УДК: 615.332+615.074+615.451.16
№ держреєстрації 0120U105251
Інв.№

Державна установа «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім.Л.В.Громашевського Національної Академії медичних наук України»
03680, м.Київ, вул.Амосова, 5 тел. (044) 275 37 11

ЗАТВЕРДЖУЮ
Заст. директора з наукової роботи ДУ «ІЕІХ НАМНУ»
д.м.н._____М.Г. Люльчук
«14» грудня 2021 р.

З В І Т
про науково-дослідну роботу

за договором від 29 жовтня 2020 року № 86/01.2020
за договором від 30 квітня 2021 року № 116/01/0226

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТА БЕЗПЕЧНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ НОВИХ ФІТОХІМІЧНИХ ТА БАКТЕРІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ КОРОНАВІРУСНОЇ ТА ІНШИХ НАЙПОШИРЕНІШИХ ІНФЕКЦІЙ

Заключний звіт за результатами реалізації проєкту 2020.01/0226
грантова підтримка Національного фонду досліджень України
конкурс "Наука для безпеки людини та суспільства"

Науковий керівник НДР:
д.м.н., проф., чл.-кор. _____ В.І. Задорожна
14 грудня 2021 р.

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського НАМН України», протокол від 14 грудня 2021 р. № 10

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР директор інституту ДУ «ІЕІХ НАМНУ», д.м.н., проф., чл.-кор.	14.12.2021р.	В.І. Задорожна (Реферат, Вступ, Розділи 2, 3, Висновки)
Відповідальні виконавці: зав. лаб. експериментальної хіміотерапії (ЛЕХВІ), д.м.н., проф.	14.12.2021р.	С.Л. Рибалко (Розділи 2, 3, 9, 10, 11, 12, 14)
зав. лаб. молекулярної вірусології, д.м.н., проф.	14.12.2021р.	А.М. Щербінська (Розділи 11, 12, 13, 15)
Виконавці: науковий співробітник	14.12.2021р.	О.М. Дерябін (Розділи 9, 11, 12, 13, 15)
старший науковий співробітник, д.м.н.	14.12.2021р.	М.Г. Люльчук (Розділи 10, 12, 13, 14)
Субвиконавці: старший науковий співробітник, к.т.н.	14.12.2021р.	Т. М. Луценко (вступ, розділи 1, 3, 4, 5, 8 висновки)
старший науковий співробітник, д.т.н., доц., с.н.с.	14.12.2021р.	Н. Б. Голуб (розділи 5, 6)
старший науковий співробітник, к.т.н.	14.12.2021р.	Ю. В. Горшунов (розділи 6, 7)
старший науковий співробітник, к.б.н.	14.12.2021р.	О. Я. Беспалова (розділи 5, 6)
науковий співробітник, доктор філософії	14.12.2021р.	В. В. Мотроненко (розділ 3, 4, 8)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 193 с.; 43 табл.; 83 рис.; 122 джерел.

Об'єкт дослідження: лікарська рослинна сировина та біологічно активні речовини рослинного походження із передбачуваною противірусною активністю, бацилярні біополімери, епідермальний фактор росту, вірус грипу, герпесу 1 та 2 типу, сурогатний вірус гепатиту С – вірус бичачої вірусної діареї, коронавірус – трансмісивний гастроентерит свиней (ТГС).

Предмет дослідження: фітохімічний та фармакотерапевтичний дизайн, молекулярна-біологічна характеристика, біологічна активність, антивірусна дія.

Мета роботи: 1) розробка, фіто- та біохімічне вивчення оригінальної фітофармацевтичної рецептури із передбачуваною противірусною активністю.
2) визначення противірусної дії фітопрепарату та препаратів бацилярних біополімерів на моделях вірусів грипу, герпесу, гепатиту С та коронавірусу ТГС та вивчення механізмів їх противірусної дії. Що передбачає виконання задач:

- Розробити лабораторну технологію отримання фітопрепарату та бацилярних біополімерів;
- Обґрунтувати параметри фіто-, біохімічної та молекулярно біологічної стандартизації фітопрепарату та бацилярних біополімерів.

Методи дослідження – фітохімічні, біохімічні, фітобіотехнологічні, вірусологічні, молекулярно-біологічні, імунологічні, бактеріологічні, цитологічні.

Результати та їх новизна

Під час виконання роботи було проведено ідентифікацію та кількісне визначення біологічно активних речовин (БАР) рослинного походження у лікарській рослинній сировині хроматографічними та спектрофотометричними методам. Також було здійснено розробку оригінальної фітофармацевтичної композиції «Лалосопіл» з лікарської рослинної сировини, що на підставі фітохімічного аналізу є перспективною з точки зору противірусної активності,

було проведено його аналітичну стандартизацію та розробку методів контролю якості.

Вперше показана антивірусна активність фітопрепарату Лалосопіл проти вірусів герпесу 1 та 2 типу, сурогатного вірусу гепатиту С – вірусу бичачої вірусної діареї, коронавірусу – трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС). Згідно з високим індексом селективності фітопрепарат Лалосопіл по відношенню до вірусів герпесу, гепатиту С та коронавірусу ТГС можна віднести до високоефективних антивірусних препаратів.

Доведено, що вплив препарату на моделі статевого герпесу самців *in vivo*, при використанні комбінованої схеми введення (*per os* та аплікації) індекс ефективної лікувальної дії був на рівні референтного препарату Віролекс.

Препарат Лалосопіл є політаргетним препаратом, механізм антивірусної дії якого здійснюється на рівні інгібування синтезу РНК та ДНК та індукції α-інтерферону на рівні референтного індуктору інтерферону Poly(I)·Poly(C).

З культуральної рідини бактерій нами були виділені бацилярні біополімери, досліджено їх молекулярно-біологічні властивості, показано, що до їх складу входять пептиди, які мають подібну лінійну послідовність не тільки з антитілами до вірусних антигенів, але і з моноклональним антитілом до рецептору фактору росту Her-2 (Трастузумаб). Враховуючи роль цих рецепторів у проникненні та реплікації вірусів, пептиди, які містять антитіла до рецептору епідермального фактору росту, є потенційно активними інгібіторами репродукції широкого кола ДНК та РНК вірусів.

Представлено експериментальну розробку нових бактеріальних антивірусних препаратів, а саме розроблено лабораторний регламент препарату, досліджено молекулярно-біологічні властивості препаратів, досліджено їх антивірусну активність.

Показано, що бацилярні біополімери мають новий механізм дії – вплив на рецептори епідермального фактору росту. Інгібіція репродукції вірусу грипу здійснюється на мультитаргентному рівні – блокада генів транскриптазного комплексу та матриксного білка, а також інгібіції гену гемаглютиніну.

Ключові слова: ЛІКАРСЬКА РОСЛИННА СИРОВИНА, ФЛАВОНОЇДИ, ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ, СЕЛЕРА ПАХУЧА, КОРЕНІ ЛОПУХА ВЕЛИКОГО, КОРЕНИВИЩА ТА КОРЕНІ ЛАБАЗНИКУ ЗВИЧАЙНОГО, ПІДМАРЕННИК СПРАВЖНІЙ, ЛЬОНОК ЗВИЧАЙНИЙ, СОФОРА ЯПОНСЬКА, БАЦИЛЯРНІ БІОПОЛІМЕРИ, BACILLUS SUBTILIS, STAPHILOCOCCUS AUREUS, LACTOBACTERIUM, CORINEBACTERIUM, СИНТЕТИЧНІ ПЕПТИДИ, ЕПІДЕРМАЛЬНИЙ ФАКТОР РОСТУ

ABSTRACT

SRW report: 193 p.; 43 tables; Fig. 83; 122 sources.

Object of study: medicinal plant raw materials and biologically active substances of plant origin with presumed antiviral activity, bacillary biopolymers, epidermal growth factor, influenza virus, herpes type 1 and 2, surrogate hepatitis C virus - bovine viral diarrhea virus, coronavirus - transmissible porcine gastroenteritis (TPG).

Subject of research: phytochemical and pharmacotherapeutic design, molecular-biological characteristics, biological activity, antiviral action.

Purpose: 1) development, phyto- and biochemical study of the original phytopharmaceutical formulation with anticipated antiviral activity. 2) determination of antiviral action of phytopreparation and preparations of bacillary biopolymers on models of influenza, herpes, hepatitis C and coronavirus - transmissible porcine gastroenteritis (TPG) viruses and study of mechanisms of their antiviral action. What involves the tasks:

- To develop laboratory technology for phytopreparation and bacillary biopolymers;
- To substantiate the parameters of phyto-, biochemical and molecular biological standardization of phytopreparation and bacillary biopolymers.

Research methods – phytochemical, biochemical, phytobiotechnological, virological, molecular biological, immunological, bacteriological, cytological.

Results and their novelty

During the work, the identification and quantification of biologically active substances (BAS) of plant origin in medicinal plant raw materials by chromatographic and spectrophotometric methods were performed. Also, the original phytopharmaceutical composition "Lalosopil" was developed from medicinal plant raw materials, which on the basis of phytochemical analysis is promising in terms of antiviral activity, its analytical standardization and development of quality control methods.

For the first time, the antiviral activity of the phytopreparation Lalosopil against herpes viruses type 1 and 2, surrogate hepatitis C virus - bovine viral diarrhea virus, coronavirus - transmissible porcine gastroenteritis (CBT) was shown. According to the

high selectivity index, the phytopreparation Lalosopil in relation to herpes viruses, hepatitis C and coronavirus THC can be attributed to highly effective antiviral drugs.

It is proved that the effect of the drug on the model of genital herpes in males in vivo, using a combined scheme of administration (per os and application), the index of effective therapeutic effect was at the level of the reference drug Virolex.

Lalosopil is a polytarget drug, the mechanism of antiviral action of which is carried out at the level of inhibition of RNA and DNA synthesis and induction of α-interferon at the level of the reference inducer of interferon Poly (I) · Poly (C).

From bacterial culture fluid we isolated bacillary biopolymers, studied their molecular biological properties, showed that they contain peptides that have a similar linear sequence not only with antibodies to viral antigens, but also with a monoclonal antibody to the growth factor receptor Her-2 (Trastuzumab). Given the role of these receptors in the penetration and replication of viruses, peptides that contain antibodies to the epidermal growth factor receptor are potentially active inhibitors of the reproduction of a wide range of DNA and RNA of viruses.

Experimental development of new bacterial antiviral drugs is presented, namely laboratory regulations of the drug are developed, molecular and biological properties of drugs are investigated, their antiviral activity is investigated.

It has been shown that bacillary biopolymers have a new mechanism of action - the effect on epidermal growth factor receptors. Inhibition of influenza virus reproduction is carried out at the multi-target level - blockade of genes of the transcriptase complex and matrix protein, as well as inhibition of the hemagglutinin gene.

Keywords: MEDICINAL PLANTS, FLAVONOIDS, ANTIVIRAL ACTIVITY, CELERY FRAGRANT, THE ROOTS OF BURDOCK, THE ROOTS OF MEADOWSWEET COURSE, BEDSTRAW REAL, LINARIA VULGARIS, JAPANESE SOPHORA, BACILLARY BIOPOLYMERS, BACILLUS SUBTILIS, STAPHILOCOCCUS AUREUS, LACTOBACTERIUM, CORINEBACTERIUM, SYNTHETIC PEPTIDES, EPIDERMAL GROWTH FACTOR

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ……..11
ВСТУП……...12
1. ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНИЙ ТА ФІТОХІМІЧНИЙ ДИЗАЙНИ КОМПЛЕКСНОГО РОСЛИННОГО ПРЕПАРАТУ ІЗ ПЕРЕДБАЧУВАНОЮ ПРОТИВІРУСНОЮ АКТИВНІСТЮ ……...…….…15
2. МОЛЕКУЛЯРНА МІМІКРІЯ БАКТЕРІЙ І ВІРУСІВ У СТВОРЕННІ АНТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ ……..…….……21
3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ……..25
4. ФІТОХІМІЧНЕ ТА БІОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ……..53
4.1. Дослідження коренів лопуху справжнього Arctium lappa L…….…….54
4.2. Дослідження плодів софори японської Sophora japonica L……56
4.3. Дослідження шишок хмелю Humulus lupulus L……..…59
4.4. Дослідження календули лікарської Calendula officinalis L…….…59
4.5. Дослідження лабазника звичайного Filipendula vulgaris Moench……..61
4.6. Дослідження підмаренника справжнього Galium verum L……62
4.7. Дослідження льонку звичайного Linaria vulgaris L……..……..64
4.8. Дослідження селери пахучої Linaria vulgaris L…….…..66
4.9. Дослідження петрушка кучерявої Petroselinum crispum Mill…….……66
5. ФІТОХІМІЧНИЙ ТА ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНИЙ ДИЗАЙН ПРЕПАРАТУ……68
6. ВІДПРАЦЮВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТУ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ…….…73
7. ВИЯВЛЕННЯ ОСНОВНИХ ГРУП БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ПРЕПАРАТІ……77
7.1. Попередній якісний аналіз передбачуваного препарату……77
7.2. Попередний кількісний аналіз передбачуваного препарату…….……...81
8. РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПРЕПАРАТУ……86

8.1. Ідентифікація……86
8.2. «Сухий залишок» та «Важкі метали»……..88
8.3. Спирт етиловий……..89
8.4. Об’єм вмісту пакування……89
8.5. Мікробіологічна чистота……..89
8.6. Кількісне визначення……91
9. АНТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ КОМПЛЕКСНОГО ФЛАВОНОЇДНОГО ПРЕПАРАТУ……..94
9.1. Визначення ефективної (EC_{50}) та цитотоксичної (CC_{50}) концентрації, індексу селективності (IS) *in vitro*……94
9.2. Вивчення антивірусної активності препарату Лалосопіл на моделі вірусу простого герпесу II типу, вірусу бичачої діареї та вірусу трансмісивного гастроентериту свиней *in vitro*……96
9.3. Вивчення антигерпетичної активності препарату Лалосопіл для лікування генітальної форми герпесвірусної інфекції *in vivo*……99
9.4. Вивчення механізмів антивірусної дії препарату Лалосопіл……..101
9.5. Вивчення індукції інтерферону препаратом Лалосопіл……..102
10. РОЗРОБКА ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТУ ОТРИМАННЯ БАЦИЛЯРНИХ БІОПОЛІМЕРІВ З КУЛЬТУРАЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА РІЗНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ……..104
11. ОТРИМАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАЦИЛЯРНИХ БІОПОЛІМЕРІВ З ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ БАКТЕРІЙ ТА КУЛЬТУР КЛІТИН……108
11.1. Отримання бацилярного біополімеру з культури мікроорганізмів *Staphylococcu saureus 209* (клінічні штами)……..108
11.2. Отримання бацилярного біополімеру з культури мікроорганізмів *Bacillus subtilis* УКМ В-5007……..109
11.3. Методика отримання бацилярних біополімерів з культури мікроорганізмів *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3……110
11.4. Вивчення молекулярно-біологічних властивостей бацилярних біополімерів……111

12. РОЗРОБКА МАРКЕРІВ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ БАЦИЛЯРНІ БІОПОЛІМЕРИ БАКТЕРІЙ……114
13. ОТРИМАННЯ СИНТЕТИЧНИХ ПЕПТИДІВ, ЯКІ МАЮТЬ ГОМОЛОГІЮ З БАЦИЛЯРНИМИ БІОПОЛІМЕРАМИ……133
13.1. Вивчення молекулярно-біологічних властивостей пептидів Р18 та Р19……..136
13.2. Вивчення молекулярно-біологічних властивостей рецептору епідермального фактору росту……..142
13.3. Вплив бацилярних біополімерів із стафілококу та Субаліну на синтез ДНК…….146
14. АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ БАЦИЛЯРНИХ БІОПОЛІМЕРІВ…….149
14.1. Вплив бацилярних біополімерів різного походження на репродукцію сурогатного вірусу – вірусу бичачої вірусної діареї (BVDV)…….149
14.2. Вплив бацилярних біополімерів на грипозну інфекцію……....152
14.3. Дослідження антивірусної активності зразків препаратів на моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС)……..159
14.4. Дослідження антивірусної активності зразків препаратів на моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС)……..166
15. АКТИВІНІСТЬ ПЕПТИДІВ Р18, Р19……..168
15.1. Антивірусна активність пептидів р18, р19…….168
15.2. Вплив пептиду Р18 на мітотичний режим клітин НГВЩ…….170
15.3. Роль впливу рецептору епідермального фактору росту на інфекційний титр вірусів…….…..175
ВИСНОВКИ……..…….177
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАНЬ……..…181

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

ADV – аденовіруси
CVB1 – віруси коксакі В1
EV71 – ентеровірус 71
GFRs – рецептори фактора росту
HER2, EGFR – епідермальний фактор росту людини
HPLC – високороздільна аніонобмінна хроматографія
HSV – вірус простого герпесу
MERS – близькосхідний коронавірусний респіраторний синдром
SARS – тяжкий гострий респіраторний синдром
АГ – антиген
АТ – антитіла
БАР – біологічно активна речовина
ББ – бацилярні біополімери
ВІЛ – вірус імунодефіциту людини
ГЗ – гранічне значення
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ДФУ- Державна Фармакопея України
ІФА –імуноферментний аналіз
ІФН – інтерферон
ЛЕХВІ – лабораторія експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій
ЛРС – лікарська рослинна сировина
МКА – моноклональні антитіла
МТ-4 – лімфобластоїдні клітини людини
ОГ – оптична густина
ПААГ – поліакриламідний гель
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
РНК – рибонуклеїнова кислота
СНІД – синдром набутого імунодефіциту
ТШХ – тонкошарова хроматографія
УФ – ультрафіолетовий спектр
ФБР – фосфатно буферний розчин
ЦПД – цитопатогенна доза

ВСТУП

Одним з найважливіших завдань, що стоять перед фармацією, є пошук і створення нових високоефективних лікарських засобів. Для їх виробництва необхідно мати в своєму розпорядженні достатні кількості ефективної лікарської сировини. Одним з найважливіших джерел такої сировини є лікарські рослини [1, 2].

Незважаючина великі успіхи у області створення синтетичних лікарських засобів, в світовій медичній практиці застосовується близько 30% лікарських препаратів рослинного походження, які привертають все більшу увагу науки і охорони здоров'я зарубіжних країн. Це пояснюється тим, що фітохімічні препарати, що містять біологічно активні речовини, краще переносяться хворими, не викликають побічних явищ, володіють меншою токсичністю порівняно з синтетичними [3].

Відродження інтересу до традиційної та народної медицини, що охоплює весь спектр рослин, а не тільки внесених в реєстр, обумовлено, в першу чергу, реальною ефективністю і високим ступінем безпеки фітотерапії при тривалому лікуванні хронічних хвороб, особливо в дитячій практиці і геронтології. Гранично низька токсичність переважної більшості лікарських рослин дозволяє призначати їх тривалими курсами (місяцями, роками) в складних або простіших комбінаціях для протирецидивного або реабілітаційного лікування. Крім того, багатство та під час, і унікальність хімічного складу (особливо у фітокомпозиціях), визначає різноманітність фармакологічних властивостей. Так у фітотерапевтичній практиці використовуються саме збори та галенові препарати на їх основі. Це дозволяє досягати максимальної вираженості основних лікувальних ефектів рослини, доповнює їх іншими корисними видами активності, та м'яко і безпечно впливає одночасно на багато систем організму, так чи інакше задіяних в патологічному процесі [4].

Важливою особливістю фітотерапії також є доступність і відносна дешевизна лікарських рослин, особливо в порівнянні з сучасними імпортними засобами. Дійсно, більшість потрібних рослин можуть бути заготовлені у

районах мешкання хворих, а небагато відсутних можуть бути придбаніу вигляді організованих аптечних заготовок [5].

В галенові препарати включають від 3—5 до 10—12 рослин, рідко більше. Обгрунтовано підібрана рецептура у комплексі із щадним режимом переробки рослиної сировини і отримання препарату визначає раціональну спрямованість лікувальної дії при достатній безпеці терапії (наприклад, комбінація протизапальної, протимікробної, спазмолітичної, седативної дій). Досягнення подібного поєднання цілей за допомогою синтетичних препаратів або зовсім нереально, або супроводжується побічними реакціями і ускладненнями, частота і небезпека яких зростають із збільшенням кількості ліків, що призначаються [6].

У 2020 – 2021 рр. співробітниками ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» та НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського» в рамках гранту Національного фонду досліджень України 2020.01/0226 «Експериментальне дослідження ефективності та безпечності застосування нових фітохімічних та бактерійних препаратів для лікування коронавірусної та інших найпоширеніших інфекцій» виконувалися наступні завдання за етапами проєкту:

1. Отримання та фітохімічне вивчення комплексного рослинного препарату із передбачуваною противірусною активністю:

- провести фармакотерапевтичний та фітохімічний дизайни комплексного рослинного препарату із передбачуваною противірусною активністю;
- провести фіто- та біохімічне дослідження обраної лікарської рослинної сировини;
- розробити лабораторну технологію отримання фітопрепарату;
- обґрунтувати параметри його фіто- та біохімічної стандартизації.

Результати роботи за етапом №1 наведені у розділах 4–8 звіту про науково-дослідну роботу.

2. Отримання біополімерів мікробного походження (бактерії р. Bacillus) та дослідження їх противірусної активності:

- провести виділення бацилярних біополімерів та їх характеризацію;

- провести дослідження щодо цитотоксичної дії препаратів бацилярних біополімерів у культурі клітин;

- визначити характер противірусної дії препаратів бацилярних біополімерів по відношенню до таких вірусів: коронавірус, грип, герпес 1,2 типів та гепатит С;

- вивчити механізми противірусної дії препаратів бацилярних біополімерів.

Результати роботи за етапом №2 наведені у розділах 10–15 звіту про науково-дослідну роботу.

3. Дослідження противірусної активності комплексних фітопрепаратів:

- провести дослідження щодо цитотоксичної дії комплексних фітопрепаратів у культурі клітин;

- визначити характер противірусної дії комплексних фітопрепаратів по відношенню до таких вірусів: коронавірус, грип, герпес 1,2 типів та гепатит С;

- вивчити механізми противірусної дії комплексних фітопрепаратів.

Результати роботи за етапом №2 наведені у розділі 9 звіту про науково-дослідну роботу.

1. ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНИЙ ТА ФІТОХІМІЧНИЙ ДИЗАЙНИ КОМПЛЕКСНОГО РОСЛИННОГО ПРЕПАРАТУ ІЗ ПЕРЕДБАЧУВАНОЮ ПРОТИВІРУСНОЮ АКТИВНІСТЮ

Вірусні інфекції забирають життя мільйонів людей щорічно. Найбільш агресивними вірусними захворюваннями вважаються геморагічна гарячка Ебола та Марбург, СНІД, грип, гострі респіраторні синдроми MERS і SARS та багато інших. А з 2019 року до цього переліку додалось захворювання, спричинене нещодавно ідентифікованим коронавірусом COVID-19.

Фітосировина дає величезний ресурс для розробки лікарських засобів усіх напрямків дії та противірусних препаратів в тому числі. В численних дослідних лабораторіях України та світу проводяться дослідження по створенню нових та більш ефективних лікарських засобів як синтетичного, так і рослинного походження [7].

Фітозасоби викликають особливу зацікавленість дослідників, оскільки сполуки природного походження можуть бути використані як інгібітори різноманітних вірусних інфекцій на різних стадіях їх розвитку та прояву. А також, що особливо цінно, такі засоби рослинного походження можуть застосовуватись протягом тривалого часу, не викликають звикання, оскільки діють «м’яко» та безпечно.

Народна медицина завжди була величезним джерелом різноманітних рослин для лікуванні вірусних захворювань ще до появи специфічної терапії та винайдення антибіотиків. Широкий спектр терапевтичних властивостей рослин обумовлений наявністю великого різноманіття структури хімічних сполук (алкалоїди, глікозиди, сапоніни, вітаміни, дубильні речовини, ефірні масла, і т.д.), що володіють різною фармакологічною дією не тільки на організм людини, а й збудників інфекції. Однією з найбільш перспективних груп сполук рослинного походження є вторинні метаболіти рослин, що відносяться до класу поліфенольних сполук, стероїдів, алкалоїдів, терпеноїдів, лігнінів та інших БАР (Jassim S.A.A. and Naji M.A. (2003) [8]; Ojo et al., 2009) [9]. Ефіроолійні рослини

також займають одне з чільних місць в лікуванні та профілактиці вірусних захворювань [10].

Оскільки лікарські рослини мають нескінченну різноманітність хімічних складових, їх можна використовувати для гальмування реплікації як ДНК, так і РНК вірусів.

Основою противірусної терапії є вплив на вірус або його складові компоненти на тій чи іншій стадії репродукції. Узагальнено за механізмом дії противірусні засоби можна розділити на декілька підгруп: блокування проникнення та вивільнення геному вірусу з капсули всередину клітини господаря, інгібування процесу збірки вірусних частинок та їх вихід з цитоплазми клітини, блокування синтезу вірусної РНК або ДНК та механізм пригнічення збірки віріонів.

У таблиці 1.1 наведена узагальнена інформація щодо сучасного стану досліджень противірусних препаратів на основі БАР рослинного походження (за 2018-20 рр.).

Таблиця 1.1 – Узагальнена інформація щодо сучасного стану досліджень противірусних препаратів на основі БАР рослинного походження

Назва БАР	**Найпоширеніші джерела БАР**	**Вірус-мішень**	**Механізм дії**	**Посилання**
Терпени				
Гліциризинова кислота	*Glycyrrhiza glabra*	Вірус гепатиту В, ВІЛ	Вплив на поверхневий антиген HBsAg, інгібування репродукції ВІЛ	[11]
Бета-есцин	*Aesculus hippocastanum*	Вірус просторо герпесу, вірус везикулярного стоматит, Денге	Вплив на реплікацію вірусів	[12]
Тульсинол, оцимарин, похідні урсолової кислоти	*Ocimum sanctum*	Вірус грипу H9N2	Маскування/ блокування вірусного білку гемаглютинації	[13]
Олеанолова кислота	*Rosmarinus officinalis*	ВІЛ, вірус грипу, гепатиту В та С, герпесвіруси	Вплив на реплікацію вірусів	[14-16]

Назва БАР	Найпоширеніші джерела БАР	Вірус-мішень	Механізм дії	Посилання
Ліналоол, урсолова кислота	*Ocimum basilicum, Prunella vulgaris*	Віруси ДНК (віруси герпесу (HSV), аденовіруси (ADV) та вірус гепатиту В) та РНК (віруси коксакі В1 (CVB1) та ентеровірус 71 (EV71)		[17-19]
Іридоїди				
Геніпін, генапозид, гарденозид	*Gardenia jasminoides*	Вірус грипу А	Супресія РНК вірусної реплікації	[20]
Адоксізидової кислоти-6-олеуропеєвий ефір, форзиціозид	*Forsythia suspensa, Forsythia viridissima*	Вірус грипу А (H5N1), коксаківірус (B3), ріновірус1B (1B)	Супресія РНК вірусної реплікації	[21-23]
Похідні фенолу та їх глікозиди (флавоноїди, фенолкарбонові кислоти, лігніни таніни, тощо)				
Арктиїн, арктигенін	*Arctium lappa, Forsythia viridissima*	Вірус простого герпесу, Коксакі вірус (B3), ріновірус1B (1B)		[24, 25]
Апігенін	*Apium graveolens, Ocimum basilicum, Petroselinum crispum*	Вірус бичого сказу, Віруси ДНК (віруси герпесу (HSV), аденовіруси (ADV) та вірус гепатиту В) та РНК (віруси коксакі В1 (CVB1) та ентеровірус 71 (EV71)	Пригнічення синтезу вірусної ДНК, мРНК та вірусних білків	[26, 27]
Лютеолін	*Arctium lappa, Salvia tomentosa, Linaria vulgaris*	Вірус грипу А, SARS-CoV	Перешкоджає подіям, що відбуваються між третьою та дев’ятою годиною циклу реплікації HSV-1, що включає транскрипцію та трансляцію вірусних білків	[28-30]

Назва БАР	Найпоширеніші джерела БАР	Вірус-мішень	Механізм дії	Посилання
Кверцетин	*Sophora japonica*	Вірус грипу А, SARS-CoV-2, вірус простого герпесу, ентеровірус 71	Інгібує загальний синтез вірусного білка	[31-34]
Ксантогумол	*Humulus lupulus*	Вірус грипу, ВІЛ	Пригнічення реплікації різних вірусних штамів; інгібування індукованих ВІЛ-1 цитопатичних ефектів, продукції вірусного антигену p24 та зворотної транскриптази в лімфоцитах C8166	[35]
Нарцисин, рутин, ізорамнетин, календофлазид	*Calendula officinalis,*	SARS-CoV-2	Інгібування вірусної протеази in-Silico	[36, 37]
Гіперозид, ізокверцитрин, спіреозид Кверцитрин	*Filipendula vulgaris, Hypericum perforatum*	Вірус гепатиту С	Пригнічення реплікації різних вірусних штамів	[38, 39]
Асперулозид, асперулін	*Galium verum, Faramea hyacinthina*	Вірус Денге-2	Вплив на реплікацію вірусів	[40]
Лінарин, лінариїн, акацетин	*Linaria vulgaris, Acacia arabica*	Вірус грипу, SARS-CoV	Цитопатичний вплив	[41-43]
Алкалоїди				
Похідні матрину, софоридин, флавезин, алопекурин	*Sophora japonica*	Вірус гепатиту В, енетровірус 71	Вплив на реплікацію вірусів	[44-47]

Тритерпенові сапоніни мають структурні особливості, які забезпечують їх здатність змінювати просторову структуру мембрани клітини, зв'язуючись з холестерином мембрани, і таким чином пригнічувати адсорбцію вірусів. Поліфенольні сполуки здатні не тільки змінювати заряд поверхні клітини, а й перешкоджати специфічній сорбції вірусу на рецептори та виявляють пригнічуючий вплив на реплікацію вірусів. Ці дві групи БАР є найбільш перспективними для розробки противірусних фітозасобів.

Аналоги лютеоліну, кверцетину пригнічують репродукцію вірусів на стадії вивільнення їх внутрішнього компоненту.

Лікарські засоби на зразок Мангіферингу, Госсиполу, Епігену є інгібіторами РНК полімерази та інгібіторами посттрансляційних модифікацій білків, пригнічують експресію вірусного генома та збирання віріонів [47].

Для блокування найбільш складної фази репродукції вірусів – виходу вірусного потомства – можуть використовуватись молекули-інгібітори нейрамінідазної ферментативної активності вірусу. Фенолкарбонові кислоти (наприклад, кавова, корична, ферулова, розмаринова та інші кислоти, речовини з групи галової кислоти) можуть імітувати структуру натуральних субстратів каталітичного сайту нейрамінідази та фактично «відволікати» на себе вірус. [48].

Суміші різних флавоноїдів або поєднання флавоноїдів з противірусними синтетичними препаратами забезпечують посилення їх противірусної дії [49].

Останні стратегії дослідження доставки ліків суттєво сприяють подоланню низької біодоступності флавоноїдів [50].

Противірусний механізм цих фітозасобів може бути різної спрямованості: антиоксидантна активність, інгібування синтезу ДНК, РНК, інгібування проникнення вірусу або інгібування розмноження вірусів тощо. Проте існують нез’ясовані механізми природних противірусних препаратів. Для великої кількості молекул рослинного походження, які виявляють противірусні властивості, слід дослідити такі механізми впливу [51].

У цьому світлі перевірка противірусної активності «коктейлю» з флавоноїдів була б вигідною для запобігання вірусних інфекцій та вдосконалення існуючих противірусних методів лікування [52].

Виклик глобального спалаху COVID-19 спричинив сплеск цікавості до ролі флавоноїдів, як одних із найбільш фізіологічно активних та перспективних БАР при лікуванні коронавірусної інфекції

Протягом останнього року дослідники активно переглядають здатність добре відомих (наприклад, кверцетину, байкаліну, лютеоліну, гесперетину, галокатехіну галату, епігалокатехіну галату) та менш поширених (наприклад, скутелареїну, аментофлавону, папірифлавонолу А тощо) флавоноїдів, вторинних

метаболітів, широко присутніх у рослинних тканинах з антиоксидантими та антимікробними властивостями для інгібування ключових білків, що беруть участь у пошкоджуючому циклі коронавірусу, таких як протеази PL^{pro}, $3CL^{pro}$, NTPази / гелікази.

Переважна більшість сучасних публікацій присвячена in-silico та in-vitro дослідженням флавоноїдних та інших природних структур з використанням можливостей молекулярного докінгу [53, 54].

Окрім скринінгу природних сполук, кілька українських груп успішно спроектували та синтезували нові аналоги, що мають перспективну противірусну активність. Основною метою структурної модифікації є зменшення токсичності, підвищення біодоступності порівняно з вихідною молекулою. Так, українські вчені проводять ряд досліджень з вивчення зміни природних якостей рослин із застосуванням методів генної інженерії, які дозволяють керовано впливати на геном рослин, зокрема генетичної трансформації за допомогою фітопатогенну Agrobacterium rhizogenes.

Висновки розділу 1

Таким чином, аналіз сучасного стану розробки противірусних препаратів на основі фітосировини в Україні та світі свідчить про перспективність і доцільність вивчення противірусної активності флавоноїдів та флавоноїдвмістної сировини з метою відбору найбільш перспективних речовин цього класу і можливості синтезу на їх основі субстанцій, які могли б знайти застосування в клінічній практиці для лікування коронавірусної та інших розповсюджених вірусних інфекцій. Зважаючи на фітохімічний склад та біологічну активність відповідних біологічно активних речовин можна вважати перспективними для вивчення противірусної активності комплексного фітопрепарату, що складатиметься із наступної лікарської рослинної сировини: *Apium graveolens, Arctium lappa, Calendula officinalis, Filipendula vulgaris, Galium verum, Humulus lupulus, Linaria vulgaris, Petroselinum crispum, Sophora japonica.*

2. МОЛЕКУЛЯРНА МІМІКРІЯ БАКТЕРІЙ І ВІРУСІВ У СТВОРЕННІ АНТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

В теперішній час активно розвивається вчення про молекулярну мімікрію різних біологічних об’єктів, зокрема бактеріальних та вірусних.

