

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК УКРАИНЫ  
Государственное учреждение «Институт эпидемиологии и инфекционных  
болезней им. Л.В.Громашевского (ГУ ИЭИБ НАМНУ)  
03680, г. Киев, ул.Амосова, 5

ООО «Научно-производительная компания «ЭКОФАРМ»  
04210, г.Киев, ул. Оболонская Набережная, д.19

УТВЕРЖДЕНО:

Генеральный директор  
ООО «НПК «ЭКОФАРМ»  
М.В. Груша  
19 марта 2020г.



УТВЕРЖДАЮ:

Директор ГУ ИЭИБ НАМНУ  
д.м.н., проф., чл.-кор.НАМНУ  
В.И.Задорожная  
19 марта 2020г.



ИЗУЧЕНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА  
ПРОТЕФЛАЗИД, ЕГО АКТИВНЫХ СТРУКТУР НА МОДЕЛИ  
КОРОНАВИРУСА ТРАНСМИССИВНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА СВИНЕЙ

Руководитель темы,  
зав.лабор.экспериментальной  
химиотерапии вирусных инфекций  
д.м.н., проф.

С.Л. Рыбалко

Руководитель темы,  
директор научного департамента  
ООО «НПК «ЭКОФАРМ»

В.П. Атаманюк

Киев – 2020

**ИСПОЛНИТЕЛИ:**

Рыбалко С.Л. д.м.н., проф.



Старосила Д.Б. к.б.н., ст.н.с.



Дерябин О.Н. н.с.



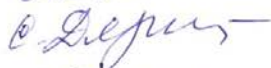
Пальчиковская Л.И. к.х.н., ст.н.с.



Завилевич М.П. к.б.н., ст.н.с.



Дядюн С.Т. к.б.н., ст.н.с.



Валовая Е.Г. старший лаборант



Брушковская Л.В. препаратор



## ОГЛАВЛЕНИЕ:

1. ВСТУПЛЕНИЕ.....	4
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	8
2.1. Объекты исследований... ..	10
2.2 Методы исследований.....	11
3.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	17
3.1. Молекулярный докинг биологически активного вещества, лекарственного препарата Протефлазид® (БАВп) в сайт связывания PRD_002214 протеазы коронавируса 2019-nCov.....	17
3.2. Характеристика вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней.....	20
3.3. Изучение признаков, генетических маркеров, связанных с белковой оболочкой вириона.....	22
3.4. рН 2,0 -маркер.....	22
3.5. T <sub>r</sub> – маркер... ..	23
3.6. T <sub>50</sub> – маркер.....	24
3.7. S – маркер.....	25
3.8. Выявление РНК вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней шт. D52 методом возвратно-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).....	30
3.9. Определение цитотоксического действия исследуемых веществ.....	31
3.10. Исследование противовирусной активности исследуемых действующих веществ Неофлазид, Протефлазид® и БАВп на модели коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС).....	37
3.11. Исследование токсичности и апоптозиндуцирующей активности биологически активного вещества лекарственного препарата Протефлазид®, субстанции Неофлазид и суммы флавоноидов БАВп в неинфицированных и инфицированных коронавирусом ТГС в культуре клеток	
4. ВЫВОДЫ.....	45
5. ЛИТЕРАТУРА.....	46

## ВСТУПЛЕНИЕ

За прошедшие годы и до нынешнего момента в Украине во время вспышек респираторных заболеваний клиницисты не выделяли у людей коронавирусных штаммов, имеющих сколько-нибудь существенное значение с точки зрения практики нашего здравоохранения. Гораздо большее значение имели и имеют те коронавирусы, которые поражают сельскохозяйственных животных и птиц. В Украине наиболее важными являются вирусы трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ВТГС, swine transmissible gastroenteritis virus, TGV) и вирус птичьего инфекционного бронхита (avian infectious bronchitis virus, IBV), давно уже (с момента их обнаружения) изучаемые в лабораториях ветеринарной вирусологии. Указанные работы проводились и проводятся, главным образом, в лабораториях Украинской академии аграрных наук (отдел животноводства, ветеринарной медицины и переработки продуктов, Киев), Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины (Харьков), Института эпизоотологии (Ровно), Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов (ГНКИБШМ) Государственной службы Украины по вопросам безопасности пищевых продуктов и защиты потребителей (Киев) и Института ветеринарной медицины (Киев), а также в некоторых филиалах этих учреждений.

ВТГС был очень актуален в 1980-е гг. до получения надлежащих вакцин; он принес значительные убытки промышленному свиноводству, особенно после того как к этой инфекции присоединилось ещё и другое вирусное заболевание – классическая чума свиней.

В Институте ветеринарной медицины было проведено тщательное изучение ВТГС с целью получения вакцины; подобраны наиболее чувствительные клетки для его культивирования *in vitro*, изучались различные свойства вируса, его устойчивость к различным факторам, состав вирусной популяции, культивируемой *in vitro*, и ее изменчивость (Е.А.Краснобаев, О.Н.Дерябин, Е.Г.Дерябина, Г.А.Попова). В

результате клонирования и получения вакцинного штамма вируса разработано было два вида вакцины – вакцина для перорального введения и для внутримышечного применения, испытаны различные адъюванты (В.К. Муравьев). Позже вакцины на основе этого штамма стали производиться в Москве. Кроме того, были разработаны методы дифференциальной диагностики трансмиссивного гастроэнтерита свиней и возбудителя респираторной коронавирусной инфекции свиней на основе полученных моноклональных антител, специфичных для консервативных антигенных детерминант и разработана научно-техническая документация для такой диагностики (О.М. Стрижакова, Е.А. Краснобаев, О.Н. Дерябин, Г.А. Попова).

Недавно в ГНКБШМ детально исследовали вирус эпизоотической диареи свиней (О.Н. Дерябин); были подробно охарактеризованы украинские изоляты вируса, проведено их полногеномное секвенирование и создана трехмерная модель пепломера одного из изолятов.

В 1990-е гг. в Институте ветеринарной медицины проводили также исследования вируса инфекционного бронхита птиц с целью получения вакцины (Е.А. Краснобаев, О.Н. Дерябин, Г.А. Попова, В.А. Постоевко, И.Ю. Педоренко, А.Ю. Немашкало, А.П. Кубаев). В Украине обнаружены изоляты этого вируса, относящиеся к серотипам H120, 4/91 и QX. Основываясь на симптомах заболевания, обнаруживаемых в птицеводческих хозяйствах, брали материалы от заболевших птиц (кур) и применяли их для тестирования (обнаружения вируса) и для размножения возбудителя (наработки вируса) на куриных эмбрионах<sup>1</sup>, свободных от специфических антигенов. Разработана была также схема комплексной диагностики этого заболевания. Вирус в патматериалах и в образцах аллантоисной жидкости зараженных куриных эмбрионов определяют при помощи ОТ-ПЦР, пользуясь собственными праймерами. Инфекционную активность вируса устанавливают титрованием на 8-дневных куриных эмбрионах. Серотип вируса определяется по индексу нейтрализации в реакции нейтрализации с применением сертифицированных сывороток на серотип, определенный в предыдущих

---

<sup>1</sup> При заражении эмбриона данным вирусом сразу же полностью прекращается его развитие.

исследованиях, и нормальной сыворотки. Проводится также биопроба на цыплятах (7-25 дн.), свободных от анти-ВИБ-антител.

На основе проведенных работ были получены очищенные вирусные препараты. Вакцину против вируса производит в Украине фирма «Био-Тест-Лаборатория» (Киев).

Никакой работы с высокопатогенными коронавирусами человека (например, с возбудителем SARS) в нашей стране не проводилось, в частности, из-за отсутствия надлежащих условий работы с высокопатогенными материалами.

Что касается лечения коронавирусных инфекций – а эта проблема стала предельно актуальной после появления в 2019 г. особо опасной эмерджентной инфекции, зарегистрированной в Китае и вызываемой коронавирусом 2019-nCoV, то в этом отношении с нашей точки зрения представляет интерес препарат Протефлазид® (<http://proteflazid.com.ua/ru/o-preparate/instruktsiya-po-meditsinskomu-primeneniyu-proteflazid-kapli/>), разработанный в Украине фирмой «Экофарма». Данный препарат, растительного происхождения, уже неоднократно испытывался против многих вирусных инфекций, включая и РНК-содержащие вирусы, частицы которых включают одноцепочечную + -цепь РНК. Лекарственный препарат Протефлазид® имеет существенное положительное влияние на выздоровление инфицированных лиц и на многие показатели противовирусного иммунитета. При этом Протефлазид® совершенно безопасен, с точки зрения побочных воздействий и каких-либо проявлений токсичности.

**Цель исследования:** изучение антивирусной активности лекарственного препарата Протефлазид® и его активных структур на модели коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС).

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Вирусы:**

**ВТГС (TGEV)** – этиологический агент трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) - высококонтагиозным кишечным заболеванием свиней.

### **Штамм вируса:**

**D<sub>52-5</sub> (BRE<sub>79</sub>)** — является высокопатогенным вирусом для свиней всех возрастных групп на уровне 5 пассажа в перевиваемых монослойной культуре клеток тестикул поросенка ST. Показан тропизм вируса желудочно-кишечного тракта и респираторного тракта. Штамм предоставлен доктором Hubert Laude из лаборатории молекулярной вирусологии и иммунологии Центра биотехнологии INRA в Жуа-ан-Жозаси (Франция).

**D<sub>52-100</sub>** — атenuированные варианты вируса после 100 последовательных пассажей в перевиваемых монослойных культурах клеток щитовидной железы свиней (КЩЖ), почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и почки поросенка (НСП) / Дерябин А.Н. /.

### **Адаптация и атenuация штамма D<sub>52-5</sub>:**

адаптацию и атenuацию вируса в перевиваемых культурах клеток выполняли серийным пассированием разведенным вирусным материалом по стандартной схеме. Критериями адаптации было появление стабильной ГПД и получения постоянных титров инфекционности. Атenuацию полученных вариантов проверяли инфицированием поросят-гнотобиотив.

### **Титрование инфекционности:**

титрование инфекционности вирусных материалов на культурах клеток проводили двумя методами — конечных разведений по ГПД (рис.1), а титр инфекционности определяли по методу Кербера-Ашмарина и

выражали в ТЦД 50 / мл и методом негативных колоний (S-признак) под 1,35 % агаровым покрытием (Difco-Vacto) (рис. 2), а титр инфекционности выражали в БОЕ/мл. Результаты обсчитывали через 120 часов культивирования при 38 ° С.

