюшинном введении

№ группы	Иодсодержащие лекарственные соединения	Число животных в группе	ЛД ₅₀ , мг/кг
1	ФС-1	10	117,74
2	ФС-1.1	10	1,01
3	ФС-1.2	10	14,50
4	ФС-1.3	10	6,06
5	ФС-1.4	10	27,27
6	ФС-1.5	10	50,70
7	ФС-1.6	10	51,00
8	ФС-1.7	10	15,18
9	ФС-1.8	10	110,7

Проведенными исследованиями установлено, что введение животным всех восьми 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 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 комплекса. В дозах выше 117,74 мг/кг токсический эффект проявляется по нейротоксическому типу.

Химическая структура лекарственных соединений определяет физико-химические свойства молекул, которые влияют на процессы всасывания, транспорта, распределения веществ в тканях организма и.т.д. Знание трансформации лекарственного соединения в организме позволяет более эффективно применять их при лечении различных патологических состояний.

Следующий этап исследования направлен на изучение биологической активности и безопасности иодсодержащих лекарственных соединений на модели вируса гриппа 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. Выбор исследуемых концентраций иодсодержащих лекарственных соединений для определения противовирусной активности основывался на результатах экспериментов по

определению цитотоксичности. После определения значений ЦТК₅₀ рассчитывали максимально переносимую концентрацию (МПК) лекарственных соединений, которая составляет 1/2 от значения ЦТК₅₀. Для исследования выбраны три концентрации. МПК вычисляли по формуле (3.4):

$$МПК = \frac{ЦТК_{50}}{2}, \quad (3.4)$$

где МПК - Максимально переносимая концентрация; ЦТК₅₀ - цитотоксическая концентрация 50 %.

Противовирусную активность соединений на модели вируса гриппа птиц штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) в опытах *in vitro* определяли по лечебной схеме [229-231]. Суспензию клеток MDCK рассеивали в 96-луночные планшеты в концентрации 2×10^5 клеток/мл по 100 мкл в лунку. После образования монослоя, из лунок планшета с культурой клеток MDCK осторожно удаляли ростовую среду. Рабочее разведение вируса гриппа А готовили в дозе 100 ТЦД₅₀/0,2 мл в питательной среде DMEM без сыворотки.

В монослой клеток MDCK вносили по 200 мкл рабочего разведения вируса гриппа птиц А /FPV/Waybrige/78 (H7N7). Для адсорбции вируса гриппа А планшет инкубировали час при комнатной температуре. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли, клетки промывали раствором Хенкса и вносили питательную среду, содержащую различные концентрации иодсодержащих лекарственных соединений. Плашки инкубировали 72 ч при 37 °С, с 5 % CO₂.

Оценку противовирусного действия иодсодержащих лекарственных соединений на модели вируса гриппа птиц А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) проводили визуально под микроскопом по степени трансформации клеточного монослоя культуры клеток MDCK. Определение остаточного титра вируса гриппа птиц определяли в реакции гемагглютинации. Результаты определения противовирусной активности иодсодержащих соединений по отношению к

вирусу гриппа птиц А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) на культуре клеток MDCK представлены в табл. 3.11.

Таблица 3.11 – Данные антивирусной активности иодсодержащих лекарственных соединений на культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа птиц А /FPV/Waybrige/78 (H7N7)

Иодсодержащие лекарственные соединения	Концентрация, мг/мл	Титр в ГАЕ*, $\log_2 \pm \text{StD}$
ФС-1	25,00	0
	12,50	$2,0 \pm 0,0$
	6,25	$3,0 \pm 0,0$
ФС-1.1	10,00	$6,0 \pm 0,4$
	5,00	$6,9 \pm 0,4$
	2,50	$7,1 \pm 0,3$
ФС-1.2	0,63	$7,3 \pm 0,2$
	0,31	$7,6 \pm 0,3$
	0,16	$8,0 \pm 0,2$
ФС-1.3	5,00	$7,4 \pm 0,1$
	2,50	$7,6 \pm 0,2$
	1,25	$8,0 \pm 0,2$
ФС-1.4	10,00	$2,0 \pm 0,3$
	5,00	$2,0 \pm 0,3$
	2,50	$3,0 \pm 0,3$
ФС-1.5	0,34	$7,5 \pm 0,3$
	0,17	$7,8 \pm 0,3$
	0,08	$7,8 \pm 0,3$
ФС-1.6	0,09	$7,0 \pm 0,2$
	0,05	$7,8 \pm 0,2$
	0,025	$8,0 \pm 0,3$
ФС-1.7	0,89	0
	0,45	0
	0,22	0
ФС-1.8	0,14	$7,6 \pm 0,3$
	0,07	$8,0 \pm 0,2$
	0,03	$8,0 \pm 0,3$
Контроль вируса		$8,0 \pm 0,5$
Примечание: * - Титр, гемагглютинирующих единиц, приведен в двоичных \log_2 ;		

Из данных табл. 3.11 видно, что иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.8 не проявляют значимой активности в отношении вируса гриппа птиц штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7), поскольку снижение титра вируса составляет от 0 до 2,0 log.

Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 обладало выраженной антивирусной активностью в концентрации 25,0 мг/мл, полностью подавляя репродукцию вируса гриппа птиц, а в концентрации 12,5 и 6,25 мг/мл снижал титр вируса на 5,0–6,0 log. Тогда как ФС-1.4 в концентрациях 10,0 и 5,0 мг/мл снижал титр вируса гриппа на 6,0 log, а в концентрации 2,5 мг/мл снижал титр вируса на 5,0 log. ФС-1.7 во всех используемых в исследовании концентрациях полностью подавлял развитие вируса. Титр остаточного вируса положительного контроля составил 8,0 log.

При изучении противовирусного действия лекарственного соединения на культуре клеток MDCK было выявлено, что наибольшая противовирусная активность из числа исследованных комплексов установлена 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.

Результаты экспериментов по изучению индукции ФС-1, ФС-1.4 и ФС-1.7 доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках, анализ мутагенной активности на различных по чувствительности тест-системах, проведенных лабораторией иммунологии показал, что соединение ФС-1 не индуцирует развитие доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках и не обладает мутагенной активностью в условиях *in vitro* и *in vivo*, в отличие от иодсодержащих лекарственных соединений ФС-1.4 и ФС-1.7. Также ФС-1.4 и ФС-1.7 показали высокую токсичность в экспериментах на животных.

Наибольшее противовирусное действие из числа исследованных лекарственных соединений установлено у комплекса ФС-1, который полностью подавил репродукцию вируса гриппа птиц А и менее токсичен по сравнению с ФС-1.7 и ФС-1.4.

Такие фармакологические исследования, как цитотоксичность соединений определяли *in vitro* при помощи МТТ-теста в многослойных перевиваемых культуре клеток MDCK в 96 луночных плашках, инкубируемых в атмосфере с 5 % содержанием CO₂ при 37 °С. Результаты МТТ-теста на клеточной линии MDCK для лекарственных соединений представлены в табл. 3.7. Результаты

острой токсичности лекарственных соединений в эксперименте на мышах при внутрибрюшном введении представлены в табл. 3.8– 3.9.

Определение противовирусного действия иодсодержащих лекарственных соединений *in vitro* в отношении вируса гриппа птиц А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) проводили на перевиваемой культуре клеток МДСК. Исследуемые соединения вносили в различных концентрациях. Данные противовирусной активности иодсодержащих лекарственных соединений на культуре клеток МДСК в отношении вируса гриппа птиц А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) представлены в табл. 3.11.

Таким образом, в результате проведенных исследований определения токсичности и противовирусной активности, наименее токсичным и обладающим противовирусной активностью оказалось соединение ФС-1. В концентрации 25,0 мг/мл оно оказывало выраженное противовирусное действие на вирус гриппа птиц штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7). При внутрижелудочном введении мышам в дозах от 60,0 мг/кг до 270,0 мг/кг летального эффекта не наблюдалось. В тоже время иодсодержащие лекарственные 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 проявили себя токсичными и малоактивными 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. Активные центры лекарственного соединения ФС-1 представлены в декстриновом кольце. Активные центры – это комплекс молекулярного иода с галогенидом лития (LiI_2), биядерный комплекс магния и лития, содержащий молекулярный иод с

трийодидом $[MgI_3LiI_2]^+$ и трийодид (I_3^-). Полипептид, находящийся вне декстриновой спирали, образует водородную связь с декстрином в комплексе с молекулярного иода с галогенидом лития (LiI_2), и координирует молекулярный иод в биядерном комплексе магния и лития, содержащий молекулярный иод и трийодид $[MgI_3LiI_2]^+$. 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 мембранно-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 [Ильин А. И., 2014, Юлдашева Г. А., 2011–2012].

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

3.4.1. Определение острой токсичности ФС-1 в эксперименте на крысах

Определение острой токсичности на крысах ФС-1 проводили согласно Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых

фармакологических веществ [233-234] на двух – трех месячных белых беспородных крысах массой 160 – 230 г обоего пола, прошедших недельный карантин. Подобные рекомендации по определению острой токсичности описаны в Европейской и в Американской фармакопеях. Иодсодержащее лекарственное соединение вводили в три приема, в течение шести часов, с расчетом на массу тела животного. За один прием животным вводили предельно возможный объем для одноразового введения – 5,0 мл. Максимальное количество приемов было 4. Распределение животных по дозам представлено в таблице 3.12.

Содержание экспериментальных животных проводили в стандартных условиях вивария с обычном рационом кормления при свободном доступе к воде и пище, в условиях нормального температурного и светового режимов (температура 22–24 °С, влажность 60–70 %). Рацион кормления: стандартные брикеты. Животные были размещены на опытные группы, включающие по 10 голов в каждой. Наблюдение за общим состоянием, поведением, двигательной активностью и состоянию шерстных покровов животных велось в течение двух недель.

Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 разводили стерильной дистиллированной водой и вводили перорально в объеме 5,0 мл с помощью пищеводного зонда. Исследуемые дозы для крыс: 124,1; 248,3; 397,2; 496,5; 596,0; 794,4; 993,0; 1191,6; 1390,0 мг/кг. Острую токсичность учитывали по проценту погибших животных. В качестве контроля использовали крыс, которым вводили физиологический раствор. Полученные результаты определения острой токсичности на крысах приведены в табл. 3.13.

Таблица 3.12 – Рассчитанные дозы ФС-1 в эксперименте на крысах при пероральном введении

Номер группы животных	Номер животных	Количество соединения, мг/кг	Полный объем дозы (мл)
1	2	3	4
1	1-10	Физиологический раствор	5,0
2	11-20	124,1	5,0

Номер группы животных	Номер животных	Количество соединения, мг/кг	Полный объем дозы (мл)
1	2	3	4
3	21-30	248,25	5,0
4	31-40	397,2	5,0
5	41-50	496,5	5,0
6	51-60	596,0	6,0
7	61-70	794,4	8,0
8	71-80	993,0	10,0
9	81-90	1191,6	12,0
10	91-100	1390,0	14,0

После введения всей дозы ФС-1 производилось наблюдение за животными, впервые сутки непрерывно (14 часов), в остальное время ежедневно.

Таблица 3.13 – Определение острой токсичности ФС-1 в эксперименте на крысах при пероральном введении

Номер группы животных	Доза, мг/кг	Кол-во выживших животных /	Кол-во погибших животных /
		Кол-во животных в группе, голов	Кол-во животных в группе, голов
1	124,1	10/10	0/10
2	248,3	10/10	0/10
3	397,2	10/10	0/10
4	496,5	10/10	0/10
5	596,0	8/10	2/10
6	794,4	7/10	3/10
7	993,0	6/10	4/10
8	1191,6	2/10	8/10
9	1390,0	1/10	9/10
Контроль	Физ. раствор	10/10	0/10

По данным табл. 3.13 видно, что дозы 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг не приводили к смерти животных. В пятой группе доза 596,0 мг/кг вызывала падеж двух крыс, в шестой группе от дозы 794,4 мг/кг пали три животных, в седьмой группе от дозы 993,0 мг/кг пали четыре крысы. Максимальное количество павших животных наблюдали при введении доз 1191,6 мг/кг, погибло восемь животных, а доза 1390,0 мг/кг привела к падежу девяти крыс.

Полученные результаты позволили рассчитать ЛД₁₀₀, ЛД₈₄, ЛД₅₀ ЛД₁₆ с помощью методики расчета наименьших квадратов. Данные расчетов летальных доз на крысах при пероральном введении представлены в табл. 3.14.

Таблица 3.14 – Показатели острой токсичности ФС-1 при однократном пероральном введении крысам

Путь введения	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄	ЛД ₁₀₀
пероральный	571	922	1273	1449

Таким образом, для ФС-1 были установлены летальные дозы при однократном пероральном введении ЛД₁₀₀ - 1449,0 мг/кг, ЛД₈₄ - 1273,0 мг/кг, ЛД₅₀ - 922,0 мг/кг, ЛД₁₆ - 571,0 мг/кг. С учетом того, что более концентрированный препарат получить не представляется возможным, без изменения его основных свойств. Другими важнейшими характеристиками токсичности ФС-1 является изучение влияния на общее физиологическое состояние организма животного (живая масса, активность, аппетит). Так для учета токсического эффекта ФС-1 была изучена динамика изменения веса крыс в зависимости от дозы по дням наблюдения, табл. 3.15.

Таблица 3.15 – Динамика изменения веса экспериментальных животных в ходе определения острой токсичности ФС-1

Доза вводимого ФС-1, мг/кг	Количество, выжившие/павшие, шт.	Средний вес выживших животных после введения ФС-1, г			Динамика массы тела, г
		на первый день	на седьмой день	на четырнадцатый день	
124,1	10/0	204,9 ± 11,6	210,1 ± 11,1	214,2 ± 11,9	+ 9,2
248,3	10/0	197,5 ± 3,7	199,9 ± 4,5	200,7 ± 6,1	+ 3,2
397,2	10/0	194,2 ± 11,8	199,4 ± 11,5	199,9 ± 12,1	+ 5,7
496,5	10/0	211,2 ± 5,3	214,7 ± 5,4	216,2 ± 4,8	+ 5,0
596,0	8/2	218,9 ± 13,9	206,4 ± 9,9	207,8 ± 10,4	-11,1
794,4	7/3	220,5 ± 10,9	212,3 ± 9,3	208,2 ± 10,6	-12,3
993,0	6/4	219,2 ± 11,6	208,8 ± 12,0	201,6 ± 10,0	-17,6
1191,6	2/8	231,8 ± 11,6	212,9 ± 11,1	214,2 ± 11,9	-25,3
1390,0	1/9	227,8 ± 11,4	205,3 ± 10,6	187,9 ± 11,1	-39,9
Контроль	10/0	214,2 ± 11,8	219,4 ± 11,5	219,9 ± 12,1	+ 5,7

Как видно из табл. 3.15, значимые различия не наблюдали в группе животных, получавших дозы ФС-1 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг от массы тела крыс. При этом наблюдали прирост массы тела от 3,2 до 9,2 г.

Обязательным условием проведения испытания на острую токсичность являлось изучение показателей соматических реакций (частота и глубина

дыхания, ритм сердечной деятельности, окраска слизистых оболочек частота мочеиспускания, дефекации, потребление пищи и воды), а также характеристики нервной деятельности (активность животного, присутствие агрессивности, положение хвоста, пилоэрекция, реакция на тактильные и световые раздражители). Исследования проводили на двух – трехмесячных белых беспородных крысах массой 160–230 г обоего пола, исследуемое соединение ФС-1 разводили стерильной дистиллированной водой и вводили перорально в объеме 5,0 мл с помощью пищеводного зонда в дозах: 124,1; 248,3; 397,2; 496,5; 596,0; 794,4; 993,0; 1191,6; 1390,0 мг/кг. Наблюдения за животными после введения исследуемого вещества вели в течение 14 дней. В качестве контроля использовали крыс, которым вводили физиологический раствор. Определение выше указанных факторов были проведены по четырех бальной крестовой системе. Полученные данные при изучении соматических реакций организма крыс на введение ФС-1 приведены в таблице 3.16.

Частота дыхания здоровой крысы составила 85 актов в минуту. В первые сутки наблюдалось повышение частоты дыхания у подопытных животных после введения препарата во всех исследуемых дозах, при максимальных дозах регистрировалось до 200 актов, что свидетельствовало о зависимости частоты дыхания от дозы введенного препарата.

Такая же тенденция просматривалась и при исследовании сердечных сокращений: в норме она составляла 300–500 уд./мин., а при воздействии ФС-1 в малых дозах 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг тахикардия была умеренно выражена, но при высоких концентрациях препарата она возрастала и достигала 400–800 уд./мин.

При изучении пилоэрекции, установлено, что введение доз 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг приводит к умеренной пилоэрекции, наблюдаемой в течение пяти дней. При введении доз от 794,4; 993,0; 1191,6 мг/кг была выявлена ярко-выраженная пилоэрекция, а при введении крысе максимальной дозы 1390,0 мг/кг наблюдали пилоэрекцию, не проходящую до летального исхода.

Частота дефекации и консистенция каловых масс не отличалась у животных опытных групп в сравнении с контрольными животными. Частота мочеиспускания была повышена в первые сутки наблюдения при высоких концентрациях препарата равных 496,5; 596,0; 794,4; 993,0; 1191,6; 1390,0 мг/кг.

Потребление корма и воды у животных опытных групп при малых дозах 124,1; 248,3; 397,2 мг/кг не отличалось от контрольных животных. В тоже время при высоких дозах препарата потребление корма и воды у животных опытных групп снижалось. Так при концентрации 596,0 мг/кг животные не подходили ни к кормушке, ни к поилке в течение суток после введения ФС-1. В концентрациях 794,4; 993,0; 1191,6; 1390,0 мг/кг во всех группах наблюдали резкое снижение аппетита и потребления воды.

При изучении факторов нервной деятельности, в период возбуждения, стресса, агрессии вызванных введением исследуемого соединения ФС-1 у крысы установлено повышение двигательной активности, активизация пилоэрекции, изменение положения хвоста, величины зрачков. Результаты изучения этих факторов представлены в табл. 3.17.

Как видно из табл. 3.17, все нейрогенные факторы отмечены в первые сутки наблюдений. Через 7–14 дней наблюдения за животными двигательная активность, тактильные, болевые и световые раздражители у крыс опытной группы мало отличались от токовых проявлений у контрольных.

Забор крови для биохимического анализа осуществляли утром до кормления крыс из сонной артерии в количестве по 10,0 мл с использованием гепарина в качестве антикоагулянта [235]. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об. /мин. Определение содержания общего билирубина, общего белка, мочевины, креатинина, холестерина, глюкозы, АЛТ, АСТ, ЛДГ, щелочной фосфатазы проводили по общепринятым методикам на автоматическом анализаторе Konelab-60i («Konelab» Финляндия), позволяющем определять концентрации исследуемых веществ. Метод основан на расчете изменений плотности реакционных сред интерферентным способом. Результаты биохимических исследований представлены в табл. 3.18 и 3.19 и на рисунке 3.8.

Таблица 3.16 – Влияние ФС-1 на соматические факторы крыс

Физиологические признаки	Срок наблюдения	Контрольные животные	Доза мг/кг									
			124,1	248,3	397,2	496,5	596,0	794,4	993,0	1191,6	1390,0	
Частота и глубина дыхания	1-е сутки	б/и	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	+	+	++
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
Ритм сердечных сокращений	1-е сутки	б/и	+	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	+	+
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
Состояние волосяного и кожных покровов	1-е сутки	б/и	N	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	++	++	++
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
Окраска слизистых оболочек	1-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
Частота дефекации, консистенция кала	1-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	++	++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
Частота мочеиспускания	1-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	++	++	++	++	++	+++	+++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
Потребление корма и воды	1-е сутки	б/и	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	+	++	++	++
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	+	+	+

б/и - без изменений, не отличающиеся от нормы показатель; + - Слабовыраженный признак (до 20 % от физиологического показателя); +- Умеренно – выраженный признак (более 20% от физиологического показателя); +++ - Выраженный признак (выше 30–60 % от физиологического показателя); ++++ - Ярко выраженный признак (выше 60% от физиологического показателя).

Таблица 3.17– Влияние ФС-1 на нейрогенные факторы крыс

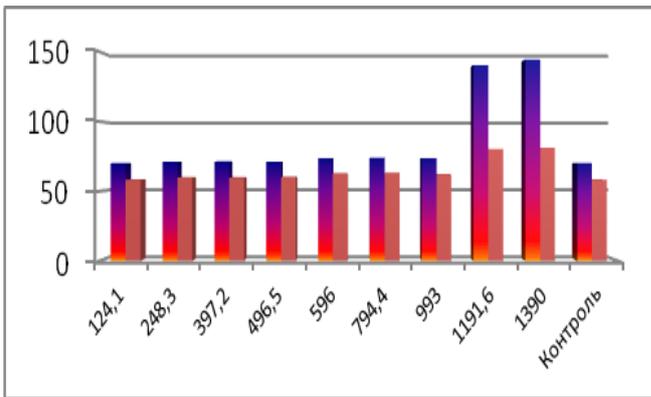
Признаки	Срок наблюдения	Контрольные животные	Дозы, мг/кг								
			124,1	248,3	397,2	496,5	596,0	794,4	993,0	1191,6	1390,0
Двигательная активность крыс	1-е сутки	б/и	+	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
Тактильные, звуковые, болевые и световые раздражители	1-е сутки	б/и	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	7-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
	14-е сутки	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и	б/и
<p>б/и - без изменений, не отличающиеся от нормы показатель; + - Слабовыраженный признак (до 20 % от физиологического показателя); + +- Умеренно – выраженный признак (более 20% от физиологического показателя); +++ - Выраженный признак (выше 30–60 % от физиологического показателя); ++++- Ярко выраженный признак (выше 60% от физиологического показателя).</p>											

Таблица 3.18 – Уровень биохимических показателей в сыворотке крови крыс при пероральном введении ФС-1

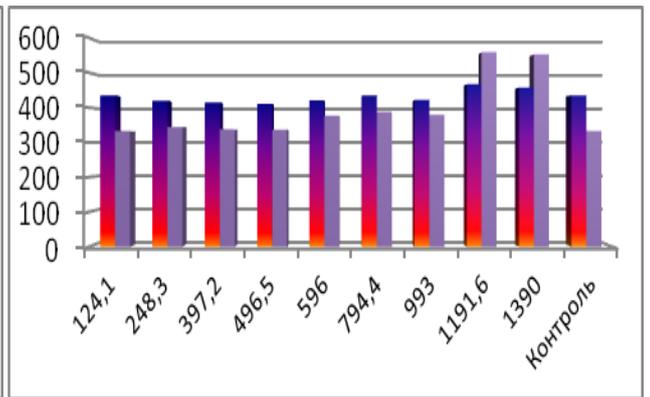
Доза вводимого ФС-1, мг/кг	Уровень биохимических показателей в периферической крови крыс						
	Общий белок, г/л	АЛТ, ед./л	АСТ ед./л	Щелочная фосфатаза, ед./л	ЛДГ, ед./л	Общий билирубин, мг/мл	Холестерин, ммоль/л
124,1	69,1±0,6	70,1±1,0	58,2±3,0	332,1±10,0	435,1±54,0	1,7±0,1	1,8±0,03
248,3	69,72±0,6	71,1±1,0	59,9±2,5	344,4±8,3	440,0±53,0	1,9±0,1	1,6±0,02
397,2	68,7±0,5	71,3±1,1	59,7±2,5	337,0±8,9	445,0±54,0	1,6±0,2	1,8±0,01
496,5	69,0±0,4	71,2±1,0	59,1±2,0	335,9±8,9	441,2±52,0	1,9±0,1	1,9±0,02
596,0	69,4±0,3	73,8±1,0	62,7±2,5	376,9±10,8	440,1±51,0	2,7±0,1	1,9±0,02
794,4	69,5±0,7	73,9±1,1	62,9±3,0	388,0±7,3	434,1±52,1	2,8±0,2	1,7±0,02
993,0	68,6±0,4	73,8±1,0	62,1±2,5	379,3±8,0	432,2±51,3	3,3±0,1	1,4±0,03
1191,6	69,0±0,8	140,5±1,2	80,3±3,0	558,6±8,4	467,2±67,0	13,8±0,2	0,8±0,01
1390,0	69,1±0,3	144,6±1,1	81,1±3,0	552,8±9,7	457,1±54,0	13,6±0,1	0,7±0,02
Контроль	69,1±0,6	70,1±1,0	58,2±3,0	332,1±10,0	435,1±54,0	1,7±0,1	1,8±0,03

Таблица 3.19 – Уровень биохимических показателей в сыворотке крови крыс при пероральном введении ФС-1

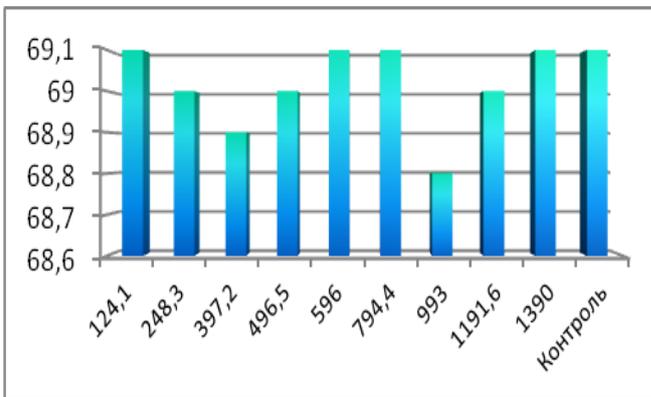
Доза вводимого ФС-1, мг/кг	Уровень биохимических показателей в периферической крови крыс				
	Глюкоза, ммоль/л	Ионы натрия, ммоль/л	Ионы калия, ммоль/л	Креатинин, мг/мл	Мочевина, ммоль/л
124,1	4,4±0,3	134,1±2,0	1,9±0,2	0,49±0,01	7,1±0,1
248,3	5,1±0,2	131,9±0,2	140±10	0,47±0,06	6,6±0,5
397,2	4,3±0,1	135,9±0,1	138±9	0,49±0,01	6,7±0,6
496,5	5,1±0,1	136,0±0,3	142±12	0,48±0	6,9±0,5
596,0	4,6±0,3	141,9±0,2	141±7	0,49±0,01	7,2±0,5
794,4	4,9±0,2	134,9±0,1	136±10	0,46±0,01	7,1±0,6
993,0	4,2±0,2	134,9±0,3	138±9	0,47±0,08	7,3±0,4
1191,6	4,9±0,2	154,0±0,1	144±10	0,48±0	7,6±0,7
1390,0	4,5±0,1	144,8±0,4	146±11	0,47±0,03	7,5±0,6
Контроль	4,4±0,3	134,1±2,0	1,9±0,2	0,49±0,01	7,1±0,1



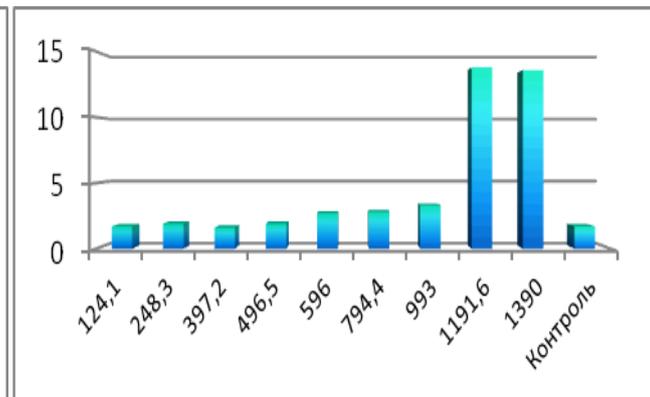
а



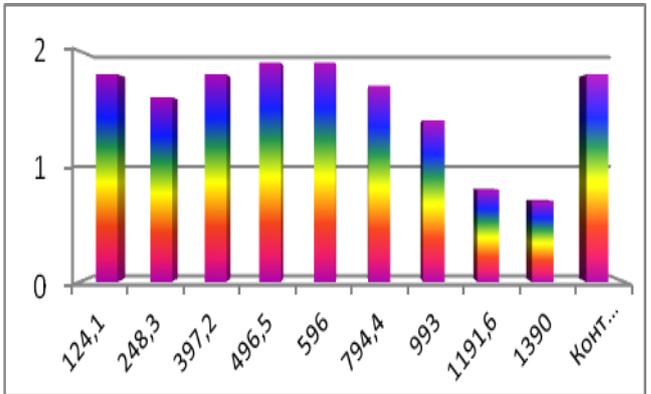
б



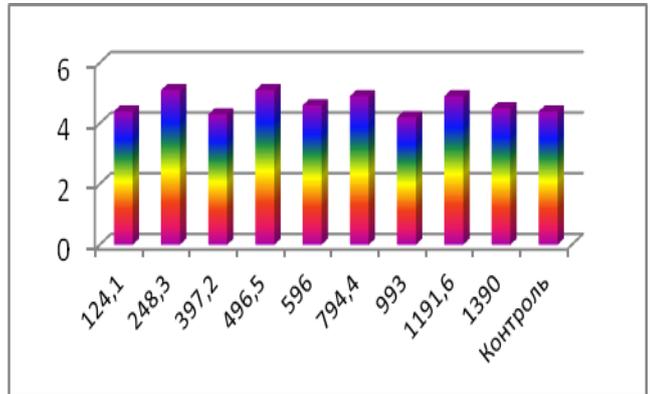
в



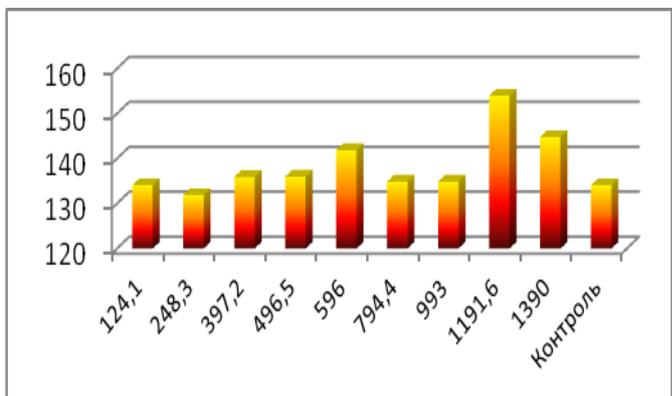
г



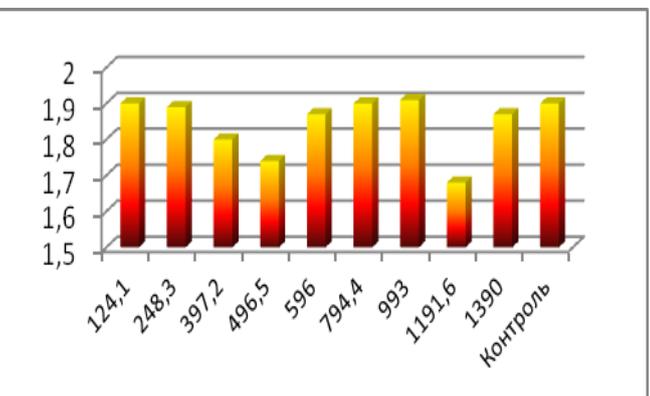
д



е



ж



з

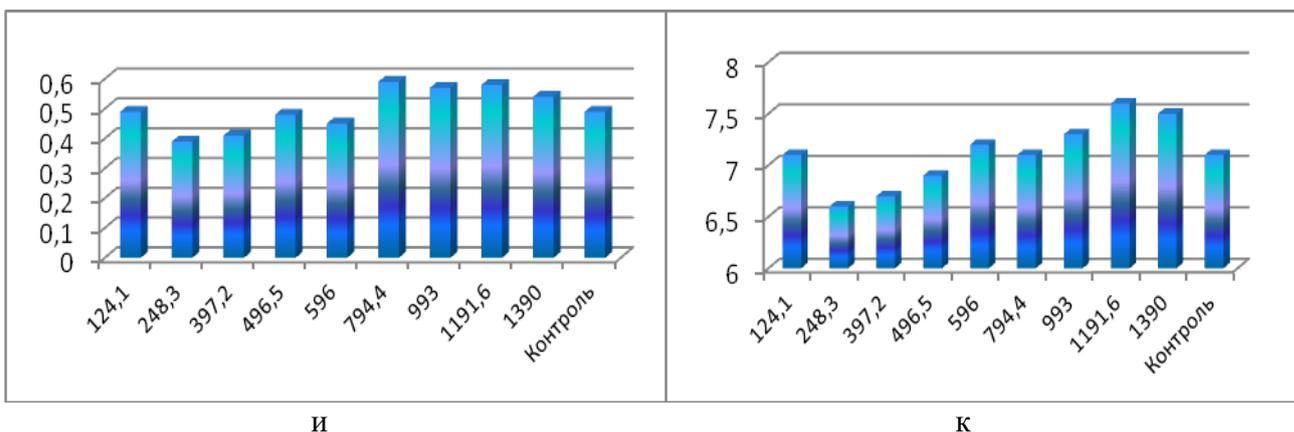


Рисунок 3.8. - Биохимические исследования периферической крови крыс

а) количество содержания АЛТ, АСТ в сыворотке крови крысы, ед./л; б) количество содержания щелочной фосфатазы, ЛДГ в сыворотке крови крысы, ед./л; в) количество содержания общего белка в сыворотке крови крысы, г/л; г) количество содержания общего билирубина в сыворотке крови крысы, мг/мл; д) количество содержания холестерина в периферической крови крыс, ммоль/л; е) количество содержания глюкозы в периферической крови крыс, ммоль/л; ж) количество содержания ионов натрия в периферической крови крыс, ммоль/л; з) количество содержания ионов калия в периферической крови крыс, ммоль/л; и) количество содержания креатинина в периферической крови крыс, мг/мл; к) количество содержания мочевины в периферической крови крыс, ммоль/л.