Властивість мімікрії антигенів є новим стратегічним напрямком у створенні сучасних вакцин і антивірусних препаратів. «Мімотопи» - термін, який увійшов в наукову літературу останніх років, означає- лінійно (послідовність амінокислот) або конформаційно подібні структури, які взаємодіють з широким спектром нейтралізуючих антитіл, і успішно використовуються в якості профілактичних і лікувальних препаратів при експериментальних вірусних інфекціях (респіраторно-синцитіальні віруси, кір, гепатит С і ін.).

В 1985 р. з’явилася технологія фагового дисплею, яка дає можливість одержання пептиду, який імітує сайт з’єднання з мішенню. Метод представлення на поверхні фагових частинок продуктів екзогенних генів, введених за допомогою генної інженерії всередину їх власних генів, кодуючих білки оболонки, з метою відбору білків пептидів з відповідними властивостями.

Одержаний за допомогою методики фазового дисплею пептид-мімотоп володіє аналогійними імуногенними властивостями з антигеном патогену. Пептиди, одержані з фагових дисплеїв пептидних бібліотек, можуть бути використані у двох аспектах. З одного боку, ці пептиди є кандидатами для нових засобів діагностики, терапії і вакцинації. З іншого боку вони можуть бути використані для прогнозування білок-білкових взаємодій. Велика кількість робіт присвячена створенню протипухлинних вакцин на основі мімотопів моноклональних антитіл до рецептору епідермального фактору росту (ритуксимаб, цетуксимаб, трастузумаб); конструюванню анти-ВІЛ вакцини на основі мімотопу Tat белка ВІЛ, папіломавірусів, вірусів гепатиту В.

Цікаві дослідження стосуються мімікрії між клітинними і вірусспецифічними цитокінами, хемокінами та їх рецепторами.

Нами були виділені бацилярні біополімери з культурального середовища золотистого стафілококу, гемофільної палички, пневмококу, мікоплазми,

холерного вібріону, туберкульозної палички, кандиди альбіканс; препаратів біоспорину, субаліну, біфідум, культурального середовища інфікованих та неінфікованих вірусами суспензійних культур В-лімфоцитів – клітин Raji, Т-лімфоцитів, *Jurkat*, CEM, лейкоцитів крові людини 1 и II групи, вуглеводвмісних біополімерів, названих бацилярними біополімерами.

Методом ІФА було показано, що сироватки до мімікруючих пептидів перехресно реагують з бацилярними біополімерами з різних продуцентів, бацилярні біополімери перехресно реагують з антитілами (АТ) проти грипу, ВІЛ, вірусів гепатиту С і В, папіломи, краснухи, вірусів герпесу 1 і II типів, ЦМВ, а також з легким та важким ланцюгом IgG.

Подібні пептиди виділені зарубіжними вченими з крові людини (VIRIP) – вірус інгібуючий пептид, який відповідає α1-антитрипсину або інгібітору серинових протеаз [55]. VIRIP інгібує входження вірусу ВІЛ-1 в клітину, взаємодіючи з пептидом злиття gp41. І другий пептид – ціановірин-N виділяється ціанобактерією, який має широкий спектр антивірусної активності (Dey B), взаємодіє з хемокіновим рецептором.

В процесі розробки CRISPR/Cas9-технології одержані дані, які є теоретичною основою одержаних нами результатів виділення бацилярних біополімерів.

CRISPR/Cas9 – це нова технологія редактування геномів вищих організмів, що базується на імунній системі бактерій. В основі цієї системи – особливі ділянки бактеріальної ДНК, короткі паліндромні кластерні повтори, або CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Між ідентичними повторами знаходяться фрагменти ДНК, які відрізняються один від одного – спейсери, багато яких відповідають ділянкам геномів вірусів, що паразитують на даній бактерії. При попаданні вірусу в бактеріальну клітину його геном знаходиться за допомогою спеціалізованих Cas-білків (CRIPR-associated sequence – послідовність, асоційована з CRIPR), зв’язаних з CRIPR РНК. Якщо фрагмент вірусу «записаний» в спейсері CRIPR-РНК, Cas-білки розрізають вірусну ДНК і знищують її, захищаючи клітину від інфекції

На початку 2013 року декілька груп вчених показали, що системи CRIPR/Cas можуть працювати не лише в клітинах бактерій, а і в клітинах вищих організмів, а тому CRIPR/Cas-системи дають можливість поправляти невірні послідовності генів і таким чином лікувати спадкові захворювання людини.

На початку 2000-х років декілька вчених незалежно один від одного порівняли послідовності відомих CRIPR-спейсерів з послідовностями ДНК, депонованих в публічні бази даних. Виявилося, що достатньо часто послідовності спейсерів були схожі на послідовності геномів вірусів.

Один з перших препаратів спрямованої терапії пухлин, дозволений до застосування в 1998 р. – трастузумаб, який уявляє собою гуманізоване моноклональне антитіло, в якому більша частина послідовностей є людським імуноглобуліном IgG, а антигензв'язуючі ділянки походять з мишиного антитіла. Мішенню для дії трастузумаба є один з рецепторів епідермального фактору росту – HER-2/neu (ErbB2). Білки-рецептори епідермального фактору росту, що містять позаклітинний рецепторний и внутрішньоклітинний протеїнкіназний домен, є традиційним об'єктом для розробки спрямованої терапії солідних пухлин, оскільки вони надмірно експресуються на багатьох ракових клітинах і регулюють ріст, диференціювання і адгезію клітин.

Рецептори фактора росту (GFRs) – це трансмембранні білки, експресовані в еукаріотичних клітинах, і основною функцією яких є зв'язування з позаклітинними факторами росту поліпептидів. Зв'язування специфічних факторів росту із GFRs призводить до активації їх внутрішньоклітинного домену протеїнкінази, що ініціює каскад сигнальних подій, що в кінцевому підсумку призводить до регуляції росту клітин. Цікаво, що GFRs також були визначені як необхідні для проникнення деяких вірусів, включаючи коронавіруси, і сигналізація GFRs бере участь у реплікації вірусів у багатьох випадках. Наразі препарати, націлені на GFRs, та їх сигналізація в даний час використовуються в клінічній практиці для лікування раку, а враховуючи роль GFRs у проникненні та реплікації вірусу, ці препарати можуть потенційно бути відновлені проти вірусних інфекцій.

Висновки розділу 2

Отже, таким чином, виходить, що лабораторні дослідження можуть сприяти розробці нових противовірусних сполук, які, можуть в обумовленому ступені сприяти успіхам противовірусної терапії. Але з викладеного видно, скільки багаточисленних перепонів на цьому шляху і як часто ми, мабуть, зіткнемося з надіями через пристосованість вірусу (virus adaptability) і несподіванними додатковими процесами, які відбуваються в конкретних живих системах вірус-клітина.

3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Гідроксикоричні кислоти: ідентифікація (у коренях лопуху справжнього). Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27) [56].

Випробовуваний розчин. 1,0 г здрібненої на порошок сировини (500) поміщають у колбу місткістю 20 мл, додають 10 мл *метанолу Р.* Колбу приєднують до зворотного холодильника і нагрівають на водяній бані протягом 15 хв. Вміст колби охолоджують до кімнатної температури і фільтрують у колбу місткістю 20 мл.

Розчин порівняння. 1.0 мг *кислоти хлорогенової Р* і 1,0 мг *кислоти кофейної Р* розчиняють у 10 мл *метанолу Р*

На лінію старту хроматографічної пластинки Сорбфіл" ПТСХ-АФ-А-УФ розміром 6×10 см наносять у вигляді смуги розміром 10×3 мм по 10 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння. Пластинки поміщають у камеру із сумішшю *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80). Коли фронт розчинників пройде 8 см від лінії старту, пластинки виймають із камери, сушать при температурі від 100 ˚С до 105 ˚С .

Пластинку обприскують розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р.* Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л *макроголу 400 Р* у *метанолі Р,* сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Поліфенольні сполуки: ідентифікація (у коренях лопуху справжнього). На фільтрувальний папір наносят в одну точку 0,02 мл випробовуваного розчину, 0,02 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р* і обприскують *калію гідроксиду розчином спиртовим Р1*; має з'явитися синє забарвлення (поліфенольні сполуки).

Гідроксикорічні кислоти: кількісне визначення (у коренях лопуху справжнього).

Випробування проводили методом абсорбційної спектрофотометрії відповідно до вимог ДФУ, 2.2.25, у модифікації [56].

Приготування вихідного розчину. 0,8 г (точна наважка) здрібненої на порошок сировини (500) поміщають у колбу місткістю 200 мл, додають 95 мл *спирту 50% Р* і нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 30 хв. Охолоджують до кімнатної температури і фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл. Фільтр промивають 5 мл *спирту 50%* Р, промивні води фільтруючи в ту саму мірну колбу. Доводять об'єм розчину *спиртом 50% Р* до позначки і перемішують.

Приготування випробовуваного розчину. 1 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 2 мл *0,5 М хлористоводневої кислоти*, 2 мл *розчину натрію нітриту – натрію молібдату*, 2 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р.* Об'єм розчину доводять *водою Р* до позначки і перемішують.

Вимірюють оптичну густину одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 525 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи у якості розчину порівняння розчин, що складається з 1 мл вихідного розчину, 2 мл *0,5 М хлористоводневої кислоти* і 2 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р*, які поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл і доводять об'єм *водою Р* до позначки.

Вміст суми гідроксикоричних кислот (Х) у відсотках, у перерахунку на хлорогенову кислоту та суху сировину, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{D \times 100 \times 10 \times 100 \times 1 \times 100}{188 \times m \times 1 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{D \times 100000}{188 \times m \times (100 - W)},$$

де: D – оптична густина випробовуваного розчину;

188 – питомий показник поглинання розчину хлорогенової кислоти за довжини хвилі 525 нм;

m – маса наважки сировини, в грамах;

W – втрата в масі при висушувані.

Флавоноїди: кількісне визначення (у плодах софори японської та коренях лопуху справжнього)

Вихідний розчин. 0.200 г здрібненої сировини поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 1 мл розчину 5 г/л *гексаметилентетраміну Р,*

20 мл *ацетону Р* і 2 мл *кислоти хлористоводневої Р1,* кип'ятять зі зворотнім холодильником протягом 30 хв і фільтрують крізь тампон із вати у колбу місткістю 100 мл. Тампон із вати додають до залишку у круглодонну колбу та екстрагують 3 порціями, по 20 мл кожна, *ацетону Р,* кожний раз проводячи кип'ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджують до кімнатної температури, фільтрують кожний екстракт крізь тампон із вати у колбу. Одержані охолоджені об`єднані ацетонові екстракти фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу, доводять об`єм розчину *ацетоном Р* до 100 мл, обполіскуючи колбу та паперовий фільтр.

25,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять до позначки *ацетоном Р* і перемішують.

20.0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку, додають 20 мл *води Р* і струшують суміш із 15 мл етилацетату, а потім із 3 порціями, по 10 мл кожна, *етилацетату Р.* Одержані етилацетатні екстракти об`єднують у ділильній лійці, промивають 2 порціями, по 50 мл кожна, *води Р,* фільтрують над 10 г *натрію сульфату безводного Р* у мірну колбу та доводять об`єм розчину *етилацетатом Р* до 50.0 мл.

Випробовуваний розчин. До 10.0 мл вихідного розчину додають 1 мл *реактиву алюмінію хлориду Р* та доводять розчином 5 % (*об/об*) *кислоти оцтової льодяної Р* у *метанолі Р* до об'єму 25.0 мл.

Компенсаційний розчин. 10.0 мл вихідного розчину доводять розчином 5 % (*об/об*) *кислоти оцтової льодяної Р* у *метанолі Р* до об'єму 25.0 мл.

Вимірюють оптичну густину (*2.2.25*) випробовуваного розчину через 30 хв у порівнянні з компенсаційним розчином за довжини хвилі 425 нм.

Вміст флавоноїдів, у відсотках, у перерахунку на рутин та суху сировину, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{D \times 1 \times 100 \times 50 \times 50 \times 25 \times 665 \times 100 \times 100 \times 100}{500 \times 100 \times m \times 25 \times 20 \times 10 \times 464{,}4 \times (100 - W_2) \times (100 - W_1)} = \frac{D \times 35800}{m \times (100 - W_2) \times (100 - W_1)}$$

де D – оптична густина випробовуваного розчину;

m - наважка сировини, в г;

665 – молекулярна маса рутину;

464,4 - молекулярна маса гіперозиду;

500 - питомий показник поглинання гіперозиду при 425 нм.

Ксантогумол: ідентифікація (у шишках хмелю). Випробування проводять методом тонкошарової хроматографії відповідно до вимог ДФУ, 2.2.27.

Приготування випробовуваного розчину. 1,0 г подрібненої сировини, отриманної у розділі «Екстрактивні речовини», поміщають у колбу місткістю 20 мл, додають додають 10 мл суміші *вода Р – метанол Р* (3:7), струшують протягом 15 хв. Вміст колби фільтрують у колбу місткістю 20 мл.

Приготування розчину порівняння. 1 мг *судану оранжевого Р,* 2 мг *куркуміну Р*, 2 мг *диметиламінобензальдегіду Р,* поміщають у колбу місткістю 10 мл, розчиняють у 10 мл суміші (3:7 об/об) води Р и *метанолу Р* і перемішують.

На лінію старту хроматографічної пластинки «Kieselgel 60 F254» розміром 6×20 см наносять смугою (10 х 3 мм) по 20 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння. Пластинку сушать на повітрі протягом 10 хв, поміщають у камеру із сумішшю розчинників *циклогексан Р - етилацетат Р –кислота оцтова льодяна Р* (60:38:2) і хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників пройде близько 15 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, сушать на повітрі у витяжній шафі протягом 15 хв.

При перегляді в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм на хроматограмі розчину порівняння повинні виявлятися три темні зони: у нижній чверті слабка зона (куркумін), трохи нижче центру - зона диметиламінобензальдегіду, і над ним - зона судану. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: слабка темна зона майже на рівні зони куркуміну на хроматограмі розчину порівняння (ксантогумол), майже на рівні зони диметиламінобензальдегіду - зони гумулонів, майже на рівні зони судану - зони лупулонів.

При перегляді в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм зони лупулонів на хроматограммі випробовуваного розчину виявляють синю флюоресценцію, зони гумулонів - коричневу флюоресценцію, а зона ксантогумолу - темно-коричневу флюоресценцію.

Хроматограму обприскують *фосфомолібденово-вольфрамовим реактивом R* і поміщають у камеру, насичену парами аміаку, переглядають при денному світлі. Зони гумулонів і лупулонів на хроматограмі випробовуваного розчину забарвлюються в синьо-сірий колір, зона ксантогумолу - зелено-сірий.

Екстрактивні речовини (у шишках хмелю). Сировину подрібнюють на порошок (355). Біля 10,00 г (точна наважка) подрібненої сировини, поміщають у колбу місткістю 1000 мл, додають 300,0 мл 70% *спирту Р,* приєднують зворотний холодильник і нагрівають на водяній бані протягом 10 хв. Після охолодження суміш фільтрують, відкидаючи перші 10 мл фільтрату. 30,0 мл фільтрату упарюють і сушать при температурі від 100 до 105°С потягом 2 год.

$$X = \frac{300 \cdot (m_1 - m_0) \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W) \cdot 30}$$

где m- маса аналітичної проби сировини, в грамах;

m_1- маса бюкси з остатком, в грамах;

m_0- маса порожньої бюкси, в грамах;

Вміст екстрактивних речовин має бути не менше 25 %.

Флавоноїди та гідроксикоричні кислоти: ідентифікація (у квітках календули лікарської). Визначення проводили методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 1.0 г здрібненої на порошок сировини (500) додають 10 мл *метанолу Р,* нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 1.0 мг кислоти кофейної Р, 1.0 мг кислоти хлорогенової Р і 2.5 мг рутину Р розчиняють у 10 мл метанолу Р.

На лінію старту хроматографічної пластинки “Сорбфіл” ПТСХ-АФ-А-УФ розміром 6×10 см смугами розміром 10×3 мм наносять 20 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80). Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать при температурі від 100 ˚С до 105 ˚С і гарячу

пластинку обприскують розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р.* Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л *макроголу 400 Р* у *метанолі Р,* сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

На хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у нижній частині – жовтаво-коричнева флуоресціюча зона (рутин), у середній частині – блакитна флуоресціюча зона (кислота хлорогенова).

На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися жовтаво-коричнева флуоресціюча зона на рівні зони рутину на хроматограмі розчину порівняння; нижче та безпосередньо вище неї мають виявлятися жовтаво-зелена флуоресціюча зона та блакитна флуоресціюча зона, що відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння.

Флавоноїди: кількісне визначення (у квітках календули лікарської). Аналітичну пробу сировини (50 г) здрібнюють до розміру часток, які проходять крізь сито з отворами діаметром 1 мм.

Близько 1,0 г здрібненої сировини поміщають у конічну колбу місткістю 250 мл зі шліфом, додають 50 мл *96 % спирту Р,* колбу закривають пробкою, зважують з точністю до 0,01 г і залишають на 1 год. Потім колбу з'єднують зі зворотним холодильником і кип'ятять протягом 2 год у водяній бані, підтримуючи слабе кипіння. Потім колбу охолоджують, закривають тією ж пробкою, зважують, доводять до початкової маси *96 % спиртом Р,* перемішують і фільтрують через тонкий шар вати в окрему колбу.

2,0 мл отриманого фільтрату поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 5 мл розчину алюмінію хлориду, 0,1 мл *кислоти оцтової льодяної Р*; доводять об'єм розчину *96 % спиртом Р* до мітки і перемішують.

Через 30 хв вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 409 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи в якості компенсаційного розчину розчин, який складається з 2,0 мл фільтрату, 0,1 мл *кислоти оцтової льодяної Р* і доведений *96 % спиртом Р* до мітки в мірній колбі місткістю 25 мл.

Паралельно вимірюють оптичну густину розчину порівняння, який складається з 1,0 мл розчину порівняння рутину, 5 мл *розчину алюмінію хлориду Р*, 0,1 мл *кислоти оцтової льодяної Р,* доведений *96 % спиртом Р* до мітки в мірній колбі місткістю 25 мл. В якості компенсаційного розчину використовують розчин, який складається з 1,0 мл розчину порівняння рутину, 0,1 мл *кислоти оцтової льодяної Р*, доведеної *96 % спиртом Р* до 25 мл.

Вміст суми флавоноїдів, в перерахунку на рутин (Х) і абсолютно суху сировину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m_1 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 \cdot (100 - w)} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 2500}{A_0 \cdot m_1 \cdot (100 - w)},$$

де: A_1 – оптична густина випробовуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння рутину;

m_0 – маса наважки *рутину*, у грамах;

m_1 - маса наважки рослинної сировини, у грамах;

w – втрата в масі при висушуванні, у відсотках.

Катехіни: ідентифікація (у лабазнику). Випробування проводили методом тонкошарової хроматографії відповідно до вимог ДФУ, 2.2.27.

Приготування випробовуваного розчину. 1,0 г сировини, здрібненої на порошок (500), поміщають у конічну колбу місткістю 20 мл, додають 10 мл *води Р*, струшують протягом 10 хв. Суміш фільтрують у ділильну лійку місткістю 50 мл і екстрагують двічі по 10 мл *етилацетату Р* протягом 1 хв кожен раз. Після повного розподілу шарів етилацетатний витяг фільтрують крізь лійку зі складчастим фільтром, заповненим 6 г *натрію сульфату безводного Р* у круглодонну колбу місткістю 50 мл і упарюють на водяній бані під вакуумом до сухого залишку. Додають 1,0 мл *метанолу Р* і перемішують.

Приготування розчину порівняння. 5 мг *катехіну Р* поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, розчиняють в 5 мл *метанолу Р*, доводять об’єм розчину тим же розчинником до позначки і перемішують.

На лінію хроматографічної пластинки “Сорбфіл” ПТСХ-АФ-А-УФ розміром 6×10 см наносять у вигляді смуги розміром 10×3 мм по 10 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння. Пластинку висушують на повітрі протягом 10 хв, поміщають у камеру із сумішшю розчинників *кислота оцтова льодяна Р - ефір Р – гексан Р – етилацетат Р* (20:20:20:40) і хроматографують висхідним способом.

Коли фронт розчинників пройде близько 8 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, висушують у сушильній шафі при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 2 хв і обприскують *реактивом ваніліну Р.* Пластинку нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв і переглядають при денному світлі.

На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися зона червоного кольору на рівні зони катехіну на хроматограмі розчину *порівняння* (катехін).

Поліфенольні сполуки: кількісне визначення (у лабазнику). Випробування проводиди методом абсорбційної спектрофотометрії відповідно до вимог ДФУ, *2.2.25.*

Приготування випробовуваного розчину. 0,2 г здрібненої на порошок сировини (500) поміщають у колбу місткістю 200 мл, додають 70 мл *води Р* і нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 30 хв. Охолоджують до кімнатної температури, кількісно переносять за допомогою 25 мл *води Р* у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об’єм розчину *водою Р* до позначки і перемішують. Фільтрують крізь фільтрувальний папір „синя стрічка”, відкидаючи перші 20 мл фільтрату.

5,0 мл фільтрату поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, доводять до позначки водою Р і перемішують.

2,0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 1,0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р*, 10 мл *води Р*, перемішують, доводять об’єм *розчином натрію карбонату Р* до позначки і перемішують.

Приготування розчину порівняння. 0,025 г (точна наважка) *пірогалолу Р* поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у *воді Р*, доводять до позначки тим же розчинником і перемішують.

5,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять *водою Р* до позначки і перемішують. Розчини використовують свіжоприготованими.

2,0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 1,0 мл *фосфорномолібденово-вольфрамового реактиву Р*, 10 мл *води Р*, перемішують, доводять об'єм *розчином натрію карбонату Р* до позначки і перемішують.

Через 30 хвилин вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 760 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, відносно *води Р*.

Вміст загальних поліфенолів (Х) , у перерахунку на пірогалол та суху сировину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$X_2 = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 25 \times 25 \times 5 \times 2 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 5 \times 2 \times 50 \times 100 \times 25 \times (100 - W)} = \frac{D \times m_0 \times 5000}{D_0 \times m \times (100 - W)},$$

де: D – оптична густина випробовуваного розчину;

D_0 – оптична густина розчину порівняння;

m_0 – маса наважки пірогалолу, у грамах;

m – маса наважки сировини;

W – втрата в масі при висушувані.

Флавоноїди та гідроксикоричні кислоти: ідентифікація (у підмареннику). Визначення проводили методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27).

Випробовуваний розчин. 1,0 г здрібненої на порошок сировини (500) поміщають у колбу місткістю 20 мл, додають 10 мл *метанолу Р.* Колбу приєднують до зворотного холодильника і нагрівають на водяній бані протягом 15 хв. Вміст колби охолоджують до кімнатної температури і фільтрують у колбу місткістю 20 мл.

Розчин порівняння. 2,5 мг *гіперозиду Р,* 1,0 мг *кислоти хлорогенової Р* і 2,5 мг *рутину Р* розчиняють у 10 мл *метанолу Р*

На лінію старту двох хроматографічних пластинок "Сорбфіл" ПТСХ-АФ-А-УФ розміром 6×10 см наносять у вигляді смуги розміром 10×3 мм по 10 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння. Пластинки поміщають у камеру із сумішшю *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80). Коли фронт розчинників пройде 8 см від лінії старту, пластинки виймають із камери, сушать при температурі від 100 ˚С до 105 ˚С .

Першу пластинку обприскують розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р*. Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л *макроголу 400 Р* у *метанолі Р,* сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися помаранчева флуоресціююча пляма на рівні плями рутину на хроматограмі розчину порівняння; вище неї мають виявлятися блакитна флуоресціююча пляма, що відповідає плямі кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння; вище неї – помаранчева флуоресціююча пляма дещо вище плями гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння, та дві блакитні флуоресціюючі плями нижче фронту розчинника.

Гідроксикорічні кислоти: кількісне визначення (у підмареннику).

Випробування проводили методом абсорбційної спектрофотометрії відповідно до вимог ДФУ, 2.2.25.

Приготування вихідного розчину. 0,4 г здрібненої на порошок сировини (500) поміщають у колбу місткістю 200 мл, додають 95 мл *спирту 50 % Р* і нагрівають зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 30 хв. Охолоджують до кімнатної температури і фільтрують у мірну колбу місткістю 100 мл. Фільтр промивають 5 мл *спирту 50 %* Р, промивні води фільтруючи в ту саму мірну колбу. Доводять об'єм розчину *спиртом 50 % Р* до позначки і перемішують.

Приготування випробовуваного розчину. 1 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 2 мл *0,5 М хлористоводневої*

кислоти, 2 мл *розчину натрію нітриту – натрію молібдату*, 2 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р.* Об'єм розчину доводять *водою Р* до позначки і перемішують.

Вимірюють оптичну густину одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 525 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи у якості розчину порівняння розчин, що складається з 1 мл вихідного розчину, 2 мл *0,5 М хлористоводневої кислоти* і 2 мл *натрію гідроксиду розчину розведеного Р*, які поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл і доводять об'єм *водою Р* до позначки.

Вміст суми гідроксикоричних кислот (X_2) у сировині, у відсотках, у перерахуванні на хлорогенову кислоту та суху сировину, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{D \times 100 \times 10 \times 100 \times 1 \times 100}{188 \times m \times 1 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{D \times 100000}{188 \times m \times (100 - W)},$$

де: D – оптична густина випробовуваного розчину;

188 – питомий показник поглинання розчину хлорогенової кислоти за довжини хвилі 525 нм;

m – маса наважки сировини, в грамах;

W – втрата в масі при висушувані.

Флавоноїди: ідентифікація (у льонку звичайному). Визначення проводили методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27).

Випробовуваний розчин. До 1,0 г здрібненої на порошок сировини (500) додають 10 мл *метанолу Р,* нагрівають на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 10 хв, охолоджують і фільтрують.

Розчин порівняння. 2.5 мг *рутину Р* 2,5 мг гіперозиду розчиняють у 10 мл *метанолу Р*.

На лінію старту хроматографічної пластинки "Сорбфіл" ПТСХ-АФ-А-УФ розміром 6×10 см смугами розміром 10×3 мм наносять 20 мкл випробовуваного розчину та 10 мкл розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80). Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластинку

виймають із камери, сушать при температурі від 100˚С до 105˚С і гарячу пластинку обприскують розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р.* Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л *макроголу 400 Р* у *метанолі Р,* сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

На хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися: у нижній частині – жовтаво-коричнева флуоресціююча пляма (рутин), вище неї жовтаво-коричнева флуоресціююча пляма (гіперозид).

На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися темна пляма декілька вище плями рутину на хроматограмі розчину порівняння; темна пляма декілька нижче плями гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння.

Флавони: кількісне визначення (у льонку звичайному). Випробування проводили методом абсорбційної спектрофотометрії відповідно до вимог ДФУ, 2.2.25.

0,80 г здрібненої на порошок сировини (250) поміщають у круглодонну колбу місткістю 100 мл, додають 30 мл *метанолу Р,* нагрівають зі зворотним холодильником у водяній бані при температурі 65 °С протягом 30 хв, постійно струшуючи, охолоджують і фільтрують через тампон із вати. Додають тампон із вати до залишку у круглодонну колбу та екстрагують двома порціями, по 15 мл кожна, *метанолу Р*, кожний раз проводячи кип’ятіння зі зворотним холодильником протягом 10 хв, і охолоджують при кімнатній температурі. Одержану рідину фільтрують крізь тампон із вати, потім об’єднаний метанольний розчин фільтрують крізь фільтрувальний папір, обполіскуючи *метанолом Р* колбу і паперовий фільтр.

Одержаний розчин випарюють на водяній бані до сухого залишку, додають 10 мл суміші *діоксан Р - вода Р* (1:1), розчиняють за допомогою ультразвукової бані і фільтрують.

По 0,02 мл (тричі) одержаного розчину наносять на лінію старту хроматографічної пластинки із силікагелем G 60 F_{254}, розміром 10 × 15 см, із товщиною шару 0,2 мм, у виді смуг розміром 10 мм × 2 мм і висушуть на повітрі протягом 20 хв. Пластинку поміщають у попередньо насичену протягом 30 хв

хроматографічну камеру із сумішшю розчинників *хлороформ Р – метанол Р* (4:1). Коли фронт розчинників пройде біля 10 см від лінії старту, пластинки виймають із камери і сушать на повітрі протягом 10 хв.

Переглядають пластинку в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм і помічають дві основних плями на кожній хроматограмі (нижня-пляма ацетилпектолінарину з R_f близько 0,2 і верхня пляма - пектолінарину з R_f близько 0,4). Знімають відповідні області покриття і додатково знімають покриття з зони, розташованої на 2 мм вище і нижче досліджуваних зон. Знятий шар силикагелю поміщають у центрифужні пробірки, додають по 15 мл суміші *діоксан Р - вода Р* (1:1) і обробляють ультразвуком при температурі 50 ^{0}С протягом 30 хв. Після охолодження до кімнатної температури розчини центрифугують протягом 15 хв і надосадову рідину фільтрують крізь паперовий фільтр, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Вимірюють оптичну густину одержаних розчинів за довжини хвилі 334 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм відносно суміші *діоксан Р- вода Р* (1:1).

Вміст суми флавонів, у відсотках, у перерахунку на ацетилпектолінарин та суху сировину, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{D \times 10 \times 15 \times 1 \times 100 \times 100}{394 \times m \times 0{,}02 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{D \times 750000}{394 \times m \times (100 - W)},$$

де D – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 334 нм,

m – маса наважки випробовуваної сировини, у грамах,

W- втрата в масі при висушуванні, в %,

394 – питомий показник поглинання ацетилпектолінарину.

За результат беруть середнє із трьох визначень.

Флавоноїди: кількісне визначення (у селері пахучій). Загальний вміст флавоноїдів у сировині визначали методом [57]. 1 мл екстракту змішували з 4 мл дистильованої води. Потім додавали 0,3 мл розчину нітриту натрію (5%), а потім 0,3 мл розчину хлориду алюмінію (10%). Пробірки інкубували протягом 5 хв при температурі навколишнього середовища, потім до суміші додавали 2 мл гідроксиду натрію (1 М), а потім кінцевий об'єм доводили до 10 мл

дистильованою водою. Суміш ретельно перемішували і визначали поглинання при 510 нм. Для оцінки отриманих даних використовували калібрувальний графік - стандартну криву розчину рутину.

Флавоноїди: кількісне визначення (у петрушці кучерявій). Визначення кількісного вмісту флавоноїдів в досліджуваній сировині проводили спектрофотометричним методом в перерахунку на рутин та абсолютно суху сировину. Для чого отримували 50% спиртовий екстракт з досліджуваної сировини, до якого додавали 2% розчин алюмінію (III) хлориду, та 5% розчин кислоти оцтової. Абсорбцію вимірювали при довжині хвилі 407 нм. Паралельно вимірювали абсорбцію розчину фармакопейного стандартного зразка рутину.

Визначення полісахаридів. Визначення проводили гравіометричним методом. Полісахариди висаджували 96% спиртом Р, потім центрифугували. Надосадову рідину і осад фільтрували крізь скляний фільтр, попередньо висушений при температурі від 100°С до 105°С до постійної маси. Фільтр із осадом сушили до постійної маси при температурі від 100°С до 105°С.

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки можливо визначати з достатнім ступенем імовірності.

Визначення ефірної олії. Кількісне визначення ефірної олії проводили ваговим методом. Ефірна олія відганяється з водою в ділильну воронку, що використовується як приймач. В ній потім проводиться екстракція ефірної олії хлороформом Р.

Перегонка ефірної олії з водою проводиться при температурі 115-120°С. Визначення маси відігнаної ефірної олії проводиться після висушування ефірного екстракту фільтрацією через безводний сульфат натрію і випарюванням екстракту на водяній бані з температурою 65-70°С. що забезпечує повне видалення хлороформу і збереження ефірних олій.

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки можливо визначати з достатнім ступенем імовірності.

Визначення аскорбінової кислоти. У фарфоровій ступці ретельно розтирають 1 г дослідного матеріалу. До розтертої маси додають 9 мл розчину

соляної кислоти, відстоюють і через 10 хв фільтрують. Для кількісного визначення беруть 3 мл фільтрату, вносять у колби й титрують розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке зберігається протягом 30 сек. Обробка результатів. 1 мл 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти. Масову концентрацію аскорбінової кислоти, мг, розраховують за формулою:

$$C = (Q * A * V_0) / (V_1 * a),$$

де: Q - кількість аскорбінової кислоти (0,088 мг), яка відповідає 1 мл 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, А – кількість 0,0005 моль/л розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витрачена на титрування, мл, V_0 – загальна кількість екстракту, мл, V_1 – об'єм екстракту, взятий для титрування, мл, а – масса дослідного біологічного матеріалу, г.

Культури клітин. Культури клітин одержані з колекції музею культур тканин Інституту вірусології ім. Д.І.Івановського (РАМН, Москва):

ВНК – перещеплювана культура клітин нирки хом'яка

MDCK – перещеплювана культура клітин нирки собак

СНЕВ – перещеплювана культура клітин нирки ембріона свині

НСП – перещеплювана культура клітин нирки поросяти

ST – перещеплювана культура клітин тестикул поросят

КЩЗ – перещеплювана культура клітин щитовидної залози свині

Vero – перещеплювана культура клітин нирки зеленої мавпи

HeLa – епітеліоїдна карцинома шийки матки.

Віруси:

Вірус грипу – при проведенні роботи використано штам вірусу грипу одержаний з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І.Івановського, (РАМН м.Москва) - штам A/FM/1/47(H1N1) – інфекційний титр алантоїсної культури – 9,0 lg EID_{50}/0,2 мл, титр гемаглютиніну – 1:512 ГАО/0,2 мл;

Вірус простого герпесу 2 типу (ВПГ-2) – штам ВН, одержаний з музею вірусів Інституту вірусології ім.Д.І.Івановського РАМН. Вірус підтримували

серійними пасажами в культурі клітин Vero. Інфекційний титр за ЦПД в культурі клітин складав – 6,5 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл. До початку експериментальних досліджень вірус зберігали при -70°С.

Вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД): вірусний матеріал отриманий з Інституту ветеринарної медицини УААН. Інфекційний титр вірусу після десяти проведених пасажів в культурі клітин МДВК складав 6,0–8,0 lg ID_{50}.