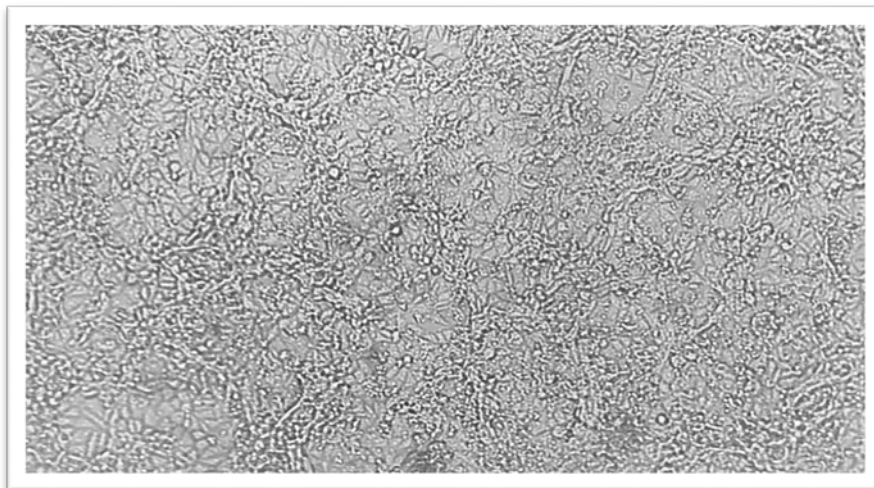


Рис.1 Контроль культуры СПЕВ (перевиваемая культура клеток почки свиньи)

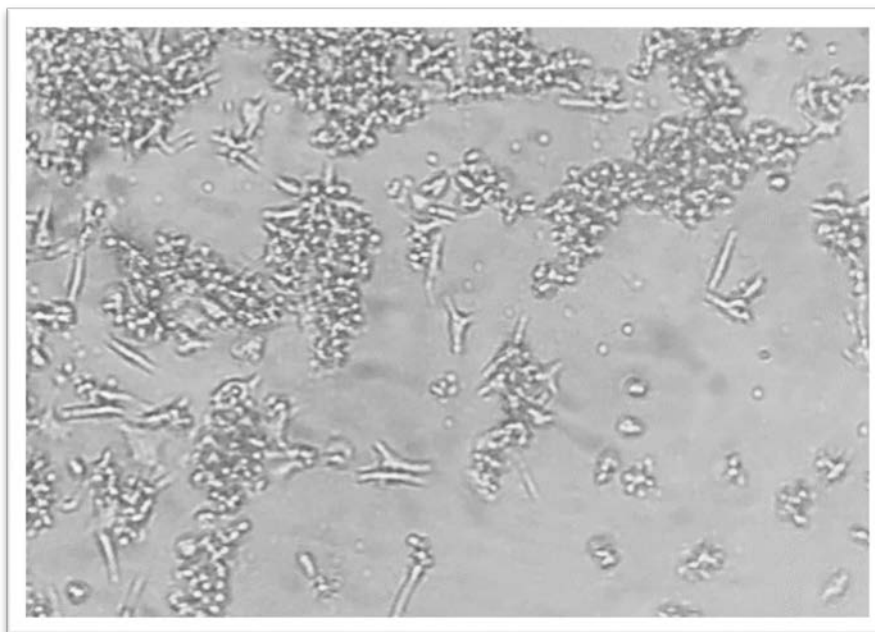


Рис.2 Контроль вируса на СПЕВ (перевиваемая культура клеток почки свиньи)  
Вирус- вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ВТГС)-коронавирус

### **Культура клеток:**

**СПЕВ-** перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи



**НСП**- перевиваемая культура клеток почки поросенка

**СТ**- перевиваемая культура клеток тестикул поросят

**КЩЗ**- перевиваемая культура клеток щетовидной железы свиньи

### **Препараты**

**Протефлазид®** - (ПФ) разработан НПК "ЭКОФАРМ", Украина, г. Киев. Для исследования представлен лекарственный препарат Протефлазид® - действующие вещества: трава щучки дернистой - 500 г; трава вейника наземного - 500 г; спирта этилового 96 % - достаточное количество для получения экстракта, который содержит сухой остаток не менее 0,7 %; сумма карбоновых кислот в перерасчете на яблочную кислоту не менее 0,3 мг в 1 мл; флавоноидов в перерасчете на рутин не менее 0,32 мг в 1 мл.

**Неофлазид** – новая субстанция, полученная из лекарственного препарата Протефлазид® с калибровочным содержанием действующего вещества, содержит до 50 % этилового спирта. Жидкость зелено-бурого цвета, неоднородная, с нерастворимыми вкраплениями, с концентрацией 7,1 мг действующего вещества в 1 г раствора. Перед исследованием Неофлазид разводили в 100 раз поддерживающей средой и готовили серии 10и кратных разведений.

**БАВп** – сумма флавоноидов в 10% растворе этилового спирта. Прозрачная, желтоватая жидкость, которая содержит 120 мкг/мл действующего вещества, лекарственного препарата Протефлазид ®.

### **Определение цитотоксической концентрации препаратов (CC<sub>50</sub>)**

Для определения CC<sub>50</sub> препаратов использовали разные культуры клеток. В опытах использовали не менее десяти рядов лунок в планшетах с культурой клеток для каждого разведения препарата в питательной среде. Планшеты с культурой клеток инкубировали при 37°C с подачей 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. Ежедневно проводили наблюдения за опытными и контрольными образцами культур с целью установления наличия или отсутствия цитопатогенного действия (ЦПД).

“-“ – полное отсутствие дегенерации клеток;

“+” – поражено не более 25% (защита клеток монослоя от антивирусного препарата на 75%);

“++” – поражено не более 50% клеточного монослоя;

“+++” – поражено не более 75% клеточного монослоя;

“++++” – полная дегенерация клеточного монослоя.

За  $CC_{50}$  препарата принимали его наибольшее количество, которое не вызывало дегенерацию клеток.

### **МТТ- метод исследования жизнеспособности клеток**

Этот метод базируется на функционировании дегидрогеназной системы митохондрий интактных клеток, которые в нормальных условиях превращают 3, (4,5 диметилтриазол-2-ил) -2,5- дифенилтетразолиум бромид (МТТ) в формазан. Продукт реакции можно определить количественно спектрофотометрическим методом. Преобразование МТТ в формазан уменьшается при гибели клеток под действием токсичных для клетки веществ.

Суспензию клеток плотностью  $5 \times 10^5$  кл/мл культивировали в ростовой среде с 10% ЭТС, содержащей исследуемые вещества в различных концентрациях в 96-луночных планшетах. В контроле были клетки необработанные препаратами. Каждую концентрацию вещества проверяли в 3-4 повторах. Планшеты с клетками выдерживали в термостате при  $37^{\circ}C$  в 5%  $CO_2$  атмосфере в течение 48 часов.

Субстрат МТТ (Sigma, США) растворяли ФСБ при комнатной температуре до концентрации 5 мг/мл. Профильтрованный раствор МТТ в объеме 25 мкл вносили в лунки, содержащие по 100 мкл клеточной суспензии и инкубировали в течение 3-х часов при  $37^{\circ}C$  в атмосфере 5%  $CO_2$ . После инкубации, для осаждения клеток, планшеты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин и надосадок удаляли. К осадку клеток в лунках добавляли по 100 мкл 96% этанола, в котором происходило растворение кристаллического формазана. После 10 мин тщательного встряхивания при  $37^{\circ}C$  определяли оптическую плотность растворов спектрофотометрически при длине волны 570 нм, используя ридер Dynatech

(Швеция), и при длине волны 538 нм на спектрофотометре для планшетов Multiskan FC (Thermo scientific). Процент подавления жизнеспособности клеток под действием препаратов определяли по количеству образованного формазана в опытных образцах по сравнению с контролем, который принимали за 100%.

### **Определение эффективной дозы (EC<sub>50</sub>)**

EC<sub>50</sub> представляет собой минимальную концентрацию препарата, которая тормозит развитие вирусспецифического ЦПД на 50 %. Для определения EC<sub>50</sub> тест-вирус у дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл вносили в культуру клеток и инкубировали в течение 60 мин при 37° С. После адсорбции вируса на клетках, остатки его удаляли, клетки промывали питательной средой, после чего в поддерживающую среду (RPMI-1640 + 2 % фетальной сыворотки) вносили препараты в разных концентрациях. Отсутствие ЦПД в опыте (в обработанных культурах), при наличии его в контроле, а также снижение инфекционного титра в обработанных культурах, при наличии его в контрольных и разница инфекционных титров в опыте по сравнению с контролем вируса позволяли установить EC<sub>50</sub> препарата.

### **Критерий оценки антивирусной активности соединений в системах *in vitro***

Цитотоксическую концентрацию (CC<sub>50</sub>) – концентрацию препарата, который способствует уменьшению жизнеспособности культуры клеток на 50% - определяли при анализе цитотоксического действия исследуемых соединений в соответствии с нормативными рекомендациями в отношении исследований антивирусных препаратов *in vitro*. Для определения антивирусной активности исследуемых веществ определяли эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>), то есть концентрацию исследуемого вещества, при которой уровень репликации вируса в инфицированной культуре клеток угнетается на 50%. После определения показателей цитотоксического и противовирусного действия вычисляли индекс селективности (IS) как соотношение CC<sub>50</sub> к EC<sub>50</sub>. Исследуемые вещества, которые имели IS ≥ 16 в системе *in vitro* считали активными и перспективными для дальнейшего исследования на животных.

### Цитологический анализ.

Цитологический анализ проводили после фиксации клеток, выращенных на покровных стеклах в жидкости Шабадаша (9 частей азотнокислой меди в этиловом спирте + 1 часть формалина) в течение 30 минут. Окраску для цитологического анализа проводили гематоксилин-эозином по общепринятой методике.

Митотический индекс (МИ) вычисляли путем исчисления 3000-10000 просмотренных клеток и выражали в промилле (‰) - число митозов на 1000 клеток. Одновременно определяли наличие аномальных (АМ) форм митозов. Для анализа патологических митозов была использована классификация, разработанная В.Н. Блюмкиным.

Коэффициент отклонения от контроля (кок) определяли по формуле:

$$\text{КОК (МИ) и КОК (АМ) ткани} = \frac{\text{МИ(АМ) инфицированных (обработанных) препаратами культур}}{\text{МИ (АМ) неинфицированных (не обработанных) препаратами культур}}$$

$$\text{КОК(МИ) и КОК(АМ) вируса} = \frac{\text{МИ(АМ) инфици. вирусом культур, обраб. препаратами}}{\text{МИ(АМ) инфици. вирусом культур, не обр. препаратами}}$$

Исследование цитологических препаратов проводили при объективах x40 и x100, окуляре x10 в микроскопе Standard 20, Zeiss.

## **Выявление РНК вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней шт. D52 методом возвратно-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)**

Выделение РНК выполняли с помощью набора «Рибо-сорб» согласно инструкции производителя (АмплиСенс, РФ).

Реакцию обратной транскрипции выполняли с помощью набора "RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" (рандомно праймеры) согласно инструкции производителя (Thermo Scientific, Литва). Для ПЦР были использованы специфичные к гену нуклеопротеина олигонуклеотидных праймеров следующей последовательности: прямой Uni\_1 (5'-TGCACTGATCAATGTGCTAG-3 ') и обратной Uni\_2 (5'-TGAAAACACTGTGGCACCCCTT-3 "). Фрагмент, амплифицируемого размером 309 П.Н. .. М - маркер "100 bp Plus DNA Ladder" ("Thermo Fisher Scientific", Литва).

### **Молекулярный докинг**

Молекулярный докинг биологически активного вещества лекарственного препарата «Протефлазид»® (БАВп) провели в сайт связывания PRD\_002214 протеазы коронавируса 2019-nCoV [[https://globalbiodefense.com/2020/02/07/protein-data-bank-archive-adds-new-coronavirus-protease-structure /](https://globalbiodefense.com/2020/02/07/protein-data-bank-archive-adds-new-coronavirus-protease-structure/)]. Комплекс использовали, как базовую модель для докинга и на этапе изучения, провели молекулярно-динамические расчеты для валидации модели, полученной прямым докингом. Использованная модель, на наш взгляд, вероятно свидетельствует о ингибировании главной протеазы коронавируса 2019-nCoV (БАВп).