Установлено, что уровень общего белка в сыворотки крови не менялся. Так проведенные биохимические исследования сыворотки периферической крови крыс на 14 день после введения ФС-1 показали стабильность белково-синтезирующей функции печени. Для выявления возможного повреждающего действия соединений на печень нами были проведены исследования активности аланинтрансаминазы (АЛТ), аспартаттрансаминазы (АСТ), щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), определен общий билирубин и холестерин. Проведены исследования креатинина и мочевины.

Полученные исследования показали, что в течение срока наблюдения у крыс, принимавших иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 в дозах от 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг не выявлены отклонения содержания перечисленных выше показателей в сравнении с животными контрольной группы. В тоже время дозы 596,0; 794,4; 993,0 мг/кг вызывали незначительное повышение АЛТ в среднем до 73,9 ед./л, АСТ до 62,9 ед./л, щелочной фосфатазы до 588,6 ед./л и общего билирубина от 2,7 до 3,3 мг/мл. Тогда как у животных, получавших ФС-1 в дозах 1191,0 и 1390,0 мг/кг выявлено значительное увеличение уровня АЛТ до

144,6 ед./л, АСТ от 80,3 до 81,1 ед./л, щелочной фосфатазы от 552,8 до 558,6 ед./л и общего билирубина 13,8 мг/мл.

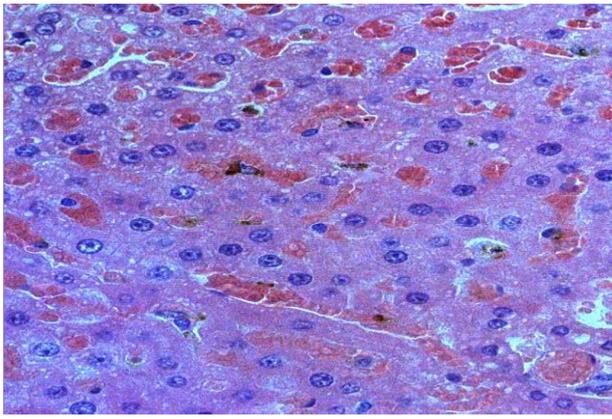
При введении ФС-1 в концентрациях 1190,6 и 1390,0 мг/кг установлено снижение общего холестерина до 0,8 ммоль/л, что свидетельствует о функциональных нарушениях в печени. Уровень содержания креатинина у животных опытной группы в течение всего эксперимента не отличался от показателей у контрольной группы животных и составил 0,47–0,49 ммоль/л.

Также проведенные исследования после введения показали, что ФС-1 не оказывает влияния на углеводный обмен. Так количество глюкозы в сыворотке животных составило 4,2–5,1 ммоль/л и не выходило за допустимые границы в сравнении с показателями у животных контрольной группы.

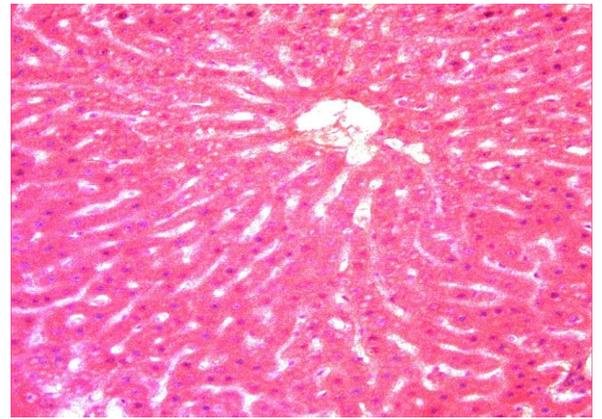
Таким образом, результаты биохимических исследований при пероральном введении ФС-1 крысам в дозах 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг не нарушали ни белкового, ни углеводного обмена. Также установлено, что введение ФС-1 крысам не оказывало повреждающего действия на функцию почек и не нарушало электролитный 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 повышаются 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.

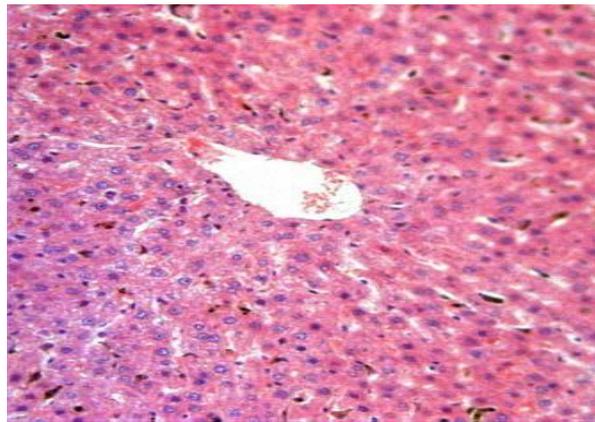
Проведенные гистологические исследования внутренних органов крыс показали: Общие нарушения кровообращения, преимущественно в виде венозного полнокровия и относительного артериального малокровия, предоставленные на рисунке 3.9.



а



б



в

Рисунок 3.9. - Гистоструктура печени крыс получавших ФС-1

а - Гистоструктура печени крыс получавших ФС-1 (Увеличение x 400, окраска: гематоксилин-эозин); б - Гистоструктура печени крыс получавших ФС-1 (Увеличение x 200, окраска: гематоксилин-эозин); в - Гистоструктура печени крыс получавших ФС-1 (Увеличение x 200, окраска: гематоксилин-эозин)

Наиболее существенные изменения наблюдались у животных в печени и почках. В частности, отмечалось венозное полнокровие (при макроскопическом исследовании - мускатная печень), в центре дольки вены и капилляра резко расширены, полнокровны. Печеночные балки атрофированы, а в области кровоизлияний разрушены. Пространства Диссе расширены, полнокровны с фрагментами препарата. Активация клеток Купфера (черного цвета за счет фагоцитоза фармакологического соединения) Гепатоциты в цитоплазме нагружены мелкими вакуолями, имеющие тенденцию к сливанию как показано на рис. 3.9 а-в.

Капилляры клубочков полнокровны, резкое сокращение мочевого пространства за счет мезангиально-эндотелиальной пролиферации.

Дистрофические и некробиотические изменения эпителиоцитов всех типов канальцев рисунок 3.10.

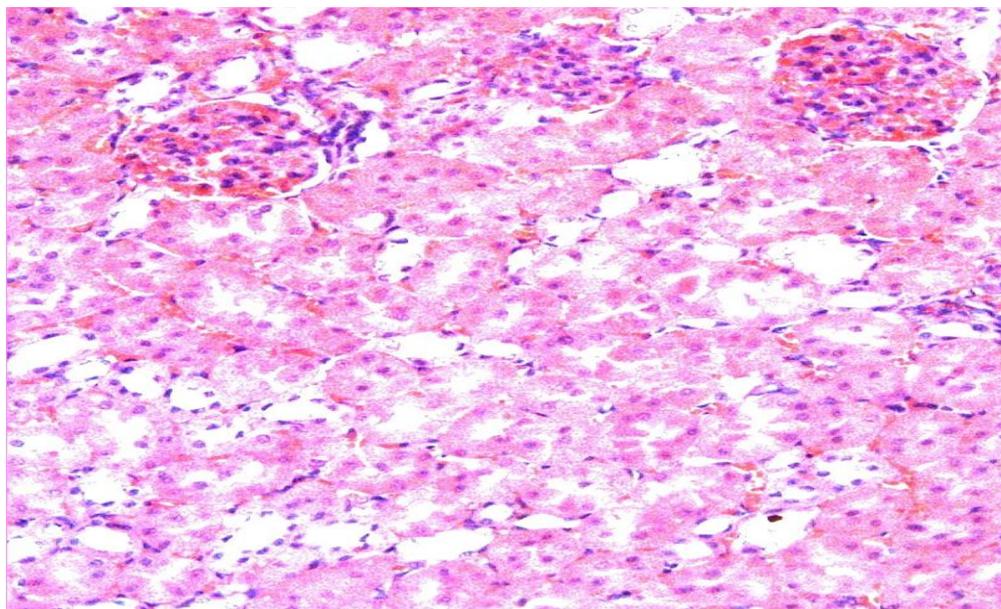


Рисунок 3.10. - Гистоструктура почек крыс, получавших ФС-1
Увеличение x 200, окраска: гематоксилин-эозин

Фолликулы представлены округлой или вытянутой овальной формы. Полость фолликулов заполнена коллоидом, эозинофильно слабо окрашена. При этом отмечены фолликулы с отсутствующим коллоидом, располагаемые преимущественно по периферии щитовидной железы. Признаки краевой резорбции (местами отсутствует и слабо окрашивается). Также встречались фолликулы, где вокруг апикально расположенных тироцитов отмечались вакуолидные выросты (коллоид с краевой вакуолизацией). Отдельные тироциты теряли связь с базальной мембраной и выталкивались в просвет фолликула. Капилляры клубочков полнокровны, резкое сокращение мочевого пространства за счет мезангиально-эндотелиальной пролиферации. Дистрофические и некробиотические изменения эпителиоцитов всех типов канальцев рисунок 3.11–3.12.

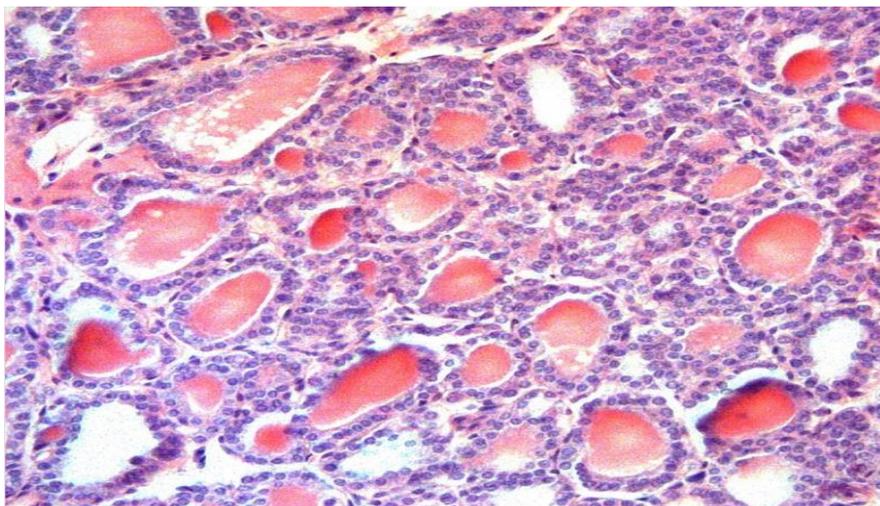


Рисунок 3.11. - Гистоструктура щитовидной железы крыс, получавших ФС-1
Увеличение x 200, окраска: гематоксилин-эозин

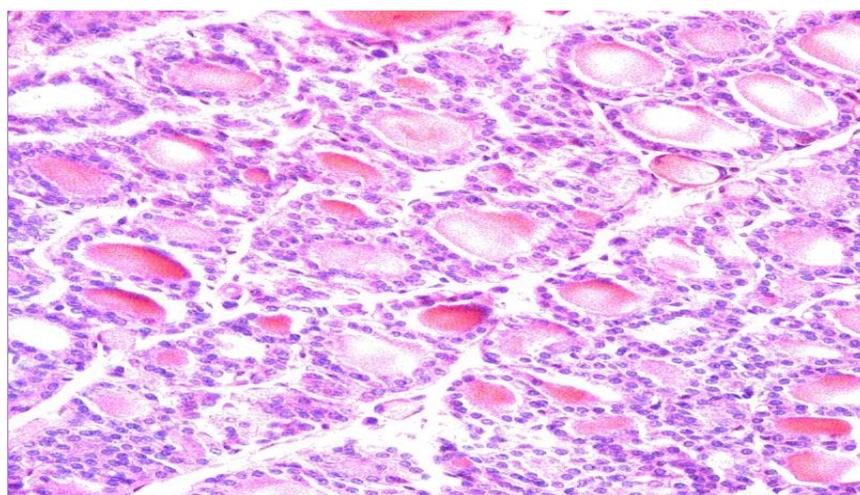


Рисунок 3.12. - Гистоструктура щитовидной железы крыс, получавших ФС-1
Увеличение: об x 200, окраска: гематоксилин-эозин

Таким образом, проведенные исследования по определению острой токсичности на крысах показали, что пероральное введение ФС-1 позволило определить ЛД₅₀ равную 922 мг/кг. В соответствии со шкалой токсичности веществ введенных per os (Hodg G., Gleason S., 1975; С. А. Куценко, 2002) исследуемый комплекс ФС-1 можно отнести к умеренно токсичным веществам или к третьему классу опасности.

3.4.2. Определение хронической токсичности ФС-1 в эксперименте на мышах

Эксперимент по изучению хронической токсичности ФС-1 позволил определить долговременное влияние лекарственного соединения на организм опытного животного. Исследование проводили на белых аутбрендных двух – трехмесячных мышах. Из опыта оценки острой токсичности установлено, что ЛД₅₀ для мышей при однократном приеме составила 5,8 мл/кг (117,74 мг/кг). Для исследования хронической токсичности использовали три дозы иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1, соответствующих 1/10 ЛД₅₀ (0,580 мл/кг), 1/25 ЛД₅₀ (0,232 мл/кг), 1/50 ЛД₅₀ (0,116 мл/кг). Разводили ФС-1 в стерильной дистиллированной воде. Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 в дозах 0,580; 0,232 и 0,116 мл/кг вводили внутривентриально мышам в объеме 1,0 мл три раза в неделю. Контрольной группе животных вводили стерильную дистиллированную воду. Общий срок введения ФС-1 составил два месяца. Группы и дозы для анализа хронической токсичности ФС-1 на мышах представлены в табл. 3.20.

Таблица 3.20 – Группы животных для анализа хронической токсичности и дозы вводимого ФС-1

Группы животных	Число животных	Доза, мл/кг	Концентрация соединения, мг/кг
1	16	0,580	11,77
2	16	0,232	4,71
3	16	0,116	2,35
Контрольная	16	Физ. раствор	-

По истечении двух месяцев половину оставшихся животных убили, а вторую половину оставили еще на месяц для наблюдения отдаленных последствий влияния ФС-1 с периодичностью регистрации изменения два раза в неделю.

В результате проведенных исследований по определению безопасности установлено, что введение животным ФС-1 в дозе 1/10 ЛД₅₀ равной 0,58 мл/кг приводило к проявлению судорог пароксизмального характера. У части животных

наблюдалась потливость и покраснение слизистых оболочек. В этой группе у животных также выявлена потеря аппетита, выраженная снижением суточного потребления корма и воды. По окончании второго месяца общее число погибших животных в данной группе составило 25 %. Отмечено снижение массы тела у оставшихся животных. В тоже время видимых изменений со стороны внутренних органов не было установлено.

Однако другие дозы 0,232 и 0,116 мл/кг ФС-1, 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. Изучение кумулятивного эффекта ФС-1 в эксперименте на мышах

Изучение кумулятивного эффекта или накопление ФС-1 в организме животного и вызываемые им эффекты при повторных воздействиях на организм проводилось в эксперименте на двух-трехмесячных мышах обоего пола весом 18–24 г, прошедших акклиматизационный период.

Проведенное исследование острой токсичности на мышах при однократном введении ФС-1 позволило рассчитать летальные дозы ЛД¹₈₄, ЛД¹₅₀, ЛД¹₁₆. Расчет проводили методом наименьших квадратов с использованием пробит-анализа на основании данных вводимых дозировок иодсодержащего лекарственного соединения и количества погибших животных. ЛД¹₈₄ составило 8,47 мл/кг (171,94 мг/кг), ЛД¹₅₀ – 5,8 мл/кг (117,74 мг/кг), ЛД¹₁₆ – 2,41 мл/кг (48,92 мг/кг).

После установления летальных доз для ФС-1 при его однократном внутрибрюшинном введении мышам была изучена его кумулятивная токсичность

при многократном внутривенном введении. Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 вводили пять раз в неделю 10 животным обоего пола, начиная с дозы $1/5$ ЛД₅₀ (1,16 мл/кг). Каждую следующую неделю дозу ФС-1 увеличивали в 1,5 раза, при этом регистрируя гибель животных. Эксперимент прекратили при достижении 100 % гибели животных. Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 вводили в объеме 1,0 мл. Разведение ФС-1 осуществляли в стерильной дистиллированной воде. Коэффициент кумуляции ФС-1 рассчитывали исходя из показателей токсичности при его однократном введении (ЛД¹₅₀), показателей токсичности при многократном введении (ЛДⁿ₅₀), функции наклона прямой при однократном введении (S_1) и функции многократном введении (S_n) по формуле (3.5):

$$K_{\text{кум}} = \frac{(\text{ЛД}^1_{50} \times S_1)}{(\text{ЛД}^n_{50} \times S_n)}, \quad (3.5)$$

где S_1 – функция наклона прямой при однократном введении;

S_n – функция наклона прямой при многократном введении.

Функции наклона прямой при однократном введении и многократном введении рассчитывали по формулам (3.6), (3.7):

$$S_1 = \frac{\text{ЛД}^1_{84}}{\text{ЛД}^1_{50}} + \frac{\text{ЛД}^1_{50}}{\text{ЛД}^1_{16} \times 2}, \quad (3.6)$$

где ЛД^1_{84} – летальная доза, вызывающая гибель 84 % животных при его однократном введении ФС-1; ЛД^1_{50} – летальная доза, вызывающая гибель 50 % животных при его однократном введении ФС-1; ЛД^1_{16} – летальная доза, вызывающая гибель 16 % животных при его однократном введении ФС-1.

$$S_n = \frac{\text{ЛД}^n_{84}}{\text{ЛД}^n_{50}} + \frac{\text{ЛД}^n_{50}}{\text{ЛД}^n_{16} \times 2}, \quad (3.7)$$

где $ЛД^{n}_{84}$ – летальная доза, вызывающая гибель 84 % животных при его многократном введении ФС-1; $ЛД^{n}_{50}$ – летальная доза, вызывающая гибель 50 % животных при его многократном введении ФС-1; $ЛД^{n}_{16}$ – летальная доза, вызывающая гибель 16 % животных при его многократном введении ФС-1.

Результаты проведенного исследования представлены в табл. 3.21.

Таблица 3.21 – Изучение кумулятивного токсического эффекта иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1

№ п/п	Доза, мл/кг	Концентрация вещества, мг/кг	Количество погибших животных, голов
1	1,16	23,55	0
2	1,74	35,32	0
3	2,61	52,98	2
4	3,91	79,37	6
5	5,87	119,16	8
6	8,87	180,06	9
7	13,22	268,37	10
8	Контроль (без введения ФС-1)	-	0

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 $ЛД^{n}_{84}$, $ЛД^{n}_{50}$ 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 (Ккум) в эксперименте на мышах составил 1,45, что по международной шкале оценки токсичности препаратов ФС-1 соответствует параметрам препаратов, со слабовыраженным кумулятивным эффектом [232].

3.4.4. Фармакокинетика ФС-1, меченного радиоактивным иодом-131 в организме цыплят при однократном пероральном применении

С целью изучения распределения ФС-1 в тканях и органах цыплят в эксперименте при однократном пероральном применении использован метод радиодиагностики [236, 237]. В качестве индикатора для оценки интенсивности накопления ФС-1 в тканях и органах цыплят использовали радиоизотоп ^{131}I с периодом полураспада 8,06 суток, полученный из института ядерной физики НАН РК (г. Алматы).

Были сформированы шесть групп цыплят, каждая группа состояла из пяти животных, всего в эксперименте использовали 30 особей.

Мечение иодом-131 ФС-1 проводили в изотопном растворе с рН равной 6,8–7,5. Радиохимическая чистота ИИИ (источника ионизирующего излучения) не менее 95,0 %. Объемная активность равна 20 МБк/мл, на день синтеза. К 19 мл ФС-1 при температуре 18–22 °С добавили 1,0 мл раствора Na^{131}I с учетом конечной активности радионуклеотида 1 МБк/мл. Лекарственное вещество, меченное, иодом-131 оставляли на три часа для полного прохождения изотопного обмена. Через три часа, исследуемый ФС-1 был готов для введения опытным животным. Цыплятам вводили перорально по 0,2 мл ФС-1, меченного радиоактивным иодом в концентрации 125,0 мг/мл. Для проведения исследований по распределению радиоактивного иода-131 использовали кровь, органы: легкие, печень, селезенка, почки, желудок и кишечник. Убой животных проводили через определенный промежуток времени: 30 минут, один час, три часа, шесть часов, 12 часов и 24 часа. Протокол исследования был одобрен этической комиссией Научного центра. Эвтаназию проводили методом цервикальной дислокации на основании Директивы Совета Европы 86/609 ЕЭС [115]. Утилизацию радиационного материала проводили в специализированном хранилище. Присутствие в организме радиоактивного иода-131 определяли с помощью прибора β -спектрометра Hidex 300. Работу выполняли обученным персоналом с соблюдением правил радиационной безопасности. Расчеты количественного содержания ФС-1 проводили исходя из количества активного вещества, введенного цыпленку,

выраженного в мкг/г, с помощью программы Microsoft Office Excel 2007. В результате проведенных экспериментов установлена динамика распределения, накопления и выведения ФС-1 меченного радиоактивным ^{131}I в крови и органах цыплят в течение суток. Полученные результаты представлены в табл. 3.22 и на рисунках 3.13–3.15.

Таблица 3.22 – Динамика распределения, накопления и выведения, меченного радиоактивным иодом – ^{131}I ФС-1 при однократном пероральном введении цыплятам

Материал исследования	Количественное содержание ФС-1 в период исследования, мкг/г					
	0,5 час	1 час	3 часа	6 часов	12 часов	24 часа
кровь	0,53±0,3	0,57±0,3	1,4±0,6	0,22±0,05	0,22±0,06	0,15±0,03
легкие	0,22±0,07	1,17±0,6	2,78±1,5	0,61±0,3	0,56±0,2	0,26±0,1
печень	0,2±0,01	0,31±0,06	0,43±0,05	0,43±0,03	0,4±0,08	0,22±0,02
селезенка	0,15±0,09	0,18±0,02	0,24±0,05	0,18±0,02	0,17±0,02	0,15±0,04
почки	2,54±1,9	12,06±6,3	16,67±6,8	5,33±1,9	3,66±0,5	1,36±0,3
желудок	9,38±2,8	1,04±0,5	0,33±0,1	0,09±0,03	0,05±0,01	0,03±0,01
кишечник	1,72±0,4	1,99±0,8	1,6±0,6	0,6±0,2	0,5±0,2	0,38±0,07



Рисунок 3.13. - Динамика содержания ФС-1 в крови цыпленка в течение 24 ч после введения

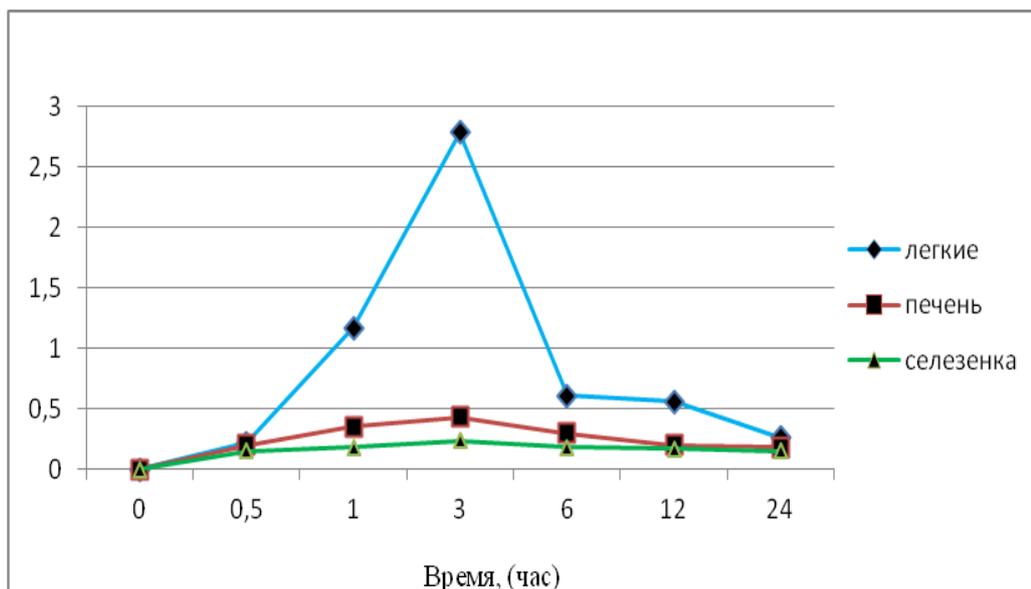


Рисунок 3.14. - Динамика содержания ФС-1 в легких, печени, селезенке цыплят в течение 24 ч после введения

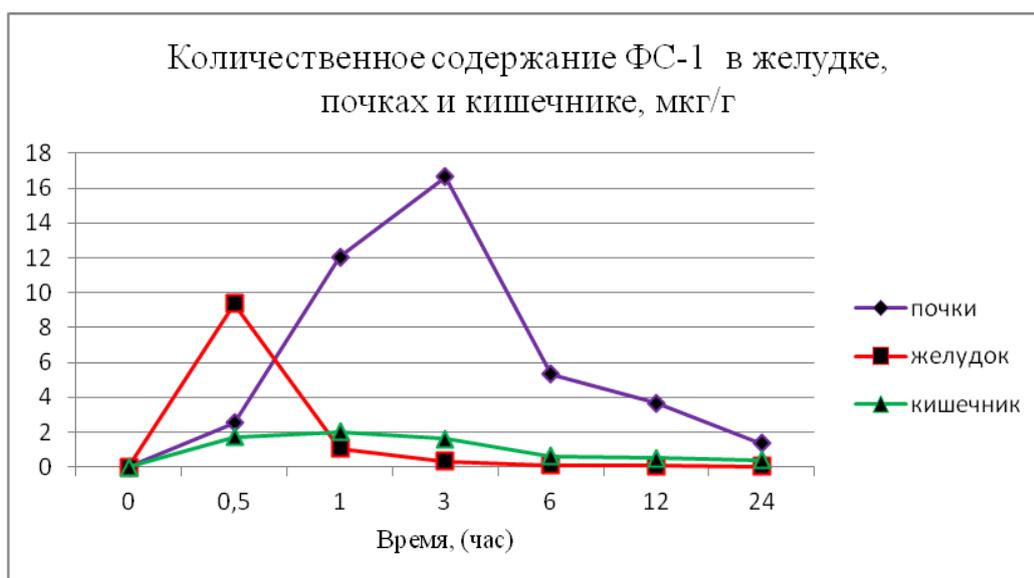


Рисунок 3.15. - Динамика содержания ФС-1 в желудке, кишечнике, почках цыплят в течение 24 ч после введения

Как показано в табл. 3.22 и на рисунке 3.13–3.15 терапевтический уровень лекарства после перорального введения достигался уже через 30 мин в крови и во всех исследуемых органах после его перорального введения, что указывает на высокую проницаемость и фармакологически активные свойства иодсодержащее

лекарственного соединения ФС-1. При пероральном приеме лекарственные вещества всасываются, в основном, в тонкой кишке и через воротную вену попадают в печень, затем в общий кровоток. В данном случае наибольшее содержание ФС-1 установлено в желудке через 30 мин после введения препарата. Однако уже к 60-й минуте и до окончания срока исследований его содержание оказывалось ниже, чем в кишечнике. Терапевтическая концентрация иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в системном кровотоке достигалась в течение трех часов после поступления препарата в организм и сохранялась до 24 ч.

Концентрация ФС-1, как показано в табл. 3.22, в крови через 30 мин составляла 0,53 мкг/г. Тогда как через три часа она увеличивалась в 1,5 раза и соответствовала 1,4 мкг/г. В последующий период времени наблюдалось ее снижение и составило 0,15 мкг/г к концу 24 ч исследования.

Наибольшее количественное содержание препарата через 30 мин отмечалось в желудке и составило 9,38 мкг/г и через час в кишечнике – 1,99 мкг/г. Препарат достаточно быстро всасывался из желудочно-кишечного тракта и максимальные значения его концентраций в легких, печени и селезенке так же наблюдали через три часа и составляли: в легких – 2,78 мкг/г, печени – 0,43 мкг/г, селезенке – 0,24 мкг/г.

Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 характеризовался относительно коротким периодом полувыведения. Время снижения концентраций препарата в крови определяли, как период полувыведения на 50 % введенного количества ФС-1. Поскольку основными путями выведения являются почки и печень, 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 три часа после однократного введения препарата и составила 16,67 мкг/г. Но к шести часам отмечалось его снижение до 5,33 мкг/г с последующим снижением до 1,36 мкг/г к 24 ч.

Нами изучены следующие фармакокинетические параметры:

- максимальная концентрация (C_{max}), характеризующая эффективность и безопасность лекарственного соединения;
- время достижения максимальной концентрации (t_{max}), позволяющее определить время наступления максимального эффекта препарата;
- объем распределения (V_p), характеризующий степень захвата препарата тканями из крови;
- константа элиминации (K_{el}), характеризующая скорость всей совокупности процессов, приводящих к выведению препарата из организма;
- площадь под фармакокинетической кривой (AUC) в участке концентрации лекарственного соединения в крови в зависимости от времени;
- период полувыведения ($t^{1/2}$), характеризующий время уменьшения вдвое концентрации препарата в организме. Результаты фармакокинетических параметров ФС-1 у животных после однократного перорального введения представлены в табл. 3.23.

Таблица 3.23 – Фармакокинетические параметры иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в крови после однократного перорального введения животным

Среднее значение	$t^{1/2}$, час	K_{el} , час ⁻¹ (л/мин)	AUC _{total}	V_p , мл/г	C_{max}	MRT	t_{max}
	8,02±0,2	0,1±0,0	26,3±10,2	2,1±1,1	0,95±0,29	11,6±0,33	3,0±0,0

Из представленной табл. 3.23 видно, что время полувыведения ($t^{1/2}$) нужное для исследуемого лекарственного соединения при однократном введении в организм животного составило 8,02 часа.

Константа скорости элиминации показывала, какая часть лекарственного соединения выводится из организма в единицу времени и составила 0,1 л/мин.

Площадь под кривой (AUC) в участке концентрации лекарственного соединения в плазме крови зависит от времени, с момента введения лекарственного соединения и до снижения концентрации в крови и составила 26,3 мкг час/г.

Объем распределения лекарственного соединения в организме характеризует степень захвата тканями препарата из крови и в данном случае он составил 2,1 мл/г. Эта концентрация соответствует его содержанию в крови.

Среднее время пребывания (MRT) лекарственного соединения в неизменном виде в большом круге кровообращения в организме животных составило 11,6 часов.

Средняя максимальная концентрация (C_{max}) ФС-1 в крови составила 0,95 мкг/г. Время достижения максимальной концентрации в крови (t_{max}) составило три часа.

Анализ параметров фармакокинетики меченого радиоактивным иодом-131 свидетельствует о хорошей биодоступности действующего лекарственного вещества в системный кровоток и содержании его в течение суток (срок наблюдения) в организме животного, связанного с накоплением препарата в крови и органах.

Количественное определение ФС-1, меченого радиоизотопом ^{131}I в организме цыплят при пероральном введении, показывало его наличие во всех исследуемых органах. Это свидетельствовало о том, что исследуемый препарат оказывал воздействие на функции всех кроветворных органов организма цыплят. При этом в период от 30 минут и до 24 часов в разных органах его содержание различно. Поскольку метод введения ФС-1 был пероральный, естественно максимальное количество в первые 30 минут от начала введения отмечалось в желудке. Следует отметить, что уже через один час содержание меченого ФС-1 в желудке резко снижалось 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).

Аналогичные результаты количественного определения ФС-1 – иода в плазме крови человека проведены сотрудниками НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН методом ВЖХ. Разделение проводили на персональном хроматографе «Beckman-Coulter» (США), состоящем из изократической помпы «System Gold 127». Используемая аналитическая колонка Watman Partisil 10\25 SAX C (250x4,6 мм; 5 мкм).

В табл. 3.24 и на рис. 3.16 представлены усредненные результаты концентрации иодид-иона в плазме крови добровольцев после однократного орального приема ФС-1 в дозе 0,75 мл/кг.

Таблица 3.24 – Усредненные значения иодид ион в плазме крови добровольцев после прием ФС-1 в дозе 0,75 мл/кг.

Время, час	Среднее значение, (нг/мл)	StD	CV, %
0	51,5	9,8	19,05
0,5	91,8	21,5	23,45
1	106,6	9,3	8,70
3	103,1	11,9	11,57
6	82,0	7,0	8,52
12	72,6	5,4	7,39
24	57,8	8,5	14,74
36	57,4	5,2	8,98
48	55,6	6,4	11,53

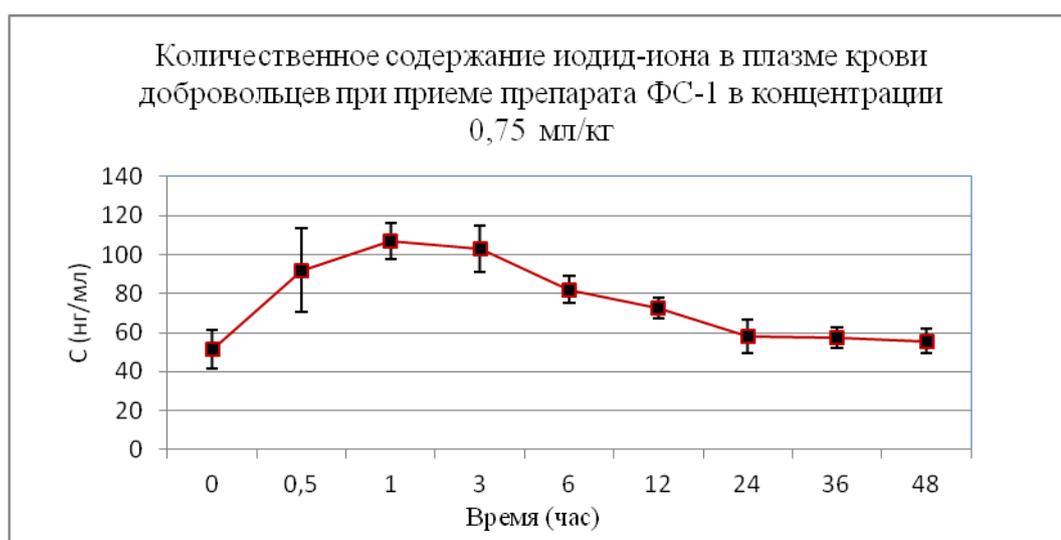


Рисунок 3.16. - Усредненный фармакокинетический профиль иодид-иона в плазме крови добровольцев после однократного орального приема

Из представленных в табл. 3.24 и на рисунке 3.26 данных выявлено, что количество иода в крови у добровольцев установлено также через 30 мин и наибольшая концентрация иода в плазме крови была достигнута через один час и держалась на этом уровне в период до трех часов, с последующим плавным снижением до 24 ч. Несмотря на то, что в данном эксперименте расчет количественного содержания вели по активному веществу, тогда как в наших исследованиях расчет проводили из дозы ФС-1. А полученные результаты совпали с результатами проведенных нами исследований по фармакокинетики меченного радиоактивным иодом-131 ФС-1.