ВТГС (TGEV) – етіологічний агент трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) високо контагіозного кишкового захворюванням свиней.

Штам вірусу: $D_{52\text{-}5}$ (BRE_{79}) – є високо патогенний вірус для свиней усіх вікових груп на рівні 5 пасажу в перещеплюваній моношаровій культурі клітин тестикул поросяти ST.

Показаний тропізм вірусу шлунково-кишкового тракту і респіраторного тракту. Штам надано доктором Hubert Laude з лабораторії молекулярної вірусології та імунології Центру біотехнології INRA в Жуа-ан-Жозасі (Франція).

Титрування інфекційності. Титрування інфекційності вірусних матеріалів на культурах клітин проводили двома методами – кінцевих розведень по ЦПД (рис.3.1), а титр інфекційності визначали за методом Кербера-Ашмаріна і визначали в ТЦД 50/мл, методом негативних колоній (S-ознака) під 1,35 % гаровим покриттям (Difco-Bacto) (рис.3.2), а титр інфекційності визначали в БУО/мл. Результати обраховували через 120 годин культивування при 38°С.

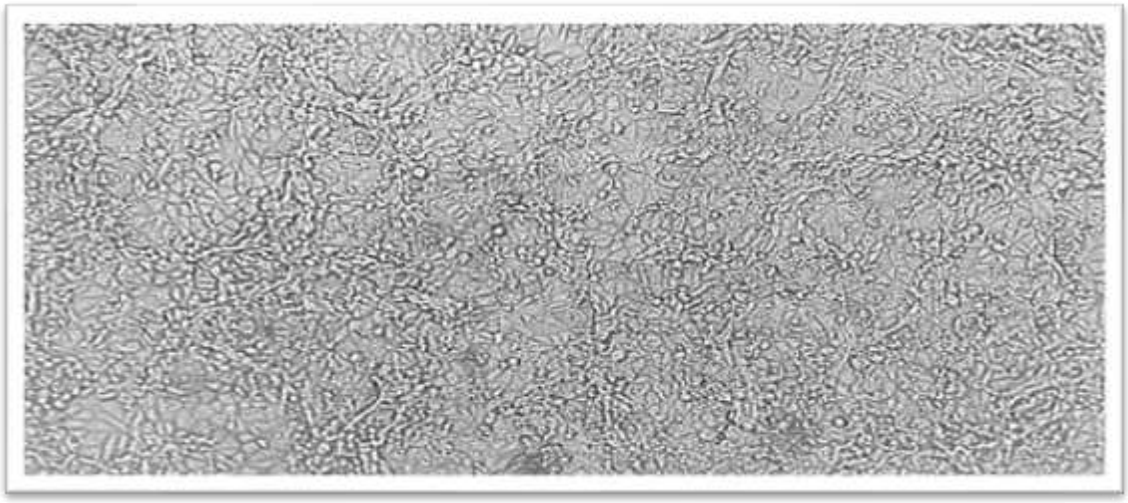


Рисунок 3.1 – Контроль культури СНЕВ
(перещеплювана культура клітин нирки свині)

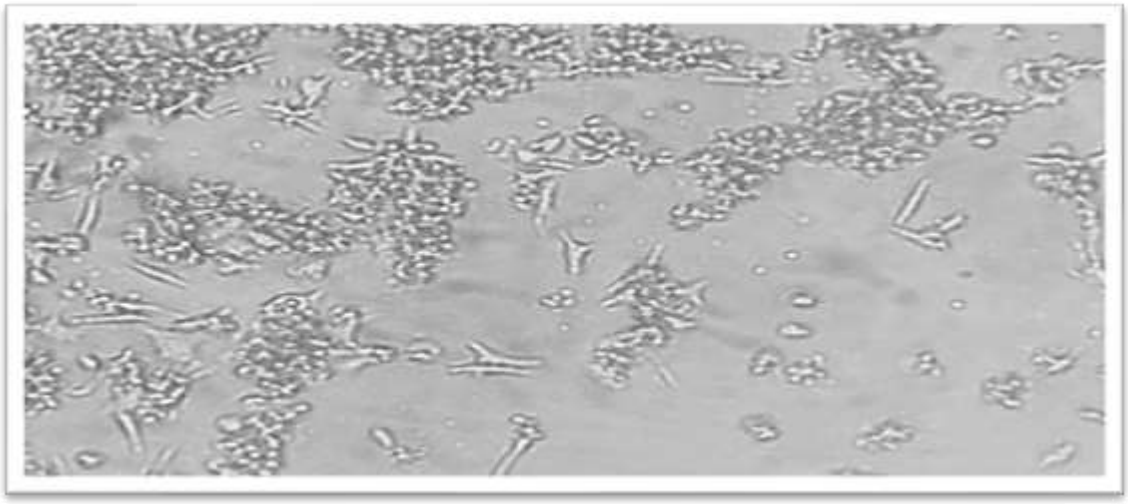


Рисунок 3.2 – Контроль вірусу на СНЕВ
(перещеплювана культура клітин нирки свині)

Визначення ефективної дози (EC_{50})

EC_{50} представляє собою мінімальну концентрацію препарату, яка гальмує розвиток вірус специфічного ЦПД на 50%. Для визначення EC_{50} тест-вірус у дозі 100 $ТЦД_{50}$/0,1 мл вносили в культуру клітин і інкубували протягом 60 хв при 37^0С. Після адсорбції вірусу на клітинах, залишки його видаляли, клітини промивали живильним середовищем, після чого в підтримуюче середовище (RPMI-1640 + 2% фетальної сироватки) вносили препарати в різних концентраціях. Відсутність ЦПД в дослідженні (в оброблених культурах), при наявності його в контролі, а також різниця інфекційних титрів в досліді в порівнянні з контролем вірусу дозволяли встановити EC_{50} препарату.

Критерій оцінки антивірусної активності сполук в системах *in vitro*

Цитотоксичну концентрацію (CC_{50}) – концентрацію препарату, яка сприяє зменшенню життєздатності культури клітин на 50% - визначали при аналізі цитотоксичної дії досліджуваних сполук відповідно до нормативних рекомендацій щодо досліджень антивірусних препаратів *in vitro*. Для визначення антивірусної активності досліджуваних речовин визначали ефективну концентрацію (EC_{50}), тобто концентрацію досліджуваної речовини, при якій рівень реплікації вірусу в інфікованій культурі клітин пригнічується на 50% (1,5-2 $lgID_{50}$). Після визначення показників цитотоксичної і противірусної дії

обчислювали індекс селективності (IS) як співвідношення CC_{50} до EC_{50}. Досліджувані речовини, які мали IS ≥ 16 в системі *in vitro* вважали більш активними та ефективними.

Виявлення РНК вірусу трансмісивного гастроентериту свиней шт. D52 методом зворотної-полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР)

Виділення РНК виконували за допомогою набору «Рибо-сорб» відповідно до інструкції виробника (АмпліСенс, РФ).

Реакцію зворотної транскрипції виконували за допомогою набору "RevertAidTM H MinusFirstStrandcDNASynthesisKit" згідно до інструкції виробника (ThermoScientific, Литва). Для ПЛР були використані специфічні до гену нуклеопротеїна олігонуклеотидних праймерів наступної послідовності: прямий Uni_1 (5'-TGCACTGATCAATGTGCTAG-3 ') та зворотній Uni_2 (5'-TGAAAACACTGTGGCACCCTT-3"). Фрагмент, ампліфікуємого розміром 309 П.М. .. М - маркер "100 bpPlus DNA Ladder" ("ThermoFisherScientific", Литва).

Електронна мікроскопія

Для трансмісійної єлектронной мікроскопії зразки напосились на інертну вуглецеву підкладку товщиною 10А та розміщалися на опорній ситці. Реєстрація зображення проводилась при низьких прискорючих напрумаг з метою запобігання пошкодження препаратів електронним променем. (Для всіх дослідженних зразків підготовка проб однакова).

Сироватки:

Моноклональні антитіла до капа- і лямбда- ланцюгів імуноглобуліну класу G (IgG) людини (Merck).

Антитіла кролячі проти отрути гюрзи отримано з Інституту фармакології та токсикології АМНУ.

Імуноглобулін антирабічний – отримано з Інституту переливання крові.

Антитіла кролячі проти бацилярних біополімерів отримано нами (архів лабораторії).

Антитіла проти вірусів грипу, герпесу, гепатиту С, ВІЛ, EBV, CMV-позитивні контролі в діагностичних наборах.

Тест-система «HumanEGFR/ ErbB1 ELISAKit» for serum, plasma, cell culture supernatant sandur (Sigma)

Тварини – кролі породи Шиншила, вагою 2,5-3,0 кг, миши білі неінбредні – вагою 18-20 г.

Препарати:

- Бацилярний біополімер із Субаліну 1:20
- Бацилярний біополімер з *Staphilococcus aureus* 1мг/мл, 1:20
- Бацилярний біополімер з *Bacillus subtilis* 1мг/мл, 1:20
- Бацилярний біополімер з *Mycobacterium tuberculosis* 1мг/мл, 1:20
- Бацилярний біополімер з *Lactobacterium* 1мг/мл, 1:20
- Бацилярний біополімер з корінебактерій 1 мг/мл, 1:20
- Бацилярний біополімер з HeLa 1 мг/мл, 1:20

Культури мікроорганізмів для отримання бацилярних біополімерів

Для отримання сполук вуглеводвмісних бацилярних біополімерів були використані *Staphylococcus aureus, Lactobacterium, Bacillus subtilis, Mycobacterium tuberculosis* і гриби *Candida albicans,* характеристику яких представлено в табл. 3.1 – 3.5.

Таблиця 3.1 - Характеристика штаму *Staphylococcus aureus* 209

Видова назва культури	***Staphylococcus aureus***
Номер чи найменування штаму	209
Спосіб одержання штаму	Виділений д.м.н. Шапіро А.В. від хворого на пневмонію
Хто (ПІП) і де (організація, її адреса) ідентифікував штам	Інститут епідеміології та інфекційних хвороб НАМНУ, Київ, Амосова, 5

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму:	Золотисто-жовті колонії, навкруги з жовтими зонами (на пептонному середовищі з манітом). Грампозитивні коки, розміщені китицями, нерегулярне ділення в різних площинах, утворюючи скопичення у вигляді китиць, факультативний анаероб
Патогенність (непатогенність, довідка додається або група патогенності за списком СЕС):	умовно-патогенний
Генетичні особливості штаму (ауксотрофність, резистентність до антибіотиків, тощо):	резистентний до ампіциліну – 200 мкг/мл
Галузь використання штаму:	медицина, біопромисловість
Спосіб, умови та склад середовища:	
для довготривалого зберігання (до 5 років)	М’ясо-пептонний агар під вазеліновим маслом при + 4°С
для короткотривалого зберігання (до 1 року)	Поживне середовище з ферментатив-ним пептоном, солями та глюкозою при + 4°С
для виробничого культивування	Поживне середовище на основі ферментативного пептону з лактозою або манітом.
Відомості про власника	Інститут епідеміології та інфекційних хвороб НАМНУ, Київ, Амосова, 5

Таблиця 3.2 - Характеристика штаму *Bacillus subtilis* 2335/105

Видова назва культури	***Bacillus subtilis***
Номер чи найменування штаму	2335/105
Спосіб одержання	Рекомбінантний штам, отриманий в Інституті мікробіології та вірусології ім.Д.К.Заболотного доктором біол. наук Сорокуловою І.Б.
Хто (ПІП) і де (організація, її адреса) ідентифікував штам	Інститут мікробіології та вірусології ім.Д.К.Заболотного, д.б.н. Сорокулова І.Б.
Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму:	Грампозитивні, аеробні, споротуворюючі палочковидні клітини, що продукують каталазу. Колонії світло-кремового кольору з гладкою поверхнею, легко знімаються петлею. В рідкому середовищі утворюють плівку. Прямі палочковидні клітини розміщені поодиноко або у вигляді ланцюжка. Штам не росте в анаеробних умовах.
Патогенність (непатогенність, довідка додається або група патогенності за списком СЕС):	відносяться до нормофлори
Генетичні особливості штаму (ауксотрофність, резистентність до антибіотиків, тощо):	Рекомбінантний штам, що трансформований плазмідою рВМВ 105, яка кодує синтез секреторного інтерферону; резистентний до всього ряду аміноглікозидів
Галузь використання штаму:	медицина, біопромисловість
Спосіб, умови та склад середовища:	
для довготривалого зберігання (до 5 років)	М’ясо-пептонний агар під вазеліновим маслом при + 4°С
для виробничого культивування	ПС Гаузе №2 рідке
Відомості про власника	Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України

Таблиця 3.3 – Характеристика штаму *Lactobacterium*

Видова назва культури	**Еталонний штам *Lactobacterium*,**
Номер чи найменування штаму	Дієтична добавка «Лактобактерин»
Спосіб одержання штаму (де, коли, ким знайдений, одержаний, мутантний та інше)	Виробництво ТОВ «ФЗ «Біофарма»
Хто (ПІП) і де (організація, її адреса) ідентифікував штам	Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського НАМН України.
Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму:	При мікроскопії мазків, забарвлених за Цілем-Нільсеном спостерігаються забарвлені в червоний колір тонкі прямі палички або злегка зігнуті довжиною 1-4 мкм і шириною 0,3-0,5 мкм, які мають часто невеликі здуття на кінцях, не утворюють спор і капсул, кислотостійкі, грам позитивні. При посіві на тверде поживне середовище Левенштейна-Ієнсена через 28-30 діб на поверхні утворюються характерного вигляду шорсткі щільні колонії кремового кольору із зморшкуватою поверхнею з тонкими нерівними краями, розміром від 0,5 до 8,0 мм в діаметрі.
Патогенність (непато-генність, довідка додається або група патогенності за списком СЕС):	Патогенні 3 група
Галузь використання	медицина
Спосіб, умови та склад середовища:	Для культивування мікобактерій використовували основу готового поживного середовища Левенштейна-Ієнсена з додаванням 10% сироватки кінської очищеної.
Відомості про власника	Харківський завод „Біолек”

Таблиця 3.4 – Характеристика штаму *Mycobacterium tuberculosis*

Видова назва культури	**Еталонний штам *Mycobacterium tuberculosis***
Номер чи найменування штаму	АТСС25618 з вакцини БЦЖ
Спосіб одержання штаму (де, коли, ким знайдений, одержаний, мутантний та інше)	Інститут пульмонології і фтизіатрії АМНУ
Хто (ПІП) і де (організація, її адреса) ідентифікував штам	Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського НАМН України.
Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму:	При мікроскопії мазків, забарвлених за Цілем-Нільсеном спостерігаються забарвлені в червоний колір тонкі прямі палички або злегка зігнуті довжиною 1-4 мкм і шириною 0,3-0,5 мкм, які мають часто невеликі здуття на кінцях, не утворюють спор і капсул, кислотостійкі, грам позитивні. При посіві на тверде поживне середовище Левенштейна-Ієнсена через 28-30 діб на поверхні утворюються характерного вигляду шорсткі щільні колонії кремового кольору із зморшкуватою поверхнею з тонкими нерівними краями, розміром від 0,5 до 8,0 мм в діаметрі.
Патогенність (непато-генність, довідка додається або група патогенності за списком СЕС):	Патогенні 3 група
Галузь використання	медицина
Спосіб, умови та склад середовища:	Для культивування мікобактерій використ-товували основу готового поживного сере-довища Левенштейна-Ієнсена з додаванням 10% сироватки кінської очищеної.
Відомості про власника	Харківський завод „Біолек”

Таблиця 3.5 – Характеристика штаму Candida albicans ATCC

Видова назва культури	***Candida albicans***
Номер чи найменування штаму	еталонний ATCC
Спосіб одержання штаму	Депозитарій мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб АМНУ, Київ, Амосова, 5
Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму:	Круглі колонії сіро-кремового кольору з матовою поверхнею та рівними краями. На рідкому середовищі ріст у вигляді каламуті і з осадом на дні. При мікро-скопічному вивчені - овальні клітини, що розташовані окремо або ланцюгом.
Патогенність (непатоген-ність, довідка додається або група патогенності за списком СЕС):	Аспорогенні дріжджі умовно-патогенний
Галузь використання штаму:	медицина, біопромисловість
Спосіб, умови та склад середовища:	
для довготривалого зберігання (до 5 років)	М’ясо-пептонний агар під вазеліновим маслом або поживне середовище для вирощування грибів при + 4°С з левоміцетіном (тверде Сабуро)
для короткотривалого зберігання (до 1 року)	Поживне середовище з ферментативним пептоном, агаром, солями та глюкозою при + 4°С
для виробничого культивування	Поживне рідке середовище на основі фосфатного фізіологічного розчину з ферментативним пептоном та з 2% глюкозою
Відомості про власника	Інститут епідеміології та інфекційних хвороб НАМНУ, Київ, Амосова, 5

Вихідну культуру засівали в пробірку з 5 мл середовища і розмножували методом двократного пересіву в 100 мл, а потім в 3 л середовища. Культивування здійснювали протягом 24 годин при 37 ˚С в режимі струшування 400 rpm.

Культури клітин для отримання бацилярних біополімерів

HeLa – епітеліоїдна карцинома шийки матки. Отримана з банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України. Культивується в атмосфері 5 % CO_2. HeLa – трансфекована плазмідою PX459 (CRISPR)SpCas9, встановлена резистентність до пуроміцину.

Одержання бацилярних біополімерів. Для роботи була взята проба в об'ємі від 100 мл до 2000 мл, що була екстрагована 96^0 етиловим спиртом у відношенні 1:1,5 протягом 20 годин при температурі $+4^0$C. Далі проби були відцентрифуговані, супернатант зібраний на переробку, а осади ресуспендовані в 40 мл 60° етилового спирту і відмиті буферним розчином з pH 7,2. Екстракцію етиловим спиртом із пробами повторювали тричі. Ресуспендований 60° етиловим спиртом осад та відмитий буфером pH 7,2 прогрівали 15 хвилин при температурі 100°C на водяної бані. Супернатант, після центрифугування використовували як бацилярні біополімери.

Очистка бацилярних біополімерів гельфільтрацією на сефадексіG-50. Зразок препарату наносили на колонку з сефадексом G-50 (2x30 см), попередньо врівноважену фосфатним буфером, збирали фракції по 0,5 мл і аналізували вміст білків біуретовим методом .

Очистка бацилярних біополімерів на сефарозі 4B. Зразок препарату нашаровували на колонку (2,2x60 см) з сефарозою 4B, урівноважену 0,1 М розчином оцтовокислого амонію. Збирали фракції по 1,5 мл і аналізували вміст білків за методом Лоурі і вуглеводів по реакції з фенолом і сірчаною кислотою .

Чистоту препарату перевіряли методом аніонообмінної високоефективної рідинної хроматографії на колонках HPLC Gold System фірми Beckman, яка забезпечена комп'ютерною програмою для кількісної обробки результатів з детекцією поглинання продуктів при довжині хвилі 280 нм. Бацилярні біополімери в концентрації 2 мг/мл вносили в колонку TSK DEAE-5PW розмірами 7,5x75 мм або TSK SW 3000XL розмірами 7,5x60 мм згідно з Europian pharmacopeia 5.0. В якості буферних розчинів використовували NaCl в концентрації 0,01 М (розчин А) и 1 М (розчин В), в який додавали 0,01 М Трис-HCl (pH 7.4). Додатково препарати фракціонували на колонках Bio Sil TSK 400 розмірами 7,5 x 300 мм і вивчали хроматографічний профіль при довжині хвилі 225 і 270 нм.

Електрофорез бацилярних біополімерів в поліакриламідному гелі (ПААГ) проводили за методом Laemmli [58] з використанням 5%-ного

концентрувального і 12 або 15 %-ного розділювального гелів при силі струму 60-70 мА.

MALDI TOF MS - спектрометрія

Триптичний гідроліз бацилярного біополімеру в поліакриламідному гелі проводили наступним чином: шматочки гелю розмірами 1-2 мм двічі промивали для знищення фарби шляхом інкубації в 100 мкл 40 %-го розчину ацетонітрилу в 0,05 М NH4HCOз протягом 30 хв. при 37 С. Після видалення розчину для дегідратації гелю додавали по 100 мкл ацетонітрилу. Видаливши ацетонітрил, і висушивши шматочок гелю, додавали до нього 4 мкл розчину модифікованого трипсину (Promega) в 0,05 М NH4HCOз з концентрацією 12 мкг/мл. Гідроліз проводили протягом 12 год при 37^0С, потім до розчину додавали 8 мкл ТФУ в 10% розчині ацетонітрилу в воді та ретельно перемішували. Надгелевий розчин використовували для одержання MALDI-мас спектрів (13а).

Підготовка розчинів для мас-спектрометрії проводили наступним чином: на мішені змішували по 1 мкл розчину зразка і 0,3 мкл розчину 2,5дегідроксибензойної кислоти (Aldrich, 10 мг в 20%-ному ацетонітрилі у воді з 0,5% ТФУ), одержану суміш висушували на повітрі.

Мас-спектрибули одержані на тандемному MALDI-часпролітному мас-спектрометрі Ultraflex II BRUKER (Німеччина) оснащеному ультрафіолетовим лазером. Мас-спектри одержані в режимі позитивних з використанням рефлекторна; точність виміряних моноізотопних мас в рефлектор-моді після докалібровки за піками автолізу трипсину складала 0,007 %.

Ідентифікацію білків за пептидним фінгерпринтом здійснювали за допомогою програми Mascot (www.matrixscience. com). Пошук здійснювався в базі даних NCBI серед білків всіх організмів і серед бактерій, із вказаною точністю з урахуванням можливого окислення метіонінів киснем повітря і можливої модифікації цистеїнів акриламідом.

Імуноферментний аналіз. В лунки планшетів Maxisorp фірми Nunc (Данія) вносили антигени по 2 мкг/мл в карбонатному буфері (рН 9,6). Після інкубації при 4°С протягом 16-18 год. і блокування вільних зв'язків на планшеті знежиреним молоком в лунки вносили досліджувані сироватки. Інкубували

протягом 1 год., відмивали лунки 4 рази промивним буфером і вносили кон'югат. Інкубували 30 хв. при 37 °С, відмивали 6 разів і вносили в лунки проявник хромоген ТМБ і розчин перекису водню в цитратному буфері (рН 5,0). Реакцію через 30 хв. зупиняли 2 М розчином сірчаної кислоти і реєстрували оптичну густину (ОГ) зразка за допомогою фотометра E_x800 (BioRad) при двохвильовому режимі (450/630 нм). Граничне значення (ГЗ) визначали по ОГ негативного контролю (K^-) + 0,12. При співвідношенні ОГ зразку/ОГ ГЗ ≥ 1 сироватка вважається позитивною.

Імунізація кролів і отримання анти- бацилярно біополімерних антитіл. Кролів породи Шиншила вагою 1,5-2 кг імунізували препаратами бацилярних біополімерів (1 мг/мл) в ретро-бульбарний синус з використанням повного ад'юванта Фрейнда (1:1). Через 1 місяць визначали наявність специфічних до бацилярних біополімерів антитіл, отримавши з вушної вени 2-3 мл крові. Якщо титри антитіл в ІФА були нижчі за 1:100, проводили повторну імунізацію, використовуючи неповний ад'ювант Фрейнда і через 1 тиждень брали кров.

Мишам проводили внутрішньочеревну імунізацію. Забір крові здійснювали з щічних сосудів.

Визначення максимальної переносимої цитотоксичної концентрації (CC_{50}). Для визначення CC_{50} препаратів використовували різні культури клітини. В дослідах застосовували не менш десяти рядів лунок в планшетах з культурою клітин для кожного розведення препарату в поживному середовищі. Планшети з культурою клітин інкубували при 37^0С з подачею 5% CO_2 протягом 5 днів. Щодня проводили спостереження дослідних та контрольних культур з метою встановлення наявності або відсутності цитопатогенної дії (ЦПД).

Ступінь ЦПД визначали за зміною морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відторгнення від поверхні лунок дегенеративно змінених по 4+ плюсовій системі від + до ++++:

"-" – повна відсутність дегенерації клітин;

"+" – уражено не більше 25% (захист клітин моношару від антивірусного препарату на 75%);

“++” – уражено не більше 50% клітинного моношару;

“+++” – уражено не більше 75% клітинного моношару;

“++++” – повна дегенерація клітинного моношару.

За CC_{50} препарату приймали його найбільшу кількість, яка не викликала дегенерацію клітин [59].

Статистична обробка результатів досліджень

Цифровий матеріал, представлений в роботі, оброблений варіаційно-статистично. Статистичну оцінку рівнів значимості відмінностей отриманих цифрових показників проводили з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програм Microsoft Excel. Достовірними вважали відмінності при $p<0,05$.

4. ФІТОХІМІЧНЕ ТА БІОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЛІКАРСЬКОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ

На основі наявних літературних даних щодо противірусної активності поліфенольних сполук рослинного походження – флавоноїдів, а також беручи до уваги літературні фармакогностичні дані щодо лікарських рослин, що містять флавоноїди, зокрема тих, що не досліджувалися щодо їх противірусної активності, нами було обрано наступні 9 рослин як кандидати для розробки комплексного рослинного препарату із потенційною противірусною дією:

- селера пахуча (культурна) (*Apium graveolens* L.);
- лопух великий, або лопух справжній (*Arctium lappa* L.);
- нагідки лікарські, або календула лікарська (*Calendula officinalis* L.);
- лабазник звичайний, або гадючник звичайний (*Filipendula vulgaris* Moench.);
- підмаренник справжній (*Galium verum* L.);
- хміль звичайний (*Humulus lupulus* L.);
- льонок звичайний (*Linaria vulgaris* Mill.);
- петрушка кучерява (*Petroselinum crispum* Mill.);
- софора японська, або японська акація (*Styphnolobium japonicum* L., синонім: *Sophora japonica* L.).

Для фітохімічного та біохімічного вивчення лікарської рослинної сировини використовували наступний підхід: кількісне визначення флавоноїдів та інших біологічно активних речовин, що згідно літературних даних, містяться у відповідних лікарських рослинах, а також якісні тести на вміст біологічно активних речовин. Такий підхід дозволяє, по-перше, провести кількісне визначення речовин, що, ймовірно, опосередковують противірусну активність (флавоноїди), по-друге, оцінити адекватність отриманих даних щодо кількісного вмісту флавоноїдів, порівнюючи ці значення із значенням кількісного вмісту інших БАР, що описані у літературі. По-третє, ідентифікація (якісне визначення) БАР різних класів являє собою додатковим підходом до ідентифікації кожного

виду лікарської рослини, що надійшла як сировина для виконання наукової роботи.

4.1. Дослідження коренів лопуху справжнього *Arctium lappa* L.

Аналіз літературних даних щодо хімічного складу лопуху справжнього показав, що поліфеноли і похідні коричної кислоти є одними із основних природних сполук даного виду ЛРС, що дозволяє використовувати якісні тести на ці групи БАР для хімічно ідентифікації даної лікарської рослини.

При проведенні тонкошарової хроматографії (ТШХ) екстракту досліджуваного зразку ЛРС у УФ-світлі було виявлено характерні блакитні і жовтаво-блакітні флуоресціюючі зони (рис. 4.1), які свідчать про наявність у зразку хлорогенової та кофейної кислот.

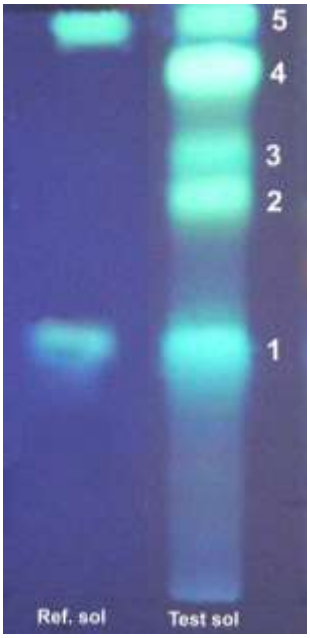


Рисунок 4.1 – Тонкошарова хроматографія для виявлення хлорогенової та кофейної кислот у коренях лопуху справжнього (Ref. sol – розчин порівняння; Test sol. – досліджуваний зразок; 1 – зона, що відповідає зоні кислоти хлорогенової; 2,3,4 – зони, що відповідають іншим БАР; 5 – зона, що відповідає зоні кислоти кофейної)

Було проведено якісну краплинну реакцію на поліфенольні сполуки з фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом з подальшою обробкою плями

калію гідроксиду розчином спиртовим: було виявлено появу синього забарвлення (позитивний тест на вміст поліфенольних сполук).

На наступному етапі роботи проводили кількісне визначення гідроксикоричних кислот у сировині із використанням абсорбційно спектрофотометричного методу (ДФУ, 2.2.25).

Було визначено УФ-спектр випробовуваного розчину екстракту лопуха й встановлено максимум поглинання досліджуваного розчину. В результаті було встановлено, що максимум поглинання відповідає довжині хвилі 525 нм (рис. 4.2), що відповідає умовам кількісного визначення гідроксикорічних кислот. Вміст суми гідроксикорічних кислот в сировині, в перерахунку на хлорогенову кислоту, склав 2,3 %, що є цілком прийнятним для даної лікарської рослинної сировини.

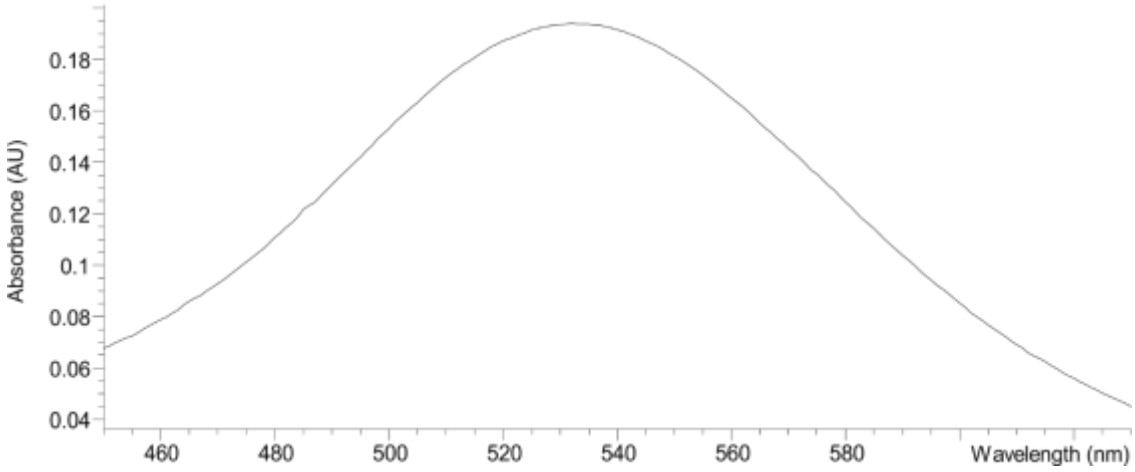


Рисунок 4.2 – Спектр поглинання випробовуваного розчину екстракту лопуха, отриманий при визначенні вмісту гідроксикорічних кислот

На наступному етапі роботи проводили кількісне визначення флавоноїдів у сировині із використанням абсорбційно спектрофотометричного методу (ДФУ, 2.2.25).

Було визначено УФ-спектр випробовуваного розчину екстракту лопуха й встановлено максимум поглинання досліджуваного розчину. В результаті було встановлено, що максимум поглинання відповідає довжині хвилі 425 нм (рис. 4.3), що відповідає умовам кількісного визначення флавоноїдів. Вміст

флавоноїдів в сировині склав 3,3 %, що є цілком прийнятним для даної лікарської рослинної сировини.

Для даної лікарської рослини додатково визначали такий біохімічний показник як вміст полісахаридів у плодах, який слав 5,5%, що узгоджується із даними літератури [60].

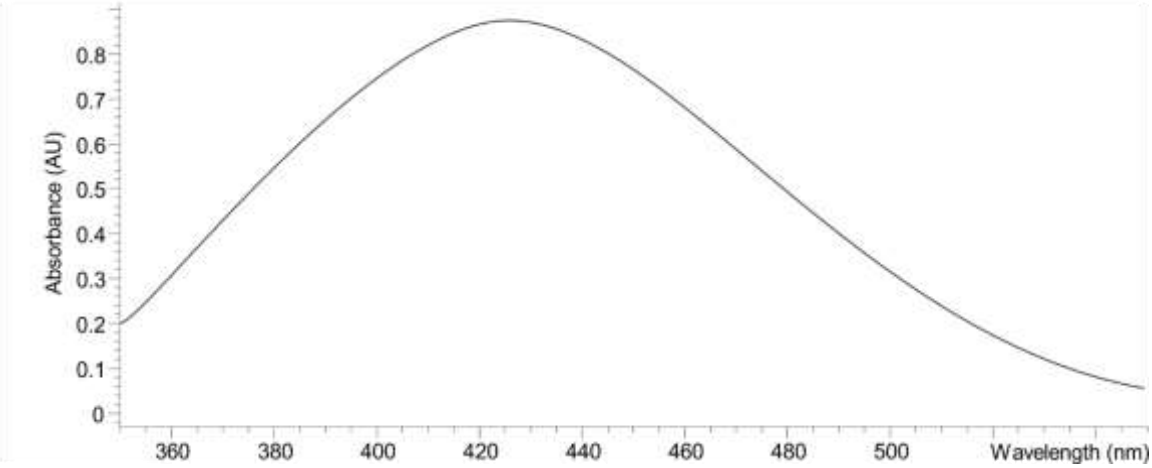


Рисунок 4.3 – Спектр поглинання випробовуваного розчину екстракту лопуха, отриманий при визначенні вмісту флавоноїдів

4.2. Дослідження плодів софори японської *Sophora japonica* L.

У зв'язку з тим, що плоди софори при їх вологості більше 10% практично неможливо подрібнити і, тим більше, просіяти крізь сито (500), перед проведенням випробувань за такими показниками як «Ідентифікація. Флавоноїди», «Кількісне визначення. Флавоноїди» тощо сировину перед подрібненням додатково висушували до вмісту вологи 3-6% при температурі 70 ºС. Далі висушену сировину подрібнюють (500) та використовують для проведення аналізу за зазначеними показниками. При розрахунках враховували загальну втрату в масі при висушуванні.

За літературними даними хімічний склад софори представлений в основному різними флавоноїдами – похідними кверцетину.

На стадії пробопідготовки екстракцію сировини проводили метанолом. На хроматограмі як випробуваний розчин наносили спиртовий розчин, у якості розчину порівняння використовували спиртовий розчин рутину, гіперозиду.