### **Статистическая обработка результатов исследований.**

Цифровой материал, представленный в работе, обработан вариационно-статистически. Статистическую оценку уровней значимости отличий полученных цифровых показателей проводили с использованием t-критерия Стьюдента при помощи программ Microsoft Excel и Microcal Origin. Достоверными считали отличия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### **Молекулярный докинг биологически активного вещества, лекарственного препарата Протефлазид® (БАВп) в сайт связывания PRD\_002214 протеазы коронавируса 2019-nCov.**

В предыдущих наших исследованиях методом докинга было показано связывание активной структуры (БАВп) с протеиназой HIV-1. Так как протеиназа HIV-1 имеет гомологию с протеиназой nCoV19, были проведены исследования молекулярного докинга активной структуры (БАВп) в сайт связывания PRD\_002214 протеазы коронавируса 2019-nCov.

Уханский коронавирус, также известный как SARS-CoV-2 или 2019-nCoV, является близким по отношению к вирусу тяжелого острого респираторного синдрома (SARS – severe acute respiratory syndrome), который вызвал вспышку в 2003 году (SARS-CoV-1), а также к вирусу респираторного заболевания (MERS-CoV – the Middle-East respiratory disease virus), появившегося в 2012 году. Все эти вирусы вызывают симптомы гриппа и часто пневмонию. Тем не менее, практически не было разработано высокоэффективных методов лечения, отчасти потому, что было относительно небольшое количество случаев заболевания, что не оправдывало больших расходов фармацевтических компаний.

Однако в мире проводили направленный поиск, как клеточных мишеней так и их ингибиторов в отношении коронавирусов разных типов.

Поскольку SARS-CoV-2, MERS-CoV и SARS-CoV-19 очень похожи, учитывая опыт разработки ингибиторов первых двух инфекций проводился направленный поиск их ингибиторов в отношении SARS-CoV-19 и разных корона- и энтеровирусов, т.е. препаратов широкого спектра действия. Можно выделить два направления разработки подобных агентов – пептидные ингибиторы (субстратные аналоги) и не пептидные аналоги.

В качестве мишени для разработки ингибиторов была выбрана основная протеаза коронавирусов

Основная протеаза коронавирусов и 3С протеаза энтеровирусов имеют сходную архитектуру активного сайта и уникальную потребность в глутаминовой кислоте в положении P1 субстрата. Из-за своей уникальной специфичности и существенной роли в процессинге вирусных полипротеинов эти протеазы являются подходящими мишенями для разработки противовирусных препаратов.

Основная протеаза недавно открытого коронавируса, связанного со вспышкой респираторного заболевания в Ухане, на 96% идентична (на 98% сходна) по аминокислотной последовательности с таковой у SARS-CoV Mpro (получена из РНК-генома BetaCoV / Wuhan / IVDC-). HB-01/2019, код доступа Genbank: MN908947.2; <http://virological.org/t/initialgenome-release-of-novel-coronavirus/319>, последний доступ к которому был осуществлен 11 января 2020 года), поэтому все результаты ингибирования SARS-CoV, скорее всего, можно будет применять и к новому вирусу.

Информация о протеазном комплексе нами была получена из работы группы авторов «The crystal structure of 2019-nCoV main protease in complex with an inhibitor N3» Liu, X., Zhang, B., Jin, Z., Yang, H., Rao, Z.. Статья находится в печати. В этой работе был получен необратимый комплекс пептидо-подобного лиганда с белком-мишенью. Мы использовали этот комплекс как базовую модель для докинга непептидного лиганда, а именно, соединения флавоноидной природы – БАВп.

Ранее было показано, что кверцетин ингибирует трипсиноподобные сериновые протеиназы в микромолярных концентрациях, связываясь двумя соседними фенольными гидроксильными группами (или катехолом) с аминокислотным окружением каталитического кармана протеазы, в том числе и с каталитически важным остатком глутаминовой кислоты, присутствующим во всех протеазах и коронавирусных тоже.

Результаты прямого докинга показали, что наш лиганд хорошо располагается в каталитическом кармане используемой протеазы, образует водородные связи с остатками Ser 144, Gly 143 и располагается между каталитическими остатками His

163, Asn 142 and Cys 145, и образует двумя гидроксилами катехола водородные связи с остатком Glu 166.

На следующем этапе нами было проведено несколько молекулярно-динамических расчетов для валидации (оценки) моделей полученных прямым докинггом. Одна из 3 моделей при этом улучшила свои параметры взаимодействия с боковым окружением и оказалась на наш взгляд наиболее вероятной. Следует отметить, что в этой модели сохраняется взаимодействие нашего лиганда с ключевым остатком Glu 166.

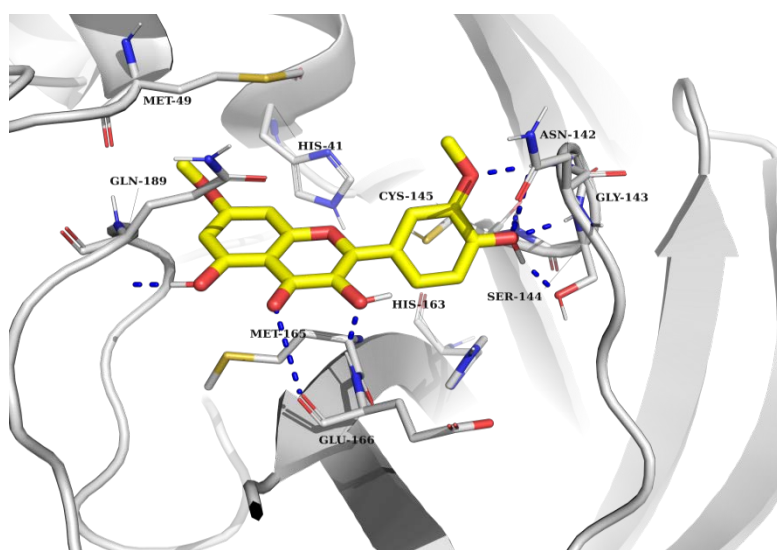


Рис.3 Результат молекулярного докинга. Протеаза – представлены серым цветом и лиганд – желтым цветом. Конформация 1.

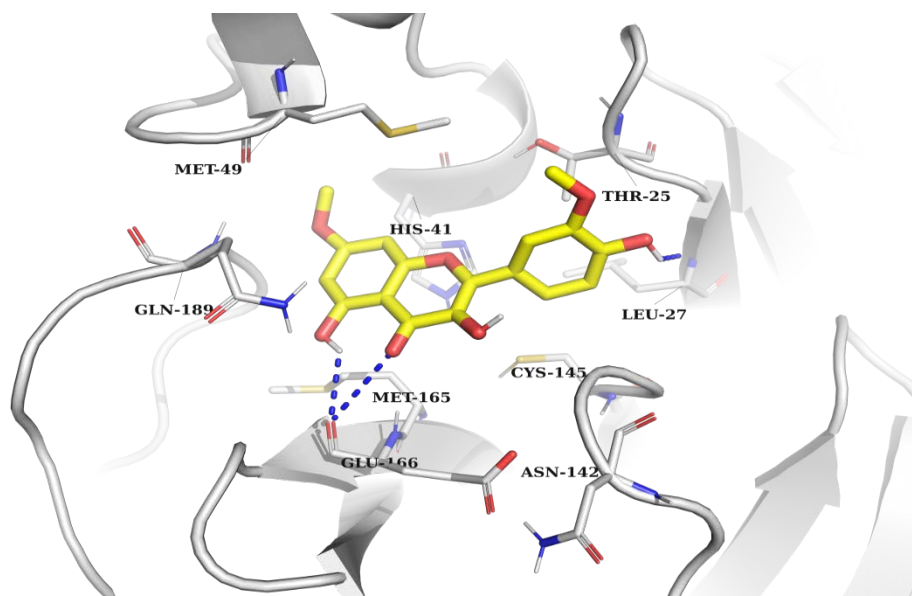




Рис.4 Результат молекулярной динамики. Указаны водородные связи, образованные лиганда с ключевым остатком Glu 166

Использованная модель, свидетельствует о ингибировании главной протеазы коронавируса 2019-nCoV- в активной структуре (БАВп).

### **Характеристика вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней**

Коронавирусы трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС)

пассированных на разных культурах характеризовали по инфекционному титру.

Результаты представлены в таблице.

Таблица 1 Инфекционный титр вируса ТГС в культурах клеток

<b>Культура клеток</b>	<b>Инфекционный титр БОЕ</b>
ST <sub>5</sub>	3,9x10 <sup>7</sup> БОЕ/мл;
СПЕВ <sub>100</sub>	3,1x10 <sup>7</sup> БОЕ/мл;
НСП <sub>100</sub>	4,3x10 <sup>7</sup> БОЕ/мл;
КЩЗ <sub>100</sub>	1,4x10 <sup>8</sup> БОЕ/мл.



Рис 5. Негативные колонии вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней шт. D<sub>52-100</sub> КЩЗ.

Реакцию вируснейтрализации проводили в 96 луночных планшетах "Costar" (США), по методу Н.Лауде, с использованием в качестве положительного контроля референтной гипериммунной сыворотки №6926, этого же автора.

#### **Проверку атенуации вируса осуществляли на гнотобиотах:**

поросят-гнотобиотов получали путем гистероэктомии свиноматки в стерильных условиях на 112-113 день супоросности / Хандкарян В.М., Дерябин А.Н. / и использовали для заражения в 1 дневном возрасте, после их адаптации к условиям существования в стерильных боксах, появления навыков самостоятельно принимать пищу (стерильную молочную смесь) и отсутствии у них каких-либо признаков заболевания. Полученных животных метили и размещали по группам в отдельные стерильные боксы с индивидуальным подогревом, подачей стерильного воздуха и поддержанием температуры  $30 \pm 1$  °С. Животных кормили 7 раз в сутки с интервалом 3 часа. Заражение проводили натошак (не ранее, чем через 2 часа после последнего кормления), орально, вводя по 2 мл вирусного фильтрованного материала. Следующее питания проводили не ранее, чем через 30 минут после заражения.

В результате проведенных исследований было показано, что все варианты вируса после 100 пассажей в культуре клеток на гнотобиотах не проявляли никаких признаков заболевания.

#### **Изучение признаков, генетических маркеров, связанных с белковой оболочкой вириона**

##### **pH 2,0 -маркер**

Изучение pH 2,0- признаки вариантов шт. D52 после 100 пассажей в перевиваемых культурах клеток СПЭВ, НСП и КЩС проводили по модифицированной методике. Модификация касалась замены буфера Зеренсена или Макилвена на буфер Кларка-Либса (0,2М HCl + 0,2М KCl) и уменьшением времени обработки до 6 минут при 38 °С. Обработке подлежали 3 параллельные пробы каждого варианта, которые после смешивания немедленно титровали методом негативных колоний.