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 птиц 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 ЭИД₅₀/0,2 мл экспериментальными концентрациями по вирусингибирующей схеме введения вещества [229, 238]. Каждая экспериментальная и контрольная группы состояли из шести эмбрионов, всего в эксперименте использовали 96 куриных эмбрионов. Для изучения антивирусной активности использовали концентрации ФС-1: 0,39; 1,6; 6,6; 26,3 мг/мл. Приготовленные концентрации ФС-1 смешивали с вирусосодержащим материалом 1:1 (к 0,1 мл лекарственного соединения добавляли 0,1 мл вирусосодержащей жидкости) и через 60 минут

инкубации при 37 °С вводили по 0,2 мл в хорион-аллантаическую полость куриных эмбрионов. В качестве положительного контроля использовали куриные эмбрионы, зараженные вирусами гриппа не получавшие ФС-1. В качестве отрицательного контроля в эмбрионы вводили раствор фосфатно-солевого буфера. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Противовирусное действие определяли по титру остаточного вируса в аллантаической жидкости в сравнении с положительным контролем методом постановки реакции гемагглютинации. Для проведения антивирусной активности на куриных эмбрионах предварительно провели исследования эмбриотоксичности. Исследование эмбриотоксичности ФС-1 проводили на 10, 12 и 18-дневных куриных эмбрионах с использованием концентраций: 52,5; 26,3; 13,1; 6,6; 3,3; 1,6; 0,8 мг/мл. На каждое разведение использовали по 10 куриных эмбрионов. Всего в эксперименте использовали 220 куриных эмбрионов. В хорион-аллантаическую полость вводили по 0,2 мл ФС-1. Контролем служил фосфатно-солевой буферный раствор без добавления препаратов. Наблюдение вели 14 дней после введения ФС-1. Эмбриотоксичность учитывали по проценту погибших эмбрионов. Полученные результаты эмбриотоксичности представлены на рисунке 3.17 и в табл. 3.25.

Таблица 3.25 – Эмбриотоксичность ФС-1 на 10, 12, 18 – дневных куриных эмбрионах

Номер группы	Кол-во эмбрионов, шт	Срок развития эмбриона	Концентрация ФС-1, мг/мл	Количество погибших эмбрионов, %
1	2	3	4	5
1	10	10 дней	52,5	100
	10	12 дней		80
	10	18 дней		50
2	10	10 дней	26,3	80
	10	12 дней		60
	10	18 дней		10
3	10	10 дней	13,1	70
	10	12 дней		30
	10	18 дней		10
4	10	10 дней	6,6	20
	10	12 дней		20
	10	18 дней		10
5	10	10 дней	3,3	0
	10	12 дней		10
	10	18 дней		10

Продолжение таблицы 3.25

1	2	3	4	5
6	10	10 дней	1,6	0
	10	12 дней		0
	10	18 дней		0
7	10	10 дней	0,8	0
	10	12 дней		0
	10	18 дней		0
8 (контроль)	10	-	-	0

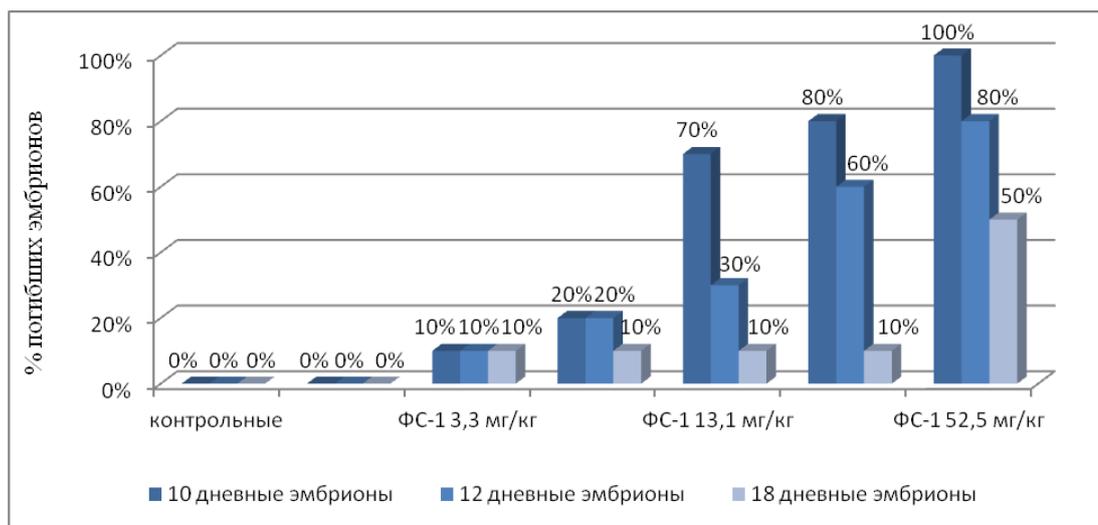


Рисунок 3.17. - Эмбриотоксичность ФС-1 в эксперименте на куриных эмбрионах

Как видно из данных, приведенных в табл. 3.25 и на рисунке 3.17, исследуемый ФС-1 в концентрациях от 0,8 до 1,6 мг/мл не оказывает токсического действия. В концентрациях от 3,3 до 6,6 мг/мл погибает от 10 до 20 % эмбрионов. Эмбриотоксическое действие ФС-1 выражено в концентрациях от 13,1 до 52,5 мг/мл, при которых погибает от 50 % до 100 % куриных эмбрионов. Так же показано, что эмбриотоксичность ФС-1 зависит не только от его концентраций, но и от сроков развития куриного эмбриона. При введении ФС-1 эмбрионам сроком развития 10; 12 и 18 дней в концентрации 52,5 мг/мл погибает 100 %, 80 % и 50 % куриных эмбрионов соответственно. При введении ФС-1 в концентрации 26,3 мг/мл погибает 80 % куриных эмбрионов сроком развития 10 дней, 60 % – 12-дневных куриных эмбрионов и 10 % – 18-дневных куриных эмбрионов. Наименьшая токсичная концентрация, вызвавшая гибель 70 % – 10-дневных

эмбрионов равна 13,1 мг/мл. Полученные концентрации ФС-1 использованы при изучении противовирусной вирусингибирующей активности. Результаты определения вирусингибирующей активности представлены на рисунке 3.18 и в табл. 3.26.

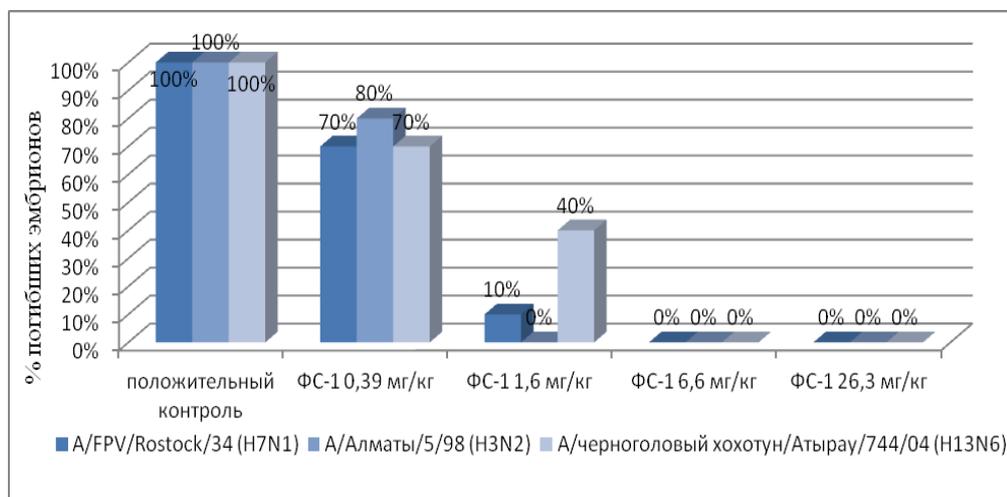


Рисунок 3.18. - Вирусингибирующая активность иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1

Таблица 3.26 – Результаты вирусингибирующей активности ФС-1 на различные штаммы вируса гриппа

Номер группы	Вирусы	Концентрация ФС-1, мг/мл	Погибшие эмбрионв, %	Титр в ГАЕ, $\log_2 \pm \text{StD}^*$
1	А /FPV/Rostock/34 (H7N1)	0,39	70	$7,0 \pm 0,1$
2	А /Алматы/5/98 (H3N2)		80	$7,0 \pm 0,2$
3	А /черноголовый хохотун/744/04 (H13N6)		70	$8,0 \pm 0,1$
4	А /FPV/Rostock/34 (H7N1)	1,6	10	$1,0 \pm 0,1$
5	А /Алматы/5/98 (H3N2)		0	0
6	А /черноголовый хохотун/744/04 (H13N6)		35	$3,0 \pm 0,2$
7	А /FPV/Rostock/34 (H7N1)	6,6	0	0
8	А /Алматы/5/98 (H3N2)		0	0
	А /черноголовый хохотун/744/04 (H13N6)		0	0
9	А /FPV/Rostock/34 (H7N1)	26,3	0	0
10	А /Алматы/5/98 (H3N2)		0	0
11	А /черноголовый хохотун/744/04 (H13N6)		0	0
Положительный контроль	А /FPV/Rostock/34 (H7N1)	-	100	$9,0 \pm 0,0$
	А /Алматы/5/98 (H3N2)	-	100	$9,0 \pm 0,0$
	А /черноголовый хохотун/744/04 (H13N6)	-	100	$9,0 \pm 0,0$
Отрицательный контроль	-	-	0	-

Примечание * - данные представлены как среднее значение $\pm \text{StD}$ (n=5). $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Как показано на рисунке 3.18 и в табл. 3.26 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. Тогда, как все контрольные эмбрионы, зараженные вирусами гриппа А и не получавшие ФС-1, погибли 100 %.

Дальнейшие исследования были посвящены сравнительному изучению вирусингибирующей активности ФС-1 в концентрации равной 6,6 мг/мл в сравнении с коммерческими препаратами римантадином в концентрации 0,5 мг/мл и рибаверином в концентрации 1,0 мг/мл. Сравнительное изучение противовирусной активности исследуемого ФС-1 проводили в экспериментах с вирусами гриппа с различными штаммами: на десятидневных куриных эмбрионах путем нейтрализации вируса 100 инфекционных доз/0,2 мл экспериментальными концентрациями. В качестве положительного контроля использовали куриные эмбрионы зараженные вирусами гриппа не получавшие ФС-1. В качестве отрицательного контроля в эмбрионы вводили раствор фосфатно-солевого буфера. Противовирусное действие определяли по титру остаточного вируса в аллантоисной жидкости в сравнении с положительным контролем методом постановки реакции гемагглютинации. Полученные результаты представлены в табл. 3.27 и на рисунке 3.19.

Таблица 3.27 – Сравнительная вирусингибирующая активность лекарственных соединений

Название лекарственного соединения	Концентрация, мг/мл	Процент выживших эмбрионов		
		А /FPV/Rostock/34 (H7N1)	А /Алматы/5/98 (H3N2)	А /черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6)
ФС-1	6,6	100,0	100,0	100,0
римантадин	0,5	20,0	50,0	60,0
рибаверин	1,0	20,0	55,0	0

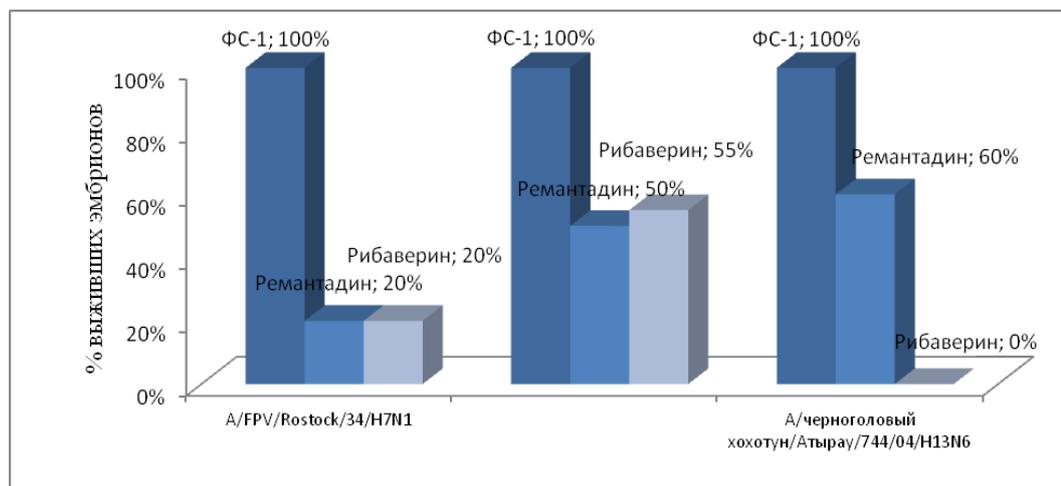


Рисунок 3.19. - Сравнительное изучение вирусингибирующей активности ФС-1 с препаратами римантадином и рибаверином

Из данных табл. 3.27 и рисунке 3.19 видно, что ФС-1 полностью подавляет репродукцию исследуемых вирусов, в то время как коммерческий 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 (H7N7) 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 инфекционных доз вируса гриппа А независимо от штамма возбудителя. Полученные в эксперименте данные позволяют заключить о высокой противовирусной активности данного комплекса в отношении возбудителей вируса гриппа А разных штаммов: А /FPV/Rostock/34 (H7N1), А /Алматы/5/98 (H3N2), А /черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6).

3.4.6. Воздействие ФС-1 на вирус гриппа птиц штамм А /FPV/Rostock/34 (H7N1) в эксперименте на цыплятах

Для определения антивирусной активности предварительно провели определение острой токсичности на цыплятах [229, 238, 239]. Определение острой токсичности проводили в эксперименте на семидневных цыплятах в количестве 170 голов, прошедших акклиматизационный период, согласно рекомендациям OECD (Guidelines for the testing of chemicals. 223 Avian Acute Oral Toxicity test) по тестированию химических соединений. Использовали два способа введения исследуемого соединения ФС-1: подкожный и пероральный в объеме по 1,0 мл. Срок наблюдения составил 14 дней. Для оценки острой токсичности исследуемого иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 использовали семь концентраций: 52,5; 26,3; 13,1; 6,6; 3,3; 1,6; 0,8 мг/кг из расчета на кг веса живой массы. ФС-1 вводили в объеме 1,0 мл двумя способами: подкожно и перорально. В качестве контроля использовали цыплят, которым вводили физиологический раствор. Обобщенные данные опытов приведены в табл.3.28.

Таблица 3.28 – Острая токсичность ФС-1 в эксперименте на цыплятах

Номер группы	Кол-во животных, гол	Способ введения	Концентрация ФС-1, мг/кг	Количество павших цыплят, гол
1	10	перорально	52,5	4 (40 %)
	10	подкожно		6 (60 %)
2	10	перорально	26,3	0
	10	подкожно		1 (10 %)
3	10	перорально	13,1	0
	10	подкожно		1 (10 %)
4	10	перорально	6,6	0
	10	подкожно		1 (10 %)
5	10	перорально	3,3	0
	10	подкожно		0
6	10	перорально	1,8	0
	10	подкожно		0
7	10	перорально	0,8	0
	10	подкожно		0
(римантадин)	10	перорально	16,7	5 (50 %)
	10	подкожно	16,7	8 (80 %)
(контроль)	10	-	-	0

Из данных табл. 3.28 видно, что при подкожном и пероральном способах введения в концентрации 52,5 мг/кг ФС-1 обладает острой токсичностью, что приводит к 40–60 % гибели цыплят. Клиническая картина интоксикации животных после введения смертельной дозы ФС-1 равной 52,5 мг/кг проявлялась в виде нарушения координации движения, шатающейся походки взъерошенности перьевого покрова, отказа от пищи.

Проведенные исследования острой токсичности показали, что – доза ЛД₅₀ для ФС-1 составила 52,5 мг/кг при пероральном и подкожном введении.

Среднетоксичные дозы установлены при подкожном введении соединения ФС-1 в концентрациях от 6,6 до 26,3 мг/кг. В тоже время переносимая концентрация противовирусного препарата римантадина, зафиксирована в дозе 8,33 мг/кг.

Определение антивирусной активности ФС-1 проводили в эксперименте на цыплятах согласно руководству по доклиническому исследованию [233, 234], протокол исследования был одобрен этической комиссией Научного центра, эвтаназию проводили методом цервикальной дислокации на основании Директивы Совета Европы 86/609 ЕЭС [224]. Животные содержались в клетках с подстилкой из бумаги, предварительно выдержанной под воздействием УФ лучей. Подстилка менялась два раза в день. Условия содержания животных соответствовали общепринятым нормам – температура окружающей среды (21±2) °С, влажность (50±10) %, искусственный световой режим 12:12. Рацион кормления включал преимущественно коммерческий стартовый комбикорм для птиц с добавлением вареных куриных яиц. Кормление животных проводили четыре раза в день, в одно и те же время суток. Водопой свободный.

Определении профилактической активности проводили на недельных цыплятах весом 50–60 мг, обоего пола, не имеющие антитела к вирусу гриппа А. Всего использовано 84 голов цыплят, которые были распределены на шесть групп по 14 голов в каждой. ФС-1 использовали в четырех концентрациях 3,3 мг/мл, соответствующего 1/16 ЛД₅₀; 6,6 мг/кг, соответствующего 1/8 ЛД₅₀; 13,1 мг/кг, соответствующего 1/4 ЛД₅₀; 26,3 мг/кг, соответствующего 1/2 ЛД₅₀. В качестве

сравнения использовали коммерческий препарат римантадин в концентрации 8,3 мг/кг.

В эксперименте использовали вирус гриппа птиц штамм А /FPV/Rostock/34 (H7N1) предоставленный лабораторией экологии вирусов ИмиВ МОН РК. Вирус гриппа птиц штамм А /FPV/Rostock/34 (H7N1) размножали на девятисуточных куриных эмбрионах путем введения 0,2 мл вируса в аллантоисную полость. Зараженные эмбрионы инкубировали, в термостате в течение 48 часов при 37 °С. Аллантоисную жидкость собирали в отдельные пробирки с последующим титрованием в реакции гемагглютинации (РГА). Цыплятам первой группы – перорально вводили ФС-1 в дозе 26,3 мг/кг. Цыплятам второй группы – перорально вводили ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг. Цыплятам третьей группы перорально вводили ФС-1 в дозе 6,6 мг/кг. Цыплятам четвертой группы – перорально вводили ФС-1 в дозе 3,3 мг/кг. Цыплятам пятой группы (контрольной) вводили перорально противовирусный препарат римантадин в дозе 8,3 мг/кг. На седьмой день провели заражение интраназально всех цыплят в дозе 100 ЭИД₅₀/0,2 мл на цыпленка под легким эфирным наркозом. Цыплята шестой группы (контрольной) оставались зараженными без приема препарата. За экспериментальными животными вели наблюдение в течение 14 дней. Эффективность профилактического действия ФС-1 учитывали двумя способами:

- по проценту выживших животных;
- по оценке остаточного вируса полученного путем титрования патологоанатомического материала на культуре клеток MDCK. Результаты титрования выявляли в реакции гемагглютинации (РГА) по стандартной методике. Результаты проведенных исследований подвергали статистической обработке с помощью программы Microsoft Office Excel 2007. Результаты исследования профилактического эффекта представлены в табл. 3.29.

Таблица 3.29 – Профилактический эффект ФС-1 на модели вируса гриппа штамм A/FPV/Rostock/34 (H7N1)

Номер Группы	Название препарата	Концентрация ФС-1, мг/кг	Число павших цыплят / Общее количество цыплят, гол	Количество выживших, %
1	ФС-1	26,3	0/14	100
2	ФС-1	13,1	0/14	100
3	ФС-1	6,6	0/14	100
4	ФС-1	3,3	6/14	42
4	римантадин	8,3	10/14	28
5	Контроль зараженные цыплята	-	14/14	0

Из табл. 3.29 видно, что эффективность защиты после приема профилактической дозы ФС-1 у зараженных 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 коммерческого препарата римантадина у цыплят от инфекции составила только 28 %. Все контрольные цыплята, зараженные вирусом, не получавшие препараты погибли (100 % смертность).

После семи дней наблюдения все цыплята опытных групп были подвергнуты эвтаназии эфирным наркозом. Проводили патологоанатомическое вскрытие, взятие материала для лабораторных исследований. Проведено титрование органов на культуре клеток MDCK с целью выявления остаточного вируса гриппа. Наличие или отсутствие вируса подтверждали путем постановки реакции гемагглютинации. Установлено, что титр в РГА остаточного вируса положительного контроля (зараженные и не леченые цыплята) составил 8,0 log. Все исследуемые дозы ФС-1, кроме 3,3 мг/кг полностью подавляют репродукцию вируса гриппа. Цыплята, зараженные вирусом и получавшие лекарственное соединение ФС-1 в дозе 3,3 мг/кг снижение репродукции вируса составило на 3,0 log ниже положительного контроля. У цыплят, зараженных вирусом и получавших препарат римантадин в концентрации 8,3 мг/кг подавление репродукции вируса составило на 2,0 log ниже 8,0 log положительного контроля. На рис. 3.20 показан профилактический эффект действия ФС-1.

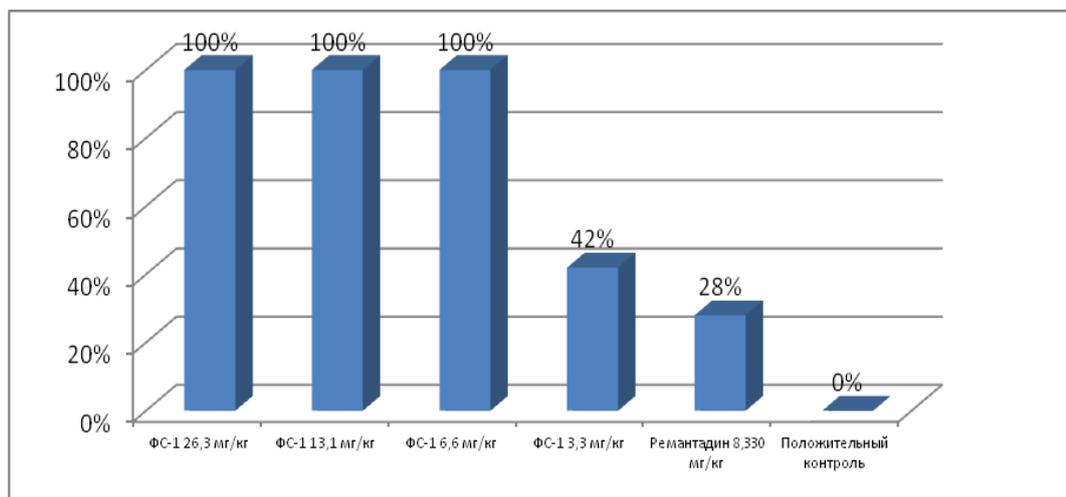


Рисунок 3.20. - Профилактический эффект действия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1

Таким образом, полученные результаты показали, что ФС-1 проявляет выраженную профилактическую эффективность в дозах 6,6; 13,1 и 26,3 мг/кг против вируса гриппа у зараженных цыплят.

Определение антивирусного терапевтического действия ФС-1 проведены также в эксперименте на цыплятах. Всего использовано 70 цыплят весом 50–60 г, обоего пола, не имеющие антитела к вирусу гриппа А распределенных на пять групп по 14 голов в каждой. ФС-1 использовали в трех дозах 6,6 мг/кг, соответствующего 1/8 ЛД₅₀; 13,1 мг/кг, соответствующего 1/4 ЛД₅₀; 26,3 мг/кг, соответствующего 1/2 ЛД₅₀. В качестве сравнения использовали коммерческий препарат римантадин в концентрации 8,3 мг/.

Все цыплята с первой по четвертую группы были заражены вирусом гриппа А /FPV/Rostock/34 (H7N1) в дозе 100 ЭИД₅₀/0,1 мл на цыпленка. Через 24 часа после заражения было начато лечение цыплят путем перорального введения ФС-1. Цыплятам первой группы вводили ФС-1 в дозе 26,3 мг/кг в течение семи дней. Цыплятам второй группы – перорально вводили ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг в течение семи дней. Цыплятам третьей группы – перорально вводили ФС-1 в дозе 6,6 мг/кг в течение семи дней. Цыплятам четвертой группы (контрольной) вводили перорально противовирусный препарат римантадин в дозе 8,3 мг/кг в течение семи дней. Цыплята пятой группы (контрольной) оставались зараженными без приема

препарата. За экспериментальными животными вели наблюдение в течение 14 дней от начала эксперимента. Эффективность терапевтического действия учитывали по проценту выживших животных по указанной выше формуле и по оценке остаточного вируса в реакции гемагглютинации, как описано выше. Результаты проведенных исследований подвергали статистической обработке с помощью программы Microsoft Office Excel 2007. Результаты опытов определения терапевтической активности представлены в табл. 3.30.

Таблица 3.30 – Терапевтическая эффективность ФС-1 на модели вируса гриппа штамм А /FPV/Rostock/34 (H7N1)

Номер Группы	Название препарата	Концентрация ФС-1, мг/кг	Число павших цыплят / Общее количество цыплят, гол	Количество выживших, %
1	ФС-1	26,3	1/14	100
2	ФС-1	13,1	3/14	78
3	ФС-1	6,6	8/14	43
4	римантадин	8,3	8/14	43
5	Контроль, зараженные цыплята	-	14/14	0

Из представленных в табл. 3.30 данных видно, что терапевтическая доза ФС-1 при ежедневном приеме 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 %.

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 %). В тоже время данный показатель активности в два раза больше, чем эффективность коммерческого препарата римантадин.

Доза 6,6 мг/кг ФС-1 проявила наименьшую эффективность терапии в сравнении с результатами первой и второй групп цыплят и составила 43 %, что аналогично эффективности применяемого коммерческого препарата.

Цыплята пятой группы, зараженные вирусом, но не получавшие препаратов погибли от гриппозной инфекции. Смертность составила 100 %.

Через семь дней после прекращения лечения все животные были подвергнуты эвтаназии эфирным наркозом. Оценку терапевтической эффективности проводили путем посева на культуру клеток MDCK материала, полученного от животных. Наличие вируса в культуральной жидкости регистрировали постановкой РГА.

Установлено, что титр в РГА остаточного вируса положительного контроля (зараженные и не леченые цыплята) составил 8,0 log. 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.

В концентрации равной 13,1 мг/кг подавление репродукции вируса соединением ФС-1 установлено на 4.0 log.

В тоже время минимальная доза соединения ФС-1 равная 6,6 мг/кг подавляет репродукцию вируса на 2,0 log, что соответствует терапевтической активности коммерческого препарата римантадина против вируса гриппа.

У зараженных цыплят, не получавших препарата титр вируса гриппа А /FPV/Rostock/34 (H7N1) в РГА составил 8,0 log, что свидетельствовало о положительном контроле. На рис. 3.21 схематично показан терапевтический эффект действия ФС-1.

Из представленного рис. 3.21 – видно, что ФС-1 оказывает выраженное антивирусное терапевтическое действие в исследуемых дозах. Применение комплекса ФС-1 в качестве лечебного соединения в дозе 26,3 мг/кг приводит к 100 % выживаемости цыплят, тогда как применяемый на практике препарат римантадин в терапевтической дозе оказывает выживаемость всего 43 % поголовья.

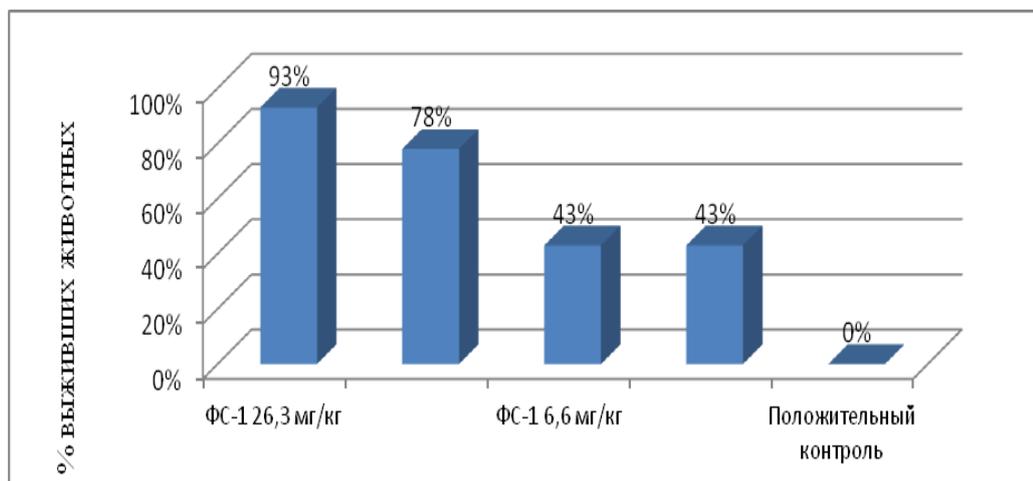
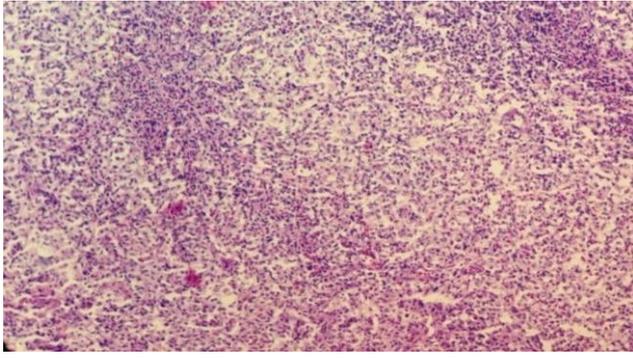


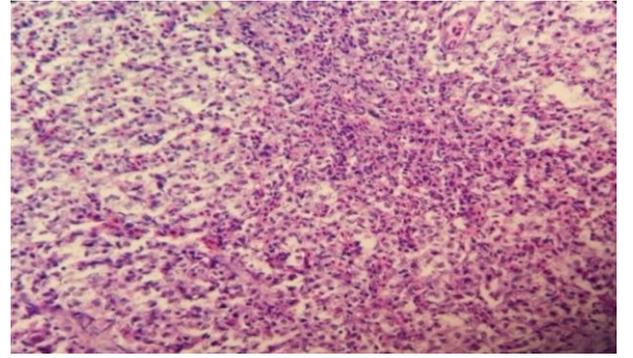
Рисунок 3.21. - Терапевтический эффект действия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1.

Специфичность поражения легочной ткани определяли при вскрытии цыплят и обнаружении вируса гриппа в реакции гемагглютинации, также и при микроскопическом исследовании легочной ткани срезов. На рисунке 3.22 представлены микрофотографии легких птиц.

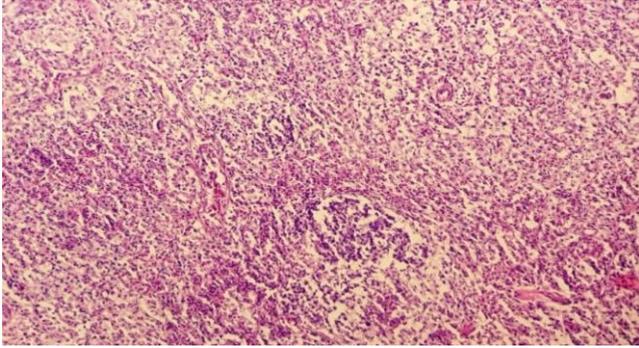
Из представленных рисунков в гистограмме легких зараженных вирусом гриппа птиц штамм А /FPV/Rostock/34 (H7N1) (контроль вируса) цыплят при микроскопическом исследовании, ярко выраженные признаки интерстициальной пневмонии. Не удастся идентифицировать долики легких. Бронхиолы, воздушные капилляры заполнены клетками воспалительной инфильтрации - экссудатом. Метаплазия эпителия. В строме выраженная воспалительно-клеточная инфильтрация, активация полиморфоядерных лейкоцитов и макрофагов. Некробиотические изменения легочной ткани. Резкое нарушение гемодинамики. Выраженное нарушение микроциркуляции. Кроме того, отмечаются интерстициальный и периваскулярный отек.