Хроматографували в системі розчинників: *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80). Після висушування при температурі від 100 до 105 °С, пластинку обприскували розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р.* Потім пластинку обприскували розчином 50 г/л *макроголу 400 Р* у *метанолі Р,* сушили на повітрі протягом 30 хв.

Хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм. Хроматографічній профіль випробуваного розчину оцінювали розчинів порівняння – відносно рутину і гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння (рис. 3.2.1). За результатами проведеного дослідження можна зробити висновок, що використана ЛРС відповідає умовам ідентифікації флавоноїдів софори японської.

Для кількісного визначення флавоноїдів у плодах софори японської використовували методику [61].

Під час відповідного дослідження було виміряно УФ-спектр випробуваного розчину сировини і визначений максимум поглинання отриманого розчину. У результаті було встановлено, що максимум поглинання знаходиться при довжині хвилі 425 нм (рис 4.4), що відповідає умовам кількісного визначення флавоноїдів у плодах софори японської. Вміст флавоноїдів в сировині, в перерахунку на рутин, склав 4,89%, що є цілком прийнятним для даної лікарської рослинної сировини.

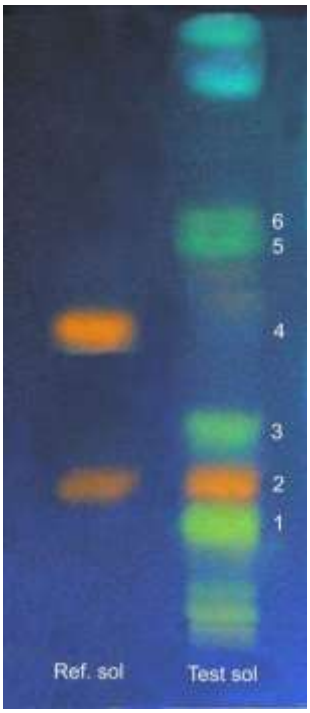


Рисунок 4.4 – Тонкошарова хроматографія для виявлення флавоноїдів у плодах софори японської (1,3,5,6 – зони, що відповідають іншим БАР; 2 – жовтаво-коричнева зона, що відповідає розчину порівняння «рутин»; 4 – жовтаво-коричнева зона, що відповідає розчину порівняння «гіперозид»)

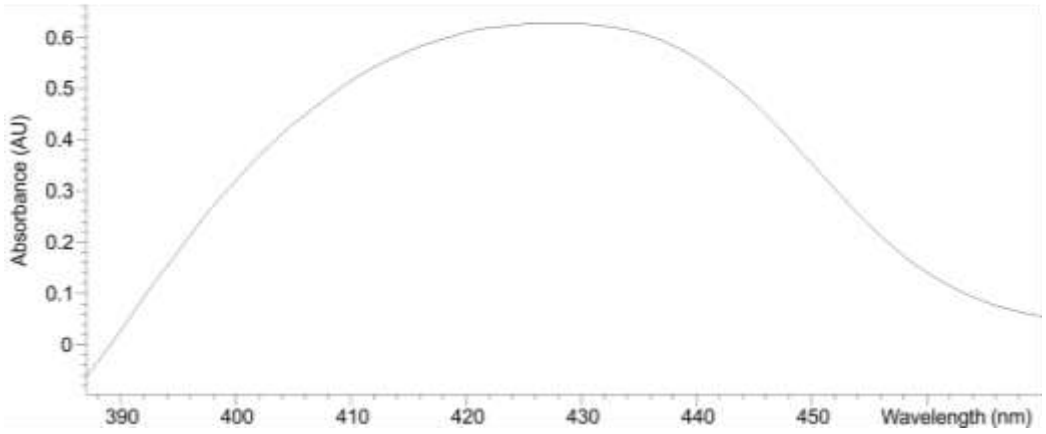


Рисунок 4.5 – Спектр поглинання випробовуваного розчину екстракту плодів софори, отриманий при визначенні вмісту суми флавоноїдів в сировині

Для даної лікарської рослини додатково визначали такий біохімічний показник як вміст полісахаридів у плодах, який слав 15%, що узгоджується із даними літератури [62].

4.3. Дослідження шишок хмелю *Humulus lupulus* L.

З літературних даних відомо, що основними біологічно активними речовинами шишок хмелю є мірцен, каріофілен, гумулон, лупулон. Тому доцільним є проводити тест «Ідентифікація» визначаючи наявність ксантогумолу, що належить до класу флавоноїдів.

При перегляді в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм на хроматограмі розчину порівняння повинні виявлятися три темні зони: у нижній чверті слабка зона (куркумін), трохи нижче центру – зона диметиламінобензальдегіду, і над ним – зона судану. На хроматограмі випробовуваного розчину було виявлено: слабка темна зона майже на рівні зони куркуміну на хроматограмі розчину порівняння (ксантогумол), майже на рівні зони диметиламінобензальдегіду – зони гумулонів, майже на рівні зони судану – зони лупулонів.

При перегляді в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм зони лупулонів на хроматограммі випробовуваного розчину виявляють синю флюоресценцію, зони гумулонів - коричневу флюоресценцію, а зона ксантогумолу - темно-коричневу флюоресценцію.

Така форма хроматограми відповідає вимогам щодо ідентифікації ксантогумолу у шишках хмелю.

Оскільки шишки хмелю містять надзвичайно багато біологічно активних речовин, у тому числі й тих, що відносяться до різних класів сполук, вважаємо за доцільне кількісне визначення проводити за сумою екстрактивних речовин (екстракція етиловим спиртом 70 % *об/об)*. Проаналізована ЛРС відповідає вимогам Європейської фармакопеї (не менше 25%).

Для даної лікарської рослини додатково визначали такий біохімічний показник як вміст ефірних олій, який слав 0,5%, що узгоджується із даними літератури [63].

4.4. Дослідження календули лікарської *Calendula officinalis* L.

Проведення ідентифікації флавоноїдів та гідроксикоричних кислот запропоновано проводити згідно рекомендацій Європейської фармакопеї.

Ідентифікація флавоноїдів проводили за виявленням помаранчевих зон (жовтаво-коричневих флуоресціючих, після реакції з аміноетиловім ефіром дифенілборної кислоти, по відношенню до зон стандартної суміші кислоти кофейної, кислоти хлорогенової і рутину. Ідентифікація гідроксикоричних кислот проводитилася за виявленням жовтаво-зелених флуоресціючих і блакитних зон, також після по відношенню до зон хлорогенової і кавової кислот на хроматограмі розчину порівняння (рис. 4.6).

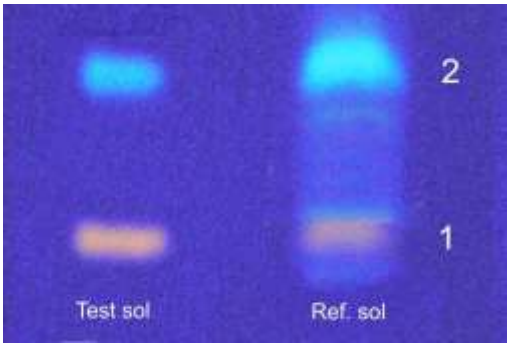


Рисунок 4.6 – Тонкошарова хроматографія для виявлення флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у квітках календули лікарської (1 – зона, що відповідає рутину; 3 – зона, що відповідає хлорогеновій кислоті)

Кількісне визначення флавоноїдів проводили на базі методики Європейської фармакопеї (“Calendula flower”). Методика основується на кольоровій реакції флавоноїдів з реактивом алюмінія хлориду і вимірюванні оптичної густини отриманного розчину за довжини хвилі 425 нм. Вміст флавоноїдів в препараті визначають в перерахунку на гіперозид.

Проаналізована сировина відповідала регламентованим Європейською фармакопеєю вимогам (не менше 0,4% суми флавоноїдів) – 1,2%.

Для даної лікарської рослини додатково визначали такий біохімічний показник як вміст ефірних олій, який слав 0,03%, що дещо нижче, ніж зазначено у літературі [2], проте за іншими даними в залежності від методу визначення даний показник може коливатися у декілька разів [64].

4.5. Дослідження лабазника звичайного *Filipendula vulgaris* Moench.

Огляд літературних даних по хімічному складу лабазника звичайного показав, що флаваноїди (поліфеноли) є одними із основних природних сполук даного виду ЛРС (зокрема – катехіни), тому нами обрано катехін для ідентифікації даної лікарської рослини. Для ідентифікації даної БАР було використано метод ТШХ: при дослідженні наявної ЛРС на хроматограмі було виявлено характерну зону рожевого кольору (рис. 4.7). Такого роду реакція свідчить про наявність катехіну у досліджуваній рослинній сировині.

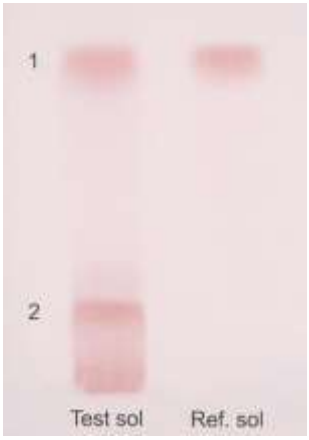


Рисунок 4.7 – Тонкошарова хроматографія для виявлення флавоноїдів (катехіни) у кореневищах та коренях лабазника звичайного (1 – зона, що відповідає катехіну; 2 – зона, що відповідає іншим БАР)

Кількісне визначення комплексу полі фенольних сполук проводили абсорбційно спектрофотометричним методом (ДФУ, 2.2.25). Методика засновується на кольоровій реакції поліфенольних сполук, які входять до складу рослинної сировини, з фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом і вимірюванні оптичної густини отриманого розчину при 760 нм. Вміст загальних поліфенолів в сировині визначали в перерахунку на пірогалол, який містить в молекулі три гідроксильні групи (рис. 4.8). Як видно із отриманого спектру, максимум поглинання знаходиться при довжини хвилі 760 нм, що є підтвердженням наявності поліфенольних сполук у досліджуваному розчині. Вміст полфіенольних сполук у досліджуваній ЛРС склав 6,58%.

Для даної лікарської рослини додатково визначали такий біохімічний

показник як вміст аскорбінової кислоти, який слав 0,23%, що відповідає даним, описаним у літературі для даної ЛРС [63].

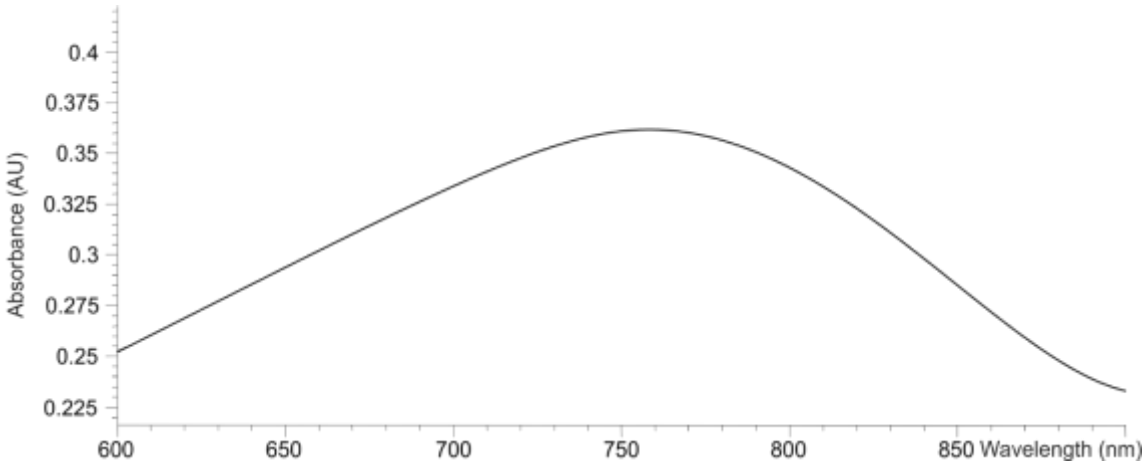


Рисунок 4.8 – Спектр поглинання розчину екстракту лабазнику, отриманий при визначенні вмісту поліфенольних сполук

4.6. Дослідження підмаренника справжнього *Galium verum* L.

За літературними даними хімічний склад підмаренника справжнього представлений різними флавоноїдами, зокрема: рутином, 3-рутинозид кемпферолом, 7-глюкозид апігенином, гіперозидом. Тому доцільним є проводити тест «ідентифікація флавоноїдів та гідроксикоричних кислот» за допомогою тонкошарової хроматографії.

Хроматограми переглядали в УФ-світлі при довжині хвилі 366 нм. Ідентифікацію флавоноїдів проводили за появою помаранчевих зон після реакції аміноетиловогім ефіром дифенілборної кислоти, по відношенню до зон стандартної суміші рутину і гіперозиду. Ідентифікація гідроксикоричних кислот проводили за появою блакитних зон, також після обробки хроматограми по відношенню до зони хлорогенової кислоти на хроматограмі розчину порівняння.

При проведенні ТШХ (рис. 4.9) було виявлено: помаранчева флуоресціюча зона (1) на рівні зони рутину на хроматограмі розчину порівняння; вище неї було виявлено блакитну флуоресціюча зона (2), що відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння; вище неї – помаранчева флуоресціюча зона (3) дещо вище зони гіперозиду на хроматограмі розчину

порівняння. Таким чином, отримані результати свідчать про коректність тесту «ідентифікація флавоноїдів та гідроксикоричних кислот» по відношенню до досліджуваної ЛРС.

Кількісне визначення у даній ЛРС доцільно проводити на прикладі гідроксикоричних кислот використовуючи абсорбційно спектрофотометричний методом (ДФУ, 2.2.25).

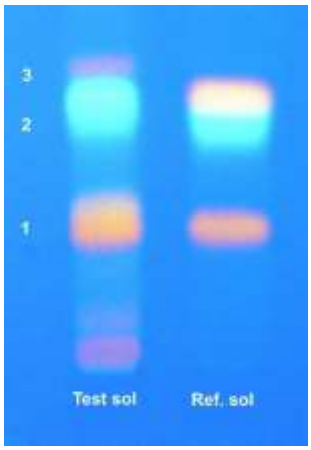


Рисунок 4.9 – Спектр поглинання розчину екстракту підмареннику справжнього, отриманий при визначенні вмісту поліфенольних сполук (1 –зона, що відповідає рутину; 2 – зона, що відповідає хлорогеновій кислоті; 3 – зона, що відповідає гіперозиду)

До складу БАР сировини входять фенолкарбонові кислоти (зокрема хлорогенова), тому за основу методики кількісного визначення нами взята методика визначення гідроксикорічних кислот Європейської фармакопеї (“Ash leaf, Fraxini folium”). Вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину проводиться за довжини хвилі 525 нм. Суму кислот перераховують на хлорогенову кислоту, з використанням питомого показника, який в умовах методики дорівнює 188 (рис. 4.10). Вміст суми гідроксикорічних кислот в підмареннику, в перерахунку на хлорогенову кислоту склав 2,55%.

Для даної лікарської рослини додатково визначали такий біохімічний показник як вміст полісахаридів, який слав 2,02%, що відповідає даним, описаним у літературі для даної ЛРС [65].

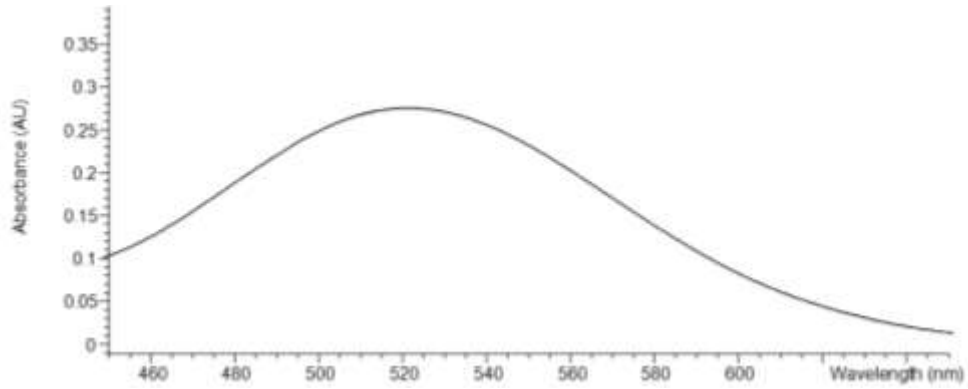


Рисунок 4.10 – Спектр поглинання випробовуваного розчину екстракту підмареннику справжнього, отриманий при визначенні вмісту гідроксикорічних кислот

4.7. Дослідження льонку звичайного *Linaria vulgaris* L.

За літературними даними хімічний склад льонку представлений різними класами біологічно активних речовин: сапоніни, алкалоїди (пеганін), флавоноїди (лінарин, пектолінарин, ацетилпектолінарин), дубильні речовини, органічні кислоти тощо. Ідентифікацію флавоноїдів (ацетилпектолінарин) проводили методом ТШХ. Хроматограми переглядали в УФ-світлі при довжині хвилі 366 нм. Виходячи з літературних даних і хімічної будови ацилірованих флавоноїдних глікозидів (7-О[6-О-(4-ацетил-α–L-рамнопіранозил)]-β-D-глюкопіранозидо-5-окси-6,4-диметоксіфлавон) ці сполуки не реагують із жодним проявником характерним для флавоноїдів. Тому ідентифікацію можливо проводити у УФ світлі по виявленню помаранчевих зон, після реакції *аміноетиловогім ефіром дифенілборної кислоти*, стандартної суміші рутина і гіперозиду, а потім по виявленню темних зон на хроматограмі випробовуваного розчину по відношенню до зон на хроматограмі розчину порівняння. На хроматограмі (рис. 4.11) випробовуваного розчину виявляється темна зона (1) декілька вище зони рутину на хроматограмі розчину порівняння; темна зона (2) декілька нижче зони гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння. Такі результати є свідченням наявності у досліджуваному розчині флавоноїдів льонку звичайного.

Із літературних даних відомо, що одними із основних БАР даного виду ЛРС являються флавони (пектолінарин, ацетилпектолінарин тощо), тому

кількісне дослідження сировини доцільно проводити хромато-спектрофотометричним методом – визначення флавонів в перерахунку на ацетилпектолінарин на основі методу [66]

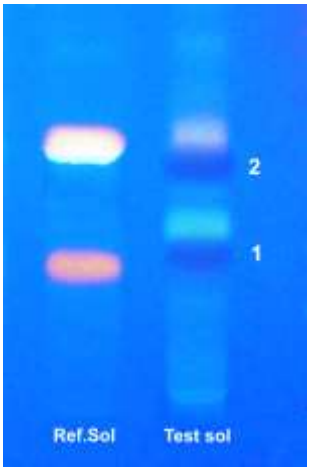


Рисунок 4.11 – Спектр поглинання розчину екстракту льонку звичайного, отриманий при визначенні вмісту флавоноїдів (1 – зона на рівні рутину, 2 – зона на рівні гіперозиду)

На рис. 4.12 наведено УФ-спектр, отриманий для досліджуваного розчину екстракту льонку. Згідно літературних даних пік на рівні 334 нм відповідає фракції флавонів. Вміст флавонів у досліджуваній сировині склав 6,38%.

Для даної лікарської рослини додатково визначали такий біохімічний показник віст аскорбінової кислоти у листі, який склав 1,1 мг/г, що узгоджується із даними описаними у літературі для даної ЛРС [2].

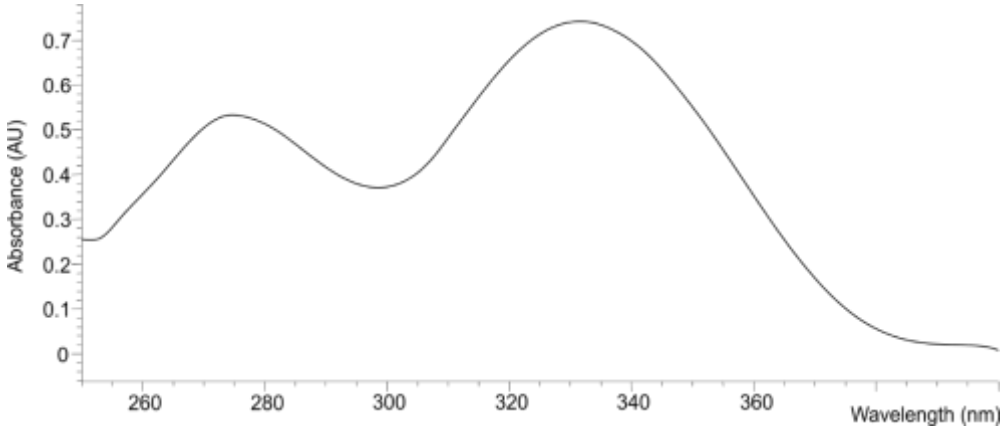


Рисунок 4.12 – УФ-спектр досліджуваного розчину екстракту льонку

4.8. Дослідження селери пахучої *Linaria vulgaris* L.

Використані нами раніше методики ідентифікації флавоноїдів для дослідження селери пахучої не давали відтворюваних результатів, а інші описані у літературі підходи [67, 68] були методично недоступними. У таких випадках, згідно практики стандартизації лікарської рослинної сировини та фармацевтичного аналізу, дозволяється проводити ідентифікації певних речовин одночасно під час їх кількісного визначення.

На рис. 4.13 наведено спектр, отриманий для досліджуваного розчину екстракту селери пахучої. Згідно літературних даних [69] пік на рівні 510 нм відповідає фракції флавоноїдів. Вміст флавоноїдів у досліджуваній сировині склав лише 1,8%.

Для даної лікарської рослини додатково визначали такі біохімічні показники як вміст полісахаридів у коренеплодах (склав 2,0 г на 100 г), а також віст аскорбінової кислоти у коренеплодах (38 мг/100 г). Такі показники вмісту БАР відповідають тим, що описані у літературі для даної ЛРС [70].

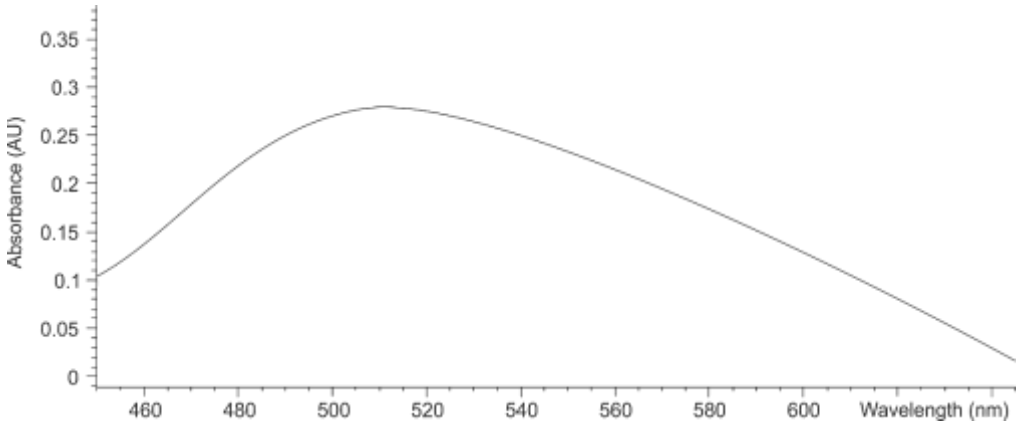


Рисунок 4.13 – Спектр поглинання випробовуваного розчину екстракту селери пахучої, отриманий при визначенні вмісту флавоноїдів

4.9. Дослідження петрушка кучерявої *Petroselinum crispum* Mill.

Згідно даних літератури [71] петрушка кучерява містить такі флавоноїди як апігенін, апігенін-7-О-глюкозид (космосихн), апігенін-7-О-апіозіл-О-глюкозид (апіїн), 6-ацетілапіїн. Використані нами раніше методики ідентифікації флавоноїдів для дослідження петрушка кучерявої не давали відтворюваних результатів, тому було прийнято рішення проводити ідентифікацію даних

речовин одночасно під час їх кількісного визначення.

Для кількісного визначення флавоноїдів використовували методику [72]. Було показано, що досліджувана сировина містить 1,44% флавоноїдів.

Для даної лікарської рослини додатково визначали такі біохімічні показники як вміст ефірної олії у листі (склав 0,25%), а також віст аскорбінової кислоти у коренеплодах (32 мг/100 г). Такі показники вмісту БАР відповідають тим, що описані у літературі для даної ЛРС [2].

Висновки до розділу 4.

На даному етапі роботи було адаптовано методики якісного та кількісного аналізу для визначення біологічно активних речовин дев’яти лікарських рослин: селери пахучої, лопуху великого, нагідок лікарських, лабазнику звичайного, підмареннику справжнього, хмелю звичайного, льонку звичайного, петрушки кучерявої, софори японської. Визначення (стандартизацію) лікарської рослинної сировини проводили передусім за групою поліфенольних сполук, які згідно сучасних даних, мають противірусний потенціал *in vitro*. З огляду на високий вміст речовин відповідної групи, а також зручності подальшої стандартизації комплексного лікарського фітопрепарату, для включення до композиції для подальшого вивчення рекомендуємо таку лікарську рослинну сировину: корені лопуха великого (гідроксикоричні кислоти – 2,3%, флавоноїди – 3,3%), кореневища та корені лабазнику звичайного (поліфенольні сполуки – 6,58%), траву підмареннику справжнього (гідроксикоричні кислоти – 2,55%), траву льонку звичайного (флавони – 6,38%), плоди софори японської (флавоноїди – 4,89%).

5. ФІТОХІМІЧНИЙ ТА ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧНИЙ ДИЗАЙН ПРЕПАРАТУ

Мета розробки – розробка лабораторної технології отримання фітопрепарату з передбачувальною противірусною активністю, а також обґрунтування параметрів його фіто- та біохімічної стандартизації.

На перередніх етапах роботи було проведено визначення (стандартизацію) лікарської рослинної сировини проводили передусім за групою поліфенольних сполук, які згідно сучасних даних, мають противірусний потенціал *in vitro*. З огляду на високий вміст речовин відповідної групи, а також зручності подальшої стандартизації комплексного лікарського фітопрепарату, для включення до композиції для подальшого вивчення була рекомендована така лікарська рослинна сировина:

- корені лопуха великого (гідроксикоричні кислоти – 2,3%, флавоноїди – 3,3%);
- кореневища та корені лабазнику звичайного (поліфенольні сполуки – 6,58%);
- траву підмареннику справжнього (гідроксикоричні кислоти – 2,55%);
- траву льонку звичайного (флавони – 6,38%);
- плоди софори японської (флавоноїди – 4,89%).

Кореневища і корені Лабазнику шестипелюсткового – FILIPENDULA VULGARIS MOENCH. (F. HEXAPETALA GILIB.) [73].

Гадючник шестипелюстковий містить дубильні речовини: у коренях — 8,6—9,8%, у листках і квітках — 8,4— 22,4%, у стеблі—2,3%. Вітаміни: С. Кумарини сліди. Фенольні сполуки: саліциловий альдегид. Фенольні глікозиди: спіреїн, монотропитин, халкони, лейкоантоцианідини [74].

Трава льонку звичайного LINARIA VULGARIS MILL—

Льонок звичайний містить алкалоїд пеганін, флавоноїдні глікозиди (лінарин, неолінарин, пектолінарин, ацетилпектолінарин, фітостерин, триакантин), органічні кислоти, аскорбінову кислоту [75].

Трава підмареннику справжнього - GALIUM VERUM L.

Підмаренник містить глікозид асперулозид, аскорбінову кислоту, пігментні речовини, ефирну олію. Ірідоїди: монотропеїн, асперулозид, дафілозид, деза-цетиласперулозид. Сапонини стероїдні. Фенолкарбонові кислоти і їх похідні: хлорогенова. Дубильні сполуки. Флавоноїди: 3-рутинозид кверцетину, 3-рамнозилглюкозид кверцетину (рутин), 3-рутинозид кемпферолу, 7-глюкозид апигенину (космосіїн), палюстрозид, ізорутин, цінарозид, 7-арабінозилглюкозид лютеолина, гіперозид [76-79].

ARCTIUM LAPPA L.— лопух великий.

Корені лопуху великого містять ефірну барданову олію, гіркі та дубильні речовини, лігнани, фенолкарбонові кислоти, глікозид арктіїн, вуглевод інулін (27—45 %), ситостерин і стигмастерин, пальмітинову і стеаринову кислоти, антибіотики, велику кількість аскорбінової кислоти [80].

SOPHORA JAPON1CA L.— софора японська.

Найціннішою складовою частиною софори японської є рутин, який являє собою глюкорамноглікозид кверцетину, його виявлено в пуп'янках, квітках, листках молодих гілках і молодих плодах рослини. В плодах у період їх дозрівання міститься близько 8 флавоноїдів. Крім рутину в них ідентифіковані кемпферол-3-софорозид, кверцетин-3-рутинозид і геністеін-4-софорабіозид. У квітках знайдено алкалоїди і глікозиди. Насіння софори містить жирну олію (близько 10 %).

На основі вибраної за хімічним складом рецептури препарату, що пропонується, нами був проведений аналіз відомої наразі фармакотерапевтичної дії, вибраних рослин [81].

Кореневища і корені лабазнику шестипелюсткового.

Дія: У науковій медицині використовують кореневища з коренями гадючника шестипелюсткового як в'яжучий, потогінний і сечогінний засіб [82].

Фармакологічні властивості і застосування в медицині. У народній медицині всю рослину використовують як сечогінний засіб при нирковокам'яній хворобі. Входить у сбір Здренко — симптоматичний засіб при папільоматозі сечового міхура і анацідних гастритах. В народній медицині відвар—при

хворобах шлунка, сердця, гипертоничной хворобі. В експерименті встановлено протизапальна і протипухлинна дія. Відвари — як діуретичний, ранозагоюванний засіб, при злоякісних пухлинах, геморої, вагінітах, укусах змій і скажених тваринах.

Трава льонку звичайного.

Дія: послаблююча, гіпотензивна, сечогінна.

Фармакологічні властивості і застосування в медицині. При фіброматозі. Виявляє кератолітичну, фунгіцидну і протизапальльну дії. Вивчалась дія алкалоїду пеганіну в експериментах на тваринах. В умовах досліду доведено, що пеганін знижує артеріальний тиск, збільшує наповнення пульсу й уповільнює серцеві скорочення [83, 84].

Експериментами доведено, що флавоноїди льонку звичайного малотоксичні і характеризуються широким спектром терапевтичної дії.

Настій трави застосовують при жовтяниці різного походження, хронічному коліті, геморої, запаленні сечового міхура. У невеликій кількості льонок вживають при головному болю з блювотою (симптомо-комплексі Меньєра) та нічному нетриманні сечі. Завдяки біологічним активаторам, що містяться у льонку звичайному, водний настій та екстракт рослини знімають ниючий біль при нирковокам'яній хворобі, діють як діуретичні чинники при сечокислому діатезі, особливо при фосфатурії.

Трава підмареннику справжнього.

Дія: сечогінна, протизапальна, знеболююча, кровоспинна, заспокійлива.

Фармакологічні властивості і застосування в медицині. Підмаренник справжній досить широко застосовується в народній медицині. Настій його трави разом з квітками вживають при гастриті, діареї, жовтяниці, захворюваннях печінки і нирок, набряках ниркового походження, різних нервових хворобах (епілепсії, істерії, конвульсіях у дітей) та шкірних захворюваннях. У цих же випадках п'ють і свіжий сік підмаренника [78, 85].

Відвар трави підмаренника використовують також для ванн, обмивань, примочок та компресів при псоріазі. При скрофульозі, абсцесах та фурункулах застосовують «мазь з трави» (траву з квітками розтирають з вершковим маслом).

Для швидкого загоєння опіків, виразок і кровоточивих ран їх посипають порошком квіток підмаренника [86].

ARCTIUM LAPPA L.— лопух великий.

Дія: салуретична, дезинфікуюча, потогінна, депуративна.

Фармакологічні властивості і застосування в медицині. У науковій медицині препарати лопуху великого не застосовуються, за винятком реп'яхової олії (проти випадання волосся на голові).

Для лікування поліартриту, захворювань шкіри, лишаїв, виразок, екземи до спеціальних ванн додають відвар суміші коренів лопуху великого та трави кропиви [87].

SOPHORA JAPON1CA L.— софора японська.

Дія: бактерицидна, кровоспинна, протизапальна.

Фармакологічні властивості і застосування в медицині. Препарати плодів софори японської виявляють бактерицидну дію проти золотистого стафілококу і кишкової палички [88, 89].

Настойку застосовують при опіках і відмороженнях I та II ступенів. Загоєння настає через 5—6 днів. При відмороженнях III ступеня, туберкульозі шкіри, вовчаку виразки зарубцьовуються набагато швидше. Препарат діє знеболююче, тому його використовують при травматичних ураженнях, при фурункулах, карбункулах, гайморіті, парапроктиті, маститі, трофічних виразках, псоріазі — у формі зрошень, промивань, змазувань, накладання тампонів (2 рази на день) і стерильних пов'язок на рани.

5—10 % настойку пуп'янків квіток і плодів софори втирають у шкіру голови проти випадання волосся. З неї роблять компреси при ячменях, ванночки при грибкових захворюваннях шкіри, екземі.

Біологічно активні речовини запропонованих лікарських рослин надають різносторонню дію на організм: загальнозміцнюючу, протизапальну, болезаспокійливу, антиспастичну дію, нормалізують обмін речовин, роботу залізистого епітелію і вміст статевих гормонів, поліпшує травлення, стимулює захисну функцію організму [90].

Наявність біологічної активності може стати основою для практичного використання БАР приведених вище лікарських рослин, як лікарський препарат (табл. 5.1).

Таблиця 5.1 – Склад збору ЛРС для створення препарату

Лікарсько рослинна сировина	Вага, г
Коренів лабазнику шестипелюсткового	28,0
Корені лопуху справжнього	23,0
Плоди софори японської	23,0
Трава підмареннику справжнього	14,0
Трава льонку звичайного	12,0

6. ВІДПРАЦЮВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТУ В ЛАБОРАТОРНИХ УМОВАХ

Настойки і екстракти є однією з найстаріших лікарських форм офіциальної медицини.

У наш час ці лікарські форми не втратили актуальності, постійно розвиваються і, як наслідок, в багатьох державах вони мають фармакопейний статус. У Державній фармакопеї України існує стаття “Екстракти", гармонізована з Європейською фармакопеєю, яка об'єднала під своїм початком дві статті «Настойки» і «Екстракти» і яка має національні вимоги [91, 92].