Таблица 2 Определение рН стабильности вирулентного и аттенуированного штамма в культурах клеток

Культура клеток	Количество пассажей вируса	рН 2,0 - стабильность	
		$\Delta$ рН 2,0 (од.lg)	P
СПЕВ	5	$3,85 \pm 0,23$	< 0,05
	100	$6,51 \pm 0,14$	
НСП	5	$4,18 \pm 0,29$	< 0,01
	100	$7,10 \pm 0,02$	
КЦЗ	5	$4,02 \pm 0,17$	< 0,01
	100	$6,87 \pm 0,21$	

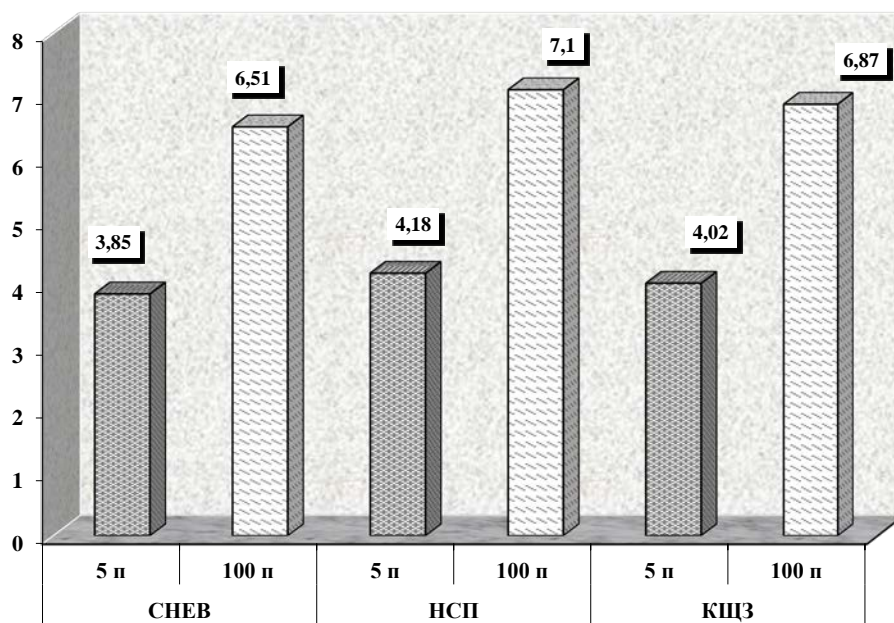


Рис.6 Определение рН стабильности вирулентного и аттенуированного штамма в культурах клеток

Было показано, что аттенуированные штаммы ТГС статистически достоверно более чувствительны к рН 2.

### Tr - маркер

Для обработки вируса использовали кристаллический трипсин с активностью 11680 BAEE ed1m, выделенный из поджелудочной железы свиней ("Sigma").

Таблица 3 Определение чувствительности к трипсину вирулентного и аттенуированного штамма в культурах клеток

Культура клеток	Количество пассажей вируса	Чувствительность к трипсину (Tr - признак)		
		Концентрация трипсина (мкг/мл)	$\Delta Tr$ (од.lg)	P
СПЕВ	5	100	$0,70 \pm 0,07$	$> 0,05$
	100	100	$0,65 \pm 0,02$	
	5	500	$0,91 \pm 0,07$	$< 0,01$
	100	500	$1,67 \pm 0,022$	
НСП	5	100	$0,28 \pm 0,13$	$> 0,05$
	100	100	$0,57 \pm 0,09$	
	5	500	$0,87 \pm 0,27$	$> 0,05$
	100	500	$0,73 \pm 0,08$	
КЦЗ	5	100	$0,68 \pm 0,08$	$> 0,05$
	100	100	$0,79 \pm 0,12$	
	5	500	$0,86 \pm 0,10$	$> 0,05$
	100	500	$0,95 \pm 0,13$	

Аттенуированные штаммы, пассированные на разных культурах были более чувствительны к обработке трипсином (500 мкг/мл, что указывает на изменение в белковой оболочке вириона).

**T<sub>50</sub> – маркер** (термостабильность)

Таблица 4 Определение чувствительности к температуре (50° С) вирулентного и аттенуированного штамма в культурах клеток

Культура клеток	Количество пассажей вируса	Термостабильность	
		$\Delta T_{50}$ (од.lg)	P
СПЕВ	5	0,87 ± 0,17	< 0,05
	100	1,67 ± 0,11	
НСП	5	0,79 ± 0,10	> 0,05
	100	1,17 ± 0,21	
КЦЗ	5	0,82 ± 0,12	> 0,05
	100	0,93 ± 0,11	

Показано, что в культурах клеток маркер термостабильности при аттенуации НСП и КЦЗ штамма ТГС почти не меняется, а в культуре СПЕВ определяется статистически достоверное различие в термостабильности.

**S - маркер (размер негативных колоний (бляшек) в УК под агаровым покрытием)**

Таблица 5 Характеристика размеров бляшек вирулентного и аттенуированного штамма

Культура клеток	Количество пассажей вируса	Общее количество колоний	в т.ч. % негативных колоний диаметром, мм						средний диаметр колоний, мм X*е	P*
			> 1	1<2	2<3	3<4	4<5	5<6		
СПЕВ	5	505	4,97	65,	18,	4,8	2,4	3,7	1,96±0,04	0,01
	100	634	3,00	39	64	8	0	2		

				40, 37	22, 56	21, 14	12, 93	-	2,51±0, 04	
НСП	5	775	1,80	16, 0	40, 13	32, 25	5,0 5	4,7 7	2,87±0, 04	0,0
	100	609	-	24, 9	55, 21	18, 35	1,5 4		2,43±0, 04	1
КЦЗ	5	503	2,19	16, 39	46, 45	22, 40	10, 38	2,1 9	2,79±0, 05	0,0
	100	524	-	25, 89	35, 72	26, 79	11, 60		2,74±0, 04	5

Вирулентные штаммы коронавируса характеризуются гетерогенностью размером бляшек от  $>1$  до  $5<6$ . При аттенуации штаммы исчезает крупно и мелкобляшечный генотип вируса, что указывает на гетерогенность популяции исходного вируса ТГС. Количество бляшек размера  $1<2$ ,  $2<3$  преобладают.

Для характеристики антигенных свойств шт. D52 разного уровня пассажей в 3 линиях культур клеток была использована панель моноклональных антител (МкАТ), полученных и охарактеризованных на референтном штамме ВТГС Пурдю (H.Laude, 1986). Косвенный иммунофлюоресцентные анализ (МФА) выполняли по общепринятой схеме.

Таблица 6 Характеристика МкАТ до референтного штамма ВТГС Пурдю-115

МкАТ	Специфичность	Эпитоп	Изотип (Ig)	Титр нейтрализации
20.9	S-S'	A (A <sub>2</sub> )	G <sub>2b</sub>	50000
25b.21	S-S'	B	G <sub>2b</sub>	32000
8.8	S-S'	B	G <sub>2a</sub>	6400
3b.5	S-S'	C (C <sub>1</sub> )	G	6400
10.4	S-S'	C (C <sub>2</sub> )	G	6400
12.18	S-S'	A (A <sub>1</sub> )	G <sub>2a</sub>	64000
40.1	S-S'	D (D <sub>2</sub> )	G <sub>2a</sub>	18000
51.13	S-S'	A (A <sub>1</sub> )	G <sub>2a</sub>	256000

76.2	S-S'	Инд.	G	800
48.1	S-S'	A(A <sub>1</sub> )-B	G <sub>2a</sub>	32000
11.20	S-S'	C (C <sub>1</sub> )	G <sub>1</sub>	350
5.2	S-S'	D (D <sub>2</sub> )	G <sub>2b</sub>	640
6.179	S-S'	Инд.	G <sub>2a</sub>	< 20
67.9	S-S'	Инд.	G <sub>2a</sub>	< 20
69.21	S-S'	D (D <sub>1</sub> )	G <sub>2a</sub>	80
78.17	S-S'	D (D <sub>1</sub> )	G <sub>2a</sub>	80
44.4	S-S'	Инд.	G <sub>2a</sub>	320
39.1	S	-	G <sub>1</sub>	< 20
4.3	S	-	G <sub>2a</sub>	< 20
13.4	S	-	G <sub>2a</sub>	< 20
25.8	S	-	G	< 20
31.191	S	-	G <sub>2a</sub>	< 20
61.142	S	-	G <sub>1</sub>	< 20
25.22	M	Зов.	G <sub>2a</sub>	< 20
9.34	M	Зов.	G <sub>1</sub>	160
3.60	M	Вн.	G <sub>3</sub>	< 20
49.22	M		G	400
19.1	NP	-	G	-
22.6	NP	-	G	-
5.1	NP	-	G	-

Моноклональные антитела к референтному штамму ВТГС выявляли высокую нейтрализующую активность с антигеном к пепломерному белку S-S' и не взаимодействовали с белками M и NP.