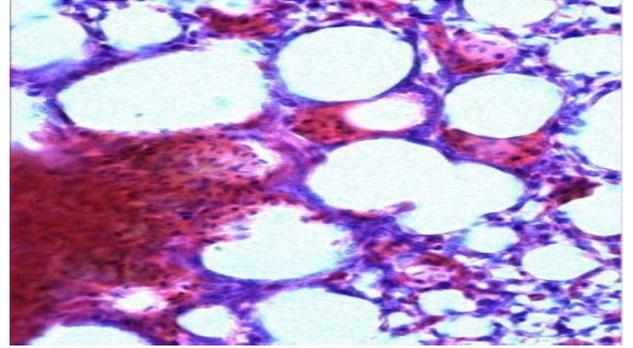
а



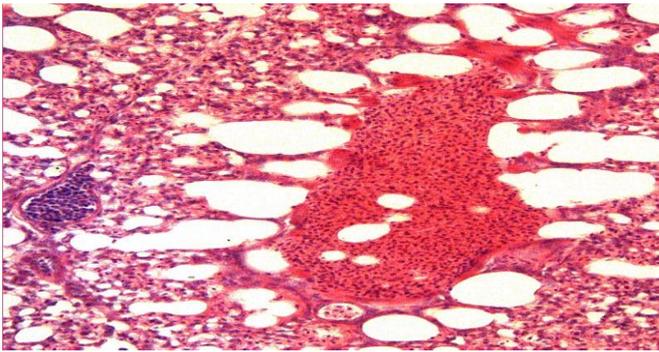
б



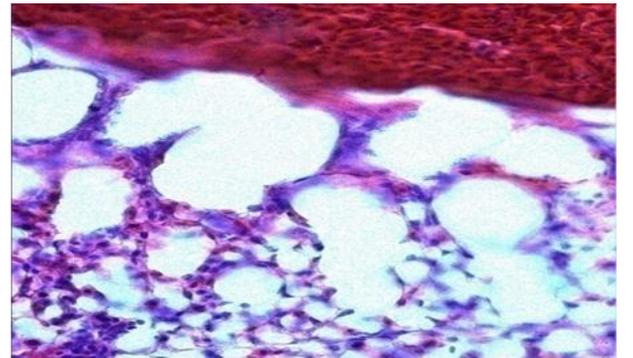
в



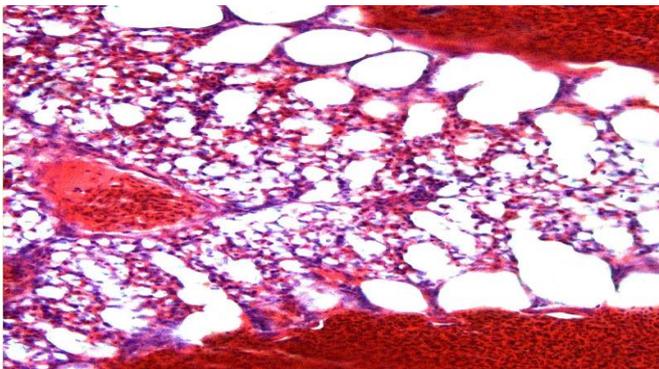
г



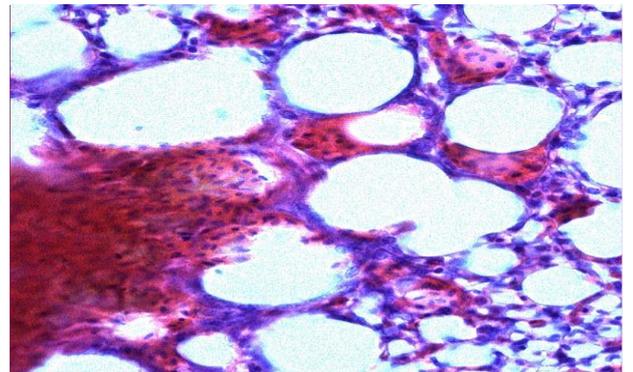
д



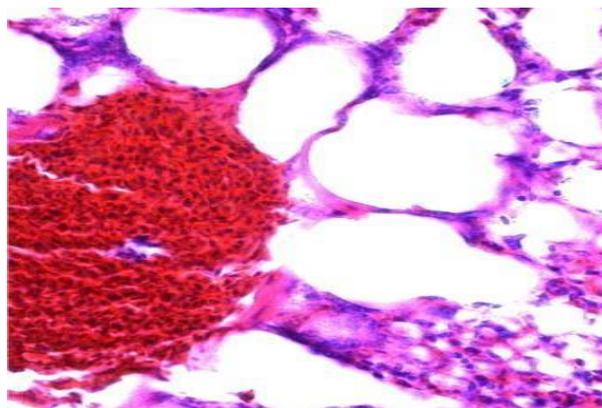
е



ж



и



к

Рисунок 3.22. - Гистоструктура легких цыплят, зараженных вирусом гриппа без приема ФС-1 и получавших ФС-1

а – Гистоструктура легких цыплят, зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) (контроль вируса) (увеличение x 100, окраска: гематоксилин-эозин); б – Гистоструктура легких цыплят, зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) (контроль вируса) (увеличение x 200, окраска: гематоксилин-эозин); в – Гистоструктура легких цыплят, зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) (контроль вируса) (увеличение x 100, окраска: гематоксилин-эозин); г - Гистоструктура легких цыплят, зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) и получавших ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг (5 сутки от начала лечения) (увеличение x 400, окраска: гематоксилин-эозин); д - Гистоструктура легких цыплят, зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) и получавших ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг (5 сутки от начала лечения) (увеличение x 200, окраска: гематоксилин-эозин); е - Гистоструктура легких цыплят, получавших ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг и зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) (увеличение: об x 40, окраска: гематоксилин-эозин); ж - Гистоструктура легких цыплят, получавших ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг и зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) (увеличение x 200, окраска: гематоксилин-эозин); и - Гистоструктура легких цыплят, получавших ФС-1 в дозе 13,1 мг/кг и зараженных вирусом гриппа птиц штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) (увеличение x 400, окраска: гематоксилин-эозин); к - Гистоструктура легких интактных птиц (увеличение x 400, окраска: гематоксилин-эозин).

В результате лечения иодсодержащим лекарственным соединением ФС-1 отмечается положительная динамика микроскопической картины легочной ткани птиц. Удаётся дифференцировать парабронхи, респираторные бронхиолы и воздушные капилляры. В целом ткань воздушная, очаговое полнокровие сосудоинтерстиция. Аналогичная картина отмечается и при профилактическом применении испытуемого лекарственного соединения.

Таким образом, изучение противовирусной активности ФС-1 в эксперименте на цыплятах, зараженных вирусом гриппа 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 римантадином и выраженную

профилактическую эффективность в дозах, превышающую почти в два раза профилактическую эффективность 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 иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в виде биологической кормовой добавки «Эвритал» на вирус гриппа А штамм А /Astana RG/6:2/2009 (H5N1), в производственных условиях проведены 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».

ТОО «Бишкульская птицефабрика» на начало сентября 2020 года содержала 320 тыс. голов кур несушек, 30 тысяч голов родительского поголовья уток пекинской породы. В середине сентября 2020 года начался массовый падеж птицы. По результатам лабораторных исследований установлено, что причиной падежа явилось заражение птицы вирусом гриппа птиц А штамм H5N1. С профилактической целью была проведена вакцинация вакциной Kazfluvac Научно-исследовательского института проблемы биологической безопасности условно-здорового поголовья птиц. Несмотря на это, падеж не прекращался.

Руководством птицефабрики совместно с компанией ТОО «Казфармаком» было принято решение о проведении производственного испытания по оценке противовирусной активности разработанной биологической кормовой добавки «Эвритал» и возможности применения с целью профилактики заболевания птицы гриппом.

Испытание по профилактике заболевания птицы гриппом (штамм H5N1) проводили в птичнике № 11, содержащей цыплят породы Ломан СуперНик, возрастом 32 дня, на поголовье 40000 птиц. Препарат использовали в виде выпойки в дозе 0,3 мл из расчета в среднем на кг живой массы, в течение пяти дней.

Выпойку проводили один раз в день, цыплята пили воду с препаратом на протяжении 2–3 часов. На это время доступ к другим источникам воды у птиц не было. В связи с большим количеством падежа птиц, контрольную группу не представилось возможным включить в испытание.

Также оценку «Эвритал» проводили на утках в двух корпусах: корпус № 2 ангар - количество 3500 голов, корпус № 6 ангар – количество 6000 голов, утки породы кросс пекинская. В корпусе № 2 ангар «Эвритал» вводили в дозе 0,3 мл на кг живого веса, пять дней. Выпойку проводили один раз в день на протяжении 2–3 часов. На это время к другим источникам воды у птиц также не было доступа.

В корпусе № 6 дозировка препарата была: два дня по 0,3 мл на кг живого веса, с третьего по пятый день дозировка 0,1 мл на кг живого веса. В качестве контроля служила группа птиц в количестве 100 голов не принимавшая кормовую добавку «Эвритал».

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. Полученные результаты по сохранности птицы представлены в табл. 3.31.

Таблица 3.31 – Динамика выживаемости птицы, принимавшей выпойку с препаратом «Эвритал»

Дата	№ 11 птичник (цыплята), * 40000 голов	№ 2 ангар (утка), 3500 голов	№ 6 ангар (утка), 6000 голов	Контроль утка*, 100 голов
	живые/павшие	живые/павшие	живые/павшие	живые/павшие
18.09.2020	39896/104	3435/65	5997/3	100/0
19.09.2020	39811/85	3377/58	5989/8	100/0
20.09.2020	39767/44	3328/49	5855/134	100/0
21.09.2020	39657/110	3278/50	5752/103	97/3
22.09.2020	39619/38	3231/47	5620/132	91/6
23.09.2020	39597/22	3218/13	5533/87	71/20
24.09.2020	39582/15	3216/2	5501/32	54/17
25.09.2020	39575/7	3216/0	5488/13	34/20
26.09.2020	39572/3	3216/0	5482/6	7/27
Итого пало	39572/428	3216/284	5482/518	7/93
Осталось живых	39572 (98,93 %)	3216 (91,9 %)	5482 (91,4 %)	7(7 %)

*Примечание. В связи с большим количеством падежа птиц (цыплят) от гриппа, контрольную группу не представилось возможным включить в испытание;
контроль утка - группа птиц, не принимавшая кормовую добавку «Эвритал».

Таким образом, согласно полученных результатов, представленных в табл. 3.31 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

Первоначально в экспериментальных условиях *in vitro* была проведена оценка чувствительности исходных штаммов вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1) к ингибирующему действию препаратов римантадин и осельтамивир. Римантадин испытывали в концентрациях: 0,0031; 0,0063; 0,0130; 0,0250; 0,0500; 0,1000 мг/мл, препарат осельтамивир в концентрациях: 0,009; 0,019; 0,038; 0,075; 0,150; 0,300 мг/мл [240]. Работу проводили на культуре клеток MDCK при воздействии нетоксических концентраций исследуемых веществ на репродукцию вирусов гриппа А.

На основании данных, полученных при изучении чувствительности исходных штаммов вируса гриппа А к действию нетоксических концентраций исследуемых веществ, были определены значения ингибирующей концентрации (ИК₅₀) препарата, при которой в культуре наблюдается 50 % подавление инфекционной активности вируса. Полученные результаты представлены в таблице 3.32.

Таблица 3.32 – Значения ИК₅₀ коммерческих препаратов в отношении исходных штаммов вируса гриппа А

№ п/п	Название штамма вируса	Значения ИК ₅₀ , (мг/мл± StD) *	
		осельтамивир	римантадин
1	A /FPV/Waybrige/78 (H7N7)	0,01 ± 0,2	0,011 ± 0,1
2	A /Swine/Iowa/15/30 (H1N1)	0,055 ± 0,1	< 0,0031 ± 0,2

Примечание: *данные представлены как среднее значение ± StD (n=5). P < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

Как видно из представленных в таблице 3.32 результатов подавление инфекционной активности вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) к препаратам практически одинакова: значение ИК₅₀ к осельтамивиру составила 0,010 мг/мл и к римантадину 0,011 мг/мл соответственно. Тогда как для вируса гриппа штамма А/Swine/Iowa/15/30 (H1N1) выявлено более высокое значение чувствительности ИК₅₀ к препарату римантадин, что составило <0 ,0031 мг/мл, чем к осельтамивиру, показатель которого составил 0,055 мг/мл.

Таким образом в ходе проведенных исследований было продемонстрировано, что выбранные штаммы вируса гриппа А обладают чувствительностью к коммерческим противовирусным препаратам в исследуемых концентрациях от 0,0031 до 0,1000 мг/мл для препарата римантадин и от 0,009 до 0,300 мг/мл для препарата осельтамивир.

Исходные штаммы вируса гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А /Swine/Iowa/15/30 (H1N1) далее подвергали адаптации к противовирусным препаратам римантадин и осельтамивир. С этой целью вирусы гриппа последовательно пассировали в культуре клеток MDCK с постепенным увеличением концентрации противовирусного препарата осельтамивир: 0,009; 0,019; 0,038; 0,075; 0,150; 0,300 мг/мл, римантадин: 0,0031; 0,0063; 0,013; 0,025; 0,050; 0,100 мг/мл. Следует отметить, что ЦТК₅₀ для препарата римантадин составила 0,100 мг/мл, а для препарата осельтамивир 0,300 мг/мл. Мутантные штаммы вируса гриппа А устойчивые (резистентные) к данным препаратам получены при последовательных длительных пассажах под воздействием препаратов римантадин и осельтамивир. При этом лекарственная устойчивость исходных штаммов вируса гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А /Swine/Iowa/15/30 (H1N1)

к препаратам несколько различалась в количестве пассажей. Так лекарственная устойчивость к препарату римантадин вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) произошла в течение 12 последовательных пассажей, а вируса гриппа штамм А /Swine/Iowa/15/30 (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.

Дальнейшие исследования были направлены на определение степени устойчивости у полученных вариантов штаммов вируса гриппа А.

Для определения стабильности приобретенной лекарственной устойчивости у мутантных штаммов к противовирусным препаратам проведены культивирования, по пять последовательных пассажей без препаратов. Сравнительный анализ лекарственной устойчивости у мутантов и исходных штаммов вируса гриппа в отношении противовирусных препаратов в диапазоне нетоксичных концентраций от 0,0031 до 0,1000 мг/мл для римантадина и от 0,009 до 0,300 мг/мл для осельтамивира показал наличие присутствия вируса гриппа А у исследуемых мутантных штаммов в реакции гемагглютинации. На основании полученных кривых зависимости противовирусного действия от концентрации (доза-ответ) были определены значения ИК₅₀. Полученные результаты показаны в табл. 3.33.

Таблица 3.33 – Определение противовирусного действия препаратов в отношении мутантных штаммов вируса гриппа А

Название препарата	Штаммы / Значения ИК ₅₀			
	FPV_RTam	FPV_RRim	Sw_RTam	Sw_RRim
осельтамивир	> 0,3	N/A	> 0,3	N/A
римантадин	N/A*	> 0,1	N/A	> 0,1
Примечание: N/A* – значения ИК ₅₀ для данных штаммов не определялись				

При проведении сравнительного анализа фенотипических характеристик чувствительности мутантных штаммов вируса гриппа А в сравнении с исходными штаммами к осельтамивиру и римантадину установлено, что полученные мутантные штаммы оказались резистентными к антивирусным препаратам, так как исследуемые нетоксические для клеток концентрации антивирусных препаратов не оказывали влияния на репликацию полученных мутантных штаммов вирусов гриппа А. Значение ИК₅₀ осельтамивира для FPV_RTam и Sw_RTam увеличилось до > 0,300 мг/мл, тогда как для исходных штаммов вируса гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А /Swine/Iowa/30 (H1N1) этот показатель составил 0,010 и 0,055 мг/мл, соответственно. Похожая картина наблюдалась и в отношении мутантных штаммов FPV_RRim и Sw_RRim, для которых показатель ИК₅₀ препарата римантадина составил > 0,100 мг/мл, в то время как значение ИК₅₀ в отношении исходных штаммов А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А /Swine/Iowa/30 (H1N1) составляло 0,011 и <0,003 мг/мл соответственно. Полученные результаты показали стабильность устойчивости штаммов к воздействию, исследуемых выше препаратов.

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. Полученные результаты представлены на рисунках 3.12, 3.13.

Variant	M	S	L	L	T	E	V	E	T	P	T	R	N	G	W	E	C	S	C	S	D	S	S	D	P	L	V	I	A
1. FPV WT	M	S	L	L	T	E	V	E	T	P	T	R	N	G	W	E	C	S	C	S	D	S	S	D	P	L	V	I	A
2. FPV RRim	M	S	L	L	T	E	V	E	T	P	T	R	N	G	W	E	C	S	C	S	D	S	S	D	P	L	V	I	A
3. Sw RRim	M	S	L	L	T	E	V	E	T	P	T	R	N	G	W	E	C	S	C	S	D	S	S	D	P	L	V	I	A
4. FPV RTam	M	S	L	L	T	E	V	E	T	P	T	R	N	G	W	E	C	S	C	S	D	S	S	D	P	L	V	I	A
5. Sw RTam	M	S	L	L	T	E	V	E	T	P	T	R	N	G	W	E	C	S	C	S	D	S	S	D	P	L	V	I	A
6. Sw WT	M	S	L	L	T	E	V	E	T	P	T	R	N	G	W	E	C	S	C	S	D	S	S	D	P	L	V	I	A

Рисунок 3.12. - Аминокислотные замены в структуре гена M2 вируса гриппа

Желтым выделена позиция аминокислотной замены в структуре гена M2 исследуемых штаммов.

Согласно рисунка 3.12 анализ аминокислотных последовательностей показал, что в структуре M2 белка мутантного штамма FPV_RRim_H7N7 произошла замена в положении S31N, а у мутанта Swine_RRim_N1H1 была выявлена замена в положении A30T, ответственных за развитие устойчивости к препарату римантадин.

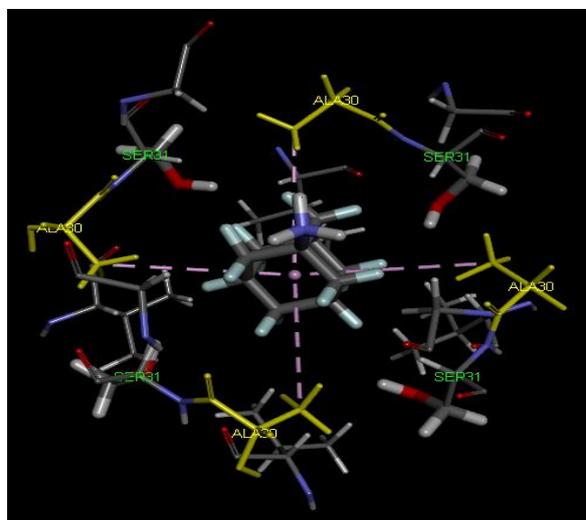
Variant	A	K	A	M	E	Q	M	A	G	S	S	E	Q	A	A	E	A	M	E	V	A	S	Q	A	R	Q	M	V	Q	A	M	R	T	V	G	I
1. FPV RRim	A	K	A	M	E	Q	M	A	G	S	S	E	Q	A	A	E	A	M	E	V	A	S	Q	A	R	Q	M	V	Q	A	M	R	T	V	G	I
2. FPV WT	A	K	A	M	E	Q	M	A	G	S	S	E	Q	A	A	E	A	M	E	V	A	S	Q	A	R	Q	M	V	Q	A	M	R	T	V	G	I
3. FPV RTam	A	K	A	M	E	Q	M	A	G	S	S	E	Q	A	A	E	A	M	E	V	A	N	Q	A	R	Q	M	V	Q	A	M	R	T	V	G	I
4. Sw RTam	A	K	A	M	E	Q	M	A	G	S	S	E	Q	A	A	E	A	M	E	V	A	N	Q	A	R	Q	M	V	Q	A	M	R	T	V	G	I
5. Sw RRim	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	Q	M	V	Q	A	M	R	T	V	G	I
6. Sw WT	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	Q	M	V	Q	A	M	R	T	V	G	I

Рисунок 3.13- Аминокислотные замены в структуре гена M1 вируса гриппа

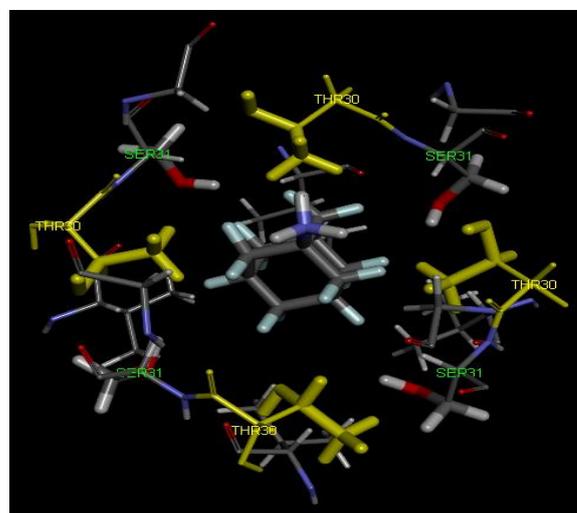
Желтым выделена позиция аминокислотной замены в структуре гена M1 исследуемых штаммов.

Помимо выявленных мутаций в структуре M2 гена как представлено на рисунке 3.13, так же обнаружена мутация в строении аминокислотной последовательности белка M1 мутантных штаммов устойчивых к осельтамивиру.

Анализ последовательностей показал наличие специфической замены в позиции N207S. По-видимому, данная мутация имеет селективное значение в устойчивости к препарату осельтамивиру.

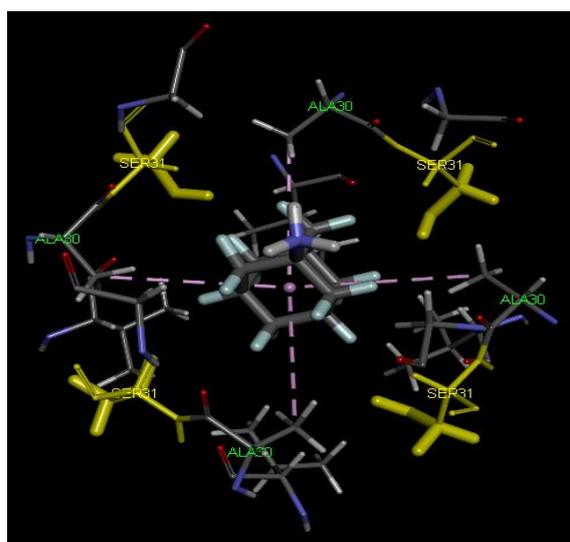


ALA30 (GCA)

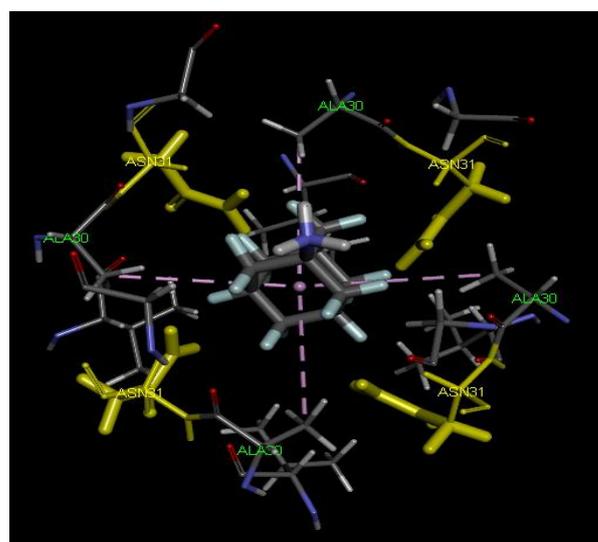


THR30 (ACA)

а



SER31 (AGT)



ASN31 (AAT)

б

Рисунок 3.14. - 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.

Анализ данных, представленных на рисунке 3.14 показал, что замена аминокислоты ALA (аланин) в 30-м положении на THR (треонин) приводит к утрате гидрофобной связи между аминокислотой и римантадином. Что, по всей видимости, приводит к возникновению устойчивости к данному препарату.

Анализ M2 белка мутантного штамма FPV_RRim_H7N7 не выявил видимых изменений в приобретении или потере связей между аминокислотой в 31-м положении и структурой препарата римантадин. Возможно, замена SER (серин) на ASN (аспарагин) в 31-м положении ведет к пространственному изменению M2 канала, что в свою очередь, приводит к формированию резистентности.

Детальный поиск не выявил канонической мутации H274Y в структуре белка NA, отвечающей за развитие резистентности к препарату осельтамивир мутантов FPV_RTam и Sw_RTam. Однако анализируя нуклеотидные последовательности исследуемых штаммов, было обнаружено, что мутанты, устойчивые к препарату осельтамивир, в строении аминокислотной последовательности белка M1 имели специфическую замену в позиции N207S. Данные о влиянии этой замены на устойчивость к лекарственным препаратам не описаны в литературе. В качестве предположения сотрудниками вирусологии выдвинута гипотеза о том, что мутация в гене M1 может носить селективный характер и может влиять на фенотип устойчивости вируса гриппа А к препарату осельтамивир. Исследования в этом направлении продолжаются сотрудниками лаборатории вирусологии.

Таким образом, возникновение резистентности может носить мультигенный характер и может характеризоваться возникновением мутаций не только в белке-мишени, на который ориентирован противовирусный препарат, но и в другом структурном белке, не связанным напрямую с действием препарата.

Фенотипом является совокупность всех признаков и свойств организма, которые выявляются в процессе индивидуального развития в данных условиях и являются результатом взаимодействия генотипа с комплексом факторов внутренней и внешней среды. В наших исследованиях проведено воздействие

лимитирующим фактором, который повлек за собой изменение в генотипе. Поэтому, наравне с изучением части генов, нами проведена оценка изменений фенотипических проявлений полученных мутантов вируса гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А /Swine/Iowa/15/30 (H1N1).

С целью изучения фенотипических признаков полученных мутантов проведены исследования по характеристике основных поверхностных белков вируса. Были определены следующие показатели – термостабильность белка гемагглютинина и оценка активности фермента нейраминидазы. Данные признаки являются характеристикой двух важнейших поверхностных белков, принимающих участие в проникновении и распространении вируса гриппа А.

Ввиду того, что температурное воздействие при нейтральном значении рН способствует образованию фузогенной формы белка НА, нами была проведена оценка термостабильности белка гемагглютинина полученных мутантов рисунок 3.15. Исходные штаммы и полученные мутанты инкубировали при 56 °С различное время (от 15 до 120 мин), после чего определяли гемагглютинирующую активность. Термостабильными считались штаммы, которые сохраняли способность вызывать агглютинацию эритроцитов человека (I группа) после прогрева при 56 °С в течение 30 мин.

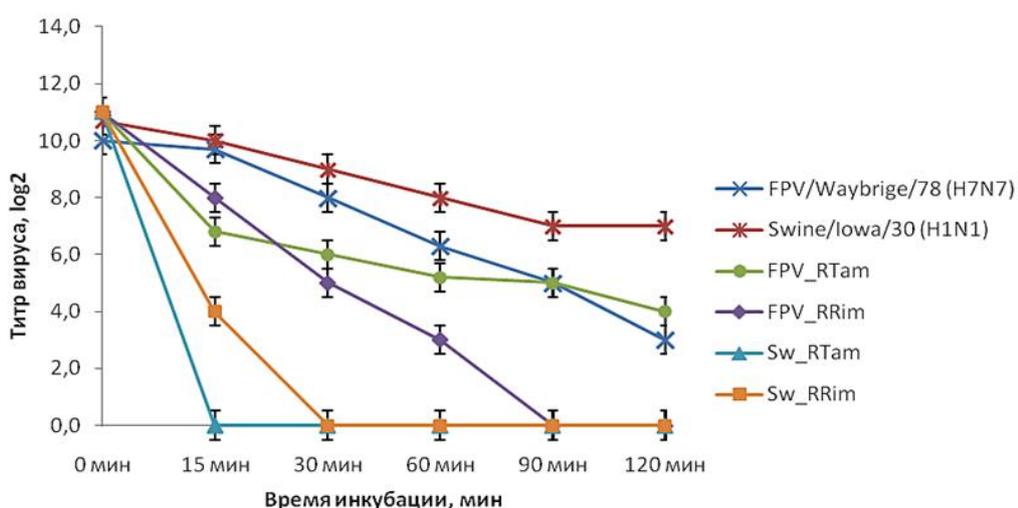


Рисунок 3.15. - Результаты сравнительного анализа термочувствительности гемагглютинина исходных и мутантных штаммов вируса гриппа

По отношению к температурному фактору исходные штаммы вируса гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) и А /Swine/Iowa/15/30 (H1N1) и полученные резистентные мутанты FPV_RTam и FPV_RRim характеризовались термостабильным гемагглютинином, сохранявшим активность после 30 мин прогрева при 56 °С. В то время как мутанты Sw_RTam и Sw_RRim оказались неустойчивы к нагреванию и теряли способность вызывать агглютинацию эритроцитов человека (I группы) после прогрева при 56 °С в течение 15–30 мин.

Оценка активности фермента нейраминидазы является одной из основных характеристик проявления инфекционности вируса гриппа. Проведено сравнительное изучение активности нейраминидазы исходных штаммов и мутантных штаммов вируса гриппа А рисунок 3.16.

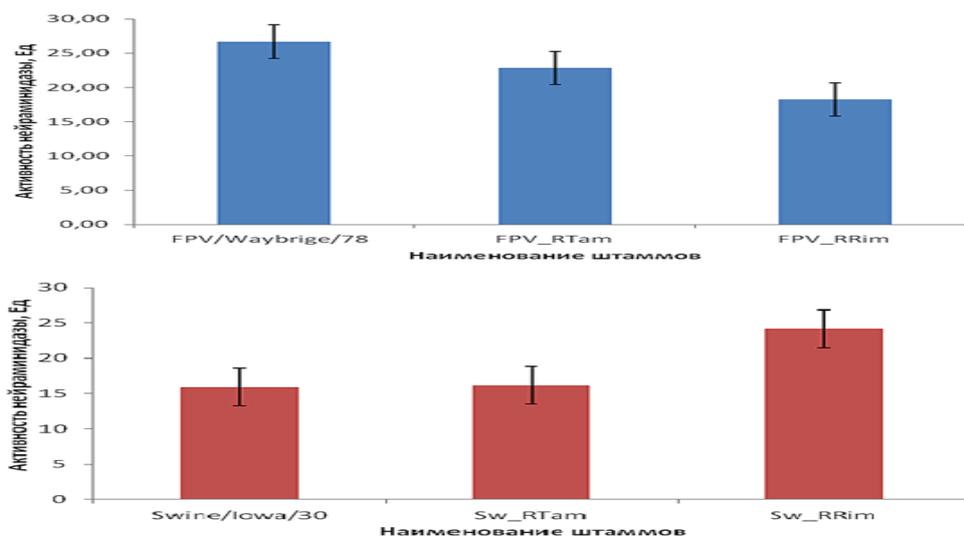


Рисунок 3.16. - Результаты сравнительного анализа нейраминидазой активности исходных и мутантных штаммов вируса гриппа

Анализ активности фермента нейраминидазы у мутантных вариантов по сравнению с исходными штаммами выявил отличия. Согласно данным, представленным на рисунке 3.16, активность фермента нейраминидазы у полученных резистентных штаммов FPV_RTam и FPV_RRim снижается по сравнению с исходным вариантом А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) на 21,27 и 28,86 %

соответственно, в то время как у мутантов, полученных из штамма A /Swine/Lowa/15/30 (H1N1), наблюдается обратная картина. Так, активность нейраминидазы мутанта Sw_RTam оставалась на уровне исходного штамма, а у мутанта Sw_RRim активность увеличивалась на 50 % по сравнению с исходным вариантом.

3.5.2. Изучение ингибирующего действия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на полученные в результате селекции лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А

Дальнейшие исследования были направлены на изучение ингибирующего действия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на полученные в результате селекции лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А FPV_RTam, Sw_RTam FPV_RRim, Sw_RRim [240]. Исследование проводили путем воздействия 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). Действие ФС-1 на цикл репродукции лекарственно устойчивых вариантов штаммов вируса гриппа оценивали путем определения числа гемагглютинирующих единиц в реакции гемагглютинации.

Таблица 3.34 – Ингибирующее действие соединения ФС-1 на лекарственно устойчивые варианты штаммов вируса гриппа А FPV_RTam, Sw_RTam FPV_RRim, Sw_RRim

Концентрации ФС-1, мг/мл	Титр в ГАЕ ¹ , log ₂ ± StD ²			
	FPV_RTam,	FPV_RRim	Sw_RTam	Sw_RRim
25,0	0	0	0	0
12,5	2,0 ± 0,0	3,7 ± 0,6	2,7 ± 0,6	4,0 ± 0
6,2	3,0 ± 0,0	5,0 ± 0	4,0 ± 0	5,0 ± 0
Контроль вируса	8,0 ± 0,5		7,0 ± 0	
Примечание: ¹ - Титр, гемагглютинирующих единиц, приведен в двоичных log ₂ ; ² - данные представлены как среднее значение ± StD (n=5). p < 0,05 по сравнению с контрольной группой.				

Как видно из данных таблицы 3.24 полученные результаты показали 100 % подавление репликации мутантных штаммов иодсодержащим 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/15/30 (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/15/30 (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

Оценку цитотоксичности ФС-1 и коммерческих противогриппозных препаратов римантадин, осельтамивир и ацетилсалициловая кислота при индивидуальном и комбинированном действии *in vitro* определяли с помощью нейтрального красного на культуре клеток MDCK [241]. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток в 1,0 мл. Плашки культивировали в термостате при 37 °С и 5 % CO₂. Исследуемые вещества

вносили однократно в лунки с клеточной суспензией. В качестве разводящей жидкости использовали питательную среду DMEM. Продолжительность воздействия веществ на культуру клеток составляла 72 ч. После окончания срока инкубации в плашки добавляли рабочий раствор нейтрального красного. Оптическую плотность в лунках измеряли на микропланшетном ридере Tecan Sunrise RC.4 (Австрия) при длине волны основного фильтра 540 нм и референс-фильтра – 620 нм.