У зв'язку з цим метою нашої роботи з'явилася розробка технологічних параметрів отримання складної настойки із збору ЛРС, призначеної для лікування і профілактики запропонованих хвороб, відповідно до сучасних вимог.

У відповідності з ДФУ - настойки - рідкі лікарські засоби, звичайно виготовлені, використовуючи одну частину рослинної або тваринної сировини і 10 частин екстрагенту або одну частину рослинної або тваринної сировини і п'ять частин екстрагенту. Національні вимоги допускають при виготовленні настойок з одної вагової частини лікарської рослинної сировини одержувати п'ять об'ємних частин готового продукту, із сильнодіючої сировини десять об'ємних частин готового продукту, якщо немає інших зазначень в окремій статті [93, 94].

Таким чином процес отримання препарату, а саме настойки із збору ЛРС, є валідованим.

Відповідно до спрямованості дії передбачуваного препарату, способу і тривалості застосування (краплі), концентрація екстрагенту нами визначена як 40%. Для отримання препарату нами пропонується використати співвідношення сировина-готовий продукт (1:10). Потрібно зазначити, що в зарубіжних фітопрепаратах за формою випуску і спрямованістю дії так само використовується 40% спирт. Додатково необхідно було визначити ступінь витягання діючих речовин 35% і 45% спиртом (як критичні при отриманні екстрагенту) та провести наработку 3 серій препарату у відповідності з ДФУ [91, 95].

У зв'язку з поставленою задачею нами була вивчена ступінь витягання БАР збору в залежності від концентрації спирто водної суміші, часу настоювання і ступеня подрібнення сировини (табл. 6.1).

Таблиця 6.1. Ступінь витягання БАР збору в залежності від концентрації Спирто-водної суміші і часу настоювання

	Екстрагент	**час екстракції, час**	**Екстрактивні речовини**			
			В витяганні, %			***в перерахунку на сировину, %**
			Ступінь подрібнення			
			3 мм	**5 мм**	**7 мм**	
1.	35% спирт	24	1,72	1,69	1,37	16,9
2.		36	1,74	1,71	1,39	17,1
3.		48	1,82	1,78	1,46	17,8
4.		60	1,84	1,82	1,50	18,2
5.	40% спирт	24	1,65	1,62	1,29	16,2
6.		36	1,73	1,68	1,35	16,8
7.		48	1,78	1,75	1,43	17,5
8.		60	1,79	1,76	1,44	17,6
9.	45% спирт	24	1,67	1,63	1,31	16,3
10.		36	1,69	1,66	1,34	16,6
11.		48	1,72	1,69	1,37	16,9
12.		60	1,74	1,71	1,39	17,1

*Ступінь подрібнення сировини - сито 5 мм

Насипна маса: 350-500 г/л

Екстрагент готують у відповідності з ДФУ

Співвідношення сировина-готовий продукт - 1:10

Температура: 20-25^{0}С

Спосіб екстракції: мацерація (по 8 годин), перколяція

Фільтрація самопливом через фільтрувальний папір

Аналізуючи отримані дані можна зробити висновок, що оптимальним часом екстракції є 36-48 годин, ступінь подрібнення сировини 3-5 мм. Зміна концентрації спирту (35-45)% істотного впливу на кількість екстрактивних речовин не надає [96, 97].

Процес виготовлення препарату складається із наступних стадій

ДР 1. Підготовка виробництва

ВР 1.1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.2 Підготовка персоналу

ДР 1.3 Миття і сушка флаконів і кришок.

ДР 2 Підготовка сировини

ДР 2.1 Подрібнення рослинної сировини

На терезах в окремій тарі (п/э мішок) частями відважують згідно з прописом лікарську рослинну сировину.

Відважену лікарську рослинну сировину подрібнюють. Після подрібнення сировину просівають через сито діаметром 5 мм в паперовий мішок. Частки подрібненої сировини більше за 5 мм повертають на повторне подрібнення.

Отримують 1,0 кг подрібненої рослинної сировини

ДР 2.2 Приготування екстрагенту

Екстрагентом для отримання препарату, служить 40% спирт етиловий. Для отримання 40% спирту етилового використовують 96% спирт етиловий ректифікат і воду очищену.

Змішують спирт етиловий 96% в кількості 5,198 л і воду очищену в кількості 7,671 л.

Вмісту спирту повинен бути 40%, що відповідає густині ρ=0,9481г/см^3.

Всього готують 12,0 л экстрагента.

ТП 3 Отримання препарату.

ТП 3.1 Екстрагування

Подрібнену і відважену рослинну сировину (1,0 кг) завантажують у екстрактор, на днищі якого заздалегідь укладена сітка обтягнута фільтруючим матеріалом (бязь).

На сировину подають 4,0 л приготованого екстрагенту - спирту етилового 40%. Залишають для настоювання на 12 годин. По закінченні часу настоювання через нижній злив екстрактора витяг зливають у збірник. Сировину в екстракторі екстрагують ще два рази по 4,0 л. Настоювання проводять по 12 годин. Витяги збирають у збірник для відстоювання.

ТП 3.2 Відстоювання

Отримані об'єднані витяги в збірнику для відстоювання перемішують 15-20 хвилин і залишають при температурі 8^0С на 48 годин.

ТП 3.3 Фільтрування

По закінченні часу відстоювання витяги фільтрують через фільтровальний папір в проміжний збірник.

Отримують 10,0 л не фасованого препарату.

ПМВ 4 Фасування, пакування та маркування

Настойку фасують в чисті і сухі банки по 100 мл.

Відбирається середня проба для проведення аналізу.

ПВ 5 Регенерація екстрагенту

Регенерація екстрагенту проводиться у заводських умовах.

При наробці трьох серій препарата у вибраних умовах на різних серіях рослинної сировини отримані порівнянні результати (табл. 6.2).

Таблиця 6.2 Екстрактивні речовини у витяганні

Речовини, що визначаються	Серія 0121	Серія 0221	Серія 0321
Екстрактивні речовини у витяганні, %	1,75	1,82	1,65

7. ВИЯВЛЕННЯ ОСНОВНИХ ГРУП БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ПРЕПАРАТІ

Отримані зразки були піддані фітохімічному вивченню. Об'єктами такого вивчення з'явилися: екстрактивні речовини, наявність (якісно) іридоїдів підмаренника, алкалоїдів льонку, флавоноїдів підмареннику та софори, дубільних речовин лабазника і гідроксикоричних кислот, амінокислот лопуху та софори, а також кількісний вміст поліфенольних сполук, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот і полісахаридів. Дані групи речовин прямо або непрямо відповідають за біологічну дію передбачуваного препарату.

7.1. Попередній якісний аналіз передбачуваного препарату.

7.1.1. Флавоноїди. Гідроксикоричні кислоти. Ідентифікацію флавоноїдів і гідроксикоричних кислот проводили методом ТШХ одночасно [98]. На хроматограмі як випробуваний розчин наносили спиртовий розчин етилацетатного витягання препарату, у якості розчину порівняння використовували спиртовий розчин рутину, гіперозиду і кислоти хлорогенової, а також спиртові витягання з квіток календули, трави підмареннику, трави льонку. Хроматографували в системі розчинників:

А. К*ислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80). Після висушування при температурі від 100 до 105 ^{0}С, пластинки обприскували розчином 10 г/л *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р,* потім - розчином 50 г/л *макроголу 400 Р* у *метанолі Р і* сушили на повітрі протягом 30 хв.

Хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 366 нм. Ідентифікація флавоноїдів проводили за виявленням оранжевих і/або жовтаво-коричневих зон, після реакції з *аміноетиловим ефіром дифенілборної кислоти*, по відношенню до зон стандартної суміші рутину і гіперозиду.

Гідроксикоричні кислоти виявляли за наявністтю блакитних зон, також після обробки хроматограми *аміноетиловим ефіром дифенілборної кислоти* по відношенню до зони хлорогенової кислоти на хроматограмі розчину порівняння.

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки присутні у досліджуваних зразках і ідентифікувати їх можливо з достатнім ступенем імовірності. Вважаємо що дану методику можна рекомендувати для подальшої розробки і включення в проект методів контролю якості (МКЯ) препарату.

Б. Хлороформ Р – метанол Р (4:1). Після висушування при температурі від 100 до 105 ^{0}С хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм. Ідентифікацію флавоноїдів льонку (ацетилпектолінарин) проводили за виявленням темних зон, по відношенню до зон, отриманих при хроматографуванні спиртового витягання трави льонку і одержанного нами вірогідного зразку ацетилпектолінарину [99].

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки присутні у досліджуваних зразках і ідентифікувати їх можливо з достатнім ступенем імовірності.

7.1.2. Ірідоїди. Ідентифікацію ірідоїдів (підмаренник) проводили методом ТШХ. У зв'язку з тим, що до складу препарату входить трава підмареннику, нами проведені дослідження на наявність ірідоїдів даної рослини в досліджуваному зразку. Для цього досліджували етилацетатне витягання з препарату, яке наносили на хроматограми як випробуваний розчин [100]. У якості розчину порівняння використовували спиртове витягання трави підмареннику. Хроматографували в системі розчинників: *кислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80). Пластинку обприскували розчином *диметиламінобензальдегіду Р1* і сушили при температурі від 100 ˚С до 105 ˚С до проявлення синіх або блакитних зон іридоїдів. Таку ідентифікацію пропонує DAC 1999 для виявлення асперулозиду та його похідних. Зони іридоїдів описують по співвідношенню до зони рутину.

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки присутні у досліджуваних зразках і ідентифікувати їх можливо з достатнім ступенем імовірності. Вважаємо, що дану методику можна рекомендувати для подальшої розробки і включення в проект МКЯ.

7.1.3. Алкалоїди. Ідентифікацію алкалоїдів (льонок) проводили методом ТШХ. У зв'язку з тим, що до складу препарату входить трава льонку, нами проведені дослідження на наявність алкалоїдів даної рослини в досліджуваному зразку. Алкалоїди льонку представлені в основному пеганіном. Ідентифікацію проводили методом ТШХ на пластинках «Сорбфіл» ПТСХ-П-А-УФ розміром 6×10 см. Суму алкалоїдів виділяли за загальноприйнятими методиками. На хроматограму наносили метанольний розчин і хроматографували в системі розчинників: *етилацетат Р – мурашина кислота безводна Р - оцтова кислота льодяна Р – вода Р* (41:3:3:3). Після висушування пластинку обприскували *калію йодовісмутату розчином Р*. Хроматограму переглядали у денному світлі [101, 102].

Хроматографічній профіль випробуваного розчину описували за наявносттю у середній (нижній) частині пластинки інтенсивної зони жовто гарячого кольору. Крім того, при розробці методики паралельно з випробовуваним розчином наносили розчин отриманного нами пеганіну і суму алкалоїдів, виділеної з рослинної сировини. Далі визначали місцезнаходження аналогичної зони (пеганіну) на хроматограмах випробовуваного розчину.

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки присутні у досліджуваних зразках і ідентифікувати їх можливо з достатним ступенем імовірності. Вважаємо, що дану методику можна рекомендувати для подальшої розробки і включення в проект МКЯ.

7.1.4. Поліфенольні сполуки. Ідентифікацію поліфенолів проводили методом ТШХ і якісною краплинною реакцією [103]. У зв'язку з тим, що до складу препарата входить кореневища та корені лабазнику нами проведені дослідження на наявність поліфенолів в досліджуваному зразку. Для цього досліджували етилацетатне витягання з препарата яке наносили:

- на фільтрувальний папір і обробляли фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом Р і калію гідроксиду розчином спиртовим Р1. З'являлося синє забарвлення.

- на хроматограми як випробуваний розчин. У якості розчину порівняння використовували розчин катехіну і спиртові витягання з коренів

лабазнику. Хроматографування можна проводити на пластинах «Сорбфіл ПТСХ-АФ-А-УХ» або «Silica gel 60» F_{254} (*Merck*) розміром 6х15 см, в якості елюючої суміші використовували суміш розчинників *метанол Р – хлороформ Р* (10:40). Для виявлення використовували відому реакцію виявлення для дубильних речовин - розчин ваніліну в сірчаній кислоті. На хроматограмах при цьому мають виявлятися характерні зони блідо-рожевого (червоного) кольору [104].

Слід відмітити, що ідентифікация методом ТШХ в деяких випадках була утруднена (рис. 7.1). Так, наприклад, відокремити сіро-фіолетову зону від рожевої катехіну не вдалося. Тому дану методику не пропонуємо до введення в методики контролю якісті препарату.

7.1.5. Полісахариди, пентозани. У коренях лопуху цукри представлені в основному пентозанами і їх похідними полісахаридами.

Ідентифікацію пентозанів проводили якісною реакцією із флороглюціном у кислому середовищі, а полісахаридний комплекс отримували шляхом виділення його з препарату трикратним об´ємом спирту [105].

7.1.6. Амінокислоти. Наявність похідних амінокислот підтверджується реакцією з нінгідрином, де в процесі відновлення нінгідрину амінокислотою утворюється забарвлена речовина – фіолетовий Руємання. Як показали дослідження даної реакції на спеціально приготованих водно-спиртових розчинах всіх рослин, що входять до складу препарату, високу чутливість виявили витяги з лопуху і софори [106].

Внаслідок проведеної роботи, можна зробити висновок, що названі сполуки присутні у досліджуваних зразках і ідентифікувати їх якісною краплинною реакцією можливо з достатнім ступенем імовірності. Вважаємо, що дану методику можна рекомендувати для подальшої розробки і включення в проект МКЯ.

Рисунок 7.1 – Хроматограми розчину препарату (1) та розчину катехіну (2)

7.2. Попередний кількісний аналіз передбачуваного препарату.

7.2.1. Визначення екстрактивних речовин (сухий залишок). Визначення проводили у відповідності до ДФУ, 2.8.16. 5,0 мл препарату поміщають у зважений бюкс діаметром близько 50 мм і заввишки близько 30 мм, випарюють насухо на водяній бані й сушать у сушильній шафі при температурі від 100 ^{0}C до 105 ^{0}C протягом 3 год. Бюкс охолоджують в ексикаторі над *фосфору (V) оксидом Р* і зважують [107, 108].

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що даний показник досить стабільний в досліджуваних зразках при використанні для екстракції екстрагенту з концентрацією спирту від 35% і до 45%.

7.2.2. Визначення поліфенолів. Визначення проводили у відповідності з ЕФ 5 вид., “Determination of tannins in herbal drugs ”. Методика основується на кольоровій реакції поліфенольних сполук, які входять до складу рослиних препаратів, з фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом і вимірюванні оптичної густини отриманного розчину за довжини хвилі 760 нм. Вміст загальних поліфенолів у дослідних зразках визначали в перерахунку на

пірогалол [76, 109].

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки можливо визначати з достатнім ступенем імовірності. Вважаємо що дану методику можна рекомендувати для подальшої розробки і включення в проект МКЯ (рис. 3.2).

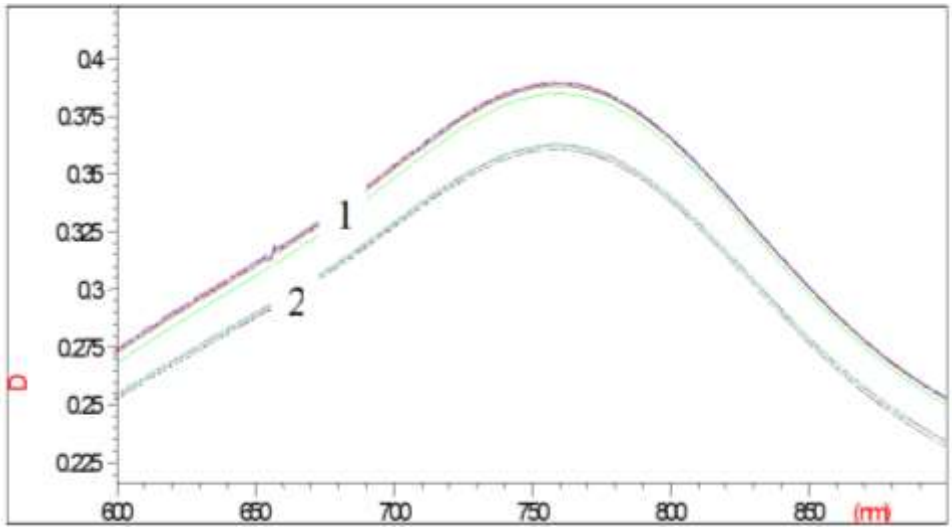


Рисунок 7.2 – Спектри поглинання розчинів препарату (1) і стандарту пірогалолу (2), отримані при визначенні вмісту загальних поліфенолів

7.2.3. Визначення флавонолів. Визначення проводили абсорбційно спектрофотометричним методом (ДФУ, 2.2.25). Вміст флавоноїдів у дослідних зразках проводити за методикою, що заснована на утворенні комплексної сполуки з хлоридом алюмінію у кислому середовищі. До складу препарату входять квітки календули, тому за основу методики кількісного визначення нами взята методика визначення флавоноїдів Європейської фармакопеї “Calendula flower”. Перед проведенням гідролізу аліквоту препарату випарювали до сухого залишку і далі кількісне визначення проводили в умовах методики ЄФ за довжини хвилі 425 нм. Суму флаваноїдів перераховувати на гіперозид [78].

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки не можливо визначати з достатнім ступенем імовірності. Спектр досліджуваного зразка мав максимум при 410 нм (425 нм за методикою). Тому використовувати дану методику для контролю якості препарату вважаємо некоректною і її не можна рекомендувати для розробки і включення в проект МКЯ. Потрібно

зазначити, що дана група речовин досить добре ідентифікується за допомогою методу ТШХ.

7.2.4. Визначення флавонів. Визначення проводили хромато спектрофотометричним методом у відповідності зі статтею: А.А.Кирьянов, Б.А.Кривут, М.Е.Перельсон [110]. Вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину проводили за довжини хвилі 334 нм.

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки не можливо визначати з достатнім ступенем імовірності. Методика достатньо складна, для приготування випробовуваного розчину необхідно використати більше за 70 мл препарату, що в свою чергу ускладнює подальший процес хроматографування зразка, виявлення зон, зняття шара сорбенту і т.п.

Вважаємо, що дану методику не можна рекомендувати для подальшої розробки і включення в проект МКЯ.

7.2.5. Визначення гідроксикорічних кислот. Визначення проводили абсорбційно спектрофотометричним методом (ДФУ, 2.2.25). Вміст кислот у дослідних зразках проводити за методикою, що заснована на утворенні комплексної сполуки з натрію нітритом і натрію молібдатом у лужному середовищі. До складу препарату входять рослини, які містять фенолкарбонові кислоті (зокрема хлорогенову), тому за основу методики кількісного визначення нами взята методика визначення гідроксикорічних кислот Європейської фармакопеї 2005 р “ASH LEAF, Fraxini folium”. Вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину проводили за довжини хвилі 525 нм. Суму кислот перераховували на хлорогенову [111].

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки не можливо визначати з достатнім ступенем імовірності. Спектр розчину досліджуваного зразка мав максимум при 505 нм (525 нм за методикою). Тому використовувати дану методику для контролю якості препарату вважаємо некоректною і її не можна рекомендувати для розробки і включення в проект МКЯ. Потрібно зазначити, що дана група речовин досить добре ідентифікується за допомогою методу ТШХ.

7.2.6. Визначення полісахаридів. Визначення проводили гравіометричним методом. Полісахариди осаджували 96% спиртом Р, потім центрифугували. Надосадову рідину і осад фільтрували крізь скляний фільтр, попередньо висушений при температурі від 100 °С до 105 °С до постійної маси. Фільтр із осадом сушили до постійної маси при температурі від 100 °С до 105 °С [110].

Внаслідок проведеної роботи можна зробити висновок, що названі сполуки можливо визначати з достатнім ступенем імовірності.

Таблиця 7.1 – Фітохимічне вивчення основних діючих речовин в препараті, що розробляється

№№	Речовини, що визначаються	Результати визначення		
		Серія 0121	Серія 0221	Серія 0321
1.	Флавоноїди	++	+++	+++
2.	Ірідоїди	++	+++	+++
3.	Алкалоїди	++	++	++
4.	Амінокислоти	+++	+++	+++
5.	Дубильні речовини	+++	+++	+++
6.	Гідроксикоричні кислоти	+	+	+
7.	Екстрактивні речовини у витяганні, %	1,75	1,82	1,65
8.	Екстрактивні речовини в перерахунку на сировину, %	17,8	17,5	16,9
9.	Поліфеноли у витяганні,%	0,21	0,25	0,17
10.	Поліфеноли в перерахунку на сировину, %	1,9	2,1	2,0
11.	Поліфеноли в перерахунку на екстрактивні речовини, %	**10,67**	**12,0**	**11,83**
12.	Флавоноли у витяганні,%	0,004	0,006	0,0062
13.	Флавоноли в перерахунку на сировину, %	0,04	0,06	0,062
14.	Флавоноли в перерахунку на екстрактивні речовини, %	**2,25**	**3,43**	**3,67**
15.	Гідроксикоричні кислоти у витяганні,%	0,075	0,08	0,08
16.	Гідроксикоричні кислоти в перерахунку на сировину, %	0,75	0,8	0,8
17.	Гідроксикоричні кислоти в перерахунку на екстрактивні речовини, %	**4,21**	**4,57**	**4,73**
18.	Полісахариди у витяганні,%	0,24	0,22	0,20
19.	Полісахариди в перерахунку на сировину, %	2,4	2,2	2,0
20.	Полісахариди в перерахунку на екстрактивні речовини, %	**13,48**	**12,56**	**11,83**

Висновки до розділу 7

- Відпрацьовано технологічні параметри отримання препарату в лабораторних умовах, а саме: екстрагент - 40% спиртово-водна суміш, співвідношення сировина - готовий продукт - 1:10, ступень подрібнення сировини – (3-5) мм.
- Проведено наробку 3 серій препарату.
- Проведено фітохімічне дослідження з виявлення основних груп біологічно активних речовин препарату.

8. РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПРЕПАРАТУ

Всі нароблені серії препарату являли собою прозору рідину від світло коричневого до коричневого кольору з ароматним запахом. Тому, у розділ проекту МКЯ «Опис» пропонуємо ввести наступне: «Прозора рідина від світло коричневого до коричневого кольору з ароматним запахом. Під час зберігання допускається утворення осаду» [96, 113].

8.1. Ідентифікація. На підставі попередних фітохімічніх досліджень у проект МКЯ пропонується ввести наступні тести для контролю якості препарату:

1. Ідентифікація методом ТШХ терпеноїдів, флавоноїдів і гідроксикоричних кислот, ірідоїдів та алкалоїдів;
2. Краплинна якісна реакция на поліфеноли.

В процесі розробки методик ТШХ були дороблено приготування випробовуванного розчину, визначені типи пластинок, що використовуються, системи розчинників, реактивів для обприскування, опис зон, що регламентуються, їх забарвлення та місце розташування.

8.1.1. Ідентифікацію терпеноїдів пропонується провести в наступних умовах [97, 114].

Випробовуваний розчин. Метанольний розчин хлороформного витягання із препарату.

Водний шар пропонується використовувати для визначення флавоноїдів.

Розчин порівняння. Розчин *евгенолу Р* у *хлороформі Р*.

Хроматографічна пластинка. “Сорбфіл” ПТСХ-П-А-УФ розміром 6×10 .

Процедура нанесення. Смуги розміром 10×3 мм, по 10 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння.

Рухома фаза. Толуол Р

Висота пробігу фронту розчинників. Близько 8 см від лінії старту

Метод виявлення. Обприскують *реактивом ваніліну Р,* нагрівають при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 5 хв і переглядають при денному світлі.

Регламентація. На хроматограмі випробовуваного розчину має виявлятися зона сіро-фіолетового кольору вище зони евгенолу на хроматограмі розчину *порівняння* (апіол).

8.1.2. Ідентифікацію флавоноїдів, гідроксикоричних кислот; ірідоїдів пропонується проводити в наступних умовах [104, 115].

Випробовуваний розчин. Метанольний розчин етилацетатного витягання із водного шару.

Розчин порівняння. Розчин *рутину Р, кислоти хлорогенової Р* і *гіперозиду Р* у *метанолі Р*.

Хроматографічна пластинка. "Сорбфіл" ПТСХ-АФ-А-УФ або «Silica gel 60» F_{254} (*Merck*) розміром 6×10 .

Процедура нанесення. Смуги розміром 10×3 мм, по 10 мкл випробуваного розчину і розчину порівняння.

Рухома фаза. К*ислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80)

Висота пробігу фронту розчинників. Близько 8 см від лінії старту.

Метод виявлення. Флавоноїди. Обприскують розчином *аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р* у *метанолі Р.* Потім пластинку обприскують розчином *макроголу 400 Р* у *метанолі Р,* і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Ірідоїди. Обприскують розчином *диметиламінобензальдегіду Р1* і сушать при температурі від 100 ˚С до 105 ˚С до проявлення синіх або блакитних зон.

Регламентація. Флавоноїди. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: зона оранжевої флуоресценції (1), слабко розділена від темної зони (2), відповідна зоні рутину на хроматограмі розчину порівняння, блакитна флуоресціюча зона (3), що відповідає зоні кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння; вище неї – оранжева флуоресціюча зона (4) дещо вище зони гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння, та дві блакитні флуоресціючі зони (5, 6) у верхній третині хроматограми.

Ірідоїди. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися: зелено блакитна зона (1) на рівні світло-коричневої зони рутину на хроматограмі

розчину порівняння, слабка блакитна зона (2) на рівні або декілька нище світло-коричневої зони гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння (іридоїди підмареннику).

8.1.3. Ідентифікацію алкалоїдів пропонується проводити в наступних умовах [83].

Випробовуваний розчин. Метанольний розчин хлороформного витягання алколоїдів.

Розчин порівняння. *Розчин метилового оранжевого Р* у *метанолі.*

Хроматографічна пластинка. "Сорбфіл" ПТСХ-П-А-УФ розміром 6×10 .

Процедура нанесення. Смуги розміром 10×3 мм, 10 мкл випробовуваного розчину.

Рухома фаза. К*ислота мурашина безводна Р – вода Р – етилацетат Р* (10:10:80)

Висота пробігу фронту розчинників. Близько 8 см від лінії старту.

Метод виявлення. обприскують *калію йодовісмутату розчином Р*.

Регламентація. На хроматограмі розчину порівняння у середний частині пластінки виявляється рожева зона метилового оранжевого (1). Зону відмічають.

Потім пластинку обприскують *калію йодовісмутату розчином Р*.

На хроматограмі випробовуваного розчину у середней частини пластинки має виявлятися зона оранжевого кольору (2) на рівні або декілька вище зони метилового оранжевого на хроматограмі розчину порівняння.

Наступний тест - якісна краплинна реакція на поліфенольні сполуки з фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом з подальшою обробкою плями калію гідроксиду розчином спиртовим. Як показали дослідження даної реакції на спеціально приготованих водно-спиртових розчинах всіх рослин, що входять до складу препарату, високу чутливість виявили витяги з лабазнику, підмареннику.

8.2. Розділи **"Сухий залишок"** та **"Важкі метали"** викладені відповідно до вимог ДФУ. Сухий залишок у препараті має бути не менше 1,5 %, вміст важких металів – не більше 0,001 %.

8.3. Спирт етиловий. Визначення вмісту спирту етилового проводять методом перегонки із подальшим визначенням густини відгону. За алкоголіметричними таблицями знаходять вміст спирту у відсотках за об'ємом. Процедура проведення аналізу викладена у МКЯ. Вміст спирту етилового у препараті має бути не менше 33,0 %.

8.4. Об'єм вмісту пакування. Випробування проводять з 10 банок за допомогою мірного циліндру місткістю 100 мл.

Об'єм вмісту пакування має бути від 97 мл до 103 мл.

8.5. Мікробіологічна чистота. Методика випробування відповідає вимогам ДФУ 1.1. (2.6.12, 2.6.13.) [91].

Перевірку придатності методики проведено відповідно до вимог ДФУ (2.6.12, 2.6.13).

Перевірку придатності методики випробування на окремі види мікроорганізмів проводили двома методами.

Метод 1.

Зразки препарату для випробування готували, як зазначено в методиці. Як розчинник використовували суміш тест-мікроорганізмів, що містила від 10 до 100 КУО/мл кожного з тест-мікроорганізмів відповідно до вимог ДФУ (2.6.13., N) в фосфатному буферному розчині з натрію хлоридом і пептоном pH 7.0 і 30 г/л полісорбату-80. Приготовлений зразок висівали на відповідне рідке живильне середовище, як зазначено в методиці. При проведенні випробування використовували маштабування – об'єм випробовуваного зразка, розчинника та живильного середовища зменшували в 10 разів. Такий метод перевірки придатності методики дозволяє урахувати вплив процедури пробопідготовки на життєздатність мікроорганізмів в умовах випробування.

В контрольному досліді в рідкі живильні середовища вносили робочу суміш тест-мікроорганізмів. Об'єм робочої суміші дорівнював об'єму випробовуваного зразка, об'єм живильного середовища був тим же самим, що і в основному досліді.

Метод 2.

Зразки препарату для випробування готували, як зазначено в методиці, використовуючи стерильний фосфатний буферний розчин з натрію хлоридом і пептоном pH 7.0, що містив 30 г/л полісорбату-80. Приготовлений зразок висівали на відповідне рідке живильне середовище, як зазначено в методиці. В кожне рідке живильне середовище вносили по 0,4 мл суміші тест-мікроорганізмів, відповідно до вимог ДФУ 1.1. (2.6.13.), що містила від 100 до 1000 КУО кожного з тест-мікроорганізмів в 4 мл. Такий метод перевірки придатності методики не дозволяє урахувати вплив процедури пробопідготовки на життєздатність мікроорганізмів в умовах випробування, але повністю відповідає вимогам ДФУ (2.6.13).

В контрольному досліді в той же об'єм кожного рідкого живильного середовища, що не містило випробовуваного зразка, вносили по 0,4 мл суміші тест-мікроорганізмів.

Подальші процедури проводили незалежно від використаного метода перевірки придатності методики.

Проводили інкубацію посівів на рідких живильних середовищах відповідно до вимог ДФУ (2.6.13). По закінченні періоду інкубації проводили ідентифікацію тест-мікроорганізмів, що виросли на рідких живильних середовищах в присутності і відсутності випробовуваного зразка. Якщо для тест-мікроорганізму були отримані позитивні результати ідентифікаційних тестів робили висновок про наявність росту тест-мікроорганізму на рідких живильних середовищах.

Нормування мікробіологічної чистоти препарату встановлено відповідно до національної частини розділу 5.1.4 ДФУ, як для готових лікарських засобів категорії 3 А.

В препараті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і 10^2 грибів в 1 мл.

Не допускається наявність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1 мл.

Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* в 1 мл.

Не допускається наявність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл.

8.6. Кількісне визначення. На підставі попередних фітохімічних досліджень у проект МКЯ пропонується для контролю якості препарату ввести кількісне визначення загальних поліфенолів у відповідності з ЕФ 5 вид., “Determination of tannins in herbal drugs” [104].

До складу препарату як один з основних компонентів входять корені лабазнику, кількість загальних поліфенолів у якому складає біля 6,0%. У складі препарату зміст цієї сировини на 100 г складає 2,8 г, тобто біля 0,17 г загальних поліфенолів. Крім того, і інші рослини містять цей клас сполук, флавоноїди і фенолкарбонові кислоти в тому числі. Із даних попередніх досліджень з'ясовано, що названі сполуки не можливо визначати з достатнім ступенем імовірності. В той же час, вони з достатнім ступенем надійності визначаються методом ТШХ. Тому стандартизацію препарату пропонується проводити за методикою визначення вмісту суми загальних поліфенолів як найбільш надійної і відтворюваної. Методика визначення суми поліфенольних сполук в перерахунку на пірогалол в препараті аналогічна методиці, розробленій для контролю якості сировини коренів лабазнику.

В першу чергу при розробці методики була перевірена відповідність спектрів поглинання випробовуваного розчину препарату, одержаного в умовах методики і спектру поглинання розчину СЗ пірогалолу. Для цього отримували водний розчин препарату необхідної концентрації і далі одержували випробовуваний розчин відповідно до методики. Отриманий спектр поглинання мав максимум поглинання при 760±3 нм, що співпадало із максимумом поглинання спектру СЗ пірогалолу.

Таким чином, отримані дані дозволили зробити висновок про можливість визначення вмісту суми поліфенольних сполук препарату в перерахунку на пірогалол.

Оскільки в основі розробленної методики лежить валідована ЄФ методика визначення вмісту загальних поліфенолів, нами переверялися лише деякі із валідаційних характеристик, а саме лінійність, діапазон застосування і збіжність результатів.

Для перевірки лінійності методики був проведений наступний експеримент: 1, 2, 3 і 4 мл препарату розводилися водою до отримання розчинів препарату різної концентрації, а саме 1%, 2,0%, 3% і 4% (при використованій за методикою - 2,0%), тобто в інтервалі від -50 до +200% від номінальної концентрації, і в даних розчинах за методикою проведено визначення вмісту суми загальних поліфенолів в перерахунку на пірогалол.

Одержана залежність оптичної густини (У) від концентрації препарату (Х) виражається рівнянням: Y=A +B·X, де А= 0,00805, В=0,222126, коефіцієнт кореляції R=0,99985 (рис. 4.1).

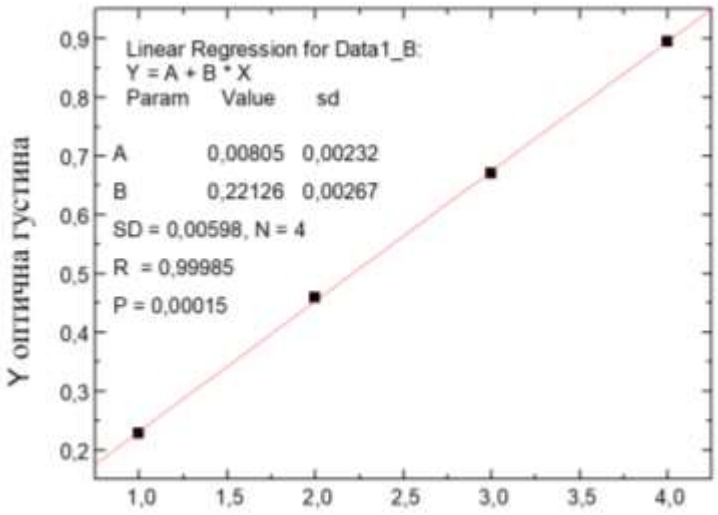


Рисунок 8.1 – Графік залежності оптичної густини розчинів препарату від концентрації розчинів

На підставі одержаних даних було встановлено, що в межах вимірюваних концентрацій (0,1 г – 0,4 г суми загальних поліфенолів в 100 мл препарату) залежність оптичної густини від концентрації носить лінійний характер, тобто дана методика лінійна в діапазоні - 50% до + 200% від номінального вмісту сполук, що визначаються.