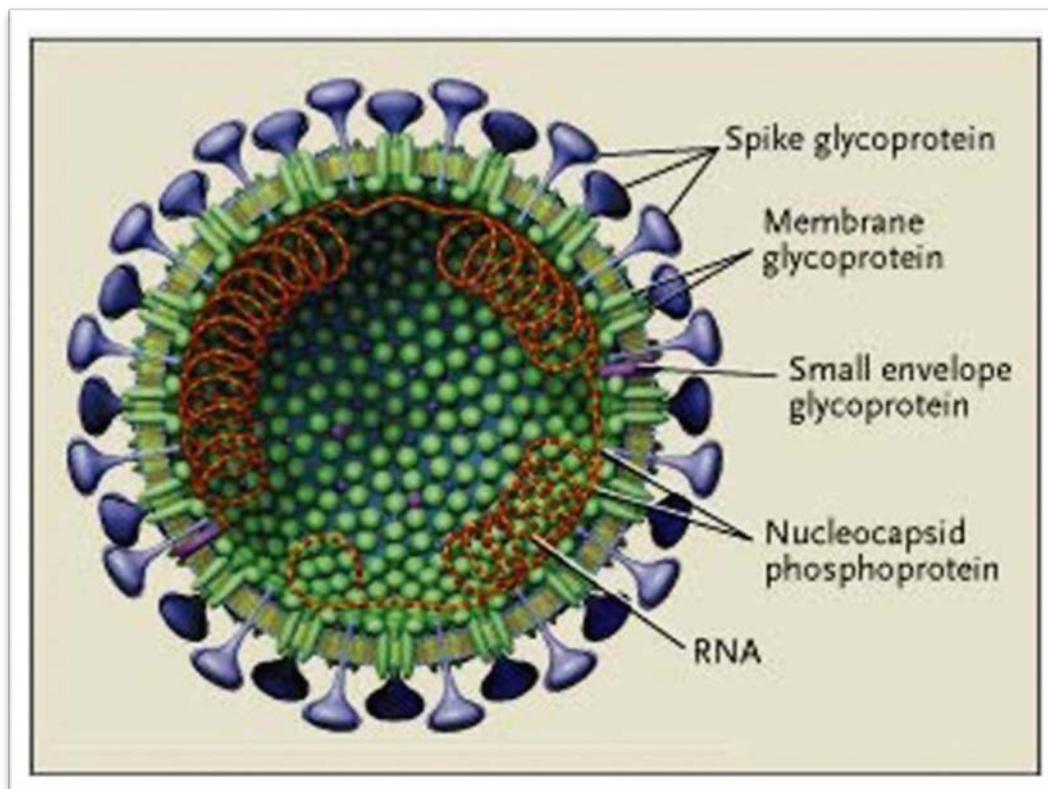


Рис 7. Схематическая структура коронавируса

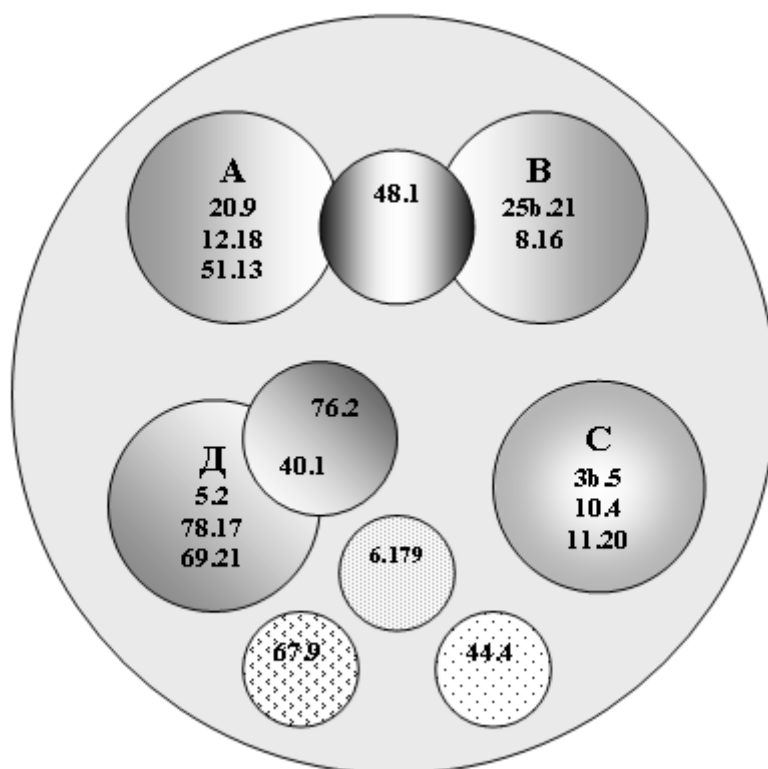


Рис. 8 Локализация антигенных детерминант на пепломерному белка (S) ВТГС (H.Laude, B.Delmas, 1986)



Таблица 7 Характеристика с моноклональными антителами в МФА антигенных свойств шт. D52 после атенуации в 3 линиях перевиваемых культур клеток

МкАТ	Специ- фичност ь	Епитоп	Пассажи вируса			
			D <sub>52</sub> ST <sub>5</sub>	D <sub>52</sub> СНЕВ <sub>100</sub>	D <sub>52</sub> НСП <sub>100</sub>	D <sub>52</sub> КЦЗ <sub>100</sub>
*20.9	S-S'	A (A <sub>2</sub> )	1/2500	1/2500	1/2500	≤1/2500
*51.13	S-S'	A (A <sub>1</sub> )	1/2500	≤1/500	≤1/2500	1/500
*12.18	S-S'	A (A <sub>1</sub> )	<1/2500	1/2500	1/2500	1/500
*48.1	S-S'	A(A <sub>1</sub> )-B	≤1/2500	1/2500	≤1/2500	1/500
*25b.21	S-S'	B	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
*8.16	S-S'	B	1/2500	≤1/500	≤1/2500	≤1/2500
**3b.5	S-S'	C (C <sub>1</sub> )	1/2500	≤1/2500	≤1/2500	≤1/2500
**10.4	S-S'	C (C <sub>2</sub> )	<1/2500	1/100	1/500	≤1/2500
11.17	S-S'	C (C <sub>1</sub> )	≤1/500	1/2500	≤1/2500	≤1/500
*40.1	S-S'	D (D <sub>2</sub> )	1/2500	≤1/2500	≤1/2500	1/2500
5.2	S-S'	D (D <sub>2</sub> )	1/500	1/500	≤1/2500	1/2500
69.21	S-S'	D (D <sub>1</sub> )	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
78.17	S-S'	D (D <sub>1</sub> )	≤1/2500	≤1/500	≤1/500	≤1/2500
*76.2	S-S'	Инд.	≤1/100	1/100	≤1/100	≤1/100
6.179	S-S'	Инд.	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
67.9	S-S'	Инд.	1/500	1/2500	1/2500	≤1/500
44.4	S-S'	Инд.	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
39.1	S'	-	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
4.3	S'	-	≤1/2500	1/2500	1/2500	≤1/2500
13.4	S'	-	≤1/2500	≤1/500	1/2500	≤1/500
25.8	S'	-	≤1/2500	1/500	1/2500	1/2500
31.91	S'	-	≤1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
61.142	S'	-	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
25.22	M	Зов.	1/2500	1/2500	1/2500	≤1/2500

9.34	M	Зов.	1/2500	1/2500	≤1/2500	≤1/2500
3.60	M	Вн.	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
49.22	M		1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
19.1	NP	-	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
22.6	NP	-	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500
5.1	NP	-	1/2500	1/2500	1/2500	1/2500

\* – МкАТ с вируснейтрализующей активностью;

\*\* – ±

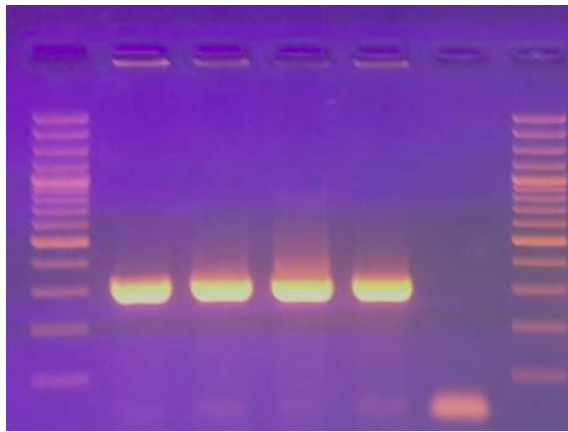
В процессе аттенуации ВТГС в разных культурах нейтрализующая активность белка S-S` оставалась высокой, в то же время МкАТ к -S-M и NP белку также активно взаимодействовали с пептидами аттенуированного вируса ТГС.

Клоны моноклональных антител 12.18; 51.13; 48.1 фиксирует изменчивость некоторых эпитопов с нейтрализующей активности штамма Д52 в процессе аттенуации в культуре КИЦЗ, а клон 8,16 в культуре СПЕВ (рис 8). Далее в таблице 8 жирным шрифтом отмечена изменчивость аттенуированного штамма Д52 с другими клонами Мкат.

### **Выявление РНК вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней шт. D52 методом возвратно-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)**

Выделение РНК выполняли с помощью набора «Рибо-сорб» согласно инструкции производителя (АмплиСенс, РФ).

Реакцию обратной транскрипции выполняли с помощью набора "RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" (рандомно праймеры) согласно инструкции производителя (Thermo Scientific, Литва). Для ПЦР были использованы специфичные к гену нуклеопротеина олигонуклеотидных праймеров следующей последовательности: прямой Uni\_1 (5'-TGCACTGATCAATGTGCTAG-3') и обратной Uni\_2 (5'-TGAAAACACTGTGGCACCCCTT-3"). Фрагмент, амплифицируемого размером 309 П.Н. .. М - маркер "100 bp Plus DNA Ladder" ("Thermo Fisher Scientific", Литва). Вирус ТГС из разных культур пропассировали в культуре СПЕВ и провели анализ продуктов амплификации проводился путем разделения фрагментов ДНК в 1,5% гели агарозы.



М 1 3а 4 6а К- М

Рис. 9 Электрофоретический анализ продуктов амплификации вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней с праймером к гену нуклеопротеина олигонуклеотидных праймеров следующей последовательности: прямой Uni\_1 (5'-TGCACTGATCAATGTGCTAG-3') и обратной Uni\_2 (5'-TGAAAACACTGTGGCACCCCTT-3'). Фрагмент, амплифицируемого размером 309 П.Н. .. М - маркер "100 bp Plus DNA Ladder" ("Thermo Fisher Scientific", Литва).

М- маркер розмеров фрагментов РНК

№1- штамм коронавируса Д52 из кк НСП

№3а- штамм коронавируса Д52 из кк СПЕВ

№4- Д52 в культуре клеток ST- тестикул поросят

№6а- Д52 в культуре щитовидной железы свиней (КВЩ)

### **Определение цитотоксического действия исследуемых веществ**

Для определения цитотоксической концентрации исследуемых веществ использовали клетки СПЕВ, чувствительные к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС). Использовали 96-луночные плашки, в которых выращивали клетки СПЕВ, через 24 часа роста клеток с сформированным монослоем, ростовую среду в плашках удаляли и в лунки вносили по 100 мкл чистой среды с антибиотиками. Исследуемые вещества вносили в концентрациях: Неофлазид (14.2 – 0,22 мкг/мл), Протефлазид® (6.4 – 0,1 мкг/мл), БАВп (50 – 0,77

мкг/мл), в 3-х повторах. Через 24 часа проводили визуальную оценку действия исследуемых веществ и вносили МТТ-раствор для колOMETрического определения жизнеспособности клеток. Согласно визуальным наблюдениям все начальные концентрации исследуемых веществ были токсичны для клеток. Результаты определения оптической плотности исследуемых клеток представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты определения цитотоксического действия  
Неофлазида, Протефлазида, БАВп

Вещество	Концентрация мкг/мл	Оптическая плотность			Среднее значение ОП/540	% живых клеток	CC <sub>50</sub> в мкг/мл
		ОП/540 нм					
Неофлазид	28,4	0,2116	0,1300	0,3115	0,2177	33,8	>25,1
	14,2	0,6767	0,9051	0,8933	0,8250	128	
	7,1	0,8836	1,0599	0,9188	0,9541	148	
	3,5	0,8531	0,7325	0,9804	0,8560	133	
	1,77	0,8273	0,8397	1,3257	0,9977	155	
	0,88	0,8122	0,4421	0,9089	0,7210	112	
	0,44	0,9381	1,1184	0,8790	0,9785	152	
	0,22	0,1827	0,0288	1,0398	0,7504	116	
Протефлазид®	6,4	0,1675	0,2107	0,2063	0,1948	30	1,2
	3,2	0,1032	0,1148	0,1387	0,1189	18	
	1,6	0,1416	0,1290	0,1196	0,1300	20	
	0,8	0,6240	0,2414	0,3550	0,4068	63,2	
	0,4	0,5341	0,3368	0,4804	0,4504	70	
	0,2	1,2187	1,2730	0,1317	0,8744	135	
	0,1	1,2314	0,9391	0,5280	0,8995	139	
БАВп	50	0,2159	0,2008	0,1517	0,1894	29,4	

	25	0,3970	0,3320	0,4357	0,3882	60,3	33
	12,5	0,7724	0,5878	0,8293	0,7298	113,4	
	6,2	0,9887	0,8961	0,2221	0,7019	109,1	
	3,1	0,9498	0,8950	0,9700	0,9382	145	
	1,65	0,6508	1,0401	0,8173	0,8360	130	
	0,77	0,2100	0,9583	0,7754	0,6479	100	
Культура клеток		0,9515	0,9023	1,1107	0,643		
		1,3019	1,3062	1,1513	50% -		
		0,9035	1,1103	0,2479	0,3215		
		0,8777	0,2352	0,5658			

На основании полученных результатов построены графики и определена цитотоксическая концентрация ( $CC_{50}$ ) для каждого исследованного вещества в культуре клеток Нер-2.