Изучение влияния иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на токсичность коммерческих противогриппозных препаратов при моно и комбинированном применении проведены по методу Chou-Talalay, при помощи программного обеспечения CompuSyn 10.1 [242].

Комбинационный индекс (CI), рассчитывался по формуле (3.7):

$$CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j}, \quad (3.7)$$

где (D)_j – доза (концентрация) препарата, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; (D_x)_j – доза (концентрация) препарата, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.

Индекс снижения дозы (DRI) компонентов комбинации рассчитывали по формуле (3.8):

$$DRI_1 = \frac{(D_x)_1}{(D)_1}, \quad DRI_2 = \frac{(D_x)_2}{(D)_2}, \quad (3.8)$$

где (D_x) – доза (концентрация) препарата, при индивидуальном применении, (D) – доза (концентрация) препарата, при комбинированном применении.

В работе использованы широко применяемые против гриппа А препараты римантадин, осельтамивир и ацетилсалициловая кислота. На основе полученных данных были рассчитаны значения ЦТК₅₀. Полученные результаты представлены в табл. 3.35 и на рисунке 3.27.

Таблица 3.35 – Оценка цитотоксического действия противогриппозных препаратов и иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на модели культуры клеток MDCK

Тест система	Название препаратов	ЦТК ₅₀ , (мг/мл± StD)*
MDCK	ФС-1	0.430 ± 0.79
	римантадин	0.049 ± 0.96
	осельтамивир	0.149 ± 0.97
	ацетилсалициловая кислота (ASA)	1.300 ± 0.92

Примечание: * – данные представлены как среднее значение ± StD (n=5). p < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

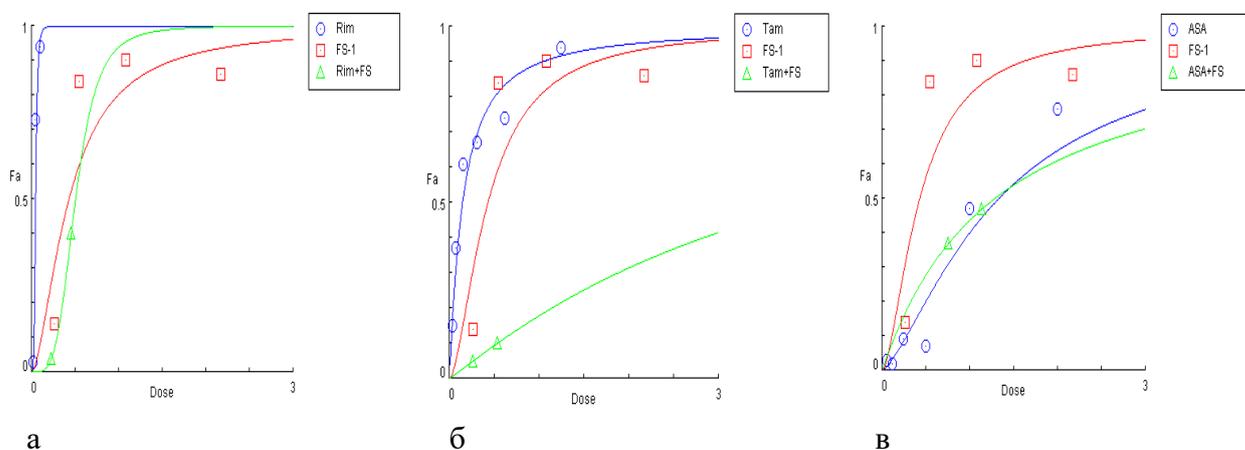


Рисунок 3.17. - График кривой «доза-эффект» действия ФС-1 с противогриппозными препаратами на модели культуры клеток MDCK

Примечания: а) римантадин; б) осельтамивир; в) ASA

Представленные в табл. 3.35 и на рисунке 3.27 результаты показали, что препараты римантадин, осельтамивир и ФС-1 обладают выраженным цитотоксическим действием. Так значение ЦТК₅₀ у римантадина составляет 0,049 мг/мл активного вещества; у тамифлю - ЦТК₅₀ 0,149 мг/мл активного вещества. Умеренная токсичность установлена у ФС-1 значение ЦТК₅₀, которого составило 0,430 мг/мл активного вещества. Наименее выраженное цитотоксическое действие, равное 1,300 мг/мл, проявил препарат ацетилсалициловая кислота.

Дальнейшие исследования были направлены на оценку эффективности комбинированного применения ФС-1 с исследуемыми противовирусными препаратами. Полученные результаты представлены в табл. 3.36.

Таблица 3.36 – Сравнительный анализ комбинированного эффекта противовирусных препаратов под действием ФС-1

Название препаратов А	Название препаратов Б	D ¹ , (мг/мл± StD) ²		Dm ³ , (мг/мл± StD) ²	DRI ⁴		CI ⁵
		Препарат А	Препарат Б		Препарат А	Препарат Б	
римантадин	ФС-1	0.049 ± 0.96	0.430 ± 0.7	0.507 ± 1.00	1,054	0,935	2,018
осельтамивир		0.149 ± 0.97		4.130 ± 1.00	0,158	0,134	13,726
ASA		1.300 ± 0.92		1.300 ± 1.00	1,0	1,226	1,518

Примечание: ¹D – доза каждого препарата, которая ингибирует рост клеток на 50 %;
² – данные представлены как среднее значение ± StD (n = 5). P < 0,05 по сравнению с контрольной группой;
³Dm – доза комбинированного эффекта препарата, которая ингибирует рост клеток на 50 %;
⁴DRI – индекс снижения дозы препарата;
⁵Значения комбинационного индекса: CI < 1 характеризует синергизм, CI = 1 – аддитивный эффект и CI > 1 – эффект антагонизма;
ASA – ацетилсалициловая кислота.

В табл. 3.36 представлены результаты комбинированного применения препаратов римантадин и осельтамивир с иодсодержащим лекарственным средством ФС-1. Так доза комбинированного эффекта ФС-1 с римантадином, 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 осельтамивира 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 три раза.

Комбинационный индекс (CI) для комбинации ФС-1-римантадин составил $CI = 2,018$; для комбинации ФС-1-осельтамивир $CI = 13,726$ и для комбинации ФС-1-ASA $CI = 1.518$. Значения комбинационного индекса (CI) лекарственных соединений трактовали в соответствии со следующей шкалой: $CI < 0,1$ – синергизм; $CI = 0,90-1,10$ – аддитивный эффект; $CI > 1$ – антагонизм.

Значения DRI показывают во сколько раз можно снизить дозу каждого препарата в комбинации для достижения наибольшего эффекта, сопоставимого с его монодействием.

Таким образом, сравнительный анализ комбинированного применения взятых для исследования противовирусных препаратов римантадина и осельтамивир с ФС-1 показал, что под воздействием последнего наблюдается снижение их токсических свойств.

Графики уравнения медианного эффекта, графики комбинационного индекса, графики индекса снижения дозы и изоболограммы, а так же проведенные расчеты, множественного лекарственного эффекта показывающие ингибирование роста токсичности лекарства А, лекарства Б и комбинации лекарства А с лекарством Б при постоянном соотношении (доза каждого препарата, ингибирует рост клеток на 50 %), результаты представлены в табл.3.36 и на рисунках 3.18-3.20.

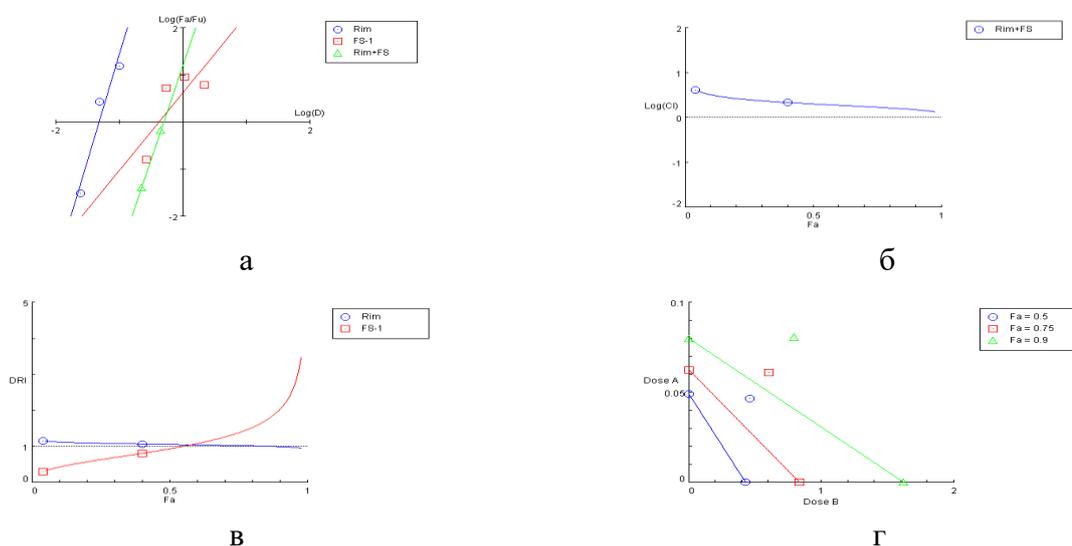


Рисунок 3.18. - Моно и комбинированное действие ФС-1 с препаратом римантадин на культуре клеток MDCK

а) график уравнения медианного эффекта; б) график комбинационного индекса (CI); в) график индекса снижения дозы (DRI); г) изоболограмма

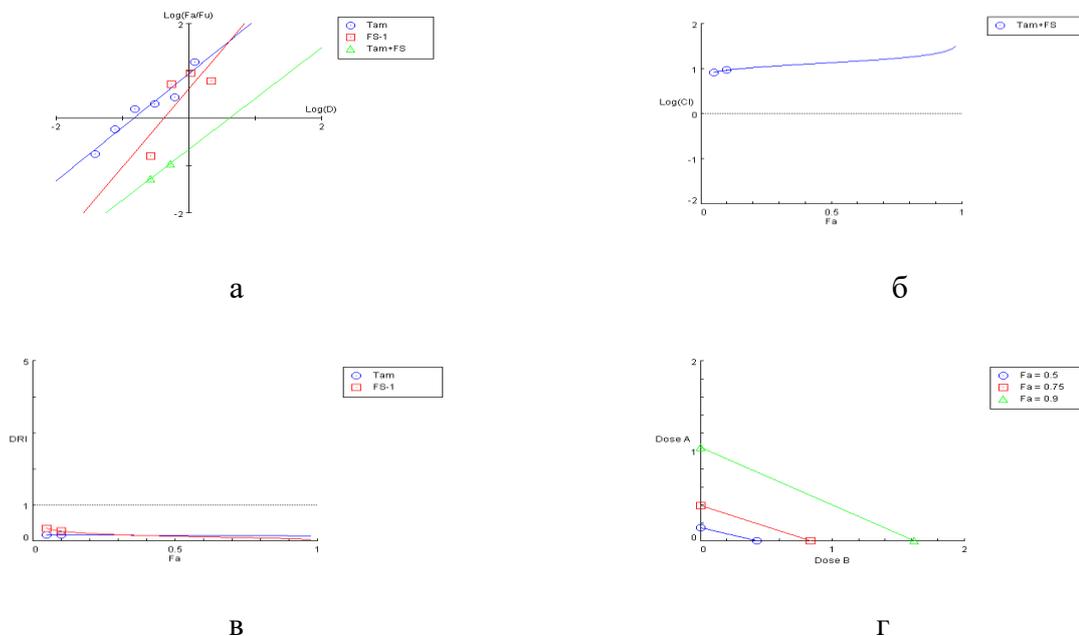


Рисунок 3.19. - Моно и комбинированное действие ФС-1 с препаратом осельтамивир на культуре клеток MDCK

а) график уравнения медианного эффекта; б) график комбинационного индекса (CI); в) график индекса снижения дозы (DRI); г) изоболограмма

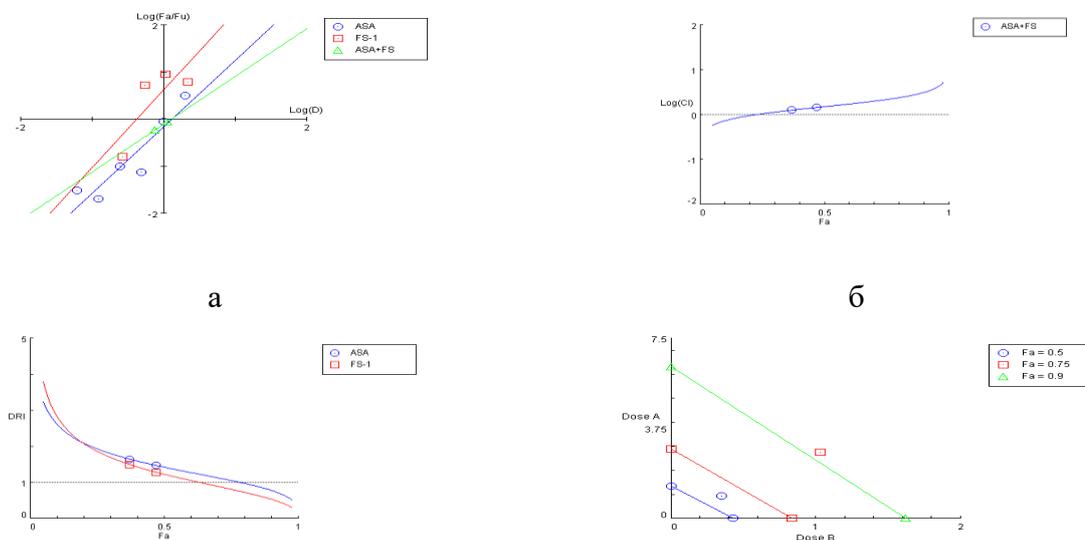


Рисунок 3.20. Моно и комбинированное действие ФС-1 с препаратом ASA на культуре клеток MDCK

а) график уравнения медианного эффекта; б) график комбинационного индекса (CI); в) график индекса снижения дозы (DRI); г) изоболограмма

Анализ изучения влияния ФС-1 на токсичность коммерческих противогриппозных препаратов при комбинированном применении на культуре клеток MDCK с количественной оценкой уровня эффекта взаимодействия по методу Чоу-Талалая, основанном на уравнении медианного эффекта, выведенном из принципа закона массового действия, представляет собой единую теорию, которая обеспечивает общую связь между одним и несколькими препаратами составляет теоретическую основу для определения комбинационного индекса (CI) (рисунки 3.28-3.30 а).

Графики комбинационного индекса (CI) на рисунках 3.18–3.20 б изображают количественные значения «эффекта» для комбинаций исследуемых препаратов, необходимых для оценки рисков. Использование 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-ASA $CI = 1.518$. Количественное определение взаимодействия противогриппозных 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 [3].

Полученные значения графиков индекса снижения дозы (DRI) в результате проведенных исследований показали во сколько раз может быть снижена доза противогриппозных 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-ASA 1:2.67.

Графики изоболограммы показывают взаимодействие между комбинируемыми препаратами и изображают количественные значения «доз».

Суммируя полученные результаты проведенных исследований, расчетов, графических изображений уравнения медианного эффекта, комбинационного индекса, индекса снижения дозы и изоболограммы, следует заключить, что комбинированное применение иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 влияет на токсичность противовирусных препаратов (рисунки 3.18–3.20). Из данных графического изображения полученных результатов видно, что применение ФС-1 в комбинации снижает дозы противогриппозных препаратов римантадин и осельтамивир, проявляя выраженный антагонистический эффект.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что комбинированное применение ФС-1 с противогриппозными препаратами римантадин, осельтамивир и ацетилсалициловой кислотой значительно снижает их токсические свойства. Анализ воздействия ФС-1 на лекарственные 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 противогриппозными препаратами в эксперименте *in vitro*

Изучение комбинированного действия ФС-1 проводили совместно с препаратами римантадин, рибазол и осельтамивир в опытах *in vitro* на модели культуры клеток MDCK при экспериментальной гриппозной инфекции вирусом гриппа штаммом А /FPV/Waybrige/78 (H7N7). Для определения противовирусной активности предварительно была проведена оценка цитотоксичности иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 и препаратов: римантадина,

осельтамивира, рибазола и амиксина. Установленные цитотоксические концентрации (ЦТК₅₀) противовирусных препаратов и иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 использовали для расчета максимально переносимых концентраций (МПК), взятых за основу определения антивирусной активности в отношении вируса гриппа штамм А.

Ввиду того, что вирус гриппа А крайне чувствителен к условиям культивирования, в качестве модели для оценки токсичности использовали монослойную перевиваемую культуру клеток MDCK. Количественную оценку цитотоксического действия исследуемых веществ осуществляли с использованием МТТ-теста. Учет результатов анализа проводили через 72 часа воздействия препаратов на культуру клеток. На основании полученных данных были рассчитаны значения ЦТК₅₀. Полученные результаты цитотоксичности противовирусных препаратов и ФС-1 на модели культуры клеток MDCK представлены в табл. 3.37.

Таблица 3.37 – Оценка цитотоксического действия исследуемых препаратов после 72 ч инкубации на культуре клеток MDCK.

Название препаратов	ЦТК ₅₀ , (мг/мл ± StD)*	МПК, (мг/мл ± StD)
римантадин	0,044 ± 2,1	0,022 ± 0,4
рибазол	1,14 ± 10,0	0,57 ± 1,2
амиксин	0,0055 ± 0,05	0,003 ± 0,21
осельтамивир	0,45 ± 1,4	0,23 ± 2,3
ФС-1	2,33 ± 1,1	1,17 ± 1,7

Примечание: *данные представлены как среднее значение ± StD (n = 5). P < 0,05 по сравнению с контрольной группой.

В результате проведенных исследований показано, что противогриппозные препараты римантадин и амиксин являются высокотоксичными в отношении клеточной культуры MDCK. Значения ЦТК₅₀ римантадина составляет 0,044 мг/мл, а значения ЦТК₅₀ амиксина составляет 0,0055 мг/мл, что указывает о высокой токсичности данного препарата и максимальная переносимая концентрация для дальнейших исследований по изучению вирусингибирующей активности концентрация римантадина составила 0,022 мг/мл (1/2 ЦТК₅₀), а амиксина

0,003 мг/мл (1/2 ЦТК₅₀). В тоже время по данным таблицы видно, что препараты осельтамивир, рибазол обладают умеренной токсичностью в отношении культуры клеток MDCK. ЦТК₅₀ осельтамивира равна 0,45 мг/мл, а рибазола – 1,14 мг/мл, следовательно, для дальнейших исследований по изучению вирусингибирующей активности максимальная переносимая концентрация осельтамивира составила 0,23 мг/мл, а рибазола 0,57 мг/мл.

Иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 малотоксичное соединение со значением ЦТК₅₀ равным -2,33 мг/мл согласно Государственной фармакопее РК. (2008). Международный стандарт: «Классификации опасности химической продукции». (2011).

При совместном применении с противовирусными препаратами фармацевтическая несовместимость у ФС-1 не установлена, отсутствует. При проведении эксперимента не наблюдали возникновения химического взаимодействия комплекса, при которых происходили бы физико-химические изменения препарата, такие как отсутствие выпадения в осадок, изменения цвета раствора, pH в пределах 6,9–7,2, и.т.д.

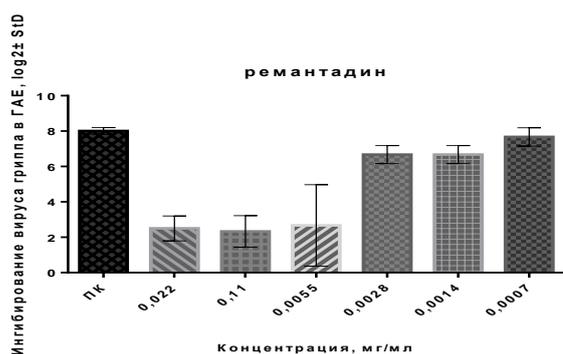
Полученные значение ЦТК₅₀ использовали для проведения исследований по оценке противовирусной активности лекарственных препаратов. Определение противовирусной активности осуществляли на культуре клеток MDCK с использованием вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7). Учитывали подавление вирусингибирующей активности вируса гриппа в дозе 100 ЭИД₅₀ путем постановки реакции гемагглютинации (РГА) по степени подавления агглютинации эритроцитов. Полученные результаты РГА представлены на рисунке 3.21 и в табл. 3.38.

Таблица 3.38 – Оценка вирусингибирующей активности изучаемых препаратов на модели вируса гриппа штамм А в опытах *in vitro*

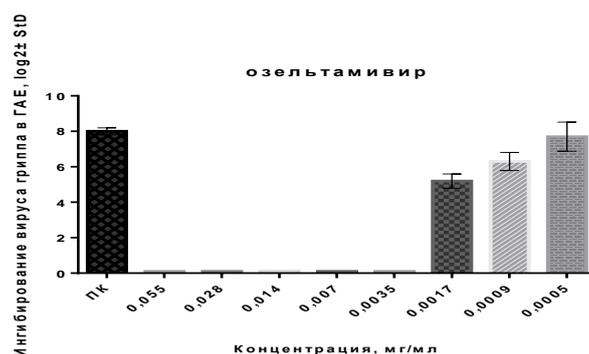
Название препарата	Концентрация веществ мг/мл	Титр в ГАЕ, log ₂ ± StD*	Название препарата	Концентрация веществ мг/мл	Титр в ГАЕ, log ₂ ± StD
1	2	3	4	5	6
осельтамивир	0,055	0	рибазол	0,14	0
	0,028	0		0,07	0

Название препарата	Концентрация веществ мг/мл	Титр в ГАЕ, $\log_2 \pm \text{StD}^*$	Название препарата	Концентрация веществ мг/мл	Титр в ГАЕ, $\log_2 \pm \text{StD}$
1	2	3	4	5	6
	0,014	0		0,035	0
	0,007	0		0,0175	$3,33 \pm 0,58$
	0,0035	0		0,0087	$7,0 \pm 0,0$
	0,0017	$5,0 \pm 1,73$		0,0044	$6,33 \pm 1,53$
	0,0009	$6,33 \pm 0,58$			
римантадин	0,022	$2,5 \pm 0,7$	амиксин	0,0028	$1,5 \pm 0,7$
	0,011	$2,33 \pm 2,89$		0,0014	$8,0 \pm 0,0$
	0,0055	$2,67 \pm 2,3$		0,0007	$8,0 \pm 0,0$
	0,0028	$6,67 \pm 1,53$		0,00035	$8,0 \pm 0,0$
	0,0014	$6,67 \pm 1,53$		0,00017	$8,0 \pm 0,0$
	0,0007	$7,67 \pm 0,58$			
ФС-1	1,16	$2,0 \pm 0,0$	ФС-1	0,12	$7,25 \pm 0,5$
	0,58	$2,5 \pm 0,58$		0,06	$7,5 \pm 0,58$
	0,23	$3,0 \pm 0,0$		0,03	$7,75 \pm 0,5$
Зараженные вирусом, не обработанные препаратом		$8,0 \pm 0$			
Не зараженные клетки		0			

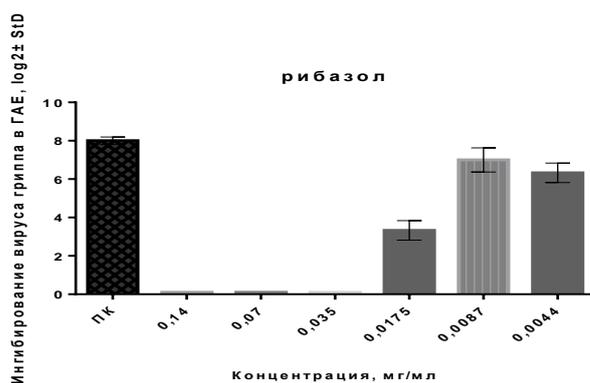
Примечание: *- данные представлены как среднее значение $\pm \text{StD}$ (n = 5). P < 0,05 по сравнению с контрольной группой.



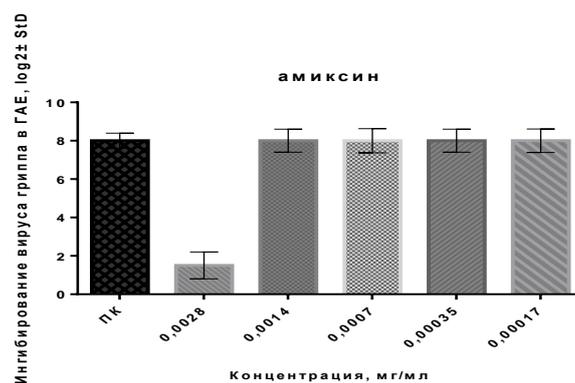
а



б



в



г

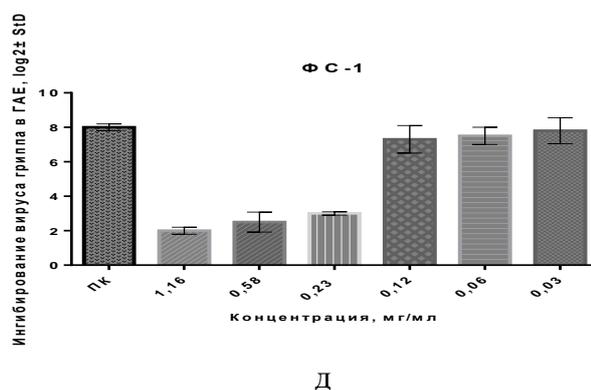


Рисунок 3.21. - Вирусингибирующая активность исследуемых веществ в опытах *in vitro*

а) – ингибирующая активность препарата римантадин в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) на линии клеток MDCK; б) ингибирующая активность препарата осельтамивир в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) на линии клеток MDCK; в) ингибирующая активность препарата рибазол в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) на линии клеток MDCK; г) ингибирующая активность препарата амиксин в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) на линии клеток MDCK; д) - ингибирующая активность ФС-1 в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) на линии клеток MDCK.

По данным, представленным в таблице 3.38 и на рисунке 3.21 видно, что противогриппозные препараты, осельтамивир, рибазол и римантадин обладают выраженными противовирусными свойствами по вирусингибирующей схеме воздействия. Препарат осельтамивир в максимальных концентрациях от 0,055 до 0,0035 мг/мл, препарат рибазол в концентрациях от 0,14 до 0,035 мг/мл полностью нейтрализуют репликацию вируса гриппа в культуре клеток. Степень подавления репродукции вируса гриппа препаратом римантадин в концентрациях от 0,022 до 0,0055 мг/мл составила от 5,3 log до 5,6 log. Противовирусное действие коммерческого препарата рибазол в концентрации от 0,0175 мг/мл показало снижение титра вируса на 4,67 log в сравнении с положительным контролем. Препарат осельтамивир в концентрации 0,007 мг/мл подавляет репликацию вируса гриппа на 3,0 log. Противовирусное действие препарата амиксин регистрировалось только в концентрации 0,0028 мг/мл снижением репликации вируса на 6,5 log. Положительный контроль вируса составил 8,0 log.

При изучении противовирусной активности иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 наиболее выраженные результаты были получены в концентрации от 1,16 до 0,23 мг/мл. При этом степень ингибирования

вируса наблюдалась от 6 log до 5 log по сравнению с положительным контролем. При воздействии ФС-1 в концентрациях от 0,12 до 0,03 мг/мл ингибирование репродукции вируса не наблюдалось.

Концентрации препаратов, в которых не наблюдалось значимой противовирусной активности в отношении вируса гриппа, использовались в последующих экспериментах для изучения совместного действия. Были отобраны по три концентрации каждого препарата. Конечные концентрации, как противовирусных препаратов, так и ФС-1, были увеличены в три раза (исходные концентрации, взятые для исследования). Данное увеличение объясняется тем, что при соединении коммерческого препарата с ФС-1 и с вирусом в соотношении 1:1:1 концентрация вещества уменьшается в три раза.

Изучение противовирусной активности ФС-1 совместно с препаратами римантадином, осельтамивиром, рибазолом и амиксином проводили на модели вируса гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) *in vitro* в культуре клеток MDCK. По результатам изучения противовирусной активности исследуемых веществ были отобраны по три концентрации каждого препарата. Римантадин в концентрациях 0,0028; 0,0014 и 0,0007 мг/мл проявлял противовирусную активность, снижая титр вируса на 0,33–1,33 log. Осельтамивир в концентрации 0,0017 мг/мл снижал репликацию вируса на 3,0 log в концентрациях 0,0009 и 0,0005 мг/мл на 1,67 log. Концентрации рибазола 0,0175; 0,0087 и 0,0044 мг/мл снижали репликацию вируса на 1,5 1,0 log. Концентрация амиксина 0,0028 мг/мл снижала репликацию вируса гриппа на 6,5 log, а концентрации 0,0014 и 0,0007 мг/мл, не обладали противовирусной активностью. Были взяты три концентрации иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 0,12; 0,06; 0,03 мг/мл, которые снижали репликацию вируса на 0,75 log, 0,5 log и на 0,25 log соответственно. Учет результатов производили через 72 часа инкубации смеси иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 и вируса с клетками. Для изучения противовирусной активности ФС-1 совместно с коммерческими препаратами использовали вирус в дозе 100 ЭИД₅₀. В качестве негативного контроля использовали фосфатно-солевой буфер, в качестве положительного контроля -

культуральная взвесь вируса. 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 рисунке 3.22.

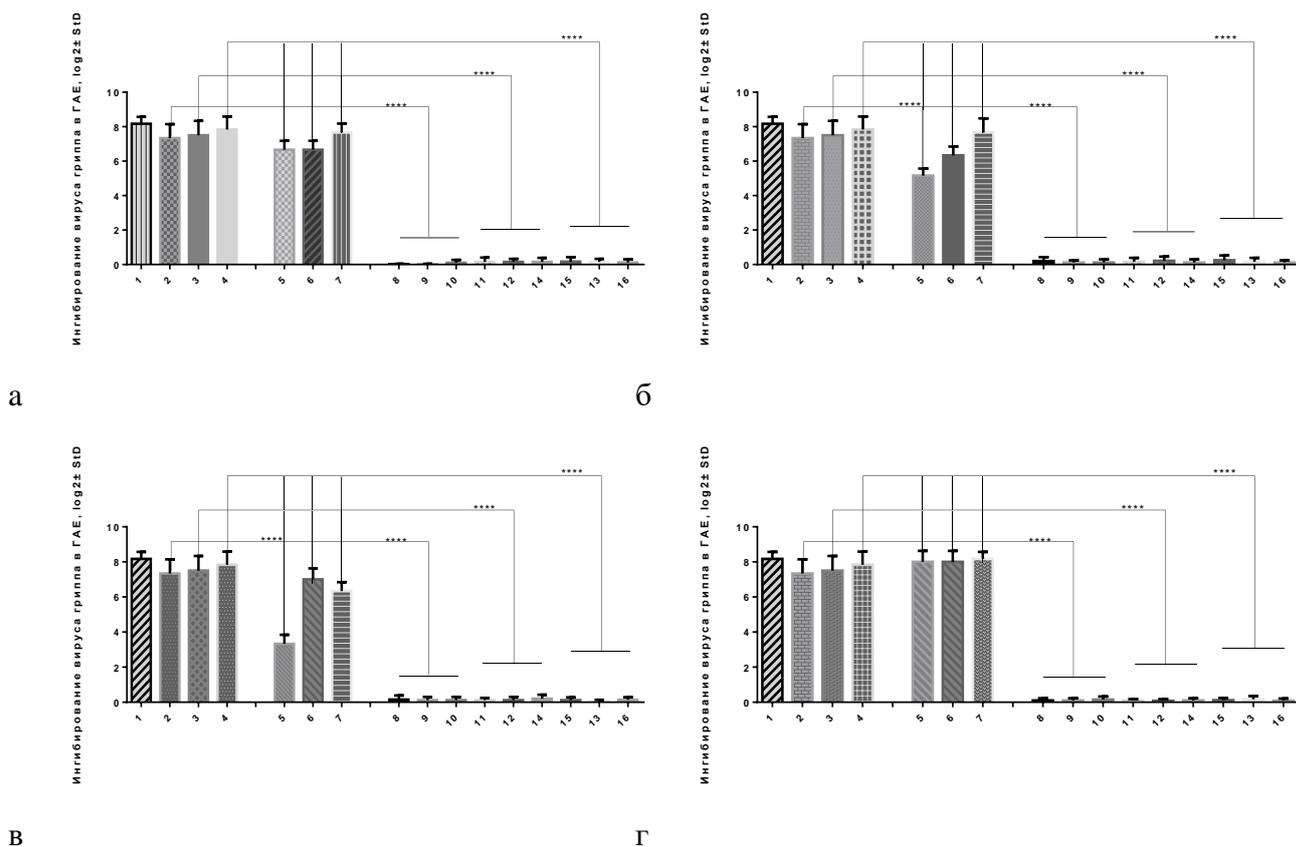


Рисунок 3.22. - Ингибирование вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) ФС-1 с противогриппозными препаратами в вирулицидной схеме воздействия на культуре клеток MDCK

а) – ингибирование вируса гриппа штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) 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 А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) 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 А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) ФС-1 в концентрациях 0,12 мг/мл; 0,06 мг/мл; 0,03 мг/мл, в комбинации с препаратом рибазол в концентрациях 0,00175 мг/мл; 0,00087 мг/мл; 0,00044 мг/мл. г) – ингибирование вируса гриппа штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) 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,

рибазолом и амиксином усиливает фармакологический эффект, полностью ингибируя размножение вируса гриппа, в отличие от монодействия каждого.

Резюмируя полученные результаты, установлено, что комбинированное применение иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 с препаратами римантадин, осельтамивир, рибазол и амиксин в исследуемых концентрациях оказывает выраженное фармакологическое действие на вирус гриппа, повышая противовирусную активность на культуре клеток MDCK.