Крім того, знайдене значення коефіцієнта А (0,00805) свідчило про статистично незначущий внесок решти компонентів препарату в кількісне загальних поліфенолів препарату, що свідчить про достатню специфічність даної методики.

Перевірена збіжність результатів визначення вмісту суми загальних поліфенолів в препараті однієї серії паралельно із 5 аліквот препарату.

Метрологічні характеристики визначення кількісного вмісту наведені в таблиці 8.1.

Вміст суми загальних поліфенолів в перерахунку на пірогалол в препараті запропановано регламентувати з урахуванням експериментально отриманих результатів - не менше 0,15 %. Регламентація дана відповідно експериментальним даним, які одержані при аналізі 3 серій препарату ($X_{(с.0121)}$=0,21, $X_{(с.0221)}$=0,25, $X_{(с.0321)}$=0,17).

Таблиця 8.1 – Метрологічні характеристики методики кількісного визначення суми загальних поліфенолів в перерахунку на пірогалол

$X_{i,\%}$	f	$\bar{X}_{ср}$	S^2	S	P,%	t(P,f)	Δx	ΔX,%	ε, %
0,210 0,208 0,215 0,195 0,222	4	0,210	$9,95x10^{-5}$	$9,975x10^{-3}$	95	2,776	$2,769x10^{-2}$	$1,238x10^{-2}$	5,89

Фотографії флаконів дослідної серії препарату наведено на рис. 8.2.

Рисунок 8.2 – Дослідна серія препарату

9. АНТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ КОМПЛЕКСНОГО ФЛАВОНОЇДНОГО ПРЕПАРАТУ

9.1. Визначення ефективної (EC_{50}) та цитотоксичної (CC_{50}) концентрації, індексу селективності (IS) *in vitro*

Система дослідження антивірусної дії комплексного флавоноїдного препарату Лалосопіл *in vitro* складалась з двох етапів – первинного визначення цитотоксичності у культурі клітин, тобто здатності препарату пригнічувати репродукцію вірусу через незворотній вплив на морфологію та метаболізм клітин вірусу, а також кількісної оцінки дії препарату Лалосопіл на репродукцію вірусу через визначення ефективної концентрації.

Для вивчення EC_{50}, CC_{50} та IS використано найбільш чутливі до обраних вірусів ВПГ-2, ВБВД, ВТГС, A/FM/1/47/H_1N_1 та універсальні культури клітин – СНЕВ, ВНК, МДВК, MDCK. Вираженість антивірусної дії препарату Лалосопіл оцінювали за допомогою показників EC_{50} та CC_{50}, а також їх співвідношення через обрахунок IS.

Аналіз наведених результатів досліджень цитотоксичної дії досліджуваних речовин показує, що цитотоксичність препарату Лалосопіл в культурі клітин СНЕВ, чутливих до ВТГС відповідає розведенню 1:20, в культурі клітин ВНК CC_{50} відповідає розведенню 1:80, в культурі клітин МДВК та MDCK у розчині препарату Лалосопіл спостерігається CC_{50} 1:40, що представлено на рис. 9.1 – 9.4.

Рисунок 9.1 – Результати визначення CC_{50} в культурі клітин СПЕВ

Рисунок 9.2 – Результати визначення CC_{50} в культурі клітин ВНК

Рисунок 9.3 – Результати визначення CC_{50} в культурі клітин МДВК

Рисунок 9.4 – Результати визначення CC_{50} в культурі клітин МДСК

9.2. Вивчення антивірусної активності препарату Лалосопіл на моделі вірусу простого герпесу II типу, вірусу бичачої діареї та вірусу трансмісивного гастроентериту свиней *in vitro*

Цитопатогенна дія ВПГ на клітини морфологічно проявляється в утворенні симпластів або округлених клітин в комплексі з проліферацією и появою велетенських багатоядерних клітин.

Через 3 доби збирали культуральне середовище з лунок плашок і в ньому визначали інфекційний титр в кожній пробі при введенні препаратів різних концентрацій.

Визначення антигерпетичної активності (EC_{50}) препарату Лалосопіл в культурі клітин ВНК (перещеплювана культура клітин нирки хом'яка) представлені на рисунку 9.5.

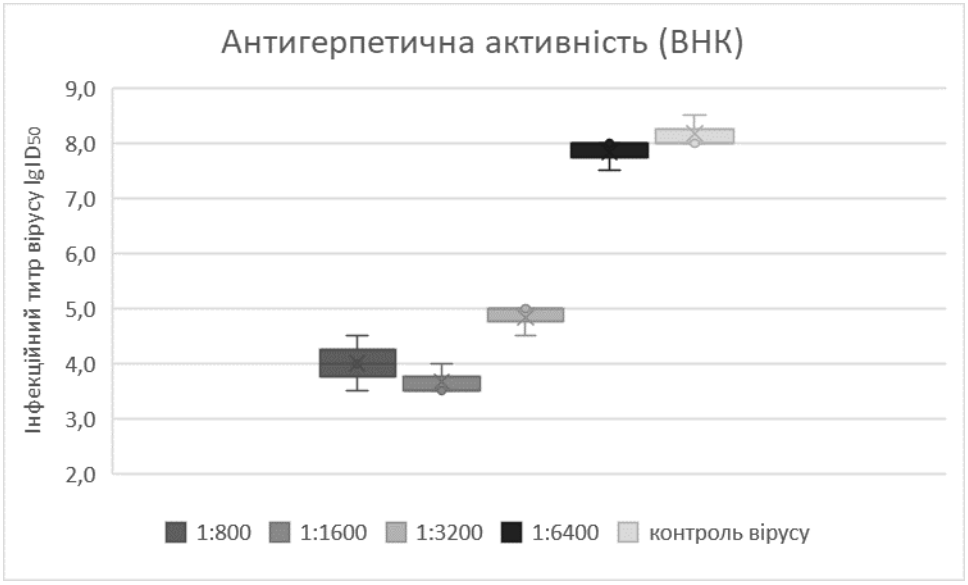


Рисунок 9.5 – Антигерпетична активність препарату Лалосопіл в культурі клітин ВНК

В результаті проведених досліджень було показано, що розчин препарату Лалосопіл інгібує репродукцію вірусу герпесу до розведення1:6400.

Визначення антивірусної активності препарату Лалосопіл в культурі клітин МДВК на моделі сурогатного вірусу гепатиту С – вірусу бичачої вірусної діареї (ВБВД) представлені на рисунку 9.6.

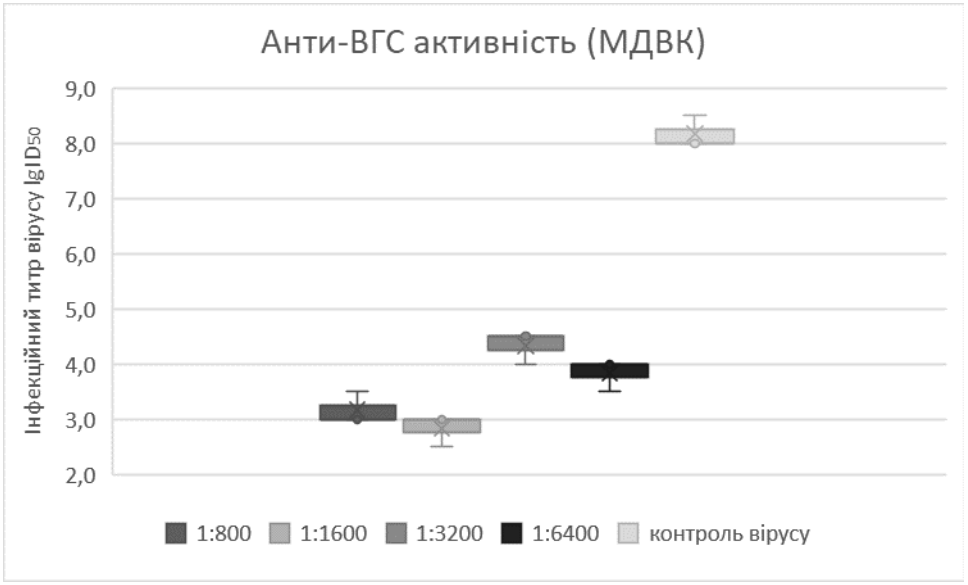


Рисунок 9.6 – Антивірусна активність розчинів препарату Лалосопіл в культурі клітин МДВК на моделі ВБВД

Згідно одержаним результатам розчин препарату Лалослпіл є активним антивірусним препаратом в розведенні 1:6400.

Результати визначення антикоронавірусної активності препарату (EC_{50}) в культурі клітин СНЕВ (перещеплювана культура клітин нирки ембріона свині) представлено на рисунку 9.7.

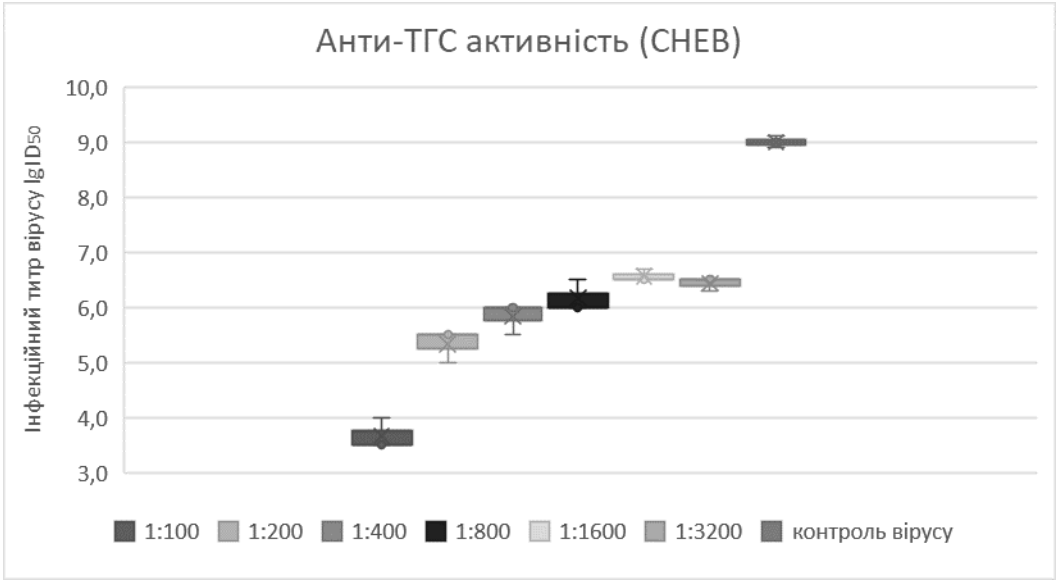


Рисунок 9.7 – Інфекційний титр вірусу ТГС в лунках оброблених різними розведеннями препарату Лалосопіл і вірусом ТГС 100 ID_{50}

Відповідно до отриманих результатів було встановлено, що досліджуваний препарат статистично достовірно інгібують репродукцію коронавірусу ТГС.

Визначення антивірусної активності препарату Лалосопіл в культурі клітин МДСК на вірус грипу A/FM/1/47/H_1N_1 представлені на рисунку 9.8.

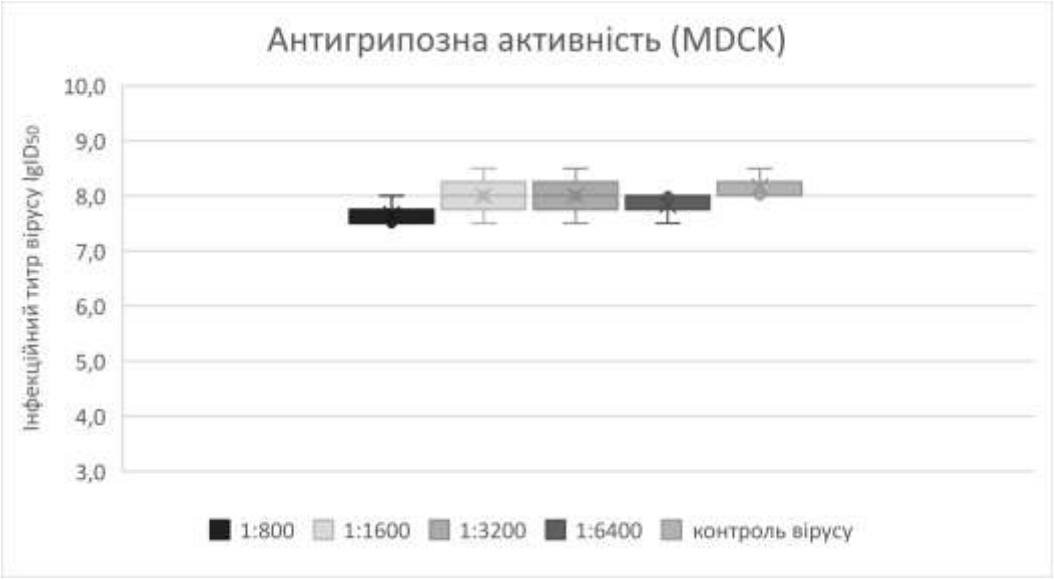


Рисунок 9.8 – Інфекційний титр вірусу ТГС в лунках оброблених різними розведеннями препарату Лалосопіл і вірусом ТГС 100 ID_{50}

Дослідження, проведені по визначенню впливу препарату Лалосопіл на репродукцію вірусу грипу показали, що досліджуваний препарат не інгібує репродукцію вірусу грипу A/FM/1/47/H_1N_1.

Критерієм оцінки інгібуючої активності антивірусних препаратів в системах *in vitro* є індекс селективності препаратів і зниження інфекційного титру на 1,5-2,0 lgТЦД$_{50}$. В таблиці представлені підсумовані результати досліджень по визначенню CC_{50}, EC_{50}, IS при введенні препарату Лалосопіл.

Визначення IS розчину препарату Лалосопіл для вирусів герпесу, сурогатного вірусу гепатиту С (ВБВД) та коронавірусу ТГС представлені в таблиці 9.1.

Таблиця 9.1 – Індекс селективності препарату Лалосопіл для вірусів герпесу, ВБДВ та коронавірусу ТГС

Вірусна модель	CC_{50}	EC_{50}	IS
Герпес	1:80	1:6400	80
ВБВД	1:40	1:6400	160
ТГС	1:20	1:3200	160
A/FM/1/47/H_1N_1	1:40	-	-

Представлені в таблиці 9.1 результати досліджень по антивірусній активності розчину препарату Лалосопіл на експериментальних моделях вірусів герпесу, сурогатного вірусу гепатиту С та коронавірусу ТГС свідчать про те, що розчин препарату Лалосопіл ефективно інгібує репродукцію вірусів герпесу, ВБВД та ТГС.

9.3. Вивчення антигерпетичної активності препарату Лалосопіл для лікування генітальної форми герпесвірусної інфекції *in vivo*

Експериментальна модель захворювань, спричинених представниками герпесвірусів, зокрема ВПГ-2, відтворена шляхом моделювання генітального ураження при місцевому введенні ВПГ-2 типу самцям морських свинок. Дана модель подібна до генітального герпесу у людини, оскільки шлях введення вірусу при інфікуванні тварин максимально подібний до природного інфікування людини ВПГ-2, а також захворювання у експериментальних тварин перебігає з

ураженням ЦНС і латентним збереженням вірусу в організмі. Серед іншого відтворюється можливість виникнення багаторазових рецидивів захворювання [116].

При дослідженні ефективності препаратів Лалосопіл та референс-препарату Віролекс на моделі генітального герпесу у морських свинок були одержані такі результати (таблиця 9.2).

Таблиця 9.2 – Ефективність препаратів на моделі генітального герпесу у морських свинок

Вплив	**Тривалість захворювання, кількість діб**	**Специфічна інтенсивність вираженності захворювання, бали**	**Індекс лікувальної дії, %**
Вірус герпесу	15,0±3,2	51,0	
Розчин Лалосопілу (1:100) *per os*	9,0±2,3	28,0	45,88
Комбінована схема (Лалосопіл *per os* +аплікація розчину)	5,0±1,5	23,0	54,49
Віролекс, аплікації	9,75±2,86	22,0	56,0

Було показано, що використання розчину препарату Лалосопіл *per os* 1 раз на добу протягом 5 днів знижувала вираженість симптоматики до 30,0 балів, що відповідає індексу лікувальної дії (терапевтичний ефект) на рівні 41,17 % і достовірно скорочувало тривалість захворювання, а також затримувало початок виявлення симптомів на 3 доби.

Рисунок 9.9 – Вираженість симптомів генітального герпесу: набряк (a), гіперемія (b), висипання (c)

При використанні комбінованої схеми лікування препаратом Лалосопіл *per os* та аплікації на інфіковану рану термін захворювання становив 5 діб, індекс лікувальної дії 54,49 % та затримка виявлення симптоматики на 3 доби.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було показано, що комбінована схема введення препарату Лалосопіл *per os* та аплікації на інфіковану рану є ефективним лікувальним препаратом на експериментальній моделі генітального герпесу.

9.4. Вивчення механізмів антивірусної дії препарату Лалосопіл

Відомо, що 3D структурирізних ДНК і РНК-полімерази мають високу ступінь подібності, містять одні й ті ж структурні домени і консервативні мотиви, необхідні для елонгації ланцюга нуклеїнової кислоти [117, 118]. Тому для селекції інгібіторів синтезу РНК, а також виявлення ефективних антимікробних або антивірусних агентів – інгібіторів транскрипції з успіхом використовували просту в застосуванні і продуктивну модельну систему транскрипції РНКП Т7 [119-122].

Інгібування синтезу ДНК досліджували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)-генна технологія розроблена для *in vitro* ампліфікації специфічних ДНК послідовностей. Базисні вимоги для проведення ПЛР включають присутність ДНК матриці, двох олігонуклеотидних праймерів до обраного регіону нуклеїнової кислоти, набору нуклеозидтрифосфатів і ДНК-полімеразу, таку як, наприклад Taq полімерази.

Існує чимало антибіотиків і синтетичних сполук, які різними механізмами можуть зупиняти або порушувати ампліфікацію ДНК фрагментів, власне ПЛР. У цьому контексті, здається логічним застосування ПЛР як модельну систему для скринінгу синтетичних сполук, механізм дії яких стосується інгібування синтезу ДНК. На додаток, висока продуктивність цього методу не потребує, також як і попередня, в радіоактивному і будь-якому іншому мічення для візуалізації продуктів ампліфікації ДНК .

Для препарату Лалосопіл були визначені властивості інгібування синтезу РНК в системі РНКПТ7 та синтезу ДНК за допомогою ПЛР. Результати досліджень представлені на рисунках 9.10, 9.11.

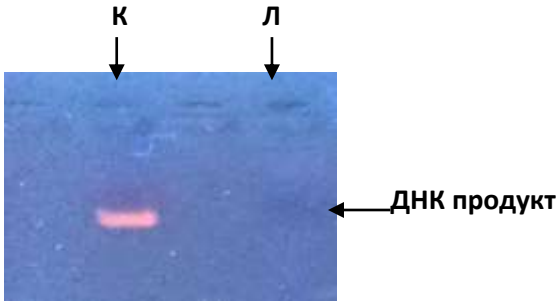


Рисунок 9.10 – Інгібування синтезу ДНК (реплікація – ПЛР) *in vitro* препаратом Лалосопіл. Де **К** – контроль реакції, **Л** – препарат Лалосопіл.

Повне інгібування визначається відсутністю ДНК-продукту в агарозному гелі (відсутність червоної смужки вказує на інгібування зразком реакції ПЛР).

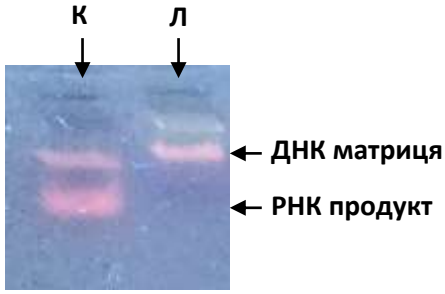


Рисунок 9.11 – Інгібування синтезу РНК (транскрипція РНКП Т7) *in vitro*. Де **К** – контроль реакції, **Л** – препарат Лалосопіл.

Повне інгібування визначається відсутністю РНК-продукту в агарозному гелі (відсутність червоної смужки вказує на інгібування зразком реакції транскрипції).

Як видно із результатів дослідження, препарат Лалосопіл блокує як синтез РНК, так і синтез ДНК *in vitro*, що є дуже характерним для флавоноїдвмісних рослинних екстрактів.

9.5. Вивчення індукції інтерферону препаратом Лалосопіл

Результати дослідження інтерфероногенної активності препарату Лалосопіл в сироватках мишей наведені в таблиці 9.3.

Таблиця 9.3 – Інтерфероногенна активність препарату Лалосопіл

Термін визначення в годинах	**Титри ІФНу, індукованого препаратом Лалосопіл, од.акт/мл**		**Титри ІФНу, індукованого Poly(I)·Poly(C), од.акт/мл**	
	ph+	**ph-**	**ph+**	**ph-**
24	1:640	1:640	1:2048	1:2048
48	1:1280	1:1280	1:1024	1:1024

Де ph+ – зі зміною pH, ph- – без зміни pH.

Динаміка індукції інтерферону розчином препарату Лалосопіл в організмі мишей полягала в тому, що максимальна активність інтерферону реєструвалася для концентрації розчину 1:100 через 48 годин. Згідно з маркером кислотостійкості індукований препаратом Лалосопіл ІФН відноситься до αІФН.

Висновки до розділу 9

Проведені дослідження антивірусної активності розчину препарату Лалосопіл, який є екстрактом багатьох трав та коренів рослин, активною структурою якого є різноманітні групи біологічно активних речовин, переважаючими є флавоноїди, на експериментальних моделях вірусів герпесу, сурогатного вірусу гепатиту С (ВБВД) та коронавірусу ТГС *in vitro* виявили високу антивірусну активність до всіх досліджуваних вірусів.

Було показано, що розчин препарату Лалосопіл є активним інгібітором репродукції вірусів герпесу, сурогатного вірусу гепатиту С (ВБВД) та коронавірусу ТГС з індексом селективності 80, 160, 160, відповідно.

В результаті проведених експериментальних досліджень було показано ефективність лікувального засобу Лалосопіл при профілактичній та лікувальній схемі дослідження при генітальному герпесі. Було показано, що розчин препарату Лалосопіл в розведенні 1:100 при комбінованій схемі введення (*per os* + аплікація препарату) затримує початок розвитку перших симптомів та скорочує час розвитку хвороби. Індекс лікувальної дії препарату Лалосопіл знаходиться на рівні референтного антигерпетичного препарату Віролекс. Механізм антигерпетичної дії препарату Лалосопіл здійснюється за рахунок індукції αІФНу, інгібіції синтезу РНК та ДНК.

10. РОЗРОБКА ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТУ ОТРИМАННЯ БАЦИЛЯРНИХ БІОПОЛІМЕРІВ З КУЛЬТУРАЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА РІЗНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Лабораторний технологічний регламент складено згідно вимог галузевого стандарту ГСТУ 42-00-02 „Технологічний регламент виробництва медичних імунобіологічних препаратів: зміст, порядок розробки, узгодження, затвердження і внесення змін”.

Під час розробки технологічного регламенту було враховано рекомендації Всесвітньої організації охорони здоров’я (ВООЗ) та вимоги Законів України «Про пожежну безпеку», «Про лікарські засоби» та Державної Фармакопеї України (збірник державних стандартів щодо якості лікарських засобів).

Технологічний регламент на виробництво бацилярних біополімерів складається з наступних розділів:

- Характеристика продукту виробництва;
- Специфікація діючих і допоміжних речовин, матеріалів;
- Апаратурно-технологічна схема виробництва, специфікація обладнання, контрольно-вимірювальних приладів та систем автоматизації (КВПіСА);
- Технологічна схема виробництва;
- Викладення технологічного процесу;
- Контроль виробництва;
- Санітарне та епідеміологічне благополуччя, охорона праці, пожежна безпека;
- Охорона навколишнього природного середовища;
- Виробничі інструкції / стандарти підприємства;

Технологія виробництва бацилярних біополімерів розроблена з використанням найновіших підходів науки та діагностичної практики.

Згідно ГСТУ42-00-02 „Технологічний регламент виробництва медичних імунобіологічних препаратів: зміст, порядок розробки, узгодження, затвердження і внесення змін”:

Етапи виробництва бацилярних біополімерів:

1) Приготування робочих розчинів та живільного середовища
2) Стерилізація живильного середовища (0,5 атм 20 хв)
3) Культивування бактерій
4) Контроль росту бактерій
5) Пересів бактерій. Інкубація (24 год, 37 °С, 400 rpm)
6) Осадження клітин (8000 об/хв. 10 хв)
7) Розведення надосадкової рідини в 95 ° спирті
8) Інкубація (16-18 год, 4 °С)
9) Центрифугування (8000 об/хв., 15 хв.)
10) Відалення надосадкової рідини, збір осаду
11) Ресуспендування осаду в фосфатному буфері і осадження 60° етанолом (3 рази)
12) Прогрів розчину при 100 °С
13) Збір і відалення осаду
14) гельфільтрація надосадкової рідини
15) Визначення концентрації білку за біуретовим мітодом
16) Діаліз протифосфатного буферу
17) Контроль чистоти препарату методом електрофорезу в ПААГ
18) Концентрування елюату ПЄГ 6000
19) Визначення концентрації очищеного білку
20) Визначення імуноферментним методом антигенних властивостей бацилярних біополімерів
21) Імунізація кролів для отримання антитіл проти ББ

Використовуючи розроблений технологічний регламент було виготовлено дослідні зразки бацилярних біополімерів.

Опис. Бацилярний біополімер – вуглеводвмисний біополімер, сполука, що виділена з культуральної рідини декількох бактерій і їх токсинів, має властивість

інгібувати нейрамінідазну активність вірусів грипу та параміксовірусів, а також взаємодіяти з деякими антитілами проти людських і вірусних антигенів.

Характристики бацилярного біополімеру, виділеного із *Staphylococcus aureus*. Амінокислотний склад бацилярного біополімеру представлений у таблиці 10.1.

Таблиця 10.1 – Амінокислотний склад бацилярного біополімеру

Лізін	0.51
Гістидин	залишки
Аргінін	не виявляється
Аспарагінова кислота	0.81
Треонін	1.31
Серин	0.9
Глютамінова кислота	1.26
Пролін	0.16
Гліцин	0.8
Аланін	1.12
Цистеїн	не виявляється
Валін	0.42
Метіонін	нет
Лейцин	0.27
Ізолейцин	0.48
Тирозін	залишки
Фенілаланін	0.95

Співвідношення білку з вуглеводами становить 1:10. Крім того препарат містить жирні кислоти від 11 до 20 вуглеводних атомів.

Моноцукровий склад бацилярного біополімеру: основним нейтральним моноцукром є маноза, глюкоза міститься в незначної кількості, співвідношення 24:1; два аміноцукра – глюкозоамін і галактозоамін.

Зовнішній вигляд. Бацилярні біополімери – світло-жовті або білі опалесцюючі рідини.

Автентичність.

Бацилярні біополімери повинні взаємодіяти зі специфічними кролячими антитілами утворюючи комплекс антиген-антитіло.

Визначають методами імуноферментного аналізу (ІФА) та імуноблоту (ІБ).

Механічні включення. Бацилярні біополімери не повинні мати осаду та сторонніх включень.

Специфічність.

Бацилярні біополімери при тестуванні в ІФА повинні визначатись як позитивні.

Виготовлені дослідні зразки серія обов’язково повинні зберігатись у холодильнику або морозильній камері при температурі мінус 20°С або нижче.

На виконання вимог щодо зберігання бацилярних біополімерів (в холодильнику або морозильній камері при температурі не вище мінус 20°С) виготовлен зразки знаходяться на відповідальному зберіганні у виробника.

11. ОТРИМАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАЦИЛЯРНИХ БІОПОЛІМЕРІВ З ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ БАКТЕРІЙ ТА КУЛЬТУР КЛІТИН

11.1. Отримання бацилярного біополімеру з культури мікроорганізмів *Staphylococcusaureus 209* (клінічні штами)

Для вирощування *Staphylococcus aureus* використовували середовище наступного складу:

Пептон ферментативний	- 1,0г
Лактоза	- 1,0г
Дріжджовий екстракт	- 0,3г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-500-600мг
Фосфатний буфер 0,15М	-1л
pH середовища	7,0±0,2

Стерилізація середовища 20 хвилин при 0,5 атм.

Культуру *Staphylococcusaureus*, що зберігається на напіврідкому середовищі, пересівали у пробірку, що вміщує 5-10мл середовища вищевказаного складу, та вирощували протягом 20±2 годин в термостаті при температурі $+37^0$С. Потім пересівали в колби з 100 мл середовища, і знов вирощували протягом 20±2 годин в термостаті при температурі $+37^0$С. Третій пересів культури проводили в колби, що містили 3л середовища, та вирощували протягом 20±2 годин в термостаті при температурі $+37^0$С. При вирощуванні час від часу проводили обертання і струшування колб з посівами з дотриманням всіх необхідних заходів обережності.

Потім отриману біомасу стафілококів центрифугували при 6 тис. об/хв. протягом 20 хвилин до отримання осаду. Отриманий надосад змішували з 96^0етанолом у співвідношенні 1:1,5 та витримували при температурі 4^0С протягом 16-24годин. Осад, що випав, збирали за допомогою центрифугування при 6-8 тис. об/хв. протягом 15 хвилин. Зібраний осад відмивали фосфатним буфером та знов осаджували 60^0 етанолом. Ці дії повторювали тричі. Потім

розчин прогрівали при 100^0С протягом 10 хвилин, що призводило до випадіння осаду, який видаляли центрифугуванням при 6-8 тис. об/хв. протягом 15 хвилин.

Надосадову рідину відправляли на гель-фільтрацію на сефадексе G-200.

11.2. Отримання бацилярного біополімеру з культури мікроорганізмів *Bacillus subtilis* УКМ В-5007

І. Вирощування культури мікроорганізмів

Відновлення культури *Bacillus subtilis* з ліофілізованого стану.

З дієтичної добавки «біоспорин» виробництва ТОВ «ФЗ «Біофарма», Україна, 09100, Київська область, м. Біла Церква, вул. Київська, 37 отримано культуру *Bacillussubtilis*УКМ В-5007. В 1мл добавки міститься не менш ніж 1,1·109 живих мікробних клітин цього штаму.

В ході роботи було здійснено підбір середовищ з найменшим вмістом вуглеводів для культивування *Bacillus subtilis*. Висів з ампули, що містить 1мл ліофілізованого препарату, попередньо розведеного стерильним 0,9% розчином фізіологічного розчину, проводили на поживний бульйон в кількості 5мл.

ІІ. Отримання біомаси *Bacillus subtilis.*

Після 24 годинного інкубування в термостаті при температурі $+37^0$С пересівали вміст пробірки в колбу з 100мл поживного бульйону та знову вирощували в термостаті при температурі $+37^0$С протягом 24 годин. Культуру *Bacillus subtilis* з колби об’ємом 100мл пересівали в колбу об’ємом 3л, яку поміщали в термостат та інкубували протягом 24 годин при температурі $+37^0$С. Протягом вирощування для перемішування використовували магнітну мішалку.

ІІІ. Видалення надосаду та отримання осаду для виділення бацилярного біополімеру.

1) Отриману біомасу з культуральною рідиною центрифугували, використовуючи центрифугу з швидкістю обертання 6000/хв. Отриманий над осад змішували з етиловим спиртом у відношенні 1:1,5. Суміш витримували в холодильнику при температурі +40°С протягом 16-18 годин.

2) Осад, що випав, збирали за допомогою центрифугування при 6-8 тис. об/хв. протягом 15 хвилин. Надосад видаляли. Зібраний осад відмивали фосфатним буфером та знов осаджували 60^0 етанолом. Ці дії повторювали тричі.

3) Потім отриману суміш прогрівали при 100^0С протягом 10 хвилин, що призводило до випадіння осаду, який видаляли центрифугуванням при 6-8 тис. об/хв. протягом 15 хвилин.

4) Надосадову рідину підлягали гель-фільтрації на сефадексе G-200.

11.3. Методика отримання бацилярних біополімерів з культури мікроорганізмів *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3

І. Відновлення культури *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3 з ліофілізованого стану.

З дієтичної добавки «лактобактерин» виробництва ТОВ «ФЗ «Біофарма», Україна, 09100, Київська область, м. Біла Церква, вул. Київська, 37 отримано культуру *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3. В 1мл добавки міститься не менш ніж 1,1·107 живих мікробних клітин цього штаму.

В ході роботи було здійснено підбір середовищ з найменшим вмістом вуглеводів для культивування *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3. Висів з ампули, що містить 1мл ліофілізованого препарату, попередньо розведеного стерильним 0,9% розчином фізіологічного розчину, проводили на поживний бульйон в кількості 5мл.

ІІ. Отримання біомаси *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3.

Після 24 годинного інкубування в термостаті при температурі $+37^0$С пересівали вміст пробірки в колбу з 100мл поживного бульйону та знову вирощували в термостаті при температурі $+37^0$С протягом 24 годин. Культуру *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3 з колби об'ємом 100мл пересівали в колбу об'ємом 3л, яку поміщали в термостат та інкубували протягом 24 годин при температурі $+37^0$С. Протягом вирощування для перемішування використовували магнітну мішалку.

ІІІ. Видалення надосаду та отримання осаду для виділення бацилярних біополімерів

1) Отриману біомасу з культуральною рідиною центрифугували, використовуючи центрифугу з швидкістю обертання 6000/хв. Отриманий надосад змішували з етиловим спиртом у відношенні 1:1,5. Суміш витримували в холодильнику при температурі +40С протягом 16-18 годин.