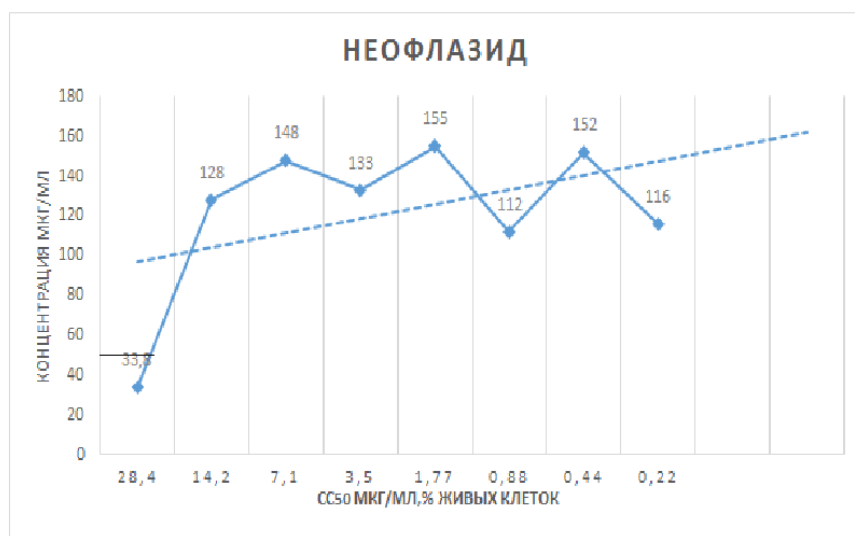


Рис. 10

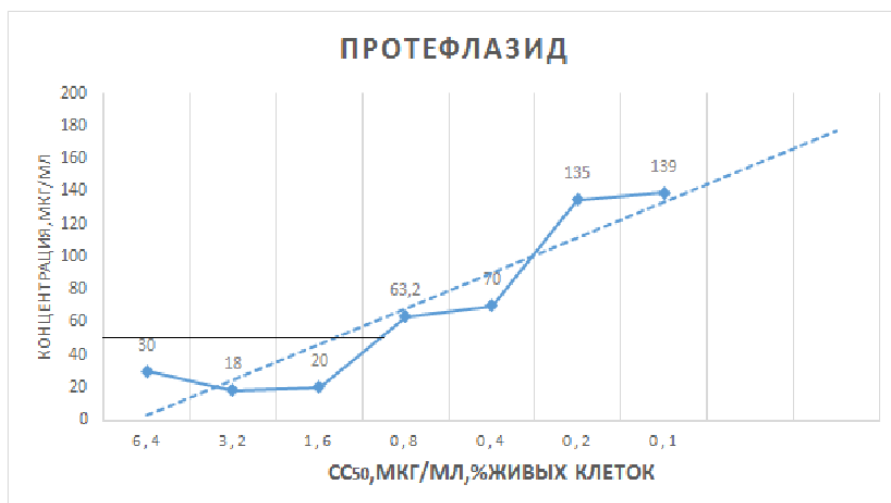


Рис.11

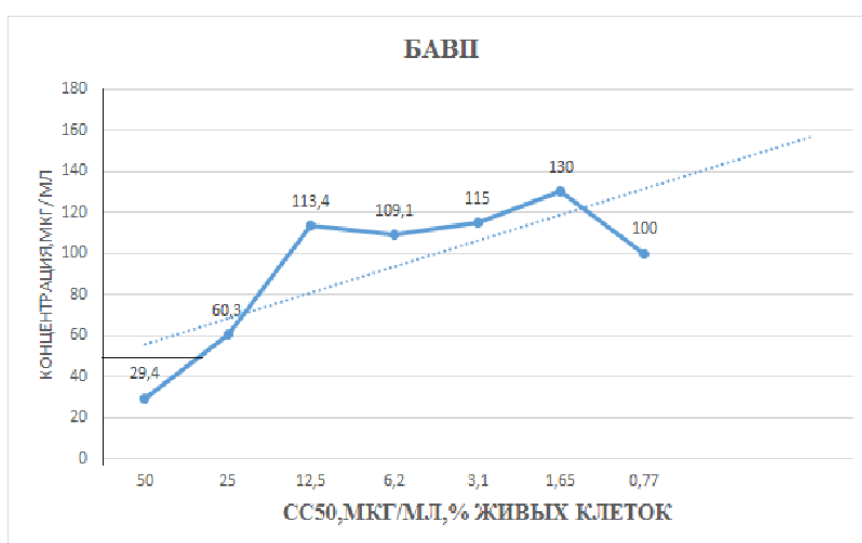


Рис.12

Согласно полученным результатам  $CC_{50}$  для Неофлазид составил 25,1 мкг/мл, для Протефлазид® – 1,2 мкг/мл, для БАВп – 33 мкг/мл.

Для подтверждения безопасности исследуемых веществ проведены исследования по изучению влияния их в нетоксических дозах на митотический режим клеток. Для этой цели в 24-луночные плашки со специально обработанными покровными стеклами вносили культуру клеток НГУК (невринома гассерова узла крысы). На следующие сутки в лунки 80-90% монослоем на покровных стеклах вносили препараты в разных концентрациях, культивировали в течение 24 часов. Затем стекла с клетками фиксировали, окрашивали

гематоксилином и микроскопировали согласно методике Блюмкина. Результаты исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Влияние препаратов на митотический режим клеток НГУК

Препараты	Концентрация в мкг/мл	Митотический индекс		Аномальные митозы	
		в ‰	КОК	в ‰	КОК
Протефлазид-100	3,2	20,0	1,05	20,0	0,95
Протефлазид – 1000	0,32	18,7	0,94	22,2	1,05
Неофлазид 500	14,2	17,0	0,89	23,5	1,1
Неофлазид 1000	7,1	18,0	0,94	22,2	1,05
Неофлазид 2000	3,2	20,0	1,05	20,0	0,95
БАВп-20	5	21,0	1,1	23,8	1,1
БАВп-50	2	17,0	0,89	23,5	1,1
БАВп-100	1	23,0	1,2	21,7	1,03
Контроль ткани		19,0	1,0	21,0	1,0

Кок – коэффициент отклонения от контроля ткани

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что исследуемые вещества в нетоксических концентрациях не влияют на митотический режим клеток – митотический индекс и количество аномальных митозов, так как

коэффициент отклонения от контроля клеток не отличается статистически достоверно.

### **Исследование антивирусной активности исследуемых действующих веществ Неофлазид, Протефлазид® и БАВп на модели коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС)**

Влияние вышеуказанных веществ на репродукцию коронавируса (ТГС) изучали с использованием следующей схемы введения препаратов:

- одновременное введение вируса ТГС и исследуемых препаратов, т.е. во время адсорбции ТГС на клетки;

Для изучения антикоронавирусной активности Неофлазида, Протефлазид® и БАВп использовали перевиваемую культуру клеток СПЕВ. Клетки выращивали в плашках на среде RPMI-1640 + 10 % фетальной сыворотки при температуре 37<sup>0</sup> С в термостате с подачей CO<sub>2</sub>.

Использовали штамм вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней, с инфекционным титром-5,0 -8,5 lg ID<sub>50</sub>.

Для изучения антивирусной активности исследуемых веществ отбирали суточные культуры клеток СПЕВ. Среду роста сливали, на монослой клеток вносили исследуемые препараты в разных концентрациях. Через 1 час контакта вносили вирус в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Культуры инкубировали в термостате с подачей CO<sub>2</sub> в течение 2 суток, ежедневно контролируя при помощи микроскопа и отмечая репродукцию вируса по цитопатогенному действию ТГС на клетки СПЕВ по сравнению с контрольными культурами, где монослой не подвергался никаким воздействиям.

Цитопатогенное действие коронавируса ТГС на клетки морфологически проявляется в образовании мелкоклеточной дегенерации.

Через 3е суток собирали культуральную среду из лунок плашек и в ней определяли инфекционный титр.



Определение антикоронавирусной активности препаратов (EC<sub>50</sub>) в культуре клеток СПЕВ представлены в таблицах и графиках.

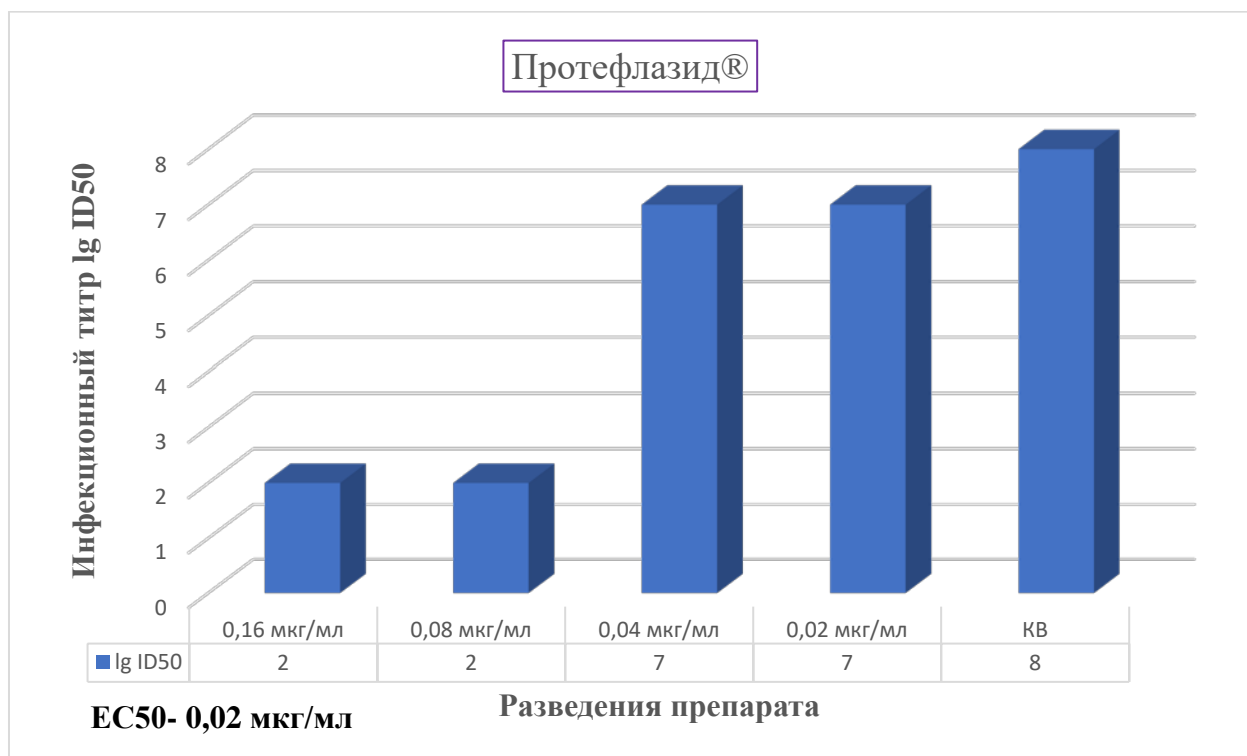
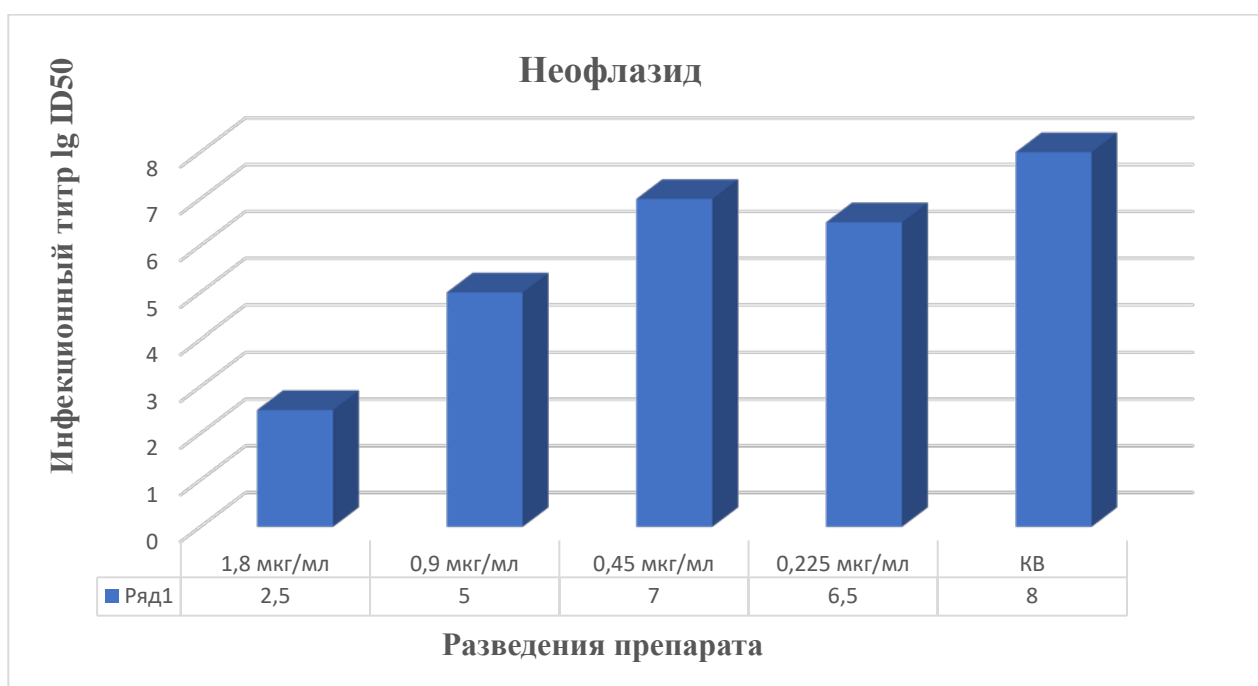