Таким образом, резюмируя полученные результаты в эксперименте *in vitro*, следует отметить, что иодсодержащее лекарственное средство 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*

Для изучения комбинированного действия иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 с коммерческими противогриппозными препаратами в опытах *in ovo* первоначально в эксперименте на девятидневных куриных эмбрионах проведена оценка безопасности исследуемых препаратов. На основании проведенных исследований были определены значения эмбриотоксичности и максимально переносимая концентрация (МПК), взятых за основу определения противовирусной активности противовирусных препаратов в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7). Полученные результаты эмбриотоксического действия изучаемых веществ представлены в таблице 3.39.

Таблица 3.39 – Эмбриотоксичность противовирусных препаратов в экспериментах на куриных эмбрионах

Концентрация препарата, мг/мл	Выживаемость, %			
	римантадин	осельтамивир	рибазол	амиксин
20,0	35,0	50,0	50,0	37,5
10,0	45,0	62,5	66,5	42,5
5,0	87,5	72,5	73,3	62,5
2,5	97,5	75,0	87,5	82,5
1,25	100,0	87,5	89,6	87,5
0,63	100,0	100,0	100,0	100,0
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0

Как следует из данных, приведенных в таб. 3.39 противогриппозные препараты осельтамивир и рибазол в концентрациях 20 мг/мл вызывали гибель 50 % эмбрионов, а в концентрациях 10,0 и 5,0 мг/мл процент выживаемости куриных эмбрионов составил от 62,5 % до 66,5 %. При использовании концентраций от 2,5 до 1,25 мг/мл, исследуемые препараты демонстрировали низкую эмбриотоксичность.

Токсичность препарата римантадина в максимальных концентрациях 20,0 и 10,0 мг/мл составляла 65–55 %, уменьшением количества активного вещества токсичность снижалась. При введении 5,0 мг/мл данного препарата выживает 87,5 % эмбрионов. А 100 % выживаемость установлена при концентрации 1,25 мг/мл. Введение препарата Амиксин в концентрации 20,0 мг/мл вызывало гибель эмбрионов в 62,5 % случаях, в концентрациях 10,0 и 5,0 мг/мл - в 50 % случаях. При использовании концентраций 2,5 и 1,25 мг/мл процент выживаемости эмбрионов составлял 62,5 % и 75 % соответственно. Результаты изучения эмбриотоксичности ФС-1 представлены в табл. 3.40.

Таблица 3.40 – Эмбриотоксичность ФС-1 на модели куриных эмбрионов

Концентрация ФС-1, мг/мл активного вещества*	Количество эмбрионов	Количество погибших эмбрионов	Выживаемость, %
17,46	10	10	0
8,73	10	8	20
4,37	10	6	40
2,18	10	0	100
1,09	10	0	100
Контроль, ФСБ	10	0	100

Примечание: * - препараты представлены в концентрациях активного вещества

Проведенным экспериментом установлено, что введение исследуемого комплекса в концентрации активного вещества 17,46 мг/мл активного вещества на эмбрион, вызывает 100 % гибель. По мере снижения концентрации, в два раза увеличивалась выживаемость. Использование вещества в концентрации 4,37 мг/мл активного вещества приводило к гибели эмбрионов в 60 % случаях. При использовании концентраций 2,18 и 1,09 мг/мл активного вещества, гибели зародышей не наблюдалось, процент выживших составил 100 %.

Значения эмбриотоксичности и максимально переносимая концентрация (МПК), взятых за основу определения противовирусной активности широко используемых противогриппозных препаратов, иодсодержащего лекарственного средства ФС-1 на куриных эмбрионах в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) представлены в таб. 3.41.

Таблица 3.41 – Оценка эмбриотоксического действия исследуемых препаратов после 72 часов инкубации на куриных эмбрионах.

Название веществ	ЭТД ₅₀ ¹ , (мг/мл ± StD) ²	МПК, (мг/мл ± StD) ²
римантадин	5,0 ± 0,2	2,5 ± 0,1
рибазол	5,0 ± 0,35	2,5 ± 0,2
амиксин	5,0 ± 0,2	2,5 ± 0,2
осельтамивир	5,0 ± 0,1	2,5 ± 0,3
ФС-1	4,36 ± 0,1	2,18 ± 0,2
Примечание: ¹ – эмбриотоксичность; ² – данные представлены как среднее значение ± StD (n = 5). p < 0,05 по сравнению с контрольной группой;		

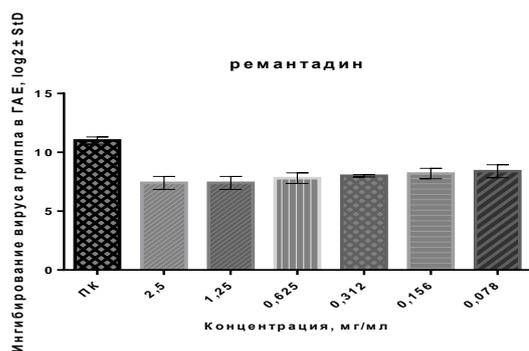
Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали выраженную зависимость выживаемости эмбрионов от используемой дозы препаратов.

Изучение противовирусной активности исследуемых веществ в отношении вируса гриппа А в опытах *in ovo* осуществляли на куриных эмбрионах с использованием штамма А /Waybrige/78 (H7N7). В качестве негативного контроля для введения в эмбрион использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ), в качестве положительного контроля – вирус гриппа в смеси с равным объемом ФСБ. Подавление активности вируса гриппа в дозе 100 ЭИД₅₀ учитывали путем

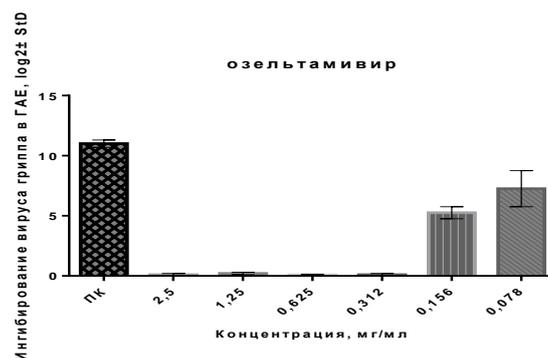
постановки реакции гемагглютинации (РГА). Полученные результаты РГА представлены в табл. 3.42 и на рисунке 3.23.

Таблица 3.42 – Оценка противовирусной активности изучаемых веществ на модели вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) в опытах *in ovo*

Название препарата	Исходная концентрация веществ мг/мл	Титр в ГАЕ, $\log_2 \pm \text{StD}^*$	Название препарата	Исходная концентрация веществ мг/мл	Титр в ГАЕ, $\log_2 \pm \text{StD}$
осельтамивир	2,5	0	римантадин	2,5	$7,4 \pm 0,55$
	1,25	0		1,25	$7,4 \pm 0,55$
	0,625	0		0,625	$7,8 \pm 0,45$
	0,312	0		0,312	$8,0 \pm 0$
	0,156	$5,25 \pm 0,5$		0,156	$8,2 \pm 0,45$
	0,078	$7,25 \pm 1,5$		0,078	$8,4 \pm 0,55$
рибазол	2,5	$9,0 \pm 0,7$	амиксин	2,5	$9,2 \pm 0,45$
	1,25	$9,2 \pm 0,45$		1,25	$9,6 \pm 0,55$
	0,625	$10,6 \pm 0,55$		0,625	$10,0 \pm 0$
	0,312	$10,75 \pm 0,5$		0,312	$9,2 \pm 0,84$
	0,156	$10,8 \pm 0,45$		0,156	$10,0 \pm 0,7$
	0,078	$10,8 \pm 0,45$		0,078	$10,0 \pm 0,7$
ФС-1	2,18	0	ФС-1	0,27	0
	1,09	0		0,14	0
	0,55	0		0,07	$8,0 \pm 0,7$
ПК, Вирус гриппа FPV		$11,0 \pm 0$			
Примечание: *данные представлены как среднее значение $\pm \text{StD}$ (n = 5). $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.					



а



б

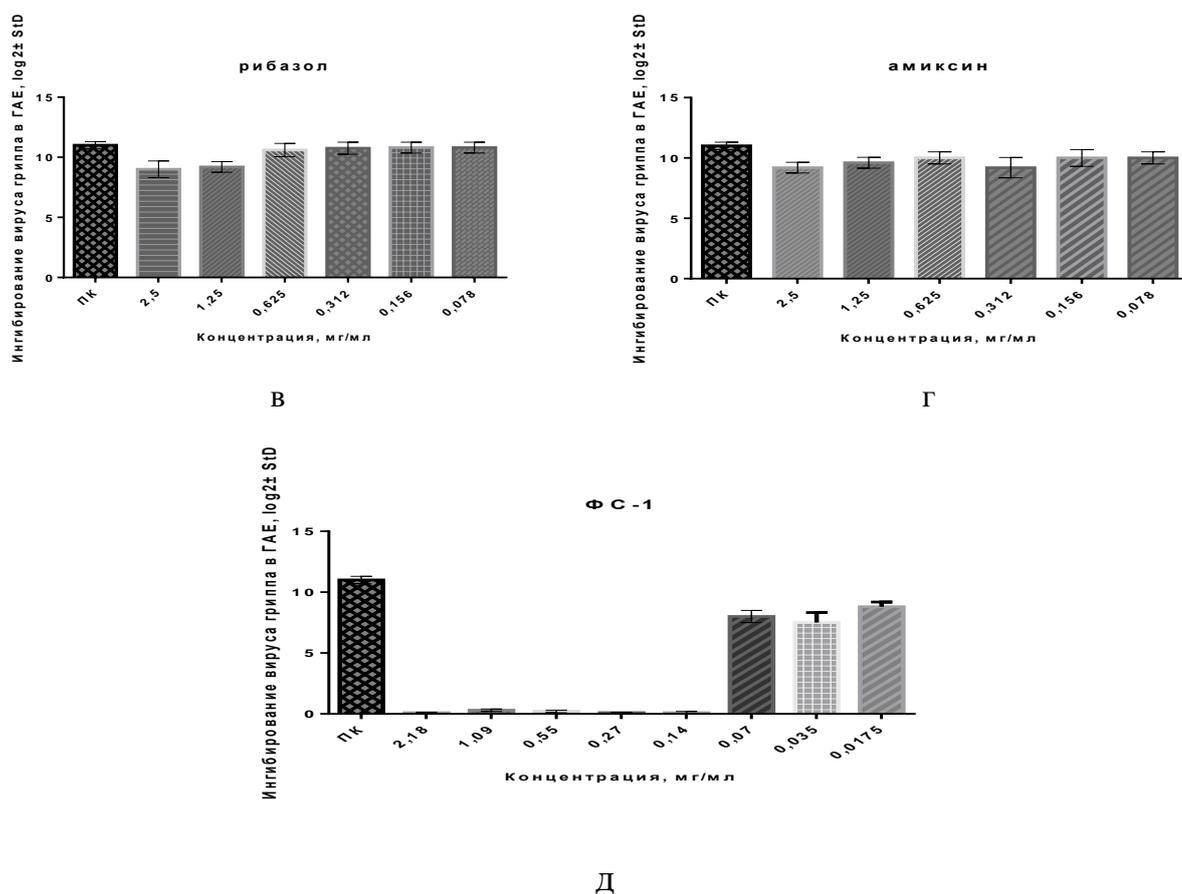


Рисунок 3.23. - Вирусингибирующая активность исследуемых веществ в опытах *in ovo*

а) – ингибирующая активность препарата римантадин в отношении вируса гриппа штамм А /Waybrige/78 (H7N7) на куриных эмбрионах; б) ингибирующая активность препарата осельтамивир в отношении вируса гриппа штамм А /Waybrige/78 (H7N7) на куриных эмбрионах; в) ингибирующая активность препарата рибазол в отношении вируса гриппа штамм А /Waybrige/78 (H7N7) на куриных эмбрионах; г) ингибирующая активность препарата амиксин в отношении вируса гриппа штамм А /Waybrige/78 (H7N7) на куриных эмбрионах; д) - ингибирующая активность ФС-1 в отношении вируса гриппа штамм А /Waybrige/78 (H7N7) на куриных эмбрионах.

В ходе проведенных исследований из таблицы 3.42 и рисунка 3.23 видно, что коммерческий препарат осельтамивир в концентрациях от 2,5 до 0,312 мг/мл полностью ингибирует активность вируса, в концентрациях 0,156 и 0,078 мг/мл титра инфекционности в реакции РГА снижается в 16–64 раз.

Таким образом, отмечено высокое антивирусное действие препарата осельтамивир в отношении штамма А /FPV/Waybrige/78 (H7N7). Римантадин проявил себя как препарат, обладающий умеренными противовирусными свойствами, способный снизить активность вируса гриппа на 3,0–4,0 log. Препараты рибазол и амиксин не проявили значимой противовирусной

активности в отношении вируса гриппа по вирусингибирующей схеме введения препаратов.

В ходе эксперимента было установлено, что ФС-1 в концентрациях от 2,18 до 0,14 мг/мл активного вещества полностью подавляет развитие вируса гриппа. Индекс защиты для данных концентраций составил 100 %. При воздействии исследуемого комплекса в концентрации 0,07 мг/мл активного вещества наблюдалось снижение титра вируса на 3 log по сравнению с контрольной группой.

Таким образом была показана высокая противовирусная активность ФС-1 в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7), которая проявлялась в снижении титра гемагглютинации вирусного потомства под воздействием соединения.

Изучение противовирусной активности ФС-1 в комбинации с противогриппозными препаратами римантадин, осельтамивир, рибазол и амиксин в опытах *in ovo* проводили на модели вируса гриппа с инфекционной дозой 100 ЭИД₅₀. По результатам изучения противовирусной активности исследуемых веществ были отобраны по три концентрации препаратов, в которых не наблюдалось значимой противовирусной активности. Концентрации римантадина 2,5; 1,25 и 0,625 мг/мл, в которых наблюдали снижение антивирусной активности на 3,6–3,8 log. Осельтамивир в концентрации 0,312 мг/мл полностью подавлял репликацию вируса, в концентрациях 0,156 и 0,078 мг/мл снижал развитие вируса на 5,75 log и на 3,75 log. Три концентрации рибазола 2,5; 1,25; 0,625 мг/мл понижали развития вируса на 2,0 log – 1,0 log, три концентрации амиксина 2,5; 1,25; 0,625 мг/мл снижали инфекционность вируса на 1,0–1,5 log. Три концентрации иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 0,28; 0,14; 0,07 мг/мл. ФС-1 в концентрациях 0,28; 0,14 мг/мл активного вещества полностью подавлял репликацию вируса, в концентрации 0,07 мг/мл активного вещества снижал титр вируса гриппа на 3,0 log. Конечные концентрации, как противовирусных препаратов, так и ФС-1, были увеличены в три раза (исходные концентрации, взятые для исследования). Данное увеличение объясняется тем, что

при соединении коммерческого препарата с ФС-1 и с вирусом в соотношении 1:1:1 концентрация вещества уменьшается в три раза. Результаты воздействия лекарственного соединения ФС-1 на противогриппозные препараты против вируса гриппа в опытах *in ovo* представлены на рисунке 3.24. Оценку противовирусной активности проводили по вирусингибирующей схеме внесения образцов.

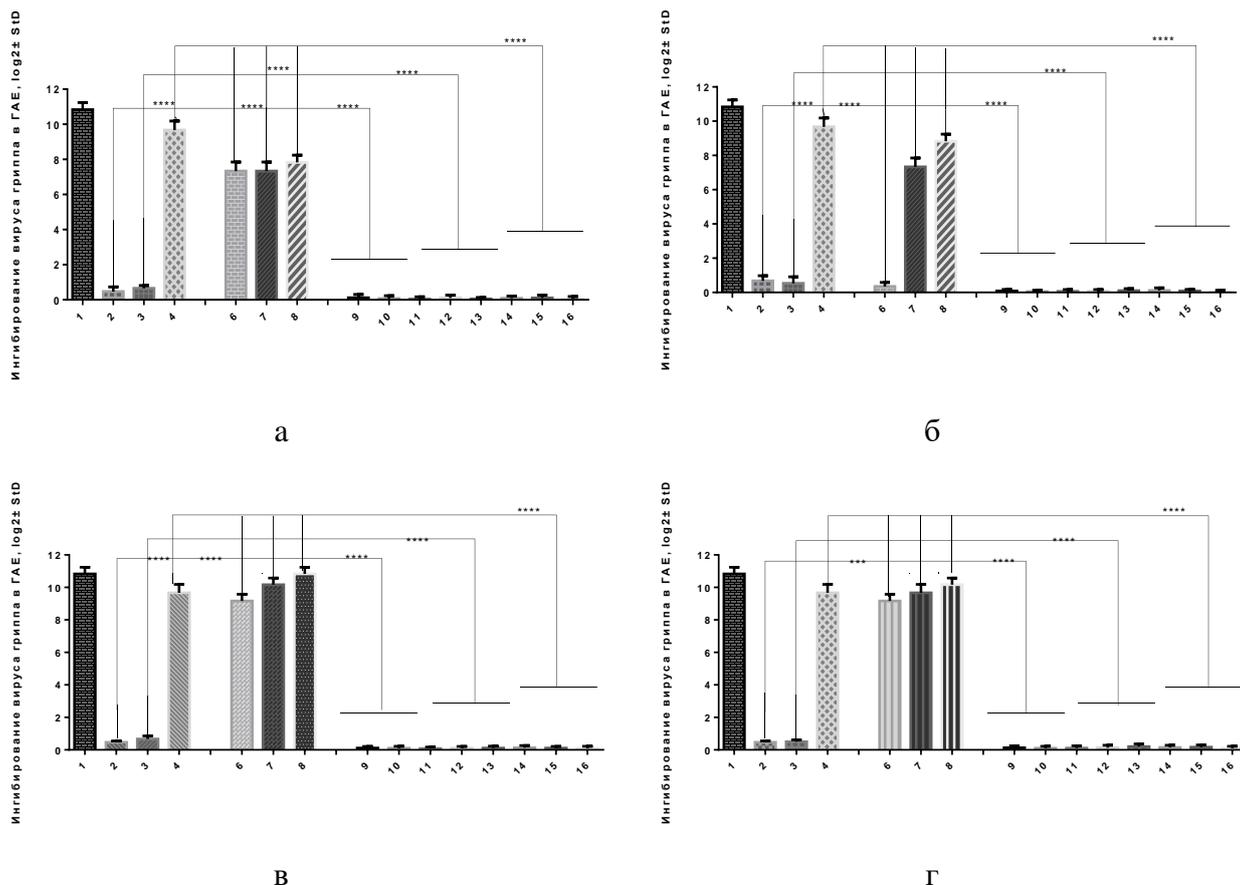


Рисунок 3.24. - Ингибирование вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) ФС-1 с противогриппозными препаратами в вирулицидной схеме воздействия в куриных эмбрионах

а) – ингибирование вируса гриппа штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) 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. б) – ингибирование вируса гриппа штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) 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. в) – ингибирование вируса гриппа штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) ФС-1 в концентрациях 0,27 мг/мл; 0,14 мг/мл; 0,07 мг/мл, в комбинации с препаратом рибавирол в концентрациях 2,5 мг/мл; 1,25 мг/мл; 0,625 мг/мл. г) – ингибирование вируса гриппа штамм А/FPV/Waybrige/78 (H7N7) 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.

Действие препарата осельтамивир в исследуемых концентрациях 0,312; 0,156 и 0,078 мг/мл совместно с ФС-1 в исследуемых концентрациях 0,27; 0,14 и

0,07 мг/мл на штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7), приводили к полному подавлению репродукции вируса, что указывает на высокие терапевтические свойства изучаемого комплекса. Монодействие осельтамивира в концентрации 0,312 мг/мл полностью ингибировало развитие вируса гриппа, в концентрации 0,156 мг/мл снижал титр вируса на 5,75 log, в концентрации 0,078 мг/мл на 3,75 log. А монодействие ФС-1 в концентрации 0,27 и 0,14 мг/мл активного вещества полностью подавлял развитие вируса, в концентрации 0,07 мг/мл активного вещества снижал развитие вируса на 3,0 log.

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 в эксперименте *in ovo* на куриных эмбрионах показывают, что иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 совместно с коммерческими препаратами римантадин, осельтамивир, рибазол и амиксин в использованных концентрациях оказывают выраженное противовирусное действие на вирус гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7).

Таким образом, полученные результаты проведенных исследований в опытах *in ovo* в куриных эмбрионах в отношении вируса гриппа штамм А /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 предварительных экспериментах определения острой токсичности и противогриппозной активности на семидневных цыплятах препарата римантадин и ФС-1 выявлено, что ЛД₅₀ (летальная доза вызывающая гибель 50 % животных) для ФС-1 равна 1,458 мг/кг активного вещества (26,2 мг/кг), доза для препарата римантадина составляет 8,33 мг/кг веса цыпленка. В эксперименте изучения противогриппозной активности концентрация римантадина равная 8,33 мг/кг приводит к сохранению цыплят, зараженных вирусом на 43 %, а концентрация 4,16 мг/кг (1/8 ЛД₅₀ из расчета на вес цыпленка) не обладает противогриппозной активностью. Концентрация ФС-1 равная 13,1 мг/кг сохраняет поголовье цыплят, зараженных вирусом гриппа на 78 %, а концентрация 6,6 мг/кг приводит к сохранению цыплят, зараженных вирусом на 43 %.

Оценку противовирусного действия ФС-1 в комбинации с препаратом римантадином в отношении вируса гриппа штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) проводят в эксперименте на семидневных цыплятах *in vivo*. Цыплятам перорально вводят иодсодержащее лекарственное средство ФС-1 с коммерческим препаратом римантадином и вирусом гриппа в соотношении 1:1:1. Оценку результатов проводят по Риду и Менчу, учитывая количество выживших животных. Результат противогриппозной активности ФС-1 с препаратом римантадин при комбинированном применении представлен на рисунке 3.35.

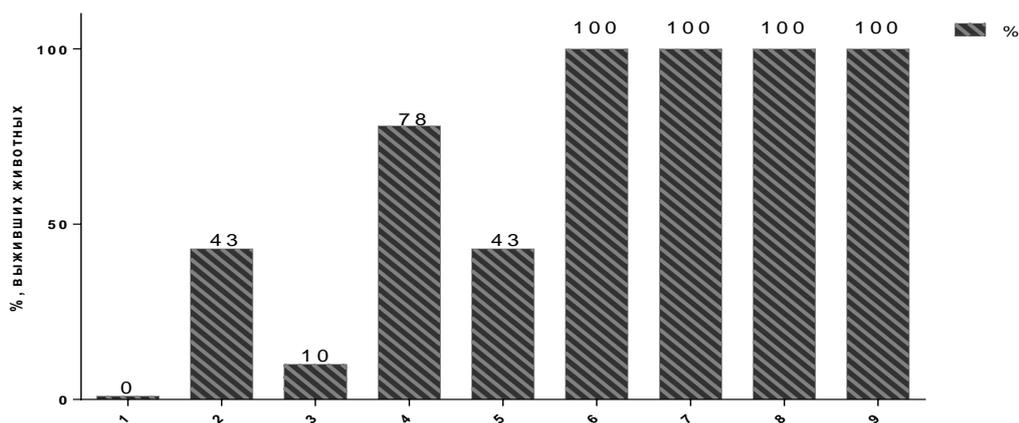


Рисунок 3.25. - Оценка комбинированного действия ФС-1 с римантадином против вируса гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) в опытах *in vivo*

Примечание: 1 – Вирус гриппа А /FPV/Waybrige/78 (H7N7); 2 – римантадин 8,33 мг/кг; 3 – римантадин 4,16 мг/кг; 4 – ФС-1 13,1 мг/кг; 5 – ФС-1 6,6 мг/кг; 6 – римантадин – 8,33 мг/кг+ ФС-1 13,1 мг/кг; 7 – римантадин – 8,33 мг/кг+ ФС-1 6,6 мг/кг; 8 – римантадин – 4,16 мг/кг+ ФС-1 13,1 мг/кг; 9 – римантадин – 4,16 мг/кг+ ФС-1 6,6 мг/кг.

Как видно из рисунка 3.25 комбинированное действие ФС-1 с препаратом римантадин в исследуемых концентрациях на вирус гриппа А штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7), приводит к полному подавлению репродукции вируса и 100 % выживаемости животных, что указывает на выраженное фармакологическое действие ФС-1 с препаратом римантадин. повышая его противогриппозную активность в опытах *in vivo*.

Для определения инфекционного титра вируса гриппа в легочной ткани животных легкие цыплят, извлеченные после инфицирования, гомогенизировали в 10-кратном объеме стерильного фосфатного буфера и готовили из гомогенатов серии 10-кратных разведений на том же буфере. При определении титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK, выращенных на 96-луночных панелях на среде DMEM. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями легочного гомогената от 10^0 до 10^{-7} и инкубировали в термостате в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1 % суспензии куриных эритроцитов в физиологическом растворе.

Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации эритроцитов. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали в логарифмах 50 % экспериментальной инфекционной дозы вируса ($\lg \text{ЭИД}_{50}$).

Проведено титрование органов на культуре клеток MDCK с целью выявления остаточного вируса гриппа. Наличие или отсутствие вируса подтверждали путем постановки реакции гемагглютинации. Установлено, что титр в РГА остаточного вируса положительного контроля (зараженные и не леченые цыплята) составил $8,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Все исследуемые дозы ФС-1 в композиции с противовирусным препаратом римантадином 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 $4,37 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

Резюмируя полученные результаты *in vivo* в эксперименте на цыплятах, следует отметить, что ФС-1 обладает выраженным противовирусным действием совместно с представленными коммерческими препаратами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекционные заболевания являются одной из самых серьезных проблем современной медицины. Возникновение новых вирусов, их быстрое распространение требуют немедленной разработки эффективных противовирусных препаратов и методов борьбы. Применение существующих противовирусных лекарственных препаратов приводит к формированию резистентных штаммов вируса, способных кумулироваться в организме и снижению эффективности проводимой терапии. Анализ литературы показывает, что в последнее время во всем мире активизируется процесс создания новых эффективных лекарственных соединений и технологий их производства. Создание таких препаратов в отношении вирусных инфекций является одной из наиболее актуальных социально-значимых задач химиотерапии. Среди вирусных заболеваний с всеобщей и высокой восприимчивостью к инфекции наибольшее распространение имеют грипп, парагрипп и др. Грипп птиц относится к высоко контагиозной и широко распространенной вирусной инфекции. Вызывает заболевание среди диких и домашних птиц от 80 до 100 % в зависимости от вирулентности вируса. Высокопатогенный вирус гриппа птиц А может быть источником широкого распространения инфекции у человека. Во время ежегодных эпидемий гриппом болеет от 5 до 15 % населения Земли, а во время пандемий это число возрастает в 4–6 раз. Установлено, что потенциальную угрозу для здоровья человека представляют вирусы H1N1, H5N1, H5N6 и H7N9. Вакцины обеспечивают защиту населения и птиц только в тех случаях, когда штаммы, используемые для их производства, хорошо сочетаются с циркулирующими вирусами. Существует угроза появления новых мутантов вируса и высокая вероятность того, что распространение вируса произойдет быстрее, чем будут разработаны, изготовлены и распространены новые эффективные против них вакцины. В этой связи наибольшей популярностью пользуются противовирусные терапевтические препараты, призванные сыграть важную роль в регуляции тяжести заболевания во время обычного сезонного гриппа, а также в стратегическом планировании

будущих пандемий. Одним из основных направлений в разработке противовирусных соединений является синтез аналогов из известных химических соединений, которые одновременно сочетали бы в себе такие свойства, как селективность действия в отношении патогенна - вируса гриппа, выражающееся в повышении фармакологической активности, низкую токсичность в макроорганизме, будь это человек или животное. При этом важно не нарушить физиологическое равновесие в эписоматическом биотипе. Среди множества известных препаратов медицинского назначения существует группа галогенпроизводных органических веществ, которым присущи экстремально высокие антибактериальные и противовирусные свойства. При создании молекул новых лекарственных препаратов перспективными являются природные карбогидраты, так как они экономически более доступны и могут подвергаться различным структурным модификациям. Интерес к химической модификации карбогидратов обусловлен тем, что введение в структуру некоторых органических соединений, например атомов галогенов, приводит к появлению новых видов биоактивности или заметному усилению имеющихся. Введение моносахаридных остатков в молекулы различных физиологически активных и лекарственных веществ представляет значительный интерес в связи с возможностью контролируемого изменения их взаимодействия с рецепторами и направленного транспорта лекарств к определенным клеткам, содержащим на своей поверхности специфические углевод-связывающие белки (лектины).

Особое значение приобретают иодсодержащие препараты, которые обладают целым рядом преимуществ перед веществами, содержащими другие галогены. Так иодсодержащие препараты, широко применяемые в медицине и ветеринарии, согласно данным литературы, проявляют высокую биологическую активность и разностороннее фармакологическое действие против бактериальных и вирусных возбудителей инфекции. Иодсодержащие препараты способны длительное время сохранять свою биохимическую активность и более устойчивы к агрессивной среде. Известно, что молекулярный иод с лёгкостью проходит через билипидные клеточные мембраны микроорганизмов и проникает внутрь клетки. Способность

иода с лёгкостью проникать через клеточные мембраны делает его применение особо ценным при тех инфекциях, основное развитие которых разворачивается во внутриклеточных структурах.

Антимикробное действие соединений иода обусловлено способностью элементарного иода и гипоиодной кислоты, катиона иода взаимодействовать с NH₂-группами аминокислот (лизин, гистидин, аргинин и др.), а также с нуклеотидами (аденин, цитозин, гуанин), формируя N-иоддериваты. Кроме того, происходит окисление SH-групп цистеина, приводящее к нарушению синтеза белков микроорганизма. Взаимодействуя с фенольными группами тирозина иод, приводит к нарушению образования водородных связей этих аминокислот. Действуя на двойные углеродные связи ненасыщенных жирных кислот, иод, также нарушает свойства липидов. Эти механизмы положены в основу иодсодержащих комплексов, разработанных под руководством д.х.н., академика КазНАЕН Ильина А. И. в АО «Научного центра противоиодных препаратов». Так создан инновационный лекарственный антибактериальный препарат под торговым названием Танерин R для лечения мультирезистентного туберкулеза. В Государственный Реестр лекарственных соединений Республики Казахстан включен первый отечественный противотуберкулезный препарат широкого спектра действия (регистрационное удостоверение № РК-ЛС-5№025967 от 19.08.2022г).

Настоящая работа посвящена совершенствованию технологии применения противогриппозных препаратов, йодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 и изучению его противовирусного действия на примере вируса гриппа птиц А.

Первоначально были изучены физико-химические свойства разработанных лекарственных иодсодержащих соединений [243]. При этом установлено, что их формированию, основу которых составляли соединения карбогидрата и альбумина с трииодидом калия, в значительной степени способствовал солевой состав, обеспечивающий ионную силу для образования макромолекул и создания условий сохранения окислительной способности иода. Альбумин выступал в качестве мощного структурного агента, формирующего особенно на фоне солей,

компактные фрактальные структуры. Карбогидрат в меньшей степени проявлял свойства структурообразователя и при высокой ионной силе собирался в плотно упакованные структурные единицы, выступающие лигандами взаимодействующих с иодом, образуя в целом прочные комплексные соединения. Полученные результаты подтверждаются проведенными исследованиями методами квантово-химического и рентгеноструктурного анализа (Юлдашева Г. А. и др., 2017–2022 г.). Доказано, что активные центры с молекулярным иодом, расположенные внутри α -декстриновой спирали - комплекс молекулярного иода с галогенидом лития (LiI_2), биядерный комплекс магния и лития, содержащий молекулярный иод с трийодидом $[\text{MgI}_3\text{LiI}_2]^+$ и трийодид (I_3^-). Такая структура ФС-1 защищает молекулярный иод от взаимодействия с биоорганическими соединениями после перорального потребления и сводит к минимуму токсические эффекты иода в организме человека. Основной механизм действия ФС-1 заключается в мембранной литической активности, а также исследуемый препарат влияет на экспрессию генов в бактериях.

Анализ данных физико-химических параметров (рН, температура затвердевания, плотность, вязкость) лекарственных соединений показывает, что исследуемые комплексы, пригодны для создания лекарственных форм. Комплексы стабильны в течение 12 месяцев со дня изготовления (срок наблюдения) при хранении с температурой окружающей среды (+4 до +20) °С, влажности (60±2) % в защищенном от света месте.

Изучение биофармацевтических свойств всех исследованных иодсодержащих лекарственных соединений на основании степени их растворимости в воде, буферных растворах с рН 1,2; 4,5 и 6,8 проницаемости на культуре клеток MDCK соответствуют III классу БКС. К III классу БКС относятся вещества с «высокой» растворимостью и «низкой» проницаемостью. Определение безопасности иодсодержащих лекарственных соединений проведено в экспериментах на культуре клеток MDCK, на мышах, куриных эмбрионах и цыплятах путем токсикологических исследований максимально переносимых доз.

Иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1, ФС-1.1, ФС-1.3, ФС-1.4 являются низко токсичными. ЦТК₅₀ соединений 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 и через 72 ч в концентрациях: 50,0; 20,0; 10,0; 20,0 мг/мл соответственно. Токсичность ФС-1, не увеличивается в зависимости от продолжительности культивирования, так как концентрации этого иодсодержащего комплекса практически не снижается, остаются на одном уровне. Иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1.2, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.7, ФС-1.8 обладают умеренной токсичностью, ЦТК₅₀ их находится в пределах от 0,39 до 2,13 мг/мл через 48 ч инкубирования на культуре клеток MDCK и от 0,20 до 1,77 мг/мл, а через 72 ч инкубирования на культуре клеток MDCK.

Определение острой токсичности в эксперименте на мышах показали, что все иодсодержащие 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, кроме ФС-1, в диапазоне доз от 1,12 до 2472,3 мг/кг 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 комплекса 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 комплекса. В дозах выше 117,74 мг/кг токсический эффект проявляется по нейротоксическому типу.