2) Осад, що випав, збирали за допомогою центрифугування при 6-8 тис. об/хв. протягом 15 хвилин. Надосад видаляли. Зібраний осад відмивали фосфатним буфером та знов осаджували 60^0етанолом. Ці дії повторювали тричі.

3) Потім отриману суміш прогрівали при 100^0С протягом 10 хвилин, що призводило до випадіння осаду, який видаляли центрифугуванням при 6-8 тис. об/хв. протягом 15 хвилин.

4) Надосадову рідину підлягали гель-фільтрації на сефадексі G-200.

11.4. Вивчення молекулярно-біологічних властивостей бацилярних біополімерів

До отриманих бацилярних біополімерів одержали гіперімунні сироватки на мишах BALB/c, які були використані для імуноферментного аналізу антигенної спорідeності з бацилярними біополімерами інших продуцентів бактерій та клітин, та пептидів вірусів.

Для цієї мети бацилярні біополімери *Staphylococcus aureus 209, Bacillus subtilis* УКМ В-5007, *Lactobacillus plantarum* 8Р-А3, сорбували на дно лунки в концентрації 5 мкг/мл в карбонатному буфері. Після погашення неспецифічності вносили гіперімунні сироватки до бацилярних біополімерів. Тестування проводили за допомогою кон’югату білку G з пероксидазою для сироваток, виготовлених на кролях та кон’югату антимишиної сироватки з пероксидазою з подальшим проявленням у субстраті. Результати досліджень представлені на рис. 11.1 та 11.2.

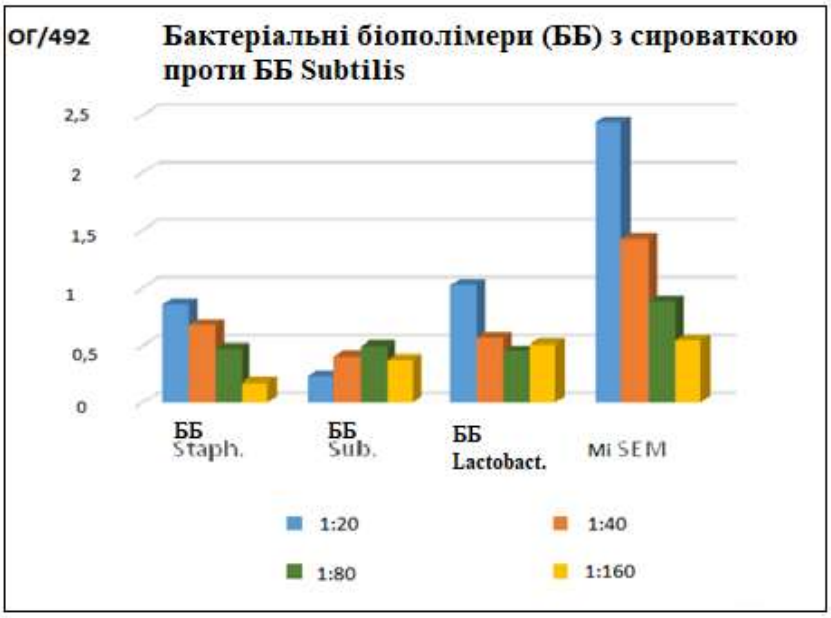


Рисунок 11.1 – Бацилярні біополімери з сироваткою проти бацилярних біополімерів

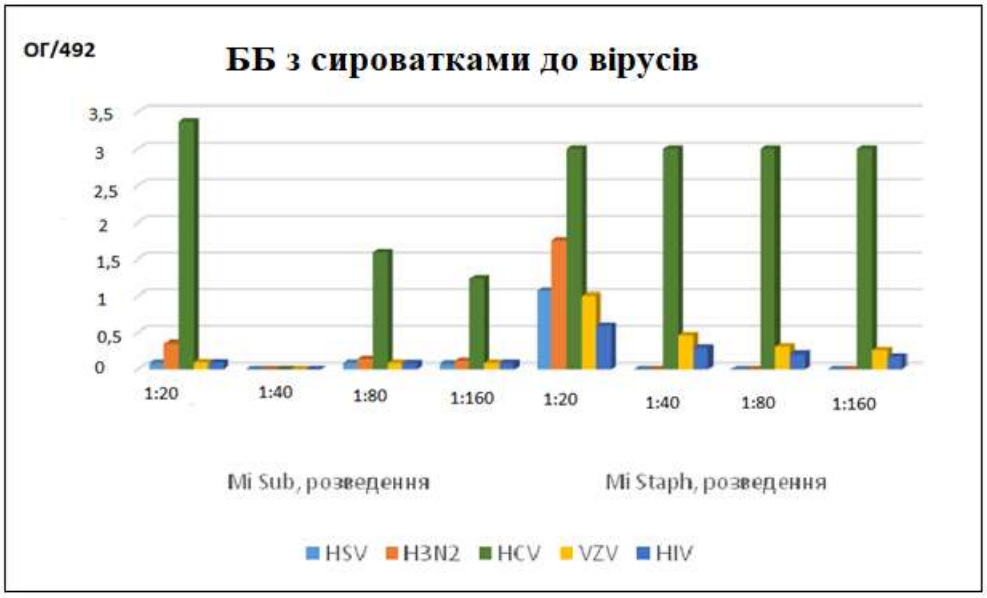


Рисунок 11.2 – Бацилярні біополімери з сироватками до вірусів

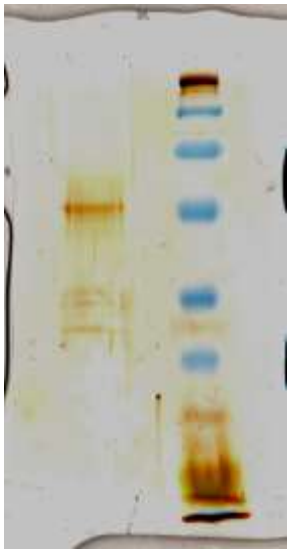
Аналізуючи отримані результати досліджень слід визнати, що бацилярні біополімери від різних продуцентів мають антигенну спорідненість між собою найбільш виражену при взаємодії в розведенні 1:80 і 1:160;

Висновки до розділу 11

Сироватки до вірусів HSV, вірусу грипу H_3N_2, HCV, VZV, HIV взаємодіють з пептидами бацилярних біополімерів по різному. Бацилярні біополімери *Bacillus subtilis* взаємодіють найбільш активно з антитілами до вірусів грипу і гепатиту С, бацилярні біополімери *Staph. Aureus* в розведенні 1/80 – 1/160 з антитілами до грипу, герпесу, гепатиту С.

12. РОЗРОБКА МАРКЕРІВ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ БАЦИЛЯРНІ БІОПОЛІМЕРИ БАКТЕРІЙ

Бацилярні біополімери отримували шляхом трьохкратного осадження етанолом з подальшим кип’ятінням розчиненого осаду протягом 10 хв. і очищенням на колонці Sephadex G200 методом гель-фільтрації. На рис. 12.1 показана електрофореграма після виділення бацилярних біополімерів.



1 2

Рисунок 12.1 – Електрофореграма бацилярного біополімеру з препарату Субалін з *Bacillus subtilis* (1); маркери (2)

Як видно з ектрофореграми, в бацилярних біополімерах *Bacillus subtilis* виявлено три смуги з молекулярною масою 48, 28 і 24 кДа.

Чистоту отриманих препаратів бацилярних біополімерів контролювали на кожному етапі виділення методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) та аніонообмінної високо роздільної хроматографії на колонках HPLC типу TSK SW.

Після очищення препарати ББ були проаналізовані методом аніонообмінної високоефективної рідинної хроматографії на колонках HPLC Gold System, яка забезпечена комп’ютерною програмою для кількісної обробки результатів з детекцією поглинання продуктів при довжині хвилі 214-280 нм. ББ

в концентрації 2 мг/мл наносили на колонку TSK DEAE-5PW розмірами 7,5х75. На рис. 12.2 показано розділення ББ зі стафілококу, а на рис. 12.3 – ББ з субаліну.

Електрофоретичні смуги ББ *Bacillus subtilis* з препарату Субалін виділені для подальшого аналізу Maldi toff.

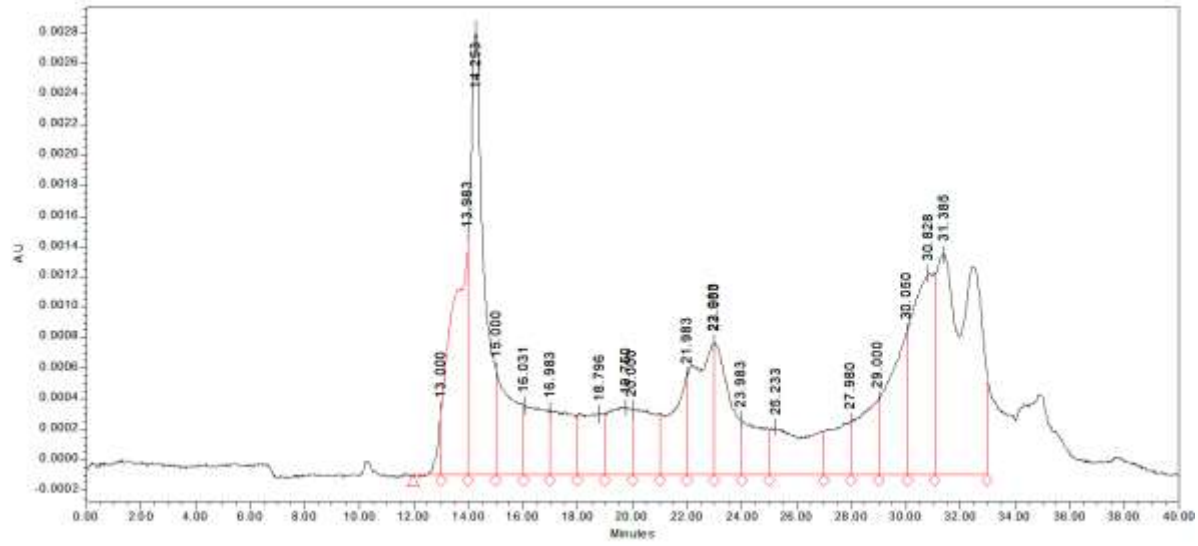


Рисунок 12.2 – Хроматографічне розподілення бацилярного біополімеру із золотистого стафілококу

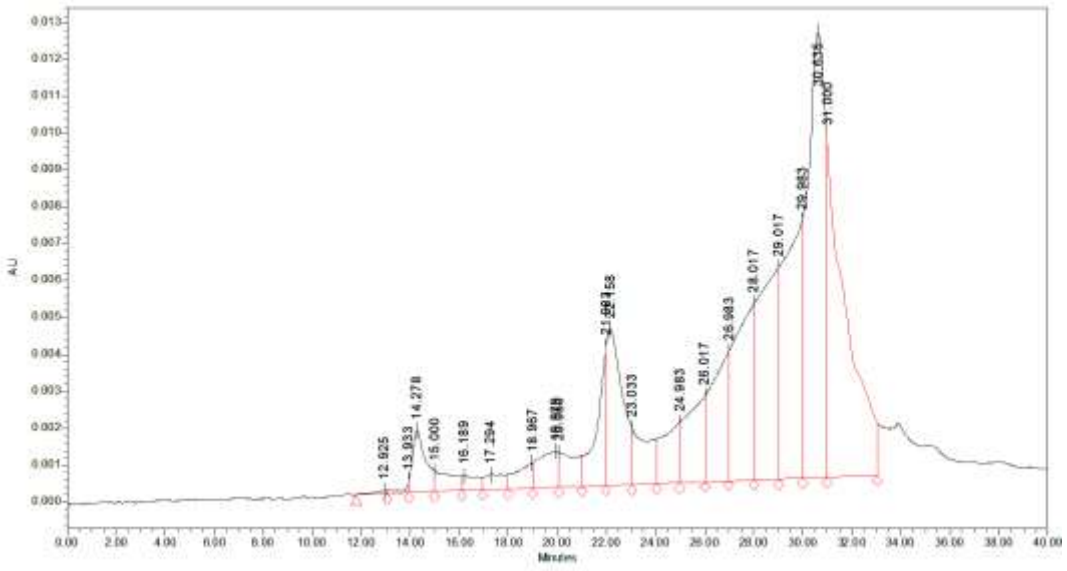


Рисунок 12.3 – Хроматографічне розподілення бацилярного біополімеру із препарату Субалін

При порівнянні одержаних профілів встановлено, що ББ золотистого стафілококу містить 5 продуктів: бацилярний біополімер субаліну – 4. При цьому

профілі елюції ББ золотистого стафілококу та субаліну близькі між собою, що свідчить про схожість фізико-хімічних характеристик вказаних білків. Але кількісні взаємовідносини білків, тобто концентрації пептидів з однаковою масою не співпадають.

Кожна хроматографічна фракція бацилярних біополімерів стафілакоку та Субаліну була проаналізована на антигенну спорідненість з бацилярними біополімерами золотистого стафілококу та кандида альбіканс методом імуноферментного аналізу. Результати дослідження представлені в таблиці 12.1.

Таблиця 12.1 – Антигенна спорідненість фракцій бацилярних біополімерів з золотистого стафілококу та Субаліну з сироваткою до бацилярних біополімерів золотистого стафілококу, кандида альбіканс

№№ фракцій	ББ золотистого стаф.		ББ із Субаліну	
	сироватка до ББ золотист.стаф. ОГ\492	сироватка до ББ кандида альб. ОГ\492	сироватка до ББ золотист.стаф. ОГ\492	сироватка до ББ кандида альб. ОГ\492
1	**0,133**	0,082	0,063	**0,129**
2	0,074	0,081	0,086	0,081
3	0,79	0,082	0,092	0,069
4	0,09	0,088	0,106	0,100
5	0,113	0,114	0,106	0,116
6	**0,127**	**0,126**	**0,122**	**0,122**
7	**0,195**	0,106	**0,129**	**0,161**
8	**0,178**	**0,186**	**0,365**	**0,261**
9	**0,192**	**0,201**	0,104	**0,172**
10	0,109	**0,164**		
11	0,098	0,071	**0,142**	0,083
12	0,054	0,085	0,079	0,090
13	0,071	0,067	0,081	0,069
14	0,076	0,060	0,119	**0,124**
15	0,119	0,067	0,106	**0,197**
16	0,110	0,091	**0,134**	**0,163**
17	0,107	0,69	0,104	**0,193**
18	**0,135**	0,093	**0,130**	**0,167**
19	**0,176**	0,092	**0,158**	**0,189**
20	0,108	0,093	**0,127**	**0,125**

Рівень взаємодії фракцій бацилярних біополімерів золотистого стафілакоку та Субаліну з сироватками до бацилярних біополімерів стафілакоку та кандида альбіканс оцінювали за показниками оптичної густини вважаючи показник ГЗ 0,120 нижчим рівнем позитивного результату.

Таким чином, в бацилярних біополімерах Субаліну виявлені 3 пика фракцій пептиду ББ, які взаємодіяли з сироватками до бацилярних біополімерів стафілококу та 3 піка фракцій пептиду бацилярних біополімерів, що взаємодіє з сироватками до бацилярних біополімерів кандида альбіканс. В бацилярних біополімерах золотистого стафілококу 2 фракції, що взаємодіяли з сироваткою до бацилярних біополімерів золотистого стафілококу і 2 фракції с сироваткою до бацилярних біополімерів кандида альбіканс.

Так як на MALDI Toff можна досліджувати лише пептидні структури, був вибраний бацилярний біополімер субаліну, представлений лише білковою структурою і не має вуглеводної структури. Пептиди піків 6, 11 та 19 були висушені у вакуумній сущці та проаналізовані методом електрофорезу. Електрофоретичний аналіз у всіх піках хроматографії виявив 3 пептиди: 50,9; 55,1; 50,2 кДа відповідно; 44,1; 44,1; 43.9 відповідно та 22,8; 22,6; 21,9 відповідно (рис. 12.4).

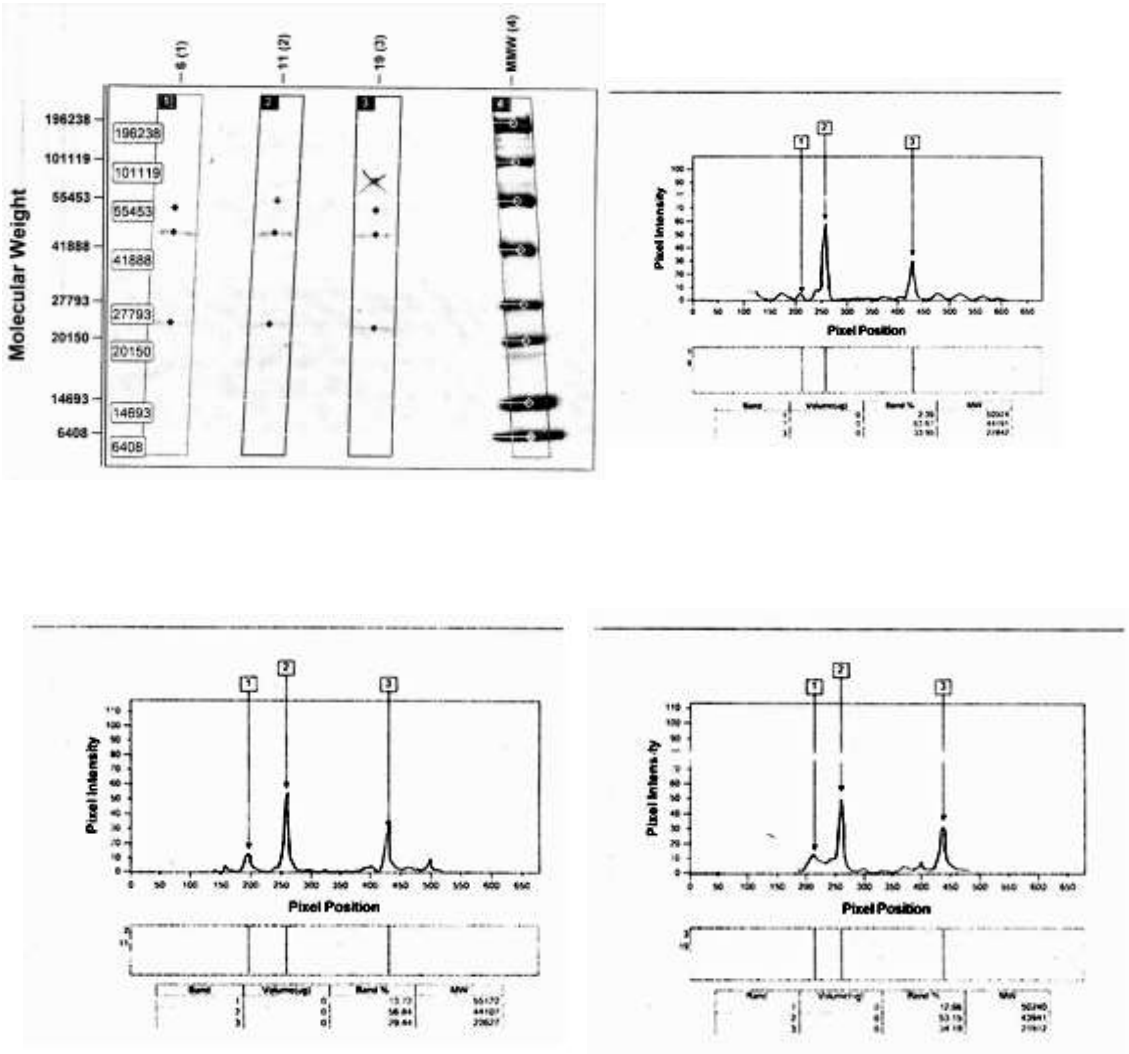


Рисунок 12.4 – Електрофоретичний аналіз MALDI Toff.

Для визначення мас-спектрів підготовлені наступні шматочки гелей бацилярних біополімерів із Bac.subtilis.

1) ББ subalin – 24 кДа
2) ББ subalin – 28 кДа
3) ББ subalin – 42 кДа
4) (19n - 1) – 50 кДа
5) (19n - 2) – 43,9 кДа
6) (19n - 3) – 21,9 кДа
7) (11n – 1) – 55 кДа
8) (11n – 2) – 44 кДа
9) (11n – 3) – 22,6 кДа

Ідентифікацію білків здійснювали за допомогою програми Mascot. Мас-спектри обробляли за допомогою програмного пакету Flex Analysis 3.3/ За допомогою програми Mascot (опція «пептидний фінгерпринт») провели пошук в

базі даних NCBI серед білків усіх організмів, бактерій і Bac.subtilis з вказаною вище точністю, з урахуванням можливого окислення метіонінів киснем повітря і можливою модифікації цистеїнів акриламідом гелю. Кандидатні білки, які мають параметр достовірності score > 75 в базі даних NCBI вважали визначені надійно ($p<0,05$).

В даному звіті буде представлена характеристика мас-спектрів хроматографічних піків 19 і 11, електрофоретичних смуг 2 з молекулярною вагою 43,9 0 44 кДа і 3 – молекулярна вага 21,9 – 22,6 кДа. MALDI Toff спектри представлені на рис. 4.5, 4.6, 4.7, 4.8.

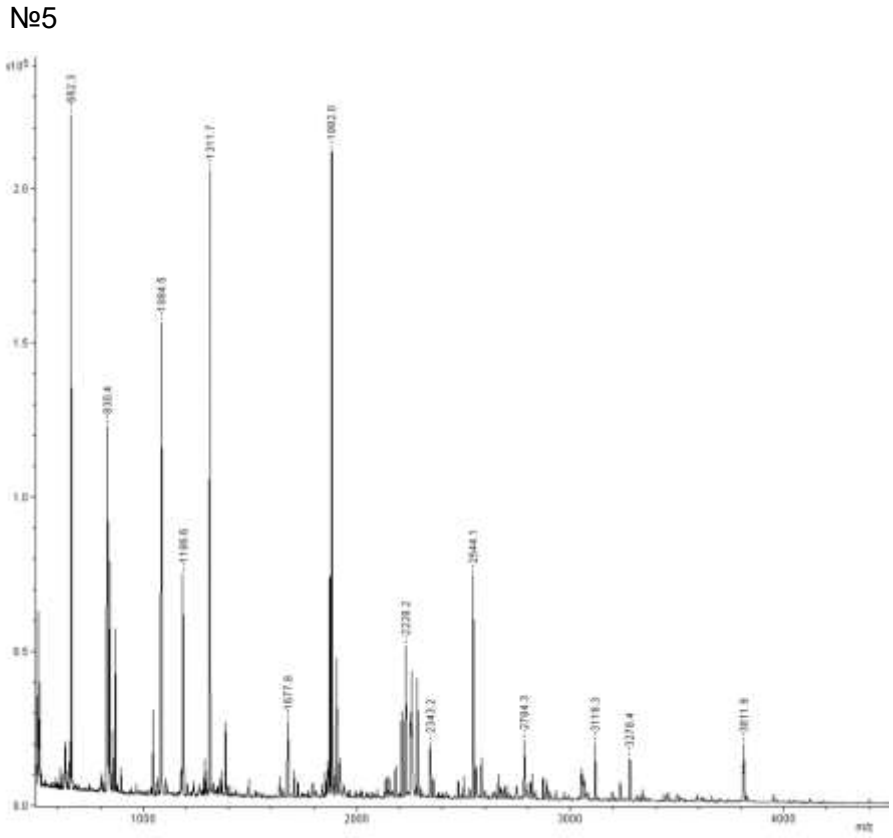


Рисунок 12.5 – Мас-спектр хроматографічного піку 11
з молекулярною вагою 43,9 кДа

№8

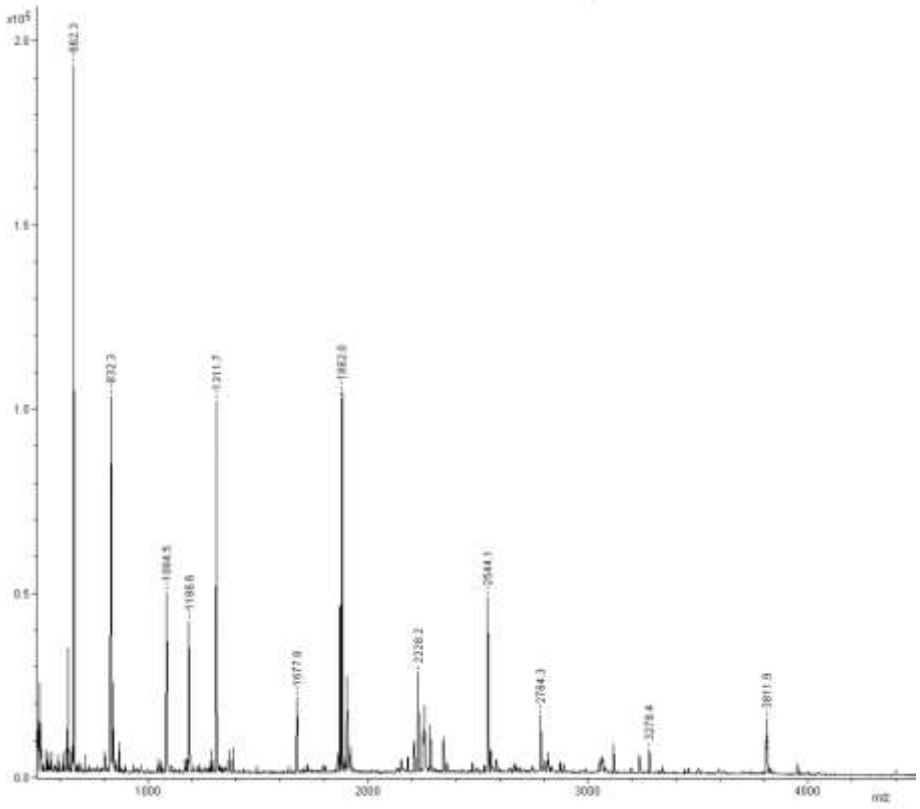


Рисунок 12.6 – Мас-спектр хроматографічного піку 11
з молекулярною вагою 44 кДа

№6

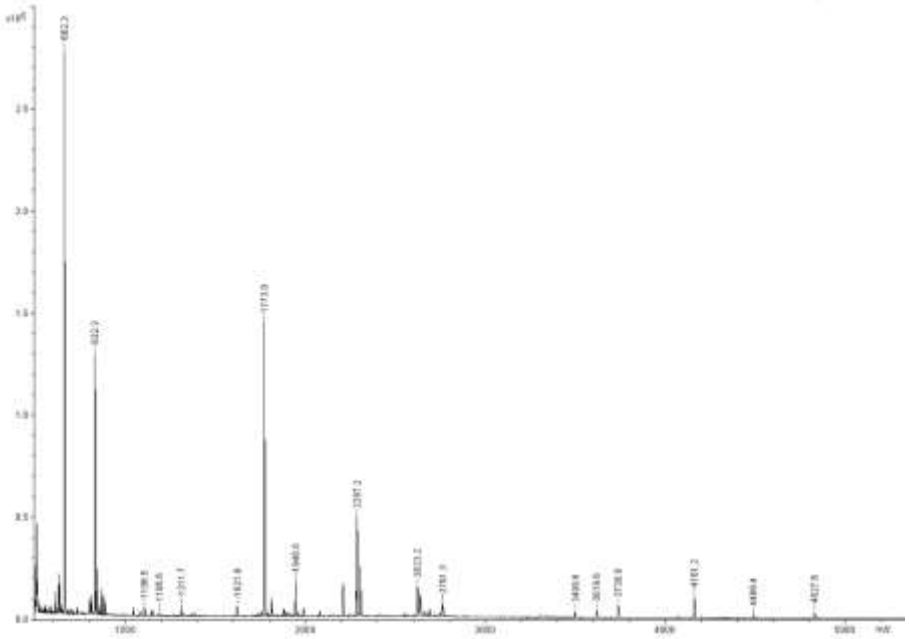


Рисунок 12.7 – Мас-спектр хроматографічного піку 19
з молекулярною вагою 21,9 кДа

№7

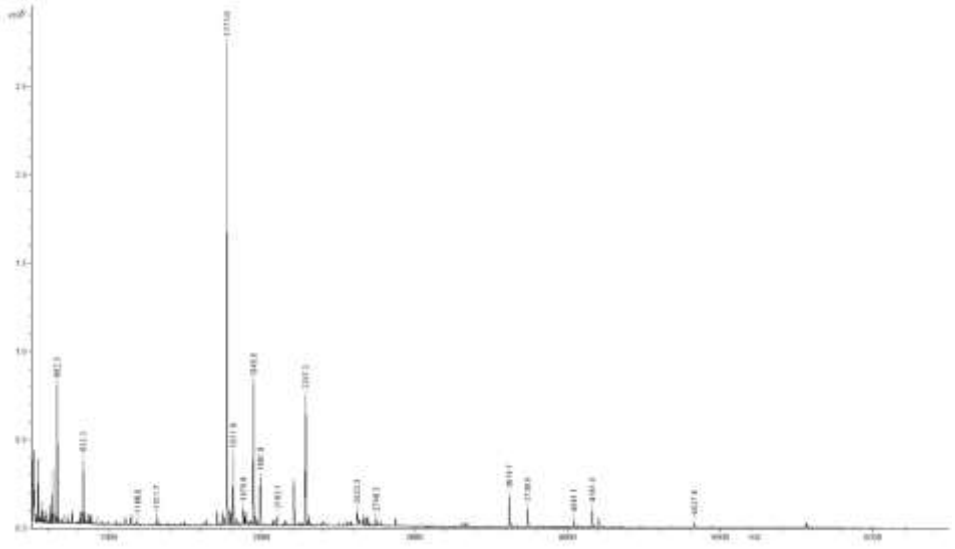


Рисунок 12.8 – Мас-спектр хроматографічного піку 19
з молекулярною вагою 22,6 кДа

Хроматографічні піки. Аналізуючи мас-спектри хроматографічних піків 19 і 11 слід відмітити, що мас-спектри 5 і 8 та 6 і 9 співпадають за кількістю розщеплених мас-спектрів. При пошуку в базі NCBI серед білків всіх організмів були виявлені пептиди гомологічні пептидам бацилярних біополімерів з молекулярною вагою 43,9 – 44,0 кДа з параметром достовірності > від 75 до 194 відповідно, найбільш цікаві з них наведені у табл. 12.2 – 12.5.

Таблиця 12.2 – Рекомбінантний IgG1 важкий ланцюг
[Homo sapiens] (скоре достовірності 102)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
838.4928	837.4855	837.4960	209-216	K.ALPAPIEK.T AlaLenProAlaIleGluLys
1186.6393	1185.6320	1185.6394	4-15	K.GPSVFPLAPSSK.S GlyProSerValPheProLenAlaProSerSerLys
1677.8016	1676.7943	1676.7947	157-170	PheAsnTrpTyrValAspGlyValGluValHisAsn AlaLys
1873.9122	1872.9049	1872.9146	275-291	ThrThrProProValLenAspSerAspGlySerPhe PheLenTyrSerLys
1904.9397	1903.9325	1903.9349	227-242	R.EPQVYTLPPSREEMTK.N GluProGinValTyrThrLenProProSerArgGlu GluMetTreLys
2228.1975	2227.1903	2227.2001	184-202	R.VVSVLTVLHQDWLNGKEYK.C ValValSerValLenTreValLenHisGinAspTrp

				LenAsnGlyLysGlyTyrLys
2343.1619	2342.1547	2342.1689	223-242	K.GQPREPQVYTLPPSREEMTK.N GlyGlnProArgGluProGinValTyrTreLenPro ProSerArgGluGluMetTreLys
2544.1199	2543.1126	2543.1241	253-274	K.GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK.T GlyPheTyrProSerAspAspIleAlaValGluTrp GluSerAspGlyGluProGluAsnAsnTyrLys
3811.8625	3810.8553	3810.8200	138-170	R.TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAK.T + Propionamide (C) ThaProGluValTreCysValValValGlyValSerHisGlyAsp ProGluValLysPheAsnTrpTyrValAspGlyValGluValHis AsnAlaLys

Таблиця 12.3 – Білок зв’язування з рецептором вірусу Гепатиту В [Homo sapiens] (скоре достовірності – 100)

Observed	**Mr(expt)**	**Mr(calc)**	**Start-end**	**Peptide**
838.4928	837.4855	837.4960	228-235	K.ALPAPIEK.T
1186.6393	1185.6320	1185.6394	23-34	K.GPSVFPLAPSSK.S
1677.8016	1676.7943	1676.7947	176-189	K.FNWYVDGVEVHNAK.T
1873.9122	1872.9049	1872.9146	294-310	K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L
1904.9397	1903.9325	1903.9349	246-261	R.EPQVYTLPPSREEMTK.N
2228.1975	2227.1903	2227.2001	203-221	R.VVSVLTVLHQDWLNGKEYK.C
2343.1619	2342.1547	2342.1689	242-261	K.GQPREPQVYTLPPSREEMTK.N
2544.1199	2543.1126	2543.1241	272-293	K.GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK.T
3811.8625	3810.8553	3810.8200	157-189	R.TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAK.T + Propionamide (C)

Таблиця 12.4 – Fc IgG1 важкого ланцюга [Homo sapiens] (скоре достовірності – 95)

Observed	**Mr(expt)**	**Mr(calc)**	**Start-end**	**Peptide**
838.4928	837.4855	837.4960	112-119	K.ALPAPIEK.T
1677.8016	1676.7943	1676.7947	60-73	K.FNWYVDGVEVHNAK.T
1873.9122	1872.9049	1872.9146	178-194	K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L
1904.9397	1903.9325	1903.9349	130-145	R.EPQVYTLPPSREEMTK.N
2228.1975	2227.1903	2227.2001	87-105	R.VVSVLTVLHQDWLNGKEYK.C
2343.1619	2342.1547	2342.1689	126-145	K.GQPREPQVYTLPPSREEMTK.N
2544.1199	2543.1126	2543.1241	156-177	K.GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK.T
3811.8625	3810.8553	3810.8200	41-73	R.TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAK.T + Propionamide (C)

Таблиця 12.5 – Імуноглобулін важкий ланцюг
[Homo sapiens] (скоре достовірності – 90)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
838.4928	837.4855	837.4960	336-343	K.ALPAPIEK.T
1186.6393	1185.6320	1185.6394	131-142	K.GPSVFPLAPSSK.S
1677.8016	1676.7943	1676.7947	284-297	K.FNWYVDGVEVHNAK.T
1873.9122	1872.9049	1872.9146	402-418	K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L
1904.9397	1903.9325	1903.9349	354-369	R.EPQVYTLPPSREEMTK.N
2228.1975	2227.1903	2227.2001	311-329	R.VVSVLTVLHQDWLNGKEYK.C
2343.1619	2342.1547	2342.1689	350-369	K.GQPREPQVYTLPPSREEMTK.N
2544.1199	2543.1126	2543.1241	380-401	K.GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK.T
3811.8625	3810.8553	3810.8200	265-291	R.TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAK.T + Propionamide (C)

Для хроматографічного піку «11», електрофоретичної фракції «2» з молекулярною масою 44кДа крім вказаних вище пептидів визначені фрагменти гомологічні анти-HIV gp 120 імуноглобіну, важкий ланцюг [Homo sapiens] (скор. достовірності – 75) та його синтетичних аналогів:

Таблиця 12.6 – Імуноглобулін важкий ланцюг
[Homo sapiens] (скоре достовірності – 75)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
838.4963	837.4890	837.4960	354-361	K.ALPAPIEK.T
1186.6422	1185.6349	1185.6394	149-160	K.GPSVFPLAPSSK.S
1677.8024	1676.7951	1676.7947	302-315	K.FNWYVDGVEVHNAK.T
1873.9236	1872.9163	1872.9146	420-436	K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L
1904.9590	1903.9518	1903.9349	329-347	R.EPQVYTLPPSREEMTK.N
2228.2104	2227.2031	2227.2001	398-419	R.VVSVLTVLHQDWLNGKEYK.C
2544.1320	2543.1247	2543.1241	7-38	K.GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK.T
3811.8679	3810.8606	3810.8200	283-315	R.TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAK.T + Propionamide (C)

При розгляді мас-спектрів 6 і 9, які відповідають 6, 19 хроматографічним пікам фракції «3» і електрофоретичній смузі 21,9 кДа та 9, 11 хроматографічним пікам фракції «3» і електрофоретичній смузі 22,6 кДа, та пошуку в базі NCBI, результати якого представлені у табл. 12.7.