Рис.14 Инфекционный титр вируса ТГС в лунках обработанных разными разведениями лекарственного препарата Протефлазид ® и вирусом ТГС 100 ID50



EC50- 0,225 мкг/мл

Рис.15 Инфекционный титр вируса ТГС в лунках обработанных разными разведениями субстанции Неофлазида и вирусом ТГС 100 ID50

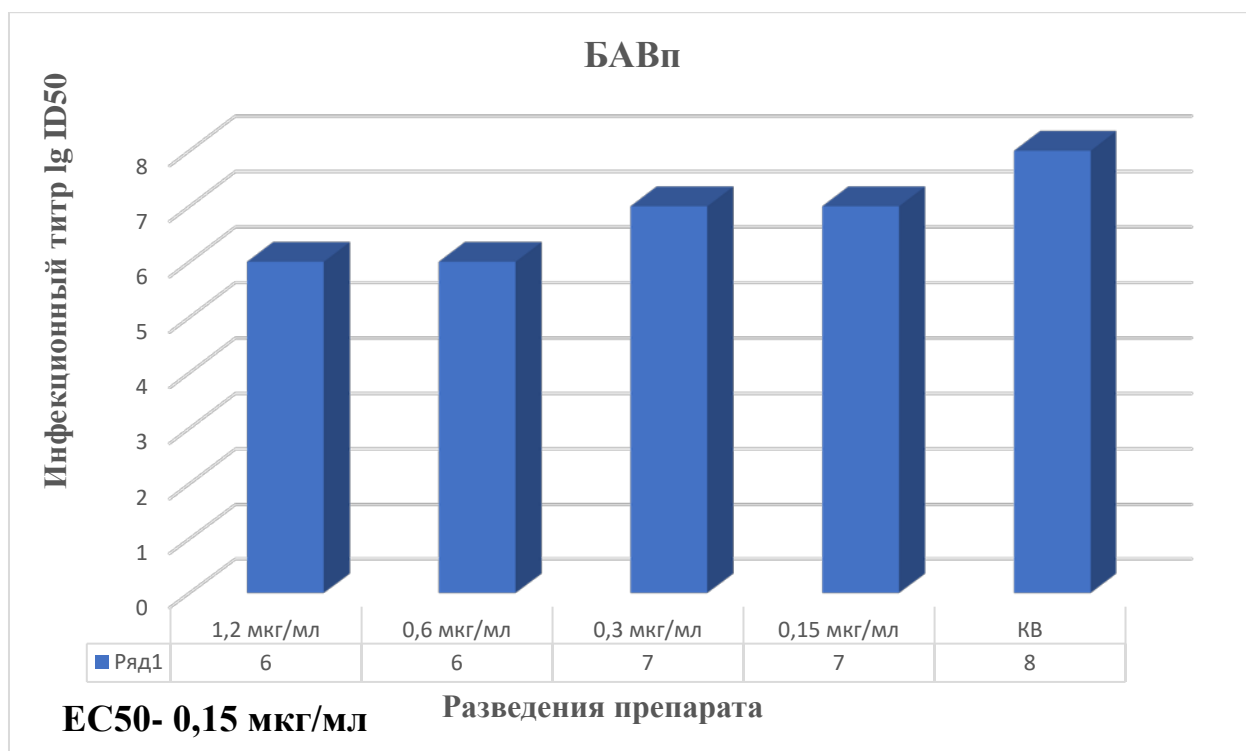


Рис.16 Инфекционный титр вируса ТГС в лунках обработанных разными разведениями суммы флавоноидов (БАВп) и вирусом ТГС 100 ID50

Согласно полученным результатам было установлено, что исследуемые вещества статистически достоверно ингибируют репродукцию коронавируса ТГС.

Критерием оценки ингибирующей активности противовирусных препаратов в системах *in vitro* является индекс селективности (IS) препаратов и снижение инфекционного титра на 1,5-2,0 lg ТЦД<sub>50</sub>. В таблице 10 представлены суммированные результаты исследований по определению СС<sub>50</sub>, ЕС<sub>50</sub>, IS исследуемых веществ.

Таблица 10 Показатели CC50, EC50, IS при определении антивирусной активности исследуемых активных веществ и лекарственного препарата Протефлазид®, субстанции Неофлазид, и суммы флавоноидов БАВп, в культуре клеток СПЕВ на модели коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней.

<b>Название препарата</b>	<b>CC50 мкг/мл</b>	<b>EC50 мкг/мл</b>	<b>IS</b>	<b>Ингибция инфекционного титра в lg ID50</b>
Протефлазид	1,2	0,02	60	6,0-1,0
Неофлазид	25,1	0,225	117	5,5-1,0
БАВп	33,0	0,15	220	2,0-1,0

## **Исследование токсичности и апоптоз-индуцирующей активности биологически активного вещества лекарственного препарата Протефлазид®, субстанции Неофлазид и суммы флавоноидов БАВп в неинфицированных и инфицированных коронавирусом ТГС в культуре клеток СПЕВ**

Исследовали токсичность и апоптоз-индуцирующую активность Протефлазид®, Неофлазид и БАВп для перевиваемых клеток СПЕВ. Клетки выращивали в суспензии в стандартных условиях в среде RPMI-1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров.

Протефлазид® в концентрации 0,16 мкг/мл, Неофлазид 1,8 мкг/мл, БАВп 1,2 мкг/мл и БАВс 1,0 мкг/мл вносили в культуру клеток СПЕВ инфицированных ТГС.

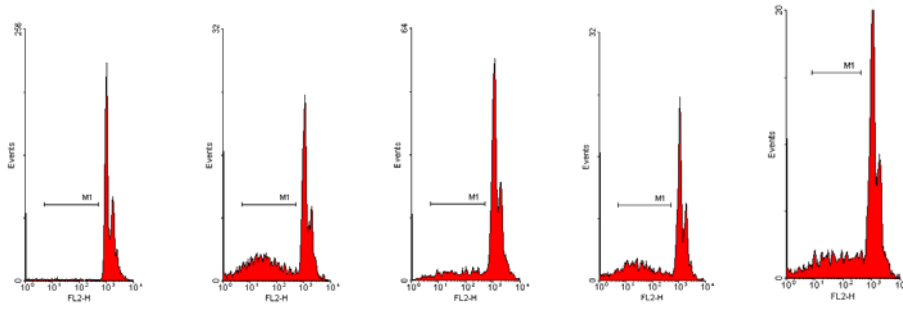
Инкубацию проводили на протяжении 48 ч при 37 °С в газовой среде, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации клетки подсчитывали и определяли жизнеспособность клеток окрашиванием трипановым синим. С аликвотами клеток, отмытых в забуференном физиологическом растворе, выполняли цитометрический анализ после окрашивания суспензии клеток пропидия йодидом (50 мкг/мл) в гипотоническом растворе с 0,1% цитрата натрия и 0,1% тритона X-100.

Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре FACScan фирмы "Becton Dickinson" (США). После проведения проточной цитометрии результаты анализировали с помощью компьютерной программы CELLQuest ("BD Biosciences Pharmingen"). Анализировали также распределение по фазам клеточного цикла в препаратах, окрашенных пропидия йодидом с помощью программы ModFit LT 2.0 ("Verity Software House", Topsham, ME, США).