Изучение противовирусного действия иодсодержащих лекарственных соединений на культуре клеток MDCK показало, что репродукция вируса гриппа птиц штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) подавляется под воздействием ФС-1.1, ФС-1.2, ФС-1.3, ФС-1.5, ФС-1.6, ФС-1.8 в сравнении с контрольным титром не более чем на 2,0 log. В тоже время комплекс ФС-1.4 снижал титр вируса гриппа птиц на 5,0–6,0 log в сравнении с контролем. Наибольшее противовирусное

действие из числа исследованных проявляют иодсодержащие лекарственные соединения ФС-1, ФС-1.4 и ФС-1.7 снижая титр вируса гриппа птиц на 5,0–8,0 log.

Результаты экспериментов по изучению индукции ФС-1, ФС-1.4 и ФС-1.7 доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках, анализ мутагенной активности на различных по чувствительности тест-системах, проведенных лабораторией иммунологии показал, что соединение ФС-1 не индуцирует развитие доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках и не обладает мутагенной активностью в условиях *in vitro* и *in vivo*, в отличие от иодсодержащих лекарственных соединений ФС-1.4 и ФС-1.7. Также ФС-1.4 и ФС-1.7 показали высокую токсичность в экспериментах на животных.

Таким образом скрининг иодсодержащих лекарственных соединений, основанный на физико-химических свойствах качественного и количественного состава, противовирусной активности на примере вируса гриппа птиц А, определении цитотоксичности, показали наиболее эффективную композицию иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1.

Путем определения безопасности иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 на мышах рассчитан коэффициент кумуляции, который составил 1,45. Так же установлено отсутствие хронической токсичности ФС-1 при многократном введении (24 раза) соединения животным.

Изучения острой токсичности ФС-1 на крысах позволили рассчитать эффективные и токсические (летальные) дозы равные ЛД₁₆ – 571 мг/кг, ЛД₅₀ – 922 мг/кг, ЛД₈₄ – 1273 мг/кг, ЛД₁₀₀ – 1449 мг/кг. Результаты биохимических исследований в дозах 124,1; 248,3; 397,2; 496,5 мг/кг не выявили отклонения АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, общего билирубина, холестерина, креатинина и мочевины в сравнении с животными контрольной группы. В тоже время дозы 596,0; 794,4; 993,0 мг/кг вызывали незначительное повышение АЛТ в среднем до 1,8 мкмоль/мл, АСТ до 0,39 мкмоль/мл, щелочной фосфатазы от 116,9 до 119,3 ед./л и общего билирубина от 6,3 до 7,3 мкмоль/л. Тогда как у животных, получавших ФС-1 в дозах 1191,0 и 1390,0 мг/ кг выявлено значительное увеличение уровня АЛТ до 2,6 мкмоль/ мл, АСТ от 0,53 до 0,55 мкмоль/мл, щелочной фосфатазы от 152,8 до

158,6 ед./л и общего билирубина 15,6 мкмоль/л. При введении ФС-1 в концентрациях 1191,0 и 1390,0 мг/кг установлено снижение общего холестерина до 0,8 ммоль/л, от 2,6 ммоль/л в норме, что свидетельствует о функциональных нарушениях в печени.

Изучение эмбриотоксичности, показало, что иодсодержащее лекарственное соединения ФС-1 относится к малотоксичным соединениям. При этом степень токсичности обратно пропорционально сроку развития эмбриона.

При изучении противовирусной активности ФС-1 на модели вируса гриппа установлено, что ФС-1 в концентрации 3,3 мг/мл подавляет репродукцию вирусов на 2,0 log, а в концентрации 6,6 мг/мл полностью подавляет 100 инфекционных доз вируса гриппа А разных штаммов: А /FPV/Rostock/34 (H7N1), А /Алматы/5/98 (H3N2), А /черноголовый хохотун/Атырау/744/04 (H13N6).

Изучение токсичности ФС-1 в эксперименте на семидневных цыплятах в дозе от 0,8 до 26,3 мг/кг выявила, что данный комплекс не оказывает токсического влияния. В тоже время увеличение в два раза дозы равной 52,5 мг/кг активного вещества через 24 ч после введения ФС-1 вызывает гибель 50 % опытных цыплят. Установлено что ФС-1 хорошо всасывается после однократного перорального введения и характеризуется длительным суточным периодом выведения. Эти характеристики позволяют объяснить продолжительность действия ФС-1 у цыплят, после однократного перорального употребления.

Оценка противовирусной активности показала, что эффективность защиты после приема профилактической дозы ФС-1 у зараженных вирусом гриппа 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 коммерческого препарата римантадина у цыплят от инфекции составила только 28 %. Все контрольные цыплята, зараженные вирусом, не получавшие препараты погибли (100 % смертность). После семи дней наблюдения все цыплята опытных групп были подвергнуты эвтаназии эфирным наркозом. Проводили патологоанатомическое вскрытие, взятие материала для лабораторных

исследований. Проведено титрование органов на культуре клеток MDCK с целью выявления остаточного вируса гриппа. Наличие или отсутствие вируса подтверждали путем постановки реакции гемагглютинации. Установлено, что титр в РГА остаточного вируса положительного контроля (зараженные и не леченые цыплята) составил 8,0 log. Все исследуемые дозы ФС-1, кроме 3,3 мг/кг полностью подавляют репродукцию вируса гриппа. У цыплят, зараженных вирусом и получавших иодсодержащий комплекс ФС-1 в дозе 3,3 мг/кг снижение репродукции вируса составило на 3,0 log ниже положительного контроля. Тогда как у цыплят, зараженных вирусом и получавших препарат римантадин в концентрации 8,3 мг/кг подавление репродукции вируса составило всего 2,0 log.

Терапевтическая доза ФС-1 при ежедневном приеме 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 концентрации 8,3 мг/кг 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 коммерческого препарата. Цыплята, зараженные вирусом, но не получавшие препаратов погибли от гриппозной инфекции. Смертность составила 100 %. Титр в РГА остаточного вируса положительного контроля (зараженные и не леченые цыплята) составил 8,0 log. В полученных образцах от цыплят, принимавших ФС-1 в дозе 26,3 мг/кг, показало, что 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. В концентрации равной 13,1 мг/кг подавление репродукции вируса соединением ФС-1 установлено на 4.0 log. В тоже время минимальная доза ФС-1 равная 6,6 мг/кг подавляет репродукцию вируса на 2,0 log, что соответствует терапевтической активности коммерческого препарата римантадина против вируса гриппа. У зараженных цыплят, не получавших

препарата титр вируса гриппа А /FPV/Rostock/34 (H7N1) в РГА составил 8,0 log, что соответствовало положительному контролю.

Значительную долю в номенклатуре лекарственных соединений при терапии составляет комбинированное применение препаратов, путем включения в свой состав несколько лекарственных веществ. Может приводить к уменьшению или полному устранению действия одного из препаратов - антагонизму. В этом контексте изучение влияния ФС-1 на токсичность коммерческих противовирусных препаратов при моно и комбинированном применении проведены в эксперименте *in vitro* на культуре клеток MDCK с количественной оценкой по методу Чоу-Талалая при помощи программного обеспечения CompuSyn 10.1. Впервые показано снижение токсичности противовирусных препаратов римантадина, осельтамивира, рибазола и амиксина при комбинированном применении под действием иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1.

Выявлен значительный фармакологический эффект на вирус гриппа птиц А за счет способности ФС-1 оказывать синергетическое действие на широко используемые противовирусные препараты (Патент РК № 7196, 2021).

Анализируя полученные результаты проведенных исследований, можно заключить, что ФС-1 проявляет противовирусную активность, обладает высоким синергетическим действием при совместном применении с препаратами римантадином, осельтамивиром, рибазолом и амиксином, повышением фармакологической активности, и усилением ингибирующего воздействия на возбудителя вируса гриппа птиц А. Уникальное сочетание компонентов в составе разработанного иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 обеспечивает такой широкий спектр действия и высокую эффективность против вируса гриппа птиц А.

ВЫВОДЫ

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

2. В соответствии со шкалой токсичности веществ, иодсодержащее лекарственное соединение ФС-1 отнесено к умеренно токсичным веществам, к третьему классу опасности ГОСТ 12.1.007–76. Летальная доза ЛД₅₀ иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 при однократном пероральном введении составила для мышей 117,74 мг/кг, а для крыс – 922,0 мг/кг. 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.

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

4. Динамика распределения, накопления и выведения ФС-1 меченного радиоактивным иодом-131 при однократном введении в организм цыплят подчинялось законам линейной кинетики: лекарственное соединение достаточно быстро всасывалось из желудочно-кишечного тракта в кровь и через 30 минут было определено во всех органах, а максимальное значение его концентрации достигнуто в течение первых трех часов.

5. 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 концентрации 8,3 мг/кг 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.

6. 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 составил 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.

7. Установлено, что применение иодсодержащего лекарственного соединения ФС-1 в экспериментах *in vitro*, *in ovo* и *in vivo* на высокопатогенный штамм А /FPV/Waybrige/78 (H7N7) вируса гриппа птиц при в комбинации с противогриппозными препаратами – осельтамивир, римантадин, рибазол, амиксин оказывал синергетическое действие, характеризующееся повышением их фармакологической активности, усилением ингибирующего действия на вирус. Комбинированное применение ФС-1 сократило продолжительность болезни и повысило 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 соединения ФС-1 в течение семи дней в дозе 26,3 мг/кг обеспечил 100 % сохранение поголовья зараженных вирусом гриппа, что свидетельствует о его 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 в соавторстве Монография «Синергетический эффект нового лекарственного препарата ФС-1 при комбинированном применении с противовирусными препаратами».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO. World health Statistics 2015 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/world-health-statistics-2015.pdf>. – Загл. с экрана.
2. **Бакулин, В. А.** Болезни птиц [Текст] / В. А. Бакулин. – СПб.:, 2006. – С. 76-92.
3. **Кэлнек Б. У.**, Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц [Текст] / Америк, ассоц. патологов птиц; под ред. Б. У. Кэлнека., пер. с англ. И. Григорьева и др.. 10-е изд. – М.: Аквариум Бук, 2003. – С. 672-693.
4. **Борисов, А. В.** Клинические признаки и патологоанатомические изменения при гриппе птиц [Текст] / А. В Борисов, В. Н. Ирза. – РацВетИнформ, 2007. – №3. – С. 7-8.
5. **Гулюкин, М. И.** Основные задачи борьбы с гриппом птиц [Текст] / М. И. Гулюкин, Г. А. Грошева, З. В.Тихонова. Сборник материалов научно-практической конференции. – М.: ГУП «Юго-Восток-Сервис, 2007. – 80 с.
6. **Воронин, Е.С.** Насколько опасен грипп птиц для человека? [Текст] /Е.С. Воронин Сборник материалов научно-практической конференции. – М.: ГУП «Юго-Восток-Сервис, 2007. – 20 с.
7. **Голубничкин, В. П.** Этиопатогенез, диагностики и профилактика смешанных вирусно-бактериальных инфекций птиц [Текст] / В. П. Голубничкин. А. П. Бирманкот, Г. В. Малиниевская. Ветеринарная наука производству, 1985. – №. 23. – С 43-48.
8. **Онищенко, Г. Г.** Эпидемическая ситуация по гриппу, вызванному высокопатогенным вирусом типа А(Н1N1), в Российской Федерации и в мире [Текст] / Г. Г. Онищенко. Журн. Микробиол, 2010. – № 1. – С. 3-10.
9. **Покровский, В. И.** Современные представления об инфекционной патологии и основные направления совершенствования стратегии ее профилактики

[Текст] / В.И. Покровский, Г.Г.Онищенко, Б.Л. Черкасский. Вест. РАМН, 2000. – №1. – С. 3-6.

10. **Мазнев, Н. И.** Энциклопедия лекарственных растений [Текст] / Н. И. Мазнев. – М.: Мартин, 2004. – 496 с.

11. **Носков, Ф. С.** Новая стратегия разработки противовирусных препаратов широкого спектра действия [Текст] / Ф. С. Носков. Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 2002. – Т. 6, № 1. – С. 79-80.

12. **Kilbourne, E. D.** Influenza pandemics of the 20th century [Text] / E. D. Kilbourne. *Emerg. Infect. Dis*, 2006. – Vol. 12, No 1. – P. 9-14.

13. Этиология современного гриппа [Текст] / [О. М. Литвинова, Е. А. Смородинцева, Э. Г. Деева и др]. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика, 2001. – № 1. – С. 5-9.

14. **Иванников, Ю. Г.** Эпидемиология гриппа [Текст] / Ю. Г. Иванников, Ф. Т. Исмагулов. Алма-Ата, 1983. – 204 с.

15. **Саятов, М.Х.** Высокпатогенный грипп птиц. Ситуация в мире и в Казахстане [Текст] / М.Х. Саятов, А.И. Кыдырманов, Н.Г. Ишмухамедова. Биотехнология. Теория и практика, 2006. – №2. – С. 5-13.

16. Эколого-вирусологический мониторинг вируса гриппа А в популяциях диких птиц Казахстана [Текст] / [М.Х. Саятов, А.И. Кыдырманов, К.Х. Жуматов и др]. Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития. Межд. Науч. - практ. конф., посвящ. 50-летию НИИ проблем биол. безопасности. Алматы, 2008. – С. 584-586.

17. Update: isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans-Hong Kong, 1997–1998 [Text] / [T.A. Saw, W. Lim, K. Shortridge, et.al]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1998. – Vol. 46. – P. 1245-1247.

18. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong [Text] / [C.B. Bridges, J.M. Katz, W.H. Seto et.al]. *Journal of Infectious Diseases*, 2000. – Vol. 181, №1. – P. 344-348.

19. Kinetics of neutralizing antibodies in patients naturally infected by H5N1 virus [Text] / [P. Buchy, S. Vong, S. Chu, et al]. PLoS ONE, 2010. – Vol. 5, № 5. – Art. no. e10864.

20. **Львов, Д. К.** Причины и последствия проникновения на территорию России высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N1 [Текст] / Д. К. Львов. Сборник материалов научно-практической конференции -М.: ГУП «Юго-Восток-Сервис», 2007. – с.46.

21. Изоляция штаммов вируса гриппа А/Н5N1 от домашних и диких птиц в период эпизоотии в Западной Сибири (июль 2005 г.) и их депонирование в государственную коллекцию вирусов (08 августа 2005 г) [Текст] / [Д. К. Львов, Г. Г. Онищенко, М. Ю. Щелканов и др]. Вопросы вирусологии, 2006. – С 11-14.

22. Циркуляцию вирусов гриппа типа А среди домашней птицы в предэпизоотический период 2005 года в Новосибирской области [Текст] / [Ю. Г. Юшков, А. Ю. Алексеев, С. И. Золотых и др]. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2006. – № 5. – С. 59-64.

23. Novel reassortant Clade 2.3.4.4 avian influenza A(H5N8) virus in wild aquatic birds, Russia, 2016. [Text] / [D. H. Lee, K. Sharshov, D. E. Swayne, et al]. Emerg Infect Dis, 2017. – Vol. 87 (4). – P. 377-396.

24. РИА Новости. Эксперты объяснили вспышки птичьего гриппа в России 26 июня 2016. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ria.ru/20180626/1523427143.html>. – Загл. с экрана.

25. Опыт проведения орнитологического мониторинга на территории Красноярского края для ранней диагностики гриппа птиц [Текст] / [А.П. Савченко, Н.В. Карпова, В.И. Емельянов и др]. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, 2007. – № 3. – С. 160-164.

26. Циркуляция высокопатогенного вируса гриппа птиц в России в 2014-2015 гг [Текст] / [Марченко В.Ю., Сулопаров И.М., Колосова Н.П. и др]. Проблема особо опасных инфекций, 2016. – С 49-54.

27. WHO. World health Statistics 2018 [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

[https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) – Загл. с экрана.

28. **Гендон, Ю. З.** Пандемия гриппа: можно ли с ней бороться? [Текст] / Ю. З. Гендон. Вопросы вирусологии, 1995. – № 2. – С.8-12.
29. **Карпухин, Г. И.** Грипп: Руководство для врачей [Текст] / Г. И. Карпухин. – СПб.: Гиппократ, 2001. – 360 с.
30. **Belshe, R. B.** Drug resistance and mechanisms of action on influenza A viruses [Text] / R. B. Belshe, A. J. *Науч. Ж. Respir. Dis*, 1989. – V. 10. – P.952-961.
31. Influenza [Text] // *Weekly Epidemiol. Rec*, 2004. Influenza [Text] // *Weekly Epidemiol. Rec*, 2004. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5425a3.htm> – Загл. с экрана.
32. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. [Text] / [R. Gao, B. Cao, Y. Hu, et al]. *N Engl J Med*, 2013. – Vol. 368, – P. 1888–1897.
33. **Chen, Y.** Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. [Text] / Y. Chen, W. Liang, S. *The Lancet*, 2013; published online April 25, 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60903-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60903-4).
34. **Кириллов, В. Б.** Прогнозирование последствий смоделированной вспышки гриппа А(Н7N9) на территории Российской Федерации [Текст] / В.Б.Кириллов, С.Л.Кириллова, С.В.Борисевич. Пробл. особо опасных инф, 2016. – № 2. – С 50–52.
35. Measurement of antibodies to avian influenza virus A(H7N7) in humans by hemagglutination inhibition test [Text] // [A. Meijer, A. Bosman, van de E. E. Kamp, et al.] *J Virol Methods*, 2006. – Vol. 132, № 1-2. – P. 113-20.
36. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [Text] / [M. Koopmans, B. Wilbrink, M. Conyn et al]. *Lancet*, 2004; – Vol. 363. – P. 587-593.
37. Pandemic influenza's 500th anniversary [Text]. / [D. M. Morens, J. K. Taubenberger, G. K. Folkers, et al]. / *Clinical Infectious Diseases*, 2010. – V. 51(12). – P. 1442– 1444.

38. Lack of evidence for human-to-human transmission of avian influenza A (H9N2) viruses in Hong Kong, China 1999 [Text] / [T. M. Uyeki, Y. H. Chong, J. M. Katz et al]. *Emerg Infect Dis*, 2002. – Vol. 8, № 2. – P.154-159.
39. Human infection with influenza H9N2 [Text] / [M. Peiris, K. Y. Yuen, C. W. Leung et al]. *Lancet*, 1999. – Vol. 354. – P. 916–917.
40. **Potter, Ch.W.** Chronicle of Influenza Pandemics. [Text] / Ch. W. Potter. Chapter 1. Textbook of Influenza. Blackwell Science Ltd, London, 1998. – P.3-18.
41. Receptor binding and cell entry by influenza viruses. [Text] / D. A. Steinhauer, N. K. Sauter, J. J. Skehel, D.C. Wiley. *Semin.Virol*, 1992. – V.3. – P.91-100.
42. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish influenza virus" [Text] / [J. K. Taubenberger, A. H. Reid, A. E. Kraft, et al]. *Science*, 1997. – V.275. –P. 1793-1796.
43. Evolution and ecology of influenza A viruses. [Text] / [R. G. Webster, W. J. Bean, O. T. Corman., et al]. *Microbiol.Rev*, 1992. –V. 56. – P. 152-179.
44. **Kinchington, D.** Design and testing of antiviral compounds [Text] / D. Kinchington, H. Kangro, D. Jeffries. In *Medical Virology*: Oxford University Press, 1997. – P. 147-160.
45. **Monto, A.S.** Efficacy and safety of neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B infections [Text] / A. S. Monto, D. M. Fleming, D. Henry. *J. Infect. Dis*, 1999. –V. 180(2). – P 254-261.
46. **Monto, A. S.** Implications of viral resistance to amantadine in control of influenza A [Text] / A. S. Monto, N. Arden. *Clin.Infect.Dis*, 1992. – V. 15. – P.362-367.
47. Санация и дезодорация животноводческих помещений термовозгонными аэрозолями эфирных масел. [М. А. Симецкий, А. В. Каштанов, А. В. Баринов, и др]. Тр. ВНИИВС, М.: 122. ВНИИВС, 2000, т. 108, С. 34-39.
48. Грипп: современные диагностические возможности и терапевтические подходы [Текст] / [Е. В. Эсауленко, А. А. Го, А. А. Сухоруки др]. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. Сер. Библиотека педиатрического университета. Санкт-Петербург, 2015. – 48с.

49. Федеральные клинические рекомендации Российского респираторного общества по диагностике и лечению тяжелых форм гриппа [Текст] / [А. Г. Чучалин, С. Н. Авдеев, А. Л. Черняев, и др]. Пульмонология, 2014. – № 5. – С. 11-19.
50. **Smith, M.J.** Evidence for the diagnosis and treatment of acute uncomplicated sinusitis in children: a systematic review [Text] / M. J. Smith. Pediatrics, 2013. – Vol. 132(1). – P. 284-296.
51. Йод в ветеринарии [Текст] / [В. А. Антипов, А. Х. Шантыз, А. В. Егунова и др]. – Краснодар: КубГАУ, 2011. – 306 с.
52. **Gani, R.** Potential Impact of Antiviral Drug Use during Influenza Pandemic [Text] / R.Gani, H.Hughes, T.Fleming. Emerg. Infect. Dis, 2005. – Vol.11(9). – P. 1355-1362.
53. **Киселев, О. И.** Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика [Текст] О. И. Киселев, Л. М. Цыбалова, В. И. Покровский. – М., 2012. – 496 с. ISBN: 978-5-9986-0096-8
54. Рекомендации по диагностике и лечению гриппа у взрослых больных (с моделями пациентов) [Текст] / [Н. А. Малышев, Е. В. Эсауленко, А. А. Яковлев и др]. Современная медицина, 201. – С. 2-56.
55. **Головко, Ю. С.** Современные методы поиска новых лекарственных соединений [Текст] / Ю. С. Головко, О. А. Ивашкевич, А. С. Головко. Вестник БГУ, 2012. – № 1. – С. 7-15.
56. Йод и его препараты как антисептики с широким спектром действия [Текст] / [В. Я. Никитин, Н. Х. Кучеру, П. И. Кузьменко, В. В. Винников]. Вестник ветеринарии, 1999. – № 1. – С. 3-52.
57. **Егунова, А. В.** Эффективность йодсодержащих препаратов при акушерско-гинекологической патологии [Текст] / А. В. Егунова. Ветеринария, 2002. – № 8. – С. 33-35.
58. **Мохнач, В. О.** Йод и проблемы жизни [Текст] / В. О. Мохнач. – Л.: Наука, 1974. – 254 с.

59. **Львов, Д. К.** Новые и вновь возникающие вирусные инфекции [Текст] / Д.К. Львов. *Вопр. Вирусол*, 2000. – Т. 45. – № 4. – С. 4-7.
60. Межпопуляционные взаимодействия в системе вирусы гриппа А животные - человек [Текст] / хД. К. Львов, С.С. Ямникова, А.Д. Забережный, и др]. *Вопр. Вирусол*, 2005. – Т. 50. – №4. – С. 4-11.
61. Высокпатогенный грипп птиц А(Н5N1): ситуация в 2009-2012 гг. и прогноз пандемического потенциала [Текст] / [А.М. Шестопапов, Н.В.Кихтенко, А.Н.Сергеев и др]. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2013. – Вып. 1. – С. 44-50.
62. **Ferguson, N. M.** Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. [Text] / [N. M. Ferguson, Derek A.T. Cummings, S. Cauchemez et al]. *Nature*, 2005, – 437. – P 209–214.
63. Finding the real case-fatality rate of H5N1 avian influenza [Text] / [F. Li, B. Choi, Sly T, A. Pak]. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 2008. – Vol. 62, № 6. – P. 555- 559.
64. Surveillance of Influenza in Indonesia, 2003-2007 [Text] / [H. Kosasih, Roselindaa Nurhayati, A. Klimov, et al]. *Influenza and other Respiratory Viruses*, 2013. – Vol. 7, № 3. – P. 312-320.
65. **Wang, T. T.** Seroevidence for H5N1 influenza infections in humans: meta-analysis [Text] / T.T. Wang, M.K. Parides, P Palese. *Science*, 2012. – Vol. 335, № 6075. – P.1463.
66. Update: isolation of avian influenza A(H5N1) viruses from humans-Hong Kong, 1997–1998 [Text] / [T.A. Saw, W. Lim, K. Shortridge, et.al]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1998. – Vol. 46. – P. 1245-1247.
67. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong [Text] / [C.B. Bridges, J.M. Katz, W.H. Seto et.al]. *Journal of Infectious Diseases*, 2000. – Vol. 181, №1. – P. 344-348.
68. Kinetics of neutralizing antibodies in patients naturally infected by H5N1 virus [Text] / [P. Buchy, S. Vong, S. Chu, et al]. *PLoS ONE*, 2010. – Vol. 5, № 5. – Art. no. e10864.

69. ВОЗ. Human infections with avian influenza A(H7N9) virus. 2014. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9.
70. Serological reports of human infections of H7 and H9 avian influenza viruses in northern China [Text] / [N Jia, S. J. de Vlas, Y.-X. Liu, et al]. Journal of Clinical Virology, 2009. – Vol. 44, № 3. – P. 225-229.
71. Serological Survey of Antibodies to H5, H7 and H9 Avian Influenza Viruses amongst the Duck-Related Workers in Beijing, China [Text] / [P. Yang, C. Ma, W. Shi, et al]. PLoS ONE, 2012. – Vol. 7, № 11. - art. no. e50770.
72. **Wong, S. S.** Avian Influenza virus infection in humans [Text] / S. S. Wong, K. Y. Yuen. Chest, 2006. – Vol. 129. – P. 156-168.
73. **G**Antigenic and henetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans [Text] / [R. J. Garten, C. T. Davis, C. A. Russell et al]. Science, 2009. – Vol. 325 (5937). – P.197-201.
74. Изоляция 24.05.2009 года и депонирование в Государственную коллекцию вирусов первого штамма A/Moscow/01/2009(H1N1) sw1, подобного свиному вирусу A(H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 года больного в г. Москве [Текст] / [Д. К. Львов, Е. И. Бурцева, А. Г. Прилипов и др]. Вопросы вирусологии, 2009. – № 5. – С. 10-15.
75. Reassortant pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom [Text] / [W. A. Howard, S. C. Essen, B. W. Strugnell et al]. // Emerging Infectious Diseases, 2011. – Vol. 17(6). – P. 1049-1052.
76. **Yewdell, J. W.** Viva la Revolución: Rethinking Influenza A Virus Antigenic Drift [Text] / J. W. Yewdell. Current Opinion in Virology, 2011. – Vol. 1(3): – P. 177-183.
77. Роспотребнадзор. Меры по профилактике гриппа птиц. 2019. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.rospotrebнадzor.ru/directions/epid_nadzor/145961/.– Загл. с экрана.
78. Опыт проведения орнитологического мониторинга на территории Красноярского края для ранней диагностики гриппа птиц [Текст] / [А.П. Савченко,

Н.В. Карпова, В.И. Емельянов и др]. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, 2007. – № 3. – С. 160-164.

79. Изоляция вирусов гриппа А (Orthomyxoviridae, Influenza A Vims), Дхори (Orthomyxoviridae, T1wgotovirus) и болезни Ньюкасла (Paramyxoviridae, Avulavirus) на острове Малый Жемчужный в северо-западной части акватории Каспийского моря [Текст] / [К. Б. Яшкулов, М. Ю. Щелканов, С. С. Львов и др]. Вопросы вирусологии, 2008. – Т. 53, № 3. – С. 34- 40.

80. Птичий грипп в Алтайском крае [Текст] / [И. П. Салдан, Л. А. Чевтаева, Н. А. Разумовская, О. А. Меркушев]. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2006. – № 5. – С. 104-105.

81. Циркуляцию вирусов гриппа типа А среди домашней птицы в предэпизоотический период 2005 года в Новосибирской области [Текст] / [Ю. Г. Юшков, А. Ю. Алексеев, С. И. Золотых и др]. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2006. – № 5. – С. 59-64.

82. Результаты мониторинга высокопатогенного вируса гриппа H5 N1 субтипа на территории республики Тыва [Текст] / [А. В. Зайковская, Л. К. Сарыглар, С. Г. Сайфутдинова и др]. Сборник статей, посвященных 90-летию службы «Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения», Новосибирск, 2012, – С. 326-330.

83. Комплексный экологовирологический мониторинг на территории Приморского Края в 2003-2006 гг. [Текст] / [М. Ю. Щелканов, В. Ю. Ананьев, Д. И. Львов и др]. Вопросы вирусологии, 2007. – Т. 52, № 5. – С.37-48.

84. Генотипирование вирусов гриппа А, выделенных от диких птиц на юге Западной Сибири в 2011 году [Текст] / [А.С. Донченко, Ю.Г. Юшков, М.В. Сивай и др]. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 2012. № 6. – С.84–89.

85. **Гужгулова Г.** Генетическая эволюция и происхождение высокопатогенного вируса гриппа птиц А серотипы H5N2 и H5N8 в Азии, Европе и Северной Америке [Текст] / Г. Гужгулова, Г. Стоименов. Журнал: Ветеринарная сборка, 2015. – С 20-22.

86. Influenza A(H5N8) virus similar to strain in Korea causing highly pathogenic avian influenza in Germany [Text] / [T. Harder, S. Maurer-Stroh, A. Pohlmann, et al]. *Emerg Infect Dis*, 2015; – Vol. 21. – P. 860–863.

87. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014 [Text] / [J. Jeong, H. M. Kang, E. K. Lee, et al]. *Vet. Microbiol*, 2014. – Vol. 173. – P. 249–257.

88. Influenza A viruses in migrating wildaquatic birds in North America [Text] / [S. Krauss, D. Walker, S. Paul Pryor, L. Niles]. *Vector-Borneand Zoonotic Diseases*, 2004. – Vol. 4. – P. 177–189.

89. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds [Text] / [D. H. Lee, M. K. Torchetti, K. Winker, et al]. *J. Virol*, 2015. – Vol. 89. – P. 6521-6524.

90. Lack of virological and serological evidence for continued circulation of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in wild birds in the Netherlands, 14 November 2014 to 31 January 2016 [Text] / [M. J. Poen, J. H. Verhagen, R.J. Manvell, et al]. *Euro Surveill*, 2016. – Vol. 21 (4). – P. 30349- 30364.

91. Outbreaks among wild birds and domestic poultry caused by reassorted influenza A(H5N8) clade 2.3.4.4 viruses, Germany [Text] / [A. Pohlmann, E. Starick, T. Harder, et al]. *Emerg Infect Dis*, 2017. – Vol. 23 (4). – P. 633-636.

92. Марченко, В.Ю. Выделение высокопатогенного вируса гриппа А субтипа H5N8 на территории Республики Саха (Якутия) [Текст] / В. Ю. Марченко, И. М. Сулопаров, А. В. Шиповалов, В. Н. Михеев, А. Б. Рыжиков. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*, 2015. – № 2 – С. 38–43. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-48-54>.

93. Ferguson, N. M. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. [Text] / N. M. Ferguson, Derek A.T. Cummings, Simon Cauchemez, et al. *Nature*, 2005, – 437. – P 209–214.

94. Surveillance of Influenza in Indonesia, 2003-2007 [Text] / [H. Kosasih, Roselindaa Nurhayati, A. Klimov, et al]. *Influenza and other Respiratory Viruses*, 2013. – Vol. 7, № 3. – P. 312-320.

95. Finding the real case-fatality rate of H5N1 avian influenza [Text] / [F. Li, B. Choi, Sly T, A. Pak]. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 2008. – Vol. 62, № 6. – P. 555- 559.

96. **Ortiz, J. R.** Lack of evidence of avian-to-human transmission of avian influenza A (H5N1) virus among poultry workers, Kano, Nigeria, 2006 [Text] / J. R. Ortiz, M. A. Katz, M. N. Mahmoud. *J Infect Dis*, 2007. – Vol. 196. – P. 1685-1691.

97. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome [Text] / [R.A. Fouchier, P. Schneeberger, F.W. Rozendaal, et al]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. – Vol. 101. – P. 1356–1361.

98. Food markets with live birds as source of avian influenza [Text] / [M. Wang, B. Di, D. H. Zhou, et al]. *Emerg Infect Dis*, 2006. – Vol. 12. – P. 1773-1775.

95. The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications [Text] / [I. Capua, F. Mutinelli, M. D. Pozza, et al]. *Acta Trop*, 2002. – Vol. 83, № 1. – P. 7-11.

100. Measurement of antibodies to avian influenza virus A(H7N7) in humans by hemagglutination inhibition test [Text] / [A. Meijer, A. Bosman, van de E. E. Kamp, et al]. *J Virol Methods*, 2006. – Vol. 132, № 1-2. – P. 113-20.

101. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands [Text] / [M. Koopmans, B. Wilbrink, M. Conyn et al]. // *Lancet*. 2004; – Vol. 363. – P. 587-593.

102. Pandemic influenza's 500th anniversary [Text]. / [D. M. Morens, J. K. Taubenberger, et al]. / *Clinical Infectious Diseases*, 2010. – V. 51(12). – P. 1442– 1444.

103. **Neumann, G.** The first influenza pandemic of the new millennium [Text]. / G. Neumann, Y. Kawaoka. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2011. – V. 5(3). – P. 157–166.

104. **Taubenberger, J. K.** Influenza: the once and future pandemic [Text]. / J. K. Taubenberger, D. M. Morens. *Public Health Reports*, 2010. – V. 125, Suppl. 3. – P. 16–26.

105. **Киселев, Л. Л.** Лев Зильбер – создатель отечественной школы медицинских вирусологов [Текст]. / Л. Л. Киселев, Г. И. Абелев, Ф. Л. Киселев. Вестник Российской академии наук, 2003. – Т. 73(7). – С. 647–659.
106. Lack of evidence for human-to-human transmission of avian influenza A (H9N2) viruses in Hong Kong, China 1999 [Text] / [T. M. Uyeki, Y. H. Chong, J. M. Katz et al]. Emerg Infect Dis, 2002. – Vol. 8, № 2. – P.154-159.
107. Human infection with influenza H9N2 [Text] / [M. Peiris, K. Y. Yuen, C. W. Leung et al]. Lancet, 1999. – Vol. 354. – P. 916–917.
108. Serological evidence for avian H9N2 influenza virus infections among Romanian agriculture workers [Text] / [A. Coman, D. N. Maftai, W. S. Krueger, et al]. J Infect Public Health, 2013. – Article in Press <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2013.05.003>.
109. **Hadipour, M. M.** Seroprevalence of H9N2 avian influenza virus in human population in Boushehr province, Iran [Text] / M. M. Hadipour. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 2011. – Vol. 6, № 2. – P. 196-200.
110. Avian influenza H9N2 seroprevalence among poultry workers in Pune, India, 2010 [Text] / [S. D. Pawar, B. V. Tandale, C.G. Raut, et al]. PLoS ONE, 2012. – Vol. 7, № 5. - art. no. e36374.
111. Seroprevalence of avian influenza H9N2 among poultry workers in Shandong Province, China [Text] / [R. Huang, A-R. Wang, Z-H. Liu, et al]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013. - Article in Press. [cited 29 Aug 2013]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23733318/>
112. **Guo, Y.** A strain of influenza A H9N2 virus repeatedly isolated from human population in China [Text] / Y. Guo, J. Xie. M. Wang. Zhonghua Shi Yan, He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2000. – Vol. 14. – P. 209–212.
113. World Health Organization. Influenza A (H9N2) in Hong Kong Special Administrative Region of China (SAR). [cited 29 Aug 2013]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/updates/en.
114. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003 [Text] / [K. M. Butt, G. J. Smith, H. Chen, et al]. J Clin Microbiol, 2005. – Vol. 43. – P. 5760–5767.

115. Potential infections of H5N1 and H9N2 avian influenza do exist in Guangdong populations of China [Text] / [C. Y. Lu, J. H. Lu, W. Q. Chen, et al]. Chin Med J (Engl), 2008. – Vol. 121, № 20. – P. 2050-2053.

116. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts [Text] / [J. M. Katz, W. Lim, C. B. Bridges, et al]. Journal of Infectious Diseases, 1999. – Vol. 180, № 6. – P. 1763-1770.

117. World Health Organization International Avian Influenza Investigation Team, Vietnam, Nguyen TL, Wilina L. Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004 [Text] / Emerg Infect Dis, 2005. – Vol. 11. – P. 210-215.

118. Avian influenza H5N1 and healthcare workers [Text] / [C. Schultsz, V. C. Dong, N. V. Chau, et al]. Emerg Infect Dis, 2005. – Vol. 11. – P.1158.

119. **Okabe, N.** Japan: serological investigation among humans involved in the mass culling operation [Text] / N. Okabe, M. Tashiro. FIC (Flu in China), 2005. – [cited 29 Aug 2013]. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.flu.org.cn/en/news-7398.html> – Загл. с экрана.

120. Prevalence of antibodies against avian influenza a (H5N1) virus among cullers and poultry workers in Ho Chi Minh City, 2005 [Text] / [C. Schultsz, V. D. Nguyen, T. Hai le, et al]. PLoS One, 2009. – Vol. 4. – P. e7948.

121. **Каримова, Т. В.** Итоги работы по выявлению РНК, специфических антител против вируса гриппа А (H5N1) в материале от людей [Текст] / Т. В. Каримова, Т. А. Малявина, О. Ю. Якунина. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2006. – № 5. – С. 82-83

122. **Klenk, H. D.** The classification and nomenclature of viruses [Text] / H. D. Klenk, N. Y. Cox. Sixth ICTV Report, 1998. – Vol. 166. – P. 1-2.

123. Грипп и гриппоподобные инфекции включая особо опасные формы гриппозной инфекции [Текст] Фундаментальные и прикладные аспекты изучения. / [В.И. Покровский, Д.К. Львов, О.И. Киселев, Ф.И. Ершов]. – СПб.:, 2008. – 109 с.

124. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens [Text] / [Ito Toshihiro, Goto Hideo, Yamamoto Eiji et al]. *J. Virol*, 2001. – V.75. – N9. – P.4439-4443.

125. **Kilbourne, E. D.** Эпидемиология гриппа [Текст] / В кн. Вирусы гриппа и грипп. Под ред Е.Д. Kilbourne. – Москва. – «Медицина», 1978. – С.526-580.

126. **Сморodinцев, А. А.** Грипп и его профилактика [Текст]. / А.А. Смородицев. – Л. – Медицина, 1984. –384 с.

127. **Гринбаум, Е. Б.** Полиморфизм популяции современных вирусов гриппа А и В человека [Текст] / Е. Б. Гринбаум, О. М. Литвинова, А. И. Банников. Вестник РАМН, 1994. – № 9. – С.36-41.

128. **Иванова, В. Т.** Особенности вирусов гриппа, обусловивших эпидемический подъем заболеваемости в России в 2002-2003 гг. Возврат в циркуляцию вирусов гриппа, подобных В/Виктория/2/87 [Текст] / В. Т. Иванова, Е. И. Бурцева, А. Н. Слепушкин. Вопросы вирусологии, 2004. – № 3. – С.12-14.

129. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 [Text] / [P. A. Rota, T. R. Wallis, M. W. Harmon, et al]. *Virology*, 1990. – Vol. 175. – P. 59–68.

130. Antigenic and genetic characterization of two hemagglutinins recent cocirculating strains of influenza type B virus [Text] / [P. A. Rota, M. L. Hemphill, et al]. *J. Gen. Virol*, 1992. – Vol. 73. – P. 2737-2742.

131. **McCullers, J. A.** Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003 [Text] / J. A. McCullers, T. Saito, A. R. Iverson. *J Virol*, 2004. – Vol. 78. – P.12817-12828.

132. **Guo, Y. J.** Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus [Text] / Y. J. Guo. *Journal of General Virology*, 1983. – Vol. 64. – P. 177-182.

133. **Yuanji, G.** Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China [Text] / G. Yuanji, U. Desselberger G. Yuanji. *Journal of General Virology*, 1984. –Vol. 65. – P. 1857-1872.

134. Патогенез тяжёлых форм гриппа. [Текст] / [О. И. Киселёв, В. А. Исаков, Б. П. Шаронов, В. П. Сухинин]. Вестник Российской академии медицинских наук, 1994. – № 9. – С. 32-36.
135. **Fukuyama, S.** The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors [Text] / S. Fukuyama, Y. Kawaoka. Current Opinion in Immunology, 2011. – Vol. 23(4). – P. 481- 486.
136. **Щелканов, М. Ю.** Патогенез гриппа: механизмы модуляции белками возбудителя [Текст] / М. Ю. Щелканов. Журнал инфектологии, 2015. – № 7(2). – С. 31-45.
137. WHO. World health Statistics 2018 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) – Загл. с экрана.
138. Патогенетические аспекты гриппа в период эпидемии, вызванной вирусом А/Н1N1v в 2009- 2010 гг. по аутопсии [Текст] / В.А. Цинзерлинг, С.Л.Воробьев, В.В. Зарубаев и др]. // Архив патологии, 2011. – № 73(6). – С. 21-25.
139. Reassortant pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom. [Text] / [W. A. Howard, S. C. Essen, B. W. Strugnell et al]. // Emerging Infectious Diseases, 2011. – № 17(6). – P. 1049-1052.
140. **Yewdell, J. W.** Viva la Revolución: Rethinking Influenza A Virus Antigenic Drift. / J. W. Yewdell. Current Opinion in Virology, 2011. – Vol. 1(3). – P. 177-183.
141. Бюллетень Всемирной организации здравоохранения [Текст] / 2012. Вып. 90. – № 4. – С. 245-320.
142. **Карпова, Л. С.** Сравнение эпидемий гриппа в России 2009 и 2011 годов, вызванных пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1) [Текст] / [Л. С. Карпова, Е. И. Бурцева, Н. М. Поповцева, Т. П. Столярова]. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2011. – № 5 (60). – С. 6–15.
143. Результаты многолетнего изучения популяционного иммунитета к вирусам гриппа А(Н1N1) pdm09, А(Н3N2) и в у взрослого населения России [Текст] / [А.А. Коншина, Е.А. Соминина, К.А. Смородинцева, И.Ю. Столяров]. – СПб.: Инфекция и иммунитет, 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 27–33

144. **Hannoun, C.** Immunogenicity and protective efficacy of influenza vaccination [Text] / C. Hannoun, F. Megas, J. Piercy. *Virus Research*, 2004. – Vol. 103, No.1-2. – P.133-138.
145. **Palache, A. M.** Influenza vaccines: a reappraisal of their use [Text] / A. M. Palach. *Drugs*, 1997. – Vol. 54, No. 6. – P. 841-856.
146. New vaccines against influenza virus [Text] / [Y. T. Lee, K. H. Kim, E. J. Ko, et al]. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014, – Vol. 3, No. 1. – P. 12-28.
147. **Hovden, A.O.** Influenza: the virus and prophylaxis with inactivated influenza vaccine in “at risk” groups, including COPD patients [Text] / A.O. Hovden, R. J. Cox, L. R. Haaheim. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2007. – Vol. 2, No 3. – P. 229-240.
148. Эффективность нового украинского препарата Амизон в комплексном лечении больных гриппом [Текст] / [В. М. Фролов, А. Ф. Фролов, Ю. Г. Пустовой, И. В. Лоскутова]. *Украинский химиотерапевтический журнал*, 2000. – №1 (5). – С. 25-28.
149. **Фролов, А. Ф.** Эффективность Амизона в лечении и профилактике вирусных инфекций (к 10-летию применения препарата в клинической практике) [Текст] / А. Ф. Фролов, В. М. Фролов // *Украинский медицинский бюллетень*, 2005. – №5 (49). – С. 75-80.
150. **Живодеров С.П.** Оценка эффективности препарата на основе эндонуклеазы бактериальной в отношении вируса инфекционного ларинготрахеита птиц [Текст] / Живодеров С.П., Келин Л.В. *Журнал "Ценовик. Сельскохозяйственное обозрение"*, 2015. – 136 с.
151. **Борисов, Л. Б.** Медицинская микробиология, вирусология, иммунология [Текст] / Л. Б. Борисов. – М.: Медицинское информационное агентство, 2005. – 736 с.
152. **Букринская, А. Г.** Репродукция вирусов [Текст] / под ред. В. М. Жданова, С. Я. Гайдамовича // *Общая и частная вирусология: в 2-х т.* – М.: Медицина, 1982. – Т. 2. – С.160-213.

153. **Закстельская, Л. Я.** Вирусы гриппа [Текст] / под ред. В. М. Жданова, С. Я. Гайдамовича. Общая и частная вирусология: в 2-х т. – М.: Медицина, 1982. – Т. 2. – С. 139-180.
154. **Жданов, В. М.** Эволюция вирусов [Текст] / В. М. Жданов. – М.: Медицина, 1990. – 372 с.
155. UCSF Chimera-A Visualization System for Exploratory Research and Analysis [Text] / [E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, et al]. J. Comput. Chem, 2004. – Vol. 25, No 13. – P. 1605-1612.
156. **Харкевич, Д. А.** Фармакология [Текст]: учеб. для вузов / Д. А. Харкевич. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 908 с.
157. **Михайлов, И. Б.** Клиническая фармакология [Текст]: учеб. для студентов педиатрических и лечебных фак. мед. вузов / И. Б. Михайлов. – СПб.: Филиант, 1998. – 496 с.
158. Мониторинг чувствительности выделенных в России эпидемических штаммов вируса гриппа к этиотропным химиопрепаратам [Текст] / [Е. И. Бурцева, Е. С. Шевченко, Н. В. Белякова и др]. // Вопр. Вирус, 2009. – № 5. – С. 24-28.
159. **Машковский, М. Д.** Лекарственные препараты [Текст]: пособие для врачей / М. Д. Машковский. – М.: Новая Волна, 2005. – 1200 с.
160. **Страчунский, Л. С.** Современная антимикробная химия [Текст]: руководство для врачей / Л. С. Страчунский, С. Н. Козлов. – М.: Боргес, 2002. – 432 с.
161. Молекулярно-генетический анализ эпидемических штаммов вируса гриппа А, характеризующихся различной чувствительностью к римантадину, на основе нуклеозидной последовательности М2-белка [Текст] / [М. Ротанов, Т. В. Гребенщикова, Е. И. Буцева и др]. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2007. – Т. 9, № 4. – С. 292-297.
162. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers [Text] / [S. D. Cady, K. Schmidt-Rohr, J. Wang, et al]. Nature, 2010. – Vol. 463. – P. 689-692.

163. **Спасов, А. А.** Фармакологические и токсикологические свойства производных адамантана [Текст] / А. А. Спасов, Т. В. Хамидова, Л. И. Бугаев. Хим.-фарм. журнал, 2000. – № 1. – С. 3-8.
164. **Столяров, З. Е.** О механизме антивирусной активности римантадина [Текст] / З. Е. Столяров, А. Г. Федорчук, Л. А. Прицепа. Хим.-фарм. Журнал, 1993. – Т. 27, № 9. – С. 4-8.
165. **Киселева, И. В.** Влияние римантадина на развитие токсикоза, вызванного различными штаммами вируса гриппа [Текст] / И. В. Киселева. Вопр. Вирусол, 1981. – № 5. – С. 541-543.
166. **Balfour, H.** Antiviral Drugs [Text]: Drug Therapy / H. Balfour. New Engl. J. Med, 1999. – Vol. 340. – P. 1255-1268.
167. Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin *in vivo* against susceptible and amantadine-resistant influenza A viruses [Text] / [J. T. Nguyen, D. F. Smee, D. L. Barnard, et al]. PloS One, 2012. – Vol. 7, No 1. – P. 93-126.
168. Ribavirin: A review of antiviral efficacy [Text] / [R. Sidwell, G. Pandalai, et al]. Recent Res. Dev. Antimicrob. Agents and Chemother, 1996. – Vol. 1. – P. 219-256.
169. Triple combination antiviral drug (TCAD) composed of amantadine, oseltamivir, and ribavirin impedes the selection of drug-resistant influenza A virus [Text] / [J. D. Hoopes, E. M. Driebe, E. Kelley, et al]. PloS One, 2011. – Vol. 6, No 12. – P. 458-497.
170. *In vivo* ribavirin activity against severe pandemic H1N1 Influenza A/Mexico/4108/2009 [Text] / [T. Rowe, D. Banner, A. Farooqui, et al]. J Gen Virol, 2010 – Vol. 91. – P. 898-906.
171. Effect of phosphonic acid analogs of acyclovir and gancyclovir on *in vitro* cytomegalovirus infections [Text] / [R. Sidwell, J. Huffman, M. Barnard, et al]. Nucleotides and Nucleosides, 1989. – Vol. 8. – P. 833-836.
172. **Крылов, Ю. Ф.** РЛС. Энциклопедия лекарств [Текст] / Ю. Ф. Крылов. – М.: РЛС-2001, 2001. – 1503 с.

173. Арбидол – новое средство для профилактики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций у детей [Текст] / [А. Л. Беляев, Е. И. Бурцева, А. Н. Слепушкин и др]. Вест. РАМН, 1996. – Т. 3. – С. 34-37.

174. Механизмы иммуномодулирующего действия арбидола [Текст] / [Р. Г. Глушков, Т. А. Гуськова, Л. Ю. Крылова и др]. Вест. РАМН, 1999. – № 3. – С. 36-40.

175. **Глушков, Р. Г.** Арбидол-иммуномодулятор, индуктор интерферона, антиоксидант [Текст] / Р. Г. Глушков, Т. А. Гуськова. – М.: Тимотек, 1999. – 93 с.

176. Клиническая аппликация иммуномодулирующих свойств Арбидола при ОРВИ [Текст] / [О. И. Кубарь, Л. А. Степанова, Л. С. Сафонова и др]. IV Рос. Нац. Конгресс «Человек и Лекарство», 1997. – С. 269.

177. Арбидол-лекарство для лечения и профилактики гриппа и других ОРВИ [Текст] / [И. С. Николаева, Т. А. Гуськова, В. В. Петерс и др]. I Рос. Нац. Конгресс «Человек и лекарство», 1992. – С. 293.

178. **Шумилов, В. И.** Эффективность арбидола в профилактике и лечении острых респираторных инфекций у военнослужащих [Текст] / В. И. Шумилов, А. М. Шустер, С. П. Лобастов. Воен.-мед. журнал. 2001, – Т. 323, № 3. – С. 51-53.

179. Осельтамивир (тамифлю) и возможность его применения при пандемии гриппа [Текст] / [Р. Дутковски, Ф. Хоффманн-Ля Рош, Дж. Смит и др]. Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2008. – № 1. – С. 91-92.

180. Эффективность осельтамивира при гриппе у взрослых во время эпидемического подъема заболеваемости в России в сезоне 2006-2007 гг. [Текст] / [Л. В. Колобухина, Л. Н. Меркулова, Е. И. Бурцева и др]. Вопр. Вирусол, 2008. – № 4. – С. 23-26.

181. Neuraminidase inhibitors for treatment of Influenza A and B infections [Text] / [A. G. Winqvist, K. Fukuda, C. B. Brings, et al]. MMWR, 1999. – Vol. 48. – P. 1-9.

182. **Hayden, F. G.** Antiviral for influenza: historical perspectives and lessons learned [Text] / F. G. Hayden. Antiviral research, 2006. – Vol. 71. – P. 372-378.

183. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized, controlled trial [Text] / [J. J. Treanor, F. G. Hayden, P. S. Vrooman, et al]. JAMA, 2000. – Vol. 283. – P. 1016-1024.

184. Maximising benefits of influenza treatment with oral oseltamivir – results of the IMPACT study [Text] / [F. Aoki, M. Macleod, P. Paggiaro, et al]. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000 Sept 17-20, Toronto, Ontario, Canada. – Toronto, 2000. – Abstract 978.

185. Oral oseltamivir rapidly delivers active drug levels to middle ear and sinuses in humans [Text]. / [Kurowski M, Barrett J, Waalberg E, et al]. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Ontario, Canada, 2000. – Abstract 509.

186. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial [Text] / [K. G. Nicholson, F. Y. Aoki, A. D. Osterhaus, et al]. Lancet, 2000. – Vol. 355. – P. 1845-1850.

187. Oral oseltamivir treatment of influenza in children [Text] / [R. J. Whitely, F. G. Hayden, K. S. Reisinger, et al]. Pediatr Infect Dis J, 2001. – Vol. 20, No 2. – P. 127-133.

188. **Gubareva, L. V.** Characterization of influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) virus in a mouse model and protective effect of zanamivir on H5N1 infection in mice [Text] / L. V. Gubareva, J. A. McCullers. J. of Infect. Dis, 1998. – Vol. 178. – P. 1592-1596.

189. Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection [Text] / [C. Y. Tai, P. A. Escarpe, W. Li, R. W. Sidwell, et al]. Antimicrob Agents Chemother, 1998. – Vol. 42, No 3. – P. 640-646.

190. Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of oseltamivir and zanamivir [Text] / [S. Bantia, C. D. Parker, S. L. Ananth, et al]. Antimicrob. Agents Chemother, 2001. – V. 45, No 4. – P. 1162-1167.

191. Comparison of efficacies of RWJ- 270201, zanamivir and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses [Text] / [E. A. Govorkova, I. A. Leneva,

O. G. Goloubeva, et al]. Antimicrob. Agents Chemother, 2001. – Vol. 45, No 10. – P. 2723-2732.

192. Intravenous zanamivir in critically ill patients due to pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus [Text] / [L. Wijaya, Y. Y. Chua, L. Cui, et al]. Singapore Med. J, 2011. – Vol. 52, No 7. – P. 481-485.

193. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant Schefflera heptaphylla [Text] / [Y. Li, R. Jiang, L. S. Ooi, et al]. Phytother. Res, 2007. – V. 21. – P. 466-470.

194. Structure and *in vitro* antiviral activity of sesquiterpene glycosides from Calendula arvensis [Text] / [De N. Tommasi, C. Pizza, C. Conti, et al]. J. Nat. Prod, 1990. – Vol. 53, No 4. – P. 830-835.

195. Действующее вещество препарата гипорамин [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.hpvinfo.ru/manuals/hiporhaminum/> – Загл. с экрана.

196. **Корсун, В. Ф.** Фитотерапия: традиции российского травничества [Текст]: новейший медицинский справочник / В. Ф. Корсун, Е. В. Корсун. – М.: Эксмо, 2010. – 880 с.

197. Mode of inhibition of respiratory syncytial virus by a plant flavonoid, SP-303 [Text] / [D. L. Barnard, J. H. Huffman, L. R. Meyerson, et al]. // Chemother, 1993. – Vol. 39, No 3. – P. 212-217.

198. Оценка эффективности применения препарата «Иммунал» с целью профилактики гриппа и других острых респираторных заболеваний [Текст] / [М. К. Ерофеев, М. А. Максакова, А. С. Шадрин и др]. Terra medica, 2000. – № 4. – С. 37-39.

199. **Коваленко, В. Н.** Компендиум 2006 – лекарственные препараты [Текст] / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К.: Морион, 2006. – 2270 с.

200. **Латышева, Т. В.** Иммунал и его применение при инфекционных заболеваниях респираторного тракта, кожи и слизистых [Текст] / Т. В. Латышева, Е. Н. Медуницына. Рус. мед. Журн, 2005. – Т. 13, № 21. – С. 1383-1385.

201. **Ершов Ф. И.** Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях [Текст] / Ф. И. Ершов, А. Н. Наровлянский, М. В. Мезенцева. Цитокины и воспаление, 2004. – Т. 3, № 1. – С. 3-6.

202. **Ершов, Ф. И.** Система интерферона в норме и при патологии [Текст] / Ф. И. Ершов. – М.: Медицина, 1996. – 239 с.
203. **Ершов, Ф. И.** Интерферон и его индукторы [Текст] / Ф. И. Ершов, А. С. Новохатский. – М.: Медицина, 1980. – 174 с.
204. Biological properties of a prolonged action interferon inducer [Text] / [E. D. Danilenko, S. G. Gamalei, A. V. Bateneva, et al]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2011. – No 3. – P. 57-61.
205. **Романцов, М. Г.** Противовирусные и иммуностропные препараты в детской практике [Текст] / М. Г. Романцов, Л. Г. Горячева, А. Л. Коваленко. – СПб., 2009. – 119 с.
206. **Романцов, М. Г.** Эффективность циклоферона при лечении гриппа и ОРВИ в период эпидемического подъема респираторной заболеваемости (2009-10 гг.) [Текст] / М. Г. Романцов, С. В. Голофеевский. Антибиотики и химиотерапия, 2010. – № 1-2. – С. 30-36.
207. **Шульдяков, А. А.** Эффективность циклоферона при проведении экстренной профилактики ОРВИ в организованных коллективах. [Текст] / А. А. Шульдяков. Методические рекомендации для врачей. – СПб., 2007. – 16 с.
208. **Логинова, С. Я.** Противовирусная активность индуктора интерферона амиксина при экспериментальной форме лихорадки Западного Нила [Текст] / С. Я. Логинова, А. В. Ковальчук, С. В. Борисевич. Вопр. Вирусол, 2004. – № 2. – С. 8-10.
209. **Zinkovsky, V. G.** Pharmacokinetics of a synthetic interferon inducer amixin in mice [Text] / V. G. Zinkovsky, O. V. Zhuk, S. K. Sumriy. Pharmacological rep, 2007. – Vol. 59, No 6. – P. 739-751.
210. **Рамазанова, З. К.** Состояние иммунной системы, интерфероногенез и продукция цитокинов у часто болеющих детей и детей с бронхиальной астмой в разные периоды заболевания [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.36 / З. К. Рамазанова. – М., 2007. – 22 с.
211. **Красильников, А. П.** Справочник по антисептике [Текст] / А. П. Красильников. – Минск: Высшая школа, 1995. – 367 с.

212. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2004. Toxicological Profile for Iodine.** GA: U.S. Department of Health and Human Services [Text] / Public Health Service. – Atlanta, 2004. – 580 p.
213. **Червяков, Д. К.** Лекарственные средства в ветеринарии [Текст] / Д. К. Червяков, П. Д. Евдокимов, А. С. Викшер. – М.: Колос, 1977. – 496 с.
214. **Ингбар, С. Г.** Болезни щитовидной железы [Текст] / С. Г. Ингбар // Внутренние болезни. Книга 9 / Е. Браунвальд, К. Дж. Иссельбахер, Р. Г. Петерсдорф. – М.: Медицина, 1997. – Гл. 324. – С. 94-134.
215. **Вартапетян, П. А.** Справочное пособие по эндокринологии [Текст] / П. А. Вартапетян. – Ереван: Айастан, 1986. – 312 с.
216. **Герасимов, Г. А.** Лечение препаратами тироксина больных с заболеваниями щитовидной железы [Текст] / Г. А. Герасимов. Проблемы эндокринологии, 1996. – № 1. – С. 30-33.
217. **Мохнач, В. О.** Соединения иода с высокополимерами, их антимикробные и лечебные свойства [Текст] / В. О. Мохнач. – Л.: АН СССР, 1962. – 178 с.
218. Antimicrobial activities of iodinated polyatylene derivatives [Text] / [K. Lin, T. Tani, Y. Endo, et al]. Artif. Organs, 1996. – Vol. 20, No 11. – P. 1191-1195.
219. **Shikani, A. H.** Polymer-iodine inactivation of the human immunodeficiency virus [Text] / A. H. Shikani, M. St. Clair, A. Domb. J. Am. Coll. Surg, 1996. – Vol. 183, No 3. – P. 195-200.
220. Dextran sulfat and other polyanionic anti-HIV compounds specifically interact with the viral gp120 glycoprotein expressed by T-cells persistently infected with HIV-1 [Text] / [D. Schols, R. Pauwels, J. Desmyter et al.] Virology, 1990. – Vol. 175, No 2. – P. 556-561.
221. **Kawana, R.** Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics [Text] / [R. Kawana, T. Kitamura, O. Nakagomi, et al]. Dermatology, 1977. – Vol.195, No 2. – P. 29-35.
222. **Блатун, Л. А.** Современные йодофоры – эффективные средства для профилактики и лечения гнойно-воспалительных процессов [Текст] / Л. А. Блатун. Журнал. Хирургия, 2005. – № 1. – С. 83-85.

223. **Reed, L.** A simple method of estimating fifty percent endpoints [Text] / L. Reed, H. Muench. Amer. J. Hyg, 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.

224. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission [Text] / [B. Close, K. Banister, V. Baumans, et al]. Lab. Anim, 1996. – Vol. 30, No 4. – P. 293-316.

225. **Головенко, Н. Я.** Биофармацевтическая классификационная система – экспериментальная модель прогнозирования биодоступности лекарственных соединений [Текст] / Н. Я. Головенко, И. Ю. Борисюк. Биомедицинская химия, 2008. – № 4. – С. 392-407.

226. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ [Текст] / [Е. В. Арзамасцев, Т. А. Гуськова, И. В. Березовская и др]. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей ред. Р. У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 41-54.

227. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных соединений [Текст] / [Е. В. Арзамасцев, И. В. Березовская, О. Л. Верстакова и др]. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных соединений. Часть первая / под общей ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Разд. 1, Гл. 1. – С. 13-51.

228. Биофармацевтические свойства комплексов иода [Текст] / [М.Е. Кулманов, Б.Ф. Керимжанова, И.С. Коротецкий и др]. Научная дискуссия: инновации в современном мире: сб. ст. по материалам LVI Международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире».– М., Изд. «Интернаука», – 2016. – № 12(55). – С. 143-156.

229. **Иванова Л.Н.** 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 (53). – С. 32-38.

230. Цитотоксичность ионных наноструктурированных комплексов *in vitro* [Текст] / [А.И. Ильин, Л.Н. Иванова, Б.Ф. Керимжанова и др]. Научная дискуссия:

инновации в современном мире: сб. ст. по материалам XLVIII Международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире». – М., Изд. «Интернаука», – 2016. – № 4(47). 2. – С. 96-105.

231. **Иванова Л.Н.** Антивирусная активность ионных наноструктурированных комплексов *in vitro* [Текст] / [Л.Н. Иванова, Б.Ф. Керимжанова, А.И. Ильин]. Научная дискуссия: инновации в современном мире: сб. ст. по материалам XLVIII Международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире». – М., Изд. «Интернаука», – 2016. – № 4(47). 2. – С. 89-95.

232. **ГОСТ 12.1.007-76.** Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности [Текст]. – Введ. 1977-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1976. – 7 с.

233. Методические указания по изучению специфической противовирусной активности фармакологических веществ [Текст] / [Ф. И. Ершов, А. Н. Наровлянский, П. Г. Дерябин др]. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей ред. Р. У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 532-557.

234. Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных соединений [Текст] / [Ф. И. Ершов, Э. Б. Тазулахова, А. Н. Наровлянский и др]. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных соединений. Часть первая / под общей ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Разд. 2, Гл. 32. – С. 525-549.

235. **Сергеев, П. В.** Биохимическая фармакология [Текст]: учебное пособие / под ред. П. В. Сергеева, Н. Л. Шимановского. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2010. – 624 с.

236. **Керимжанова Б.Ф.** Фармакокинетика лекарственного средства фс-1 при однократном пероральном применении в организме цыплят [Текст] / [Б.Ф. Керимжанова, Л.Н. Иванова, А.И. Ильин]. Научная дискуссия: инновации в современном мире: сб. ст. по материалам XLVIII Международной научно-

практической конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире».– М., Изд. «Интернаука», – 2016. – № 4(47). 2. – С. 109-117.

237. Противовирусная активность лекарственного средства ФС-1 в отношении вируса гриппа штамма [Текст] / [А. И. Ильин, Б.Ф. Керимжанова, и др]. Известия НАН КР. Раздел Медицина. – Б., 2016. – № 1. – С. 43–51.

238. **Иванова Л.Н.** Противовирусная активность лекарственного средства ФС-1 в опытах *in ovo* [Текст] / [Л.Н. Иванова]. Известия НАН КР. Раздел Медицина. – Б., 2016. – № 1. – С. 43–51.

239. Антигриппозное действие лекарственного вещества ФС-1 в эксперименте на цыплятах [Текст] / [М.Е. Кулманов, Л.Н. Иванова, Н.Н. Соколова и др]. / Журнал «Известия». – Серия биологическая и медицинская НАН РК. – № 5. – 2015. – С. 27–35.

240. Характеристика мутантных штаммов H1N1 и H7N7 Вируса гриппа устойчивых к коммерческим противовирусным препаратам. [Текст] / [И.С. Коротецкий, Н.В. Зубенко и др]. Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика. Астана, – 2015. – № 4. – С. 47–56.

241. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity [Text] // National Institute of Environmental Health Sciences National Institutes of Health U.S. Public Health Service Department of Health and Human Services, 2001. – 102 p.

242. **Chou, T.C.**, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies [Text] / T.C. Chou, Pharmacological Reviews, 2006. – No 58. – P. 621–681.

243. **Ильин А.И.** Физико-химическая характеристика качественного и количественного состава новых синтезированных ионноструктурированных комплексов, определение их противовирусной активности и токсичности [Текст] / [А.И. Ильин, Б.Ф. Керимжанова, Л.Н. Иванова]. Научная дискуссия: инновации в современном мире: сб. ст. по материалам XLVIII Международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире». – М., Изд. «Интернаука», – 2016. – № 4(47). 2. – С. 118-131.

Приложение 1.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 7196

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL



(21) 2021/1124.2

(22) 13.12.2021

(45) 10.06.2022

(54) Тұмауға қарсы препараттардың фармакологиялық белсенділігін арттыру тәсілі
Способ повышения фармакологической активности противогриппозных препаратов
Method for increasing pharmacological activity of anti-influenza drugs

(73) «Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы» акционерлік қоғамы (KZ)
Акционерное общество «Научный центр противинфекционных препаратов» (KZ)
«Scientific Center of Anti-Infective Drugs» Joint-Stock Company (KZ)

(72) Керимжанова Бахытжан Фазылжановна (KZ) Kerimzhanova Bakhytzhana Fazylzhanovna (KZ)
Иванова Людмила Николаевна (KZ) Ivanova Lyudmila Nikolayevna (KZ)
Коротецкий Илья Сергеевич (KZ) Korotetskiy Ilya Sergeevich (KZ)
Шилов Сергей Владимирович (KZ) Shilov Sergey Vladimirovich (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Оспанов
Е. Оспанов
Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of RSE «National institute of intellectual property»

Патентті күшінде ұстау ақысы уақытылы төленген жағдайда патенттің күші
Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында қолданылады.

Патентке пайдалы модельдің толық сипатта масы www.kazpatent.kz ресми сайтында
«Қазақстан Республикасының пайдалы модельдерінің мемлекеттік тізілімі» бөлімінде қолжетімді

* * *

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан
при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

Полное описание полезной модели к патенту доступно на официальном сайте www.kazpatent.kz
в разделе «Государственный реестр полезных моделей Республики Казахстан».

* * *

Subject to timely payment for the maintenance of the patent in force
the patent shall be effective on the entire territory of the Republic of Kazakhstan.

Full description of the patent for utility model are available on the official website www.kazpatent.kz
in the section «State Register of Utility Models of the Republic of Kazakhstan».



Қазақстан Республикасы Әділет министрлігінің
«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК
Нұр-Сұлтан қаласы, Мәңгілік Ел даңғылы, ғимарат 57А

РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Министерства юстиции Республики Казахстан
Город Нур-Султан, проспект Мангилик Ел, здание 57А

«National Institute of Intellectual Property» RSE,
Ministry of Justice of the Republic of Kazakhstan
Nur-Sultan, 57A Mangilik El Avenue

Тел./Tel.: +7 (7172) 62-15-15
E-mail: kazpatent@kazpatent.kz
Website: www.kazpatent.kz