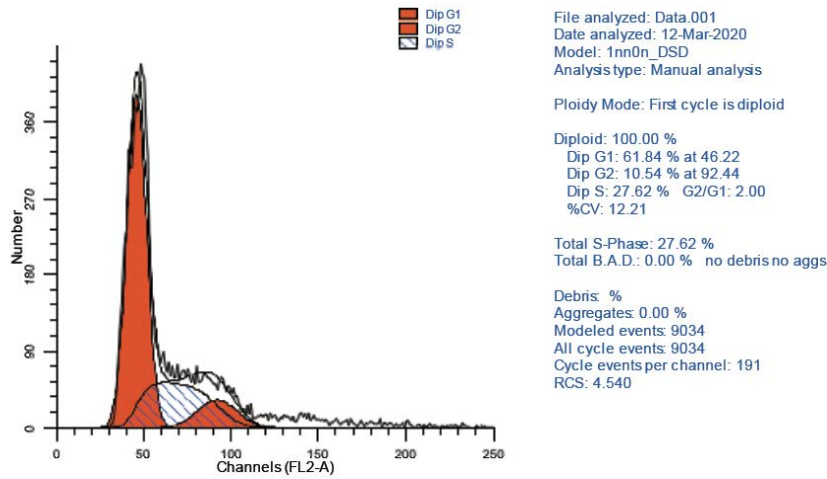
В опыт были взяты следующие варианты культур:

- 1 – СПЭВ
- 2 – СПЕВ+ТГС 10<sup>-3</sup>
- 3 – СПЕВ+ТГС + ПФ 1:1000 (0,16 мкг/мл)
- 4 – СПЕВ+ТГС + НФ 1:2000 (1,8 мкг/мл)
- 5 – СПЕВ+ТГС + БАВп 1:100 (1,2 мкг/мл)

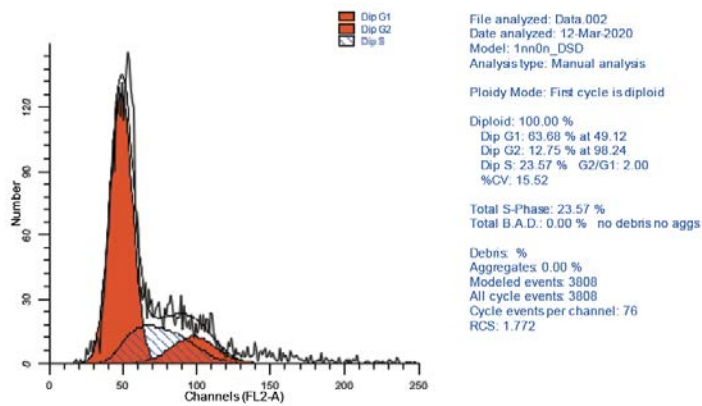
Результаты представлены на рис.18 и в таблице 11



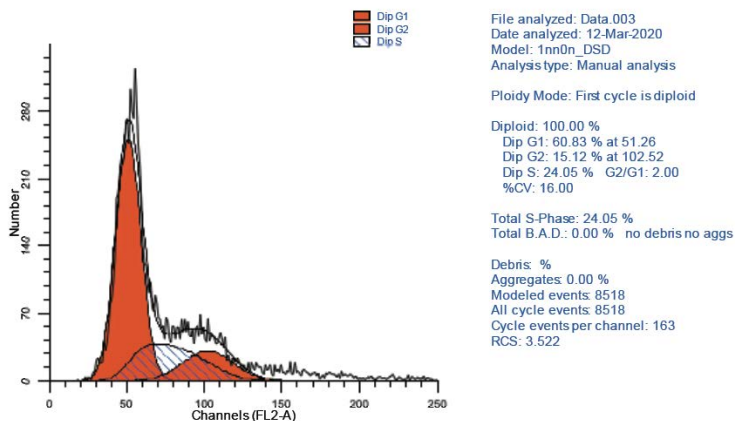
## Контроль СПЭВ



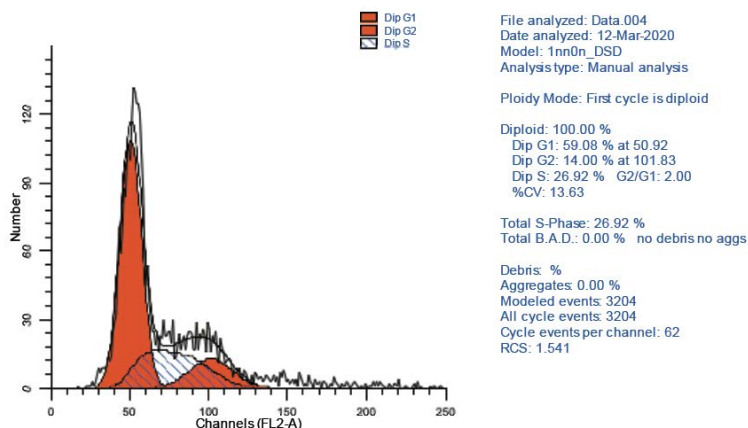
## ТГС



## ТГС + Протефлазид



### ТГС + Неофлазид



### БАВп

Рис.18

Таблица 11 Количество гипоплоидных клеток для разных вариантов опыта

Название образца	Концентрация препарата мкг/мл	% гипоплоидных клеток
СПЭВ		2,9
СПЕВ+ТГС $10^{-3}$		37,8
СПЕВ+ТГС + ПФ	0,16	18,7
СПЕВ+ТГС + НФ	1,8	31,0
СПЕВ+ТГС+ БАВп	1,2	24,1

ТГС вызывает значительный апоптоз в клетках СПЭВ (37,8% в сравнении с 2,9% в контроле) при значительном снижении количества клеток в образце.

Лекарственный препарат Протефлазид® в указанных концентрациях существенно снижает процент апоптотических клеток в сравнении с клетками, инфицированными вирусом 18,7% для Протефлазид. Более слабый эффект оказывал БАВп- 24,1. У Неофлазида – 31% гипоплоидных клеток.

## ВЫВОДЫ

В результате исследования по изучению противовирусного действия биологически активных веществ лекарственного препарата Протефлазид®, субстанции Неофлазид, и суммы флавоноидов БАВп на экспериментальной модели коронавируса- вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) в культуре клеток СПЭВ было показано, что Протефлазид® и Неофлазид эффективно ингибируют репродукцию коронавируса свиней в концентрации 0,02мкг/мл- 0,225 мкг/мл на 6,0-2,0 lgID50 с индексом селективности 60 и 117 соответственно, биологически активная структура БАВп ингибировала репродукцию коронавируса свиней на 1,0-2,0 lgID50 в концентрации 0,15 мкг/мл с индексом селективности 220. Методом молекулярного докинга в кристаллическую структуру nCov2019 протеазы было показано, что лиганд хорошо располагается в каталитическом кармане протеазы образуя водородные связи с остатками Ser 144, Gly 143 и располагается между каталитическими остатками His 163, Asn 142 and Cys 145, и образует двумя гидроксилами катехола водородные связи с остатком Glu 166, что свидетельствует о ингибировании главной протеазы коронавируса 2019-nCoV активной структурой БАВп.

ТГС вызывает значительный апоптоз в клетках СПЭВ (37,8% в сравнении с 2,9% в контроле) при значительном снижении количества клеток в образце.

Протефлазид® в указанных концентрациях существенно снижает процент апоптотических клеток в сравнении с клетками, инфицированными вирусом (18,7%).

Сравнительный анализ противовирусного действия исследуемых веществ лекарственного препарата Протефлазид®, субстанцию Неофлазид и суммы флавоноидов БАВп на моделях вирулентного и аттенуированного штамма Д52 вируса ТГС в настоящее время проводится.



## ЛИТЕРАТУРА:

1. Характеристика генетических признаков штаммов коронавируса-возбудителя трансмиссивного гастроэнтерита свиней.  
Сельскохозяйственная биология. сер. «Биология животных», 1990, N4, с.165-171  
Краснобаев Е.А., Дерябин О.Н., Дерябина Е.Г., Попова Г.А.
2. Сравнительное изучение штаммов коронавируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней с панелью моноклональных антител к референтному штамму. Материалы Всесоюзной научно-технической конференции "Современные проблемы иммунологии, биотехнологии, генной и клеточной инженерии", Н.Новгород, 10-12 окт.1990 г., с.42-44.  
Дерябин О.Н., Лод У., Краснобаев Е.А., Джелфи Ж.
3. Влияние системы культивирования на генетические признаки вируса ТГС. Вестник сельскохозяйственной науки, 1991, №8 (419), с.138-141. Дерябин О.Н., Дерябина Е.Г., Краснобаев Е.А., Бобык В.И.
4. Fauquet С.М. Taxonomy, classification and nomenclature of viruses. In the "Encyclopedia of Virology, 3<sup>rd</sup> edition (eds.: B.W.J.Many & M.H.V. Van Regenmortel), Academic Press. 2008, v. 5.
5. Field H.J., Hodge R.A.V. Antiviral agents. - In the "Encyclopedia of Virology, 3<sup>rd</sup> edition (eds.: B.W.J.Many & M.H.V. Van Regenmortel), Academic Press. 2008, v. 1.
6. Harborne J.B., Williams Ch.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, v. 55, N 6, 481-504.
7. Jaime J.M.F.V, Redko F., Muschietti L.V., Campos R.F., Mantino V.S., Cavallaro V.S. *In vitro* antiviral activity of plant extracts from *Asteraceae* medicinal plants. – *Virology Journal*, 2013, v.10, 245-
8. Jung HA, Moon HE, Oh SH, Kim BW, Sohn HS, et al. (2012) Kinetics and molecular docking studies of kaempferol and its prenylated derivatives as aldose reductase inhibitors. *Chem Biol Interact* 197: 110–118. doi: 10.1016/j.cbi.2012.04.004
9. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. – *J. Nat. Products*, 2014, v.77, 629-661.
10. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1458-61.
11. Priyadarsini R.V., Murugan R.S., Maitreyi S., Ramalingam R., Karunagran D., Nagini S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cell through p53 induction and NK-κB inhibition. – *Europ.J.Pharmacol.*, 2010, 649, 84-91.
12. Тараховский Б.С., Ким Ю.А., Абрасилов Б.С., Музафаров Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина (отв. ред. Е.И.Маевский). – *Synchrobook*, 2013, Пущино, 2013, 310 с.

13. Arango D., Morohashi V., Yilmaz A., Kuramochi K., Parihar A. Molecular basis of action of a dietary flavonoid revealed by the comprehensive identification of apigenin human targets. – Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2013, E2153-2162.
14. Fauquet C.M. Taxonomy, classification and nomenclature of viruses. In the “Encyclopedia of Virology, 3<sup>rd</sup> edition (eds.: B.W.J.Many & M.H.V. Van Regenmortel), Academic Press. 2008, v. 5.
15. Field H.J., Hodge R.A.V. Antiviral agents. - In the “Encyclopedia of Virology, 3<sup>rd</sup> edition (eds.: B.W.J.Many & M.H.V. Van Regenmortel), Academic Press. 2008, v. 1.
16. Harborne J.B., Williams Ch.A. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 2000, v. 55, N 6, 481-504.
17. Jaime J.M.F.V, Redko F., Muschietti L.V., Campos R.F., Mantino V.S., Cavallaro V.S. *In vitro* antiviral activity of plant extracts from *Asteraceae* medicinal plants. – Virology Journal, 2013, v.10, 245-
18. Jung HA, Moon HE, Oh SH, Kim BW, Sohn HS, et al. (2012) Kinetics and molecular docking studies of kaempferol and its prenylated derivatives as aldose reductase inhibitors. Chem Biol Interact 197: 110–118. doi: 10.1016/j.cbi.2012.04.004
19. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. – J. Nat. Products, 2014, v.77, 629-661.
20. Щербінська А.М., Дяченко Н.С. Рибалко С.Л., Носач Л.М., Дядюн С.Т., Вринчану Н.О. Вивчення антивірусної дії лікарських засобів. В кн.. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод.реком., Київ, 2001, 371-396.
21. Laude H., Gelfi T., Rasschaert D., Dellmass B/ Caracterisation antigenique du coronavirus respiratoire porcin f l'aide d'antiocops monoclonaux diriges contre le virus de la Gastro-enterite Transmissible. 1988, Tournees Rech Porcine en France, 20, 89-94
22. Laude H., Chapsal. J., Gefli T., Labiau S. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus . 1986., Properties of monoclonal antibodies directed against virions pronein J. gen.Virol. 67, 119-130
23. Laude H., Rasschaert D and Huet T. Sequence and N-terminal Processing of the Nransmembrane Heotein E1 of Cjrjnavirus Transmissible Gastroenteritis Virus. J.Gen.Virol, 1987, 68, 1687-1693.