Таблиця 12.7 – Мас-спектри 6 і 9 піків

Observed	**Mr (expt)**	**Mr (calc)**	**Start-end**	**Peptide**
662.3192	661.3119	661.3581	41-46	R.VTIACR.A
1740.8831	1739.8758	1739.8665	149-164	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E SerGlyThrAlaSerValValCysLenLenAsAsPheTyrProArg
1811.9220	1810.9147	1810.9036	149-164	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
1889.9321	1888.9248	1888.9353	213-229	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
1946.0293	1945.0220	1945.0197	131-148	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S ThrValAlaAlaProSerValPheIlePreProProSerAsp GluLenLys
2102.1113	2101.1041	2101.1208	130-148	K.RTVAAPSVFIFPPSDEQLK.S ArgThrValAlaAlaProSerValPheIlePheProProSerA spGluGinLenLys
2155.0947	2154.0874	2154.0892	211-229	K.HKVYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
3619.6873	3618.6800	3618.7020	172-205	K.VDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSK.A ValAspAsnAlaLenGlyAsnSerGinGluSerValThrGl uGinAspSerLysAspSerTheTyrserLeuSerSerThrLe nThaLenSerLys
3738.8928	3737.8855	3737.9127	131-164	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
4161.0496	4160.0423	4160.0033	168-205	K.VQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSK.A ValGinTrpLysValAspAsnAlaLenGinSerGlyAsnSe rGinGlu SerValThrGinAspSerLysAspSerThrTyrSerLenSer SerThrLenThrLenSerLys

Серед білків всіх організмів були виявлені пептиди гомологічні пептидам ББ субаліну.

Для MALDi спектру хроматографічного піку 9(11) (найбільш цікаві гомологічні пептиди): 1) Каппа ланцюг імуноглобуліну (скоре достовірності – 189): Кристалічна структура Cb_2 Fab (скоре достовірності – 163) представлена у табл. 12.8.

Таблиця 12.8 – Кристалічна структура Cb_2 Fab

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
1740.8831	1739.8758	1739.8665	127-142	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E
1772.9668	1771.9595	1771.9509	46-61	K.LLIYSASFLYSGVPSR.F
1811.9220	1810.9147	1810.9036	127-142	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
1878.8769	1877.8696	1877.8789	1-18	-.DIQMTQSPSSLSASVGDR.V
1889.9321	1888.9248	1888.9353	191-207	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
1894.8915	1893.8842	1893.8738	1-18	-.DIQMTQSPSSLSASVGDR.V + Oxidation (M)
1946.0293	1945.0220	1945.0197	109-126	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2069.1355	2068.1283	2068.1357	43-61	K.APKLLIYSASFLYSGVPSR.F
2102.1113	2101.1041	2101.1208	108-126	K.RTVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2155.0947	2154.0874	2154.0892	189-207	K.HKVYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
2623.2590	2622.2517	2622.2742	1-24	-.DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCR.A + Propionamide (C)
3619.6873	3618.6800	3618.7020	150-183	K.VDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSK.A
3738.8928	3737.8855	3737.9127	109-142	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
4161.0496	4160.0423	4160.0033	146-183	K.VQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSK.A

Таблиця 12.9 – Механізм активації повного довжини K^+-каналу Kcsa (скоре достовірності – 163)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
1740.8831	1739.8758	1739.8665	129-144	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E
1811.9220	1810.9147	1810.9036	129-144	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
1878.8769	1877.8696	1877.8789	1-18	-.DIQMTQSPSSLSASVGDR.V
1889.9321	1888.9248	1888.9353	193-209	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
1894.8915	1893.8842	1893.8738	1-18	-.DIQMTQSPSSLSASVGDR.V + Oxidation (M)
1946.0293	1945.0220	1945.0197	111-128	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
1991.0083	1990.0010	1989.9908	25-42	R.ASQDVNTAVAWYQQKPGK.A
2069.1355	2068.1283	2068.0411	129-147	K.SGTASVVCLLNNFYPREAK.V
2102.1113	2101.1041	2101.1208	110-128	K.RTVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2155.0947	2154.0874	2154.0892	191-209	K.HKVYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
2287.1873	2286.1800	2286.1757	25-45	R.ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK.L
2623.2590	2622.2517	2622.2742	1-24	-.DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR.A + Propionamide (C)
3619.6873	3618.6800	3618.7020	152-185	K.VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSK.A
3738.8928	3737.8855	3737.9127	111-144	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
4161.0496	4160.0423	4160.0033	148-185	K.VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSK.A

Таблиця 12.10 – Кристалічна структура людського інтерлейкіну-34 зв’язаного з Fab1.1 (скоре достовірності – 163)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
1740.8831	1739.8758	1739.8665	127-142	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E
1772.9668	1771.9595	1771.9509	46-61	K.LLIYSASFLYSGVPSR.F
1811.9220	1810.9147	1810.9036	127-142	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
1878.8769	1877.8696	1877.8789	1-18	-.DIQMTQSPSSLSASVGDR.V
1889.9321	1888.9248	1888.9353	191-207	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
1894.8915	1893.8842	1893.8738	1-18	-.DIQMTQSPSSLSASVGDR.V + Oxidation (M)
1946.0293	1945.0220	1945.0197	109-126	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2069.1355	2068.1283	2068.1357	43-61	K.APKLLIYSASFLYSGVPSR.F
2102.1113	2101.1041	2101.1208	108-126	K.RTVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2155.0947	2154.0874	2154.0892	189-207	K.HKVYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
2623.2590	2622.2517	2622.2742	1-24	-.DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CR.A + Propionamide (C)
3619.6873	3618.6800	3618.7020	150-183	K.VDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSK.A
3738.8928	3737.8855	3737.9127	109-142	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
4161.0496	4160.0423	4160.0033	146-183	K.VQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSK.A

Таблиця 12.11 – Кристалічна структура широко нейтралізуючого антитіла Cr8020 зв’язаного з Influenza A H3 Гемаглютиніном.
(скоре достовірності – 194):

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-End	Peptide
1740.8831	1739.8758	1739.8665	129-144	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E
1811.9220	1810.9147	1810.9036	129-144	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
1889.9321	1888.9248	1888.9353	193-209	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
1946.0293	1945.0220	1945.0197	111-128	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2102.1113	2101.1041	2101.1208	110-128	K.RTVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2155.0947	2154.0874	2154.0892	191-209	K.HKVYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
2748.3043	2747.2970	2747.3582	1-25	-QEIVMTQSPGTLSLSPGERATLSCR.A + Oxidation (M); Propionamide (C)
3619.6873	3618.6800	3618.7020	152-185	K.VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK.A
3738.8928	3737.8855	3737.9127	111-144	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
4161.0496	4160.0423	4160.0033	148-185	K.VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK.A

Для хроматографічного піку 6(19) і електрофоретичної фракції 22,6 кДа, окрім гомології з усіма вказаними фрагментами пептидів додається Ланцюг А комплексу антиботі-антиген (скоре достовірності – 86) (рис. 12.12).

Таблиця 12.12 – Ланцюг А комплексу антиген-антитіло
(скоре достовірності – 86)

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Start-end	Peptide
1878.8625	1877.8552	1877.8789	1-18	-.DIQMTQSPSSLSASVGDR.V
1946.0434	1945.0362	1945.0197	109-126	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S
2623.2367	2622.2294	2622.2742	1-24	-.DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR.T + Propionamide (C)
2639.2228	2638.2155	2638.2691	1-24	-.DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR.T + Oxidation (M); Propionamide (C)
2761.3146	2760.3073	2760.3541	184-207	K.ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK.S + Propionamide (C)
3619.6346	3618.6274	3618.7020	150-183	K.VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK.A
3738.9480	3737.9407	3737.9127	109-142	R.TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR.E + Propionamide (C)
4161.1869	4160.1797	4160.0033	146-183	K.VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK.A
4489.4282	4488.4209	4488.1780	143-183	R.EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK.A

Слід відмітити, що ББ Субаліну має гомологію з усіма вказаними пептидами від 18 до 40 амінокислот.

Аналіз пептидів методом масс-пектрометрії показав, що фрагмент бацилярного біополімеру субаліну з молекулярною вагою 43,9 – 44,0 кДа має амінокислотну гомологію з пептидами: 1. Рекомбінантний IgG1 важкий ланцюг [Homo sapiens], 2. Білок зв'язування з рецептором вірусу Гепатиту Б [Homo sapiens], 3. Fc IgG1 важкого ланцюга [Homo sapiens], 4. Імуноглобуліном важкого ланцюга [Homo sapiens], 5. Фрагменти гомологічні анти-HIV gp 120 імуноглобіну, важкий ланцюг [Homo sapiens] і іншими фрагментами пептидів важкого ланцюга імуноглобуліну, що відповідають за зв'язок з антигеном. При цьому визначено, що пептиди, які повністю за амінокислотною послідовністю співпадали з фрагментами пептиду субаліну були наступні – ACPAPIEK, FNWYVDGVEVHNAK, TTPPVLDSDGSFFLYSK, VVSVLTVLHQDWLNGKEYK, GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK, TPEVTCVVVDVSY-EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK.

Фрагмент бацилярного біополімеру Субаліну з молекулярною вагою 21,9 – 22,6 кДф має амінокислотну гомологію з пептидами: 1. Каппа ланцюг імуноглобуліну, 2. Кристалічна структура Cb_2 Fab, 3. Механізм активації повного довжини K^+-каналу Kcsa, 4. Кристалічна структура людського інтерлейкіну-34 зв'язаного з Fab1.1, 5. Кристалічна структура Широко нейтралізуючого антитіла Cr8020 зв'язаного з Influenza A H3 Гемаглютиніном, 6. Ланцюг А комплексу антитіло-антиген.

Ідентифіковано 5 немодифікованих пептидів, які відповідали наступним послідовностям – DIQMTQSPSSLSASVGDR, TVAAPSVFIFPPSDEQLK, VDNALQSGNSGESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK, VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK, EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK.

Таким чином, виявлені амінокислотні послідовності фрагменту з молекулярною масою 44,0 кДа, які мають гомологію з фрагментами імуноглобуліну, які відповідають за зв'язування важкого ланцюга IgG з антигеном з рецепторами вірусу гепатиту В, анти-HIV gp120 імуноглобуліну з пептиду ББ субаліну. Фрагмент пептиду 22,0 кДа має амінокислотну

послідовність з Fab-фрагментом IgG, каппа-ланцюгом IgG, з нейтралізуючими антитілами H_3 ГА вірусу грипу, кристалічною структурою людського інтерлейкіну-34. Виявлена гомологія амінокислотних послідовностей пояснює імуноад'ювантні властивості ББ Субаліну.

Піками № 6, 11, 19, імунізованих мишей для отримання специфічних сироваток до піків №6, 11, 19 бацилярного біополімеру Субаліну.

Для контролю взаємодії отриманих мишачих сироваток проти фракцій ББ з субаліну були проведені дослідження по визначенню взаємодії їх з бацилярними біополімерами. Для цієї мети на дно плашки були засорбовані ББ із St. aureus 3 і 4, і субаліну, Lactobact. Сироватки розводили 1:10, 1:20, 1:40 і 1:80. Дані по взаємодії мишачих антитіл з бацилярними біополімерами наведено на рис. 12.9.

Результати досліджень взаємодії антитіл до фракції бацилярного біополімеру № 6 з бацилярними біополімерами інших бактерій вказують на те, що бацилярний біополімер Субаліну (фракція №6) має високу антигенну спорідненість з бацилярним біополімером з стафілококу, Lactobact (рис. 12.10)

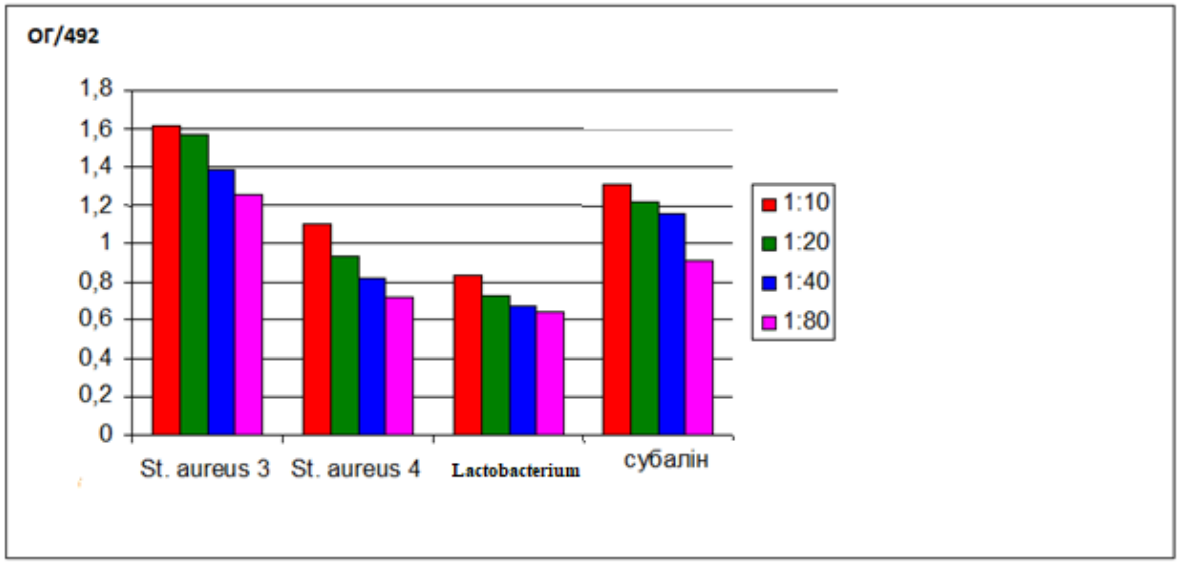


Рисунок 12.9 – Взаємодія бацилярних біополімерів з бактерій з мишачими антитілами проти фракції № 6 бацилярного біополімеру з Субаліну

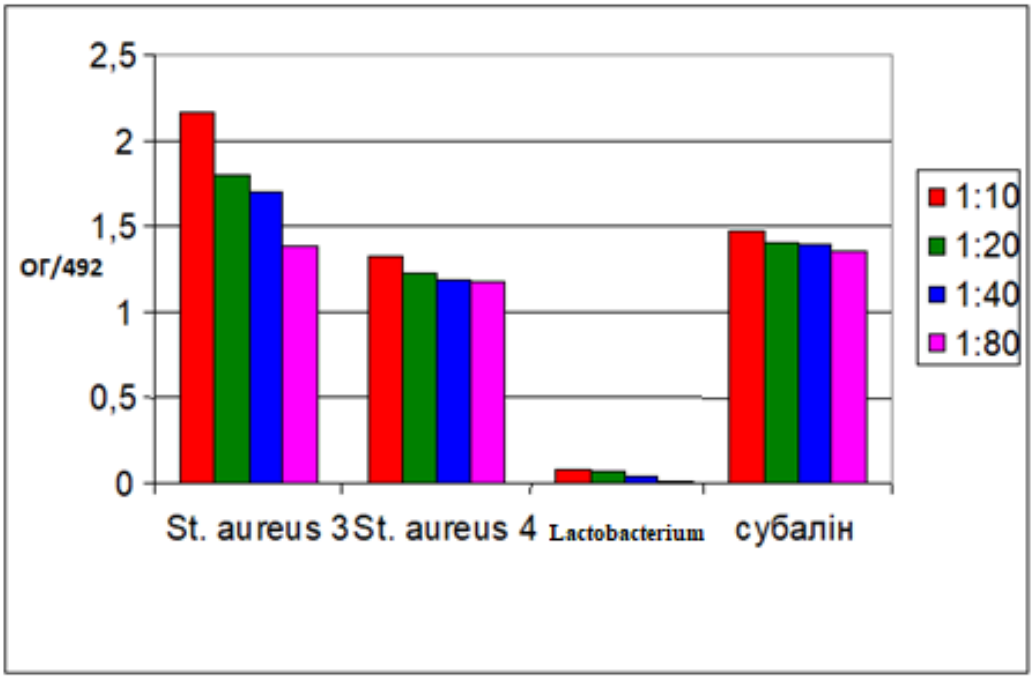


Рисунок 12.10 – Взаємодія бацилярних біополімерів з мишачими антитілами проти фракції № 11 бацилярного біополімеру із Субаліну

Згідно з результатами досліджень, висока антигенна спорідненість з бацилярним біополімером Субаліну (фракція №11) має бацилярний біополімер з стафілококу та Lactobact.

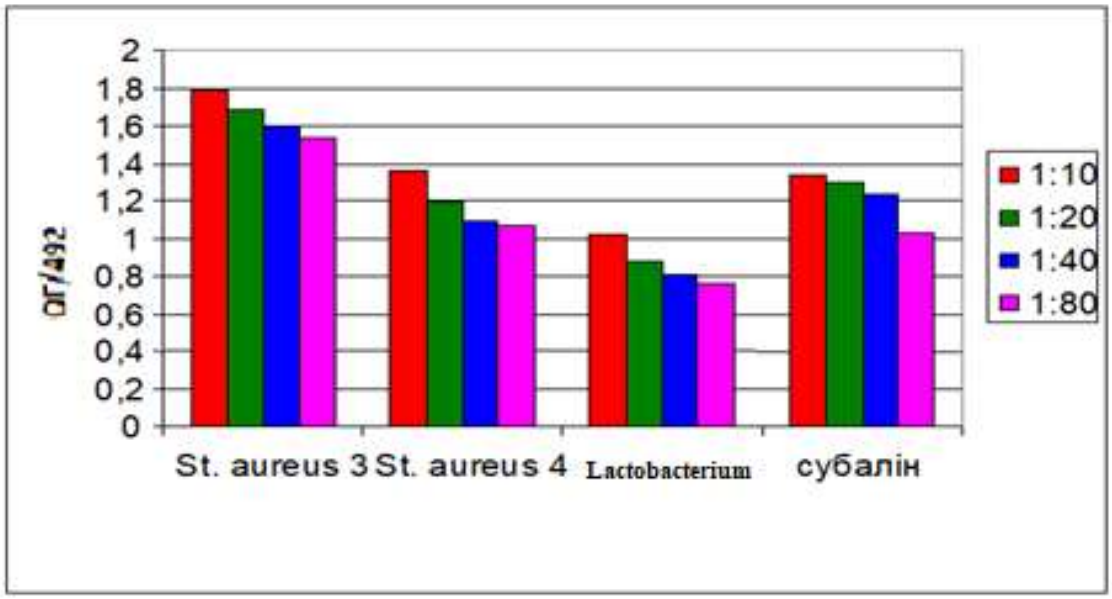


Рисунок 12.11 – Взаємодія бацилярних біополімерів з мишачими антитілами проти фракції № 19 ББ із Субаліну

Аналізуючи результати показників антигенної спорідненості, бацилярних біополімерів з антитілами проти фракції №19 бацилярного біополімеру з субаліну, слід зауважити, що ББ субаліну (фракція №19) має високу антигенну спорідненість з ББ із стафілококу та Lactobact.

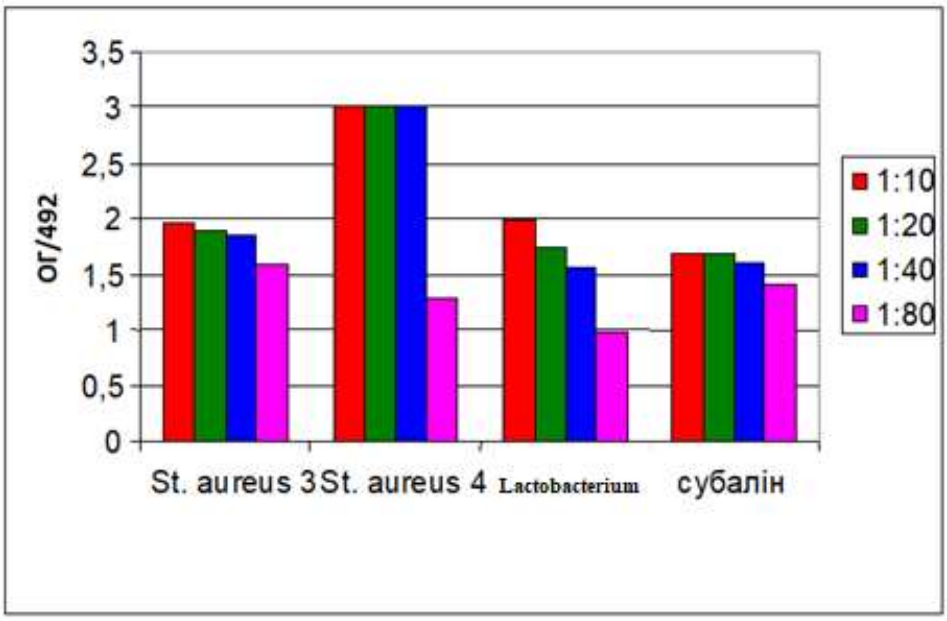


Рисунок 12.12 – Взаємодія бацилярних біополімерів з антирабічним імуноглобуліном

Антирабічний імуноглобулін, який виявив антигенну спорідненість з бацилярними біополімерами бактерій, по спорідненості з бацилярними біополімерами мав таку закономірність, як і фракція бацилярного біополімеру субаліну №19.

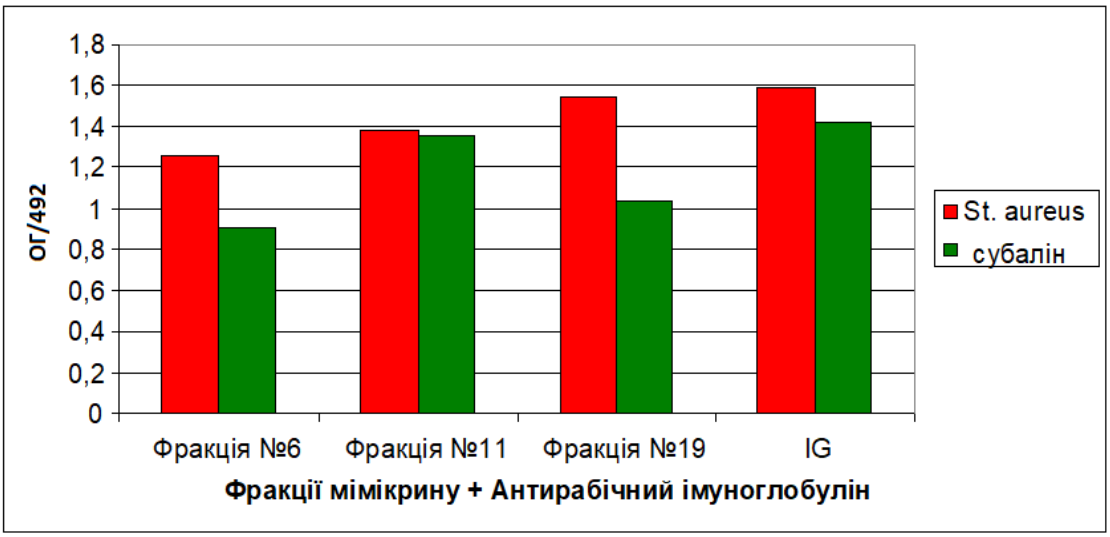


Рисунок 12.13 – Загальна гістограма усіх пиків та антирабічного IgG (1 а/№6; 2 – а/№ 11, 3 – а/№ 19, 4 – антираб IgG)

В результаті проведених досліджень було показано, що всі фракції різної молекулярної маси (№6, №11, №19) мають високу антигенну спорідненість з бацилярним біополімеріом з стафілококу та антирабічним імуноглобуліном.

13. ОТРИМАННЯ СИНТЕТИЧНИХ ПЕПТИДІВ, ЯКІ МАЮТЬ ГОМОЛОГІЮ З БАЦИЛЯРНИМИ БІОПОЛІМЕРАМИ

В результаті досліджень молекулярної структури бацилярних біополімерів- ББ була розроблена методика виділення активних пептидів з бацилярного біополімеру *Bacillus subtilis*, яка складається з:

- хроматографічного аналізу препаратів бацилярних біополімерів в системі HPLC;
- виявлені у фракціях активних структур бацилярних біополімерів методом ІФА;
- вакуумному висушуванні активних піків фракцій;
- наступним електрофоретичним аналізом цих фракцій;
- визначенні мас-спектрів хроматографічних піків;
- пошук в базі даних NCBI серед білків всіх організмів гомологічних пептидів.

За допомогою запропонованої методики були отримані пептиди №5, 8 і №6,9 з молекулярними масами 43,9-44,0 кДа та 22,0 кДа, відповідно. При пошуку в базі данихNCBI мас-спектри пептиду №5 з молекулярною масою 43,9-44,0 кДа має гомологічні пептиди з Fc-фрагменту важкого ланцюга імуноглобулінуG(IgG) з рецептором вірусу гепатиту В та фрагментом важкого ланцюга антитіла протиgp ВІЛ.

Мас-спектри пептиду № 9 мають гомологію довжиною від 18 до 36 а.к. з пептидами капа-ланцюгів IgG, кристалічною структурою нейтралізуючого фрагменту антитіла зв’язуючого з гемаглютинінам Р3 вірусу грипу, фрагменти пептиду, відповідаю чого за активацію каналу К+, кристалічної структури Fab, кристалічної структури людського інтерлейкіну-34, зв’язуючого зFab 1.1, з ланцюгом комплексу АТ-АГ, пептид розміром 206 АМ, який відповідає фрагментам моноклональних антитіл до рецепторів епідермального росту.

Так як молекулярна мімікрія між пептидами вірусів капа-ланцюгом імуноглобуліну та пептидом бацилярного біополімеру Субаліну відповідала фрагменту ББ з молекулярною масою 21,9-22,6 кДа, тому з 5 немодифікованих

пептидів, які повністю співпадали з амінокислотною послідовністю були видібрані та синтезовані пептиди NH2-NVAAPSVESFPPSDEQLK-COOH та NH2- DIQMTQSPSSLSASVGDR-COOH і були названі P18, P19

Таблиця 13.1- Синтезовані пептиди (Metabionprim)

Molecular mass, kDa	**Peptide sequence**	**Source**	**Accession number**
18.11	DIQMTQSPSSLSASVGDR	Immunoglobulin kappa light chain VLJ region Crystal structure of extracellular domain of human HER-2 complexed with Herceptin Fab.	GenBank:BAC01680.1
19.46	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	Structure Of Influenza A Neutralizing Antibody Selected From Cultures Of Single Human Plasma Cells In Complex With Human H3 Influenza Haemagglutinin	PDB: 3ZTJ_H

Одержані фізико-хімічні характеристики пептиду P18: молекулярна вага – 1946,26 кДа методом мас-спектрометрії, ступінь очистки препарату 70% HPLC-хроматографією ; пептиду P19: молекулярна вага 1879,04, >70% ступінь чистоти HPLC, ідентифікація Maldi-Toff .

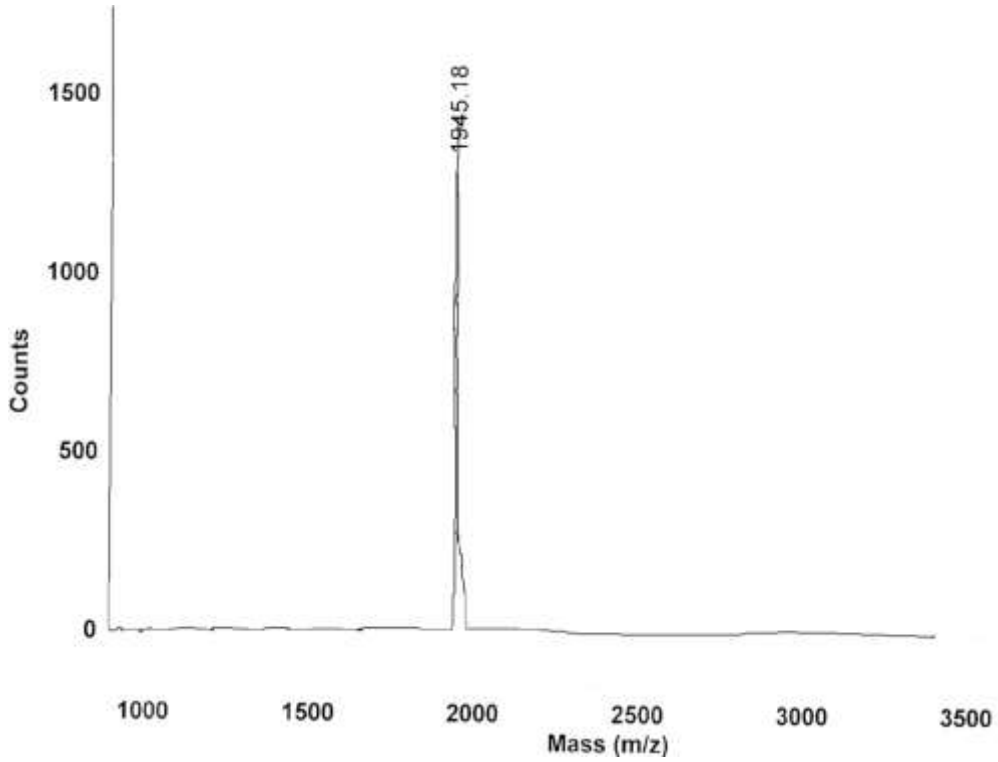


Рисунок 13.1 – Метод мас-спектрометрії Р18

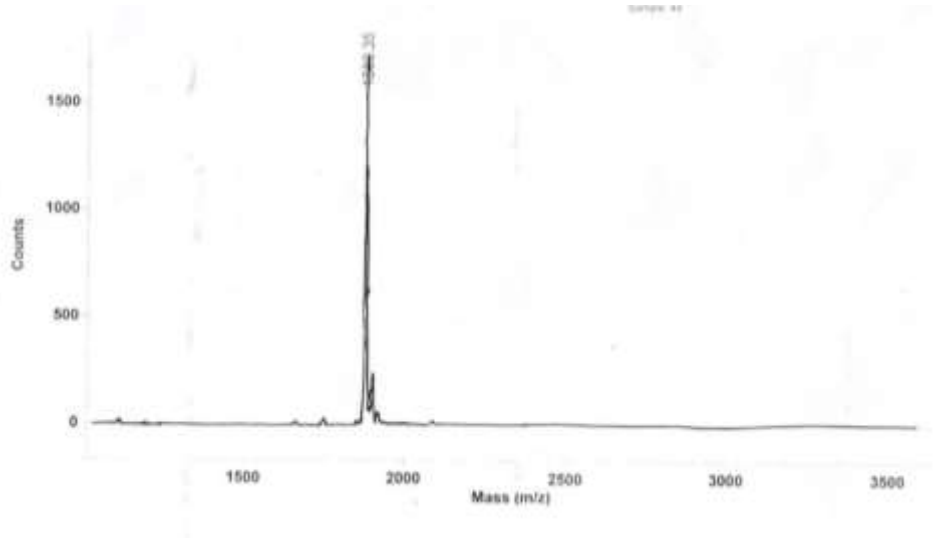


Рисунок 13.2 – Метод мас-спектрометрії Р19

Досліджені молекулярно-біологічні характеристики:

- антигенна спорідненість з ББ різних бактерій методом ІФА;
- антигенна спорідненість з пептидами вірусів та χ та λ- ланцюгами IgG методом ІФА;
- антигенна спорідненість з рецептором епідермального росту Her-2;
- вплив на мітотичний режим інтактних та інфікованих вірусами клітин;

13.1. Вивчення молекулярно-біологічних властивостей пептидів Р18 та Р19

Антигенну спорідненість з бацилярними біополімерами різних бактерій та фракцій піків з різною молекулярною масою бацилярного біополімеру з Субаліну вивчали за допомогою ІФА. Для цієї мети в лунки планшетів сорбували пептидР18 в концентрації 3-5 мкг/мл. Потім за методикою Voller (18) визначали перехресну взаємодію з антитілами до різних бацилярних біополімерів та їх фракцій. Для аналізу застосовували сироватки кролів (з архіву лабораторії), імунізованих бацилярними біополімерами із *St.aureus*, *M.tuberculosis*, *Mycoplasma ph.*, лімфоїдних клітин; мишачими сироватками до бацилярних біополімерів з *St.aureus* та хроматографічних піків бацилярних біополімерів з Субаліну № 11 (44 кДа) та №19 (22 кДа). Результати аналізу представлені на рис. 13.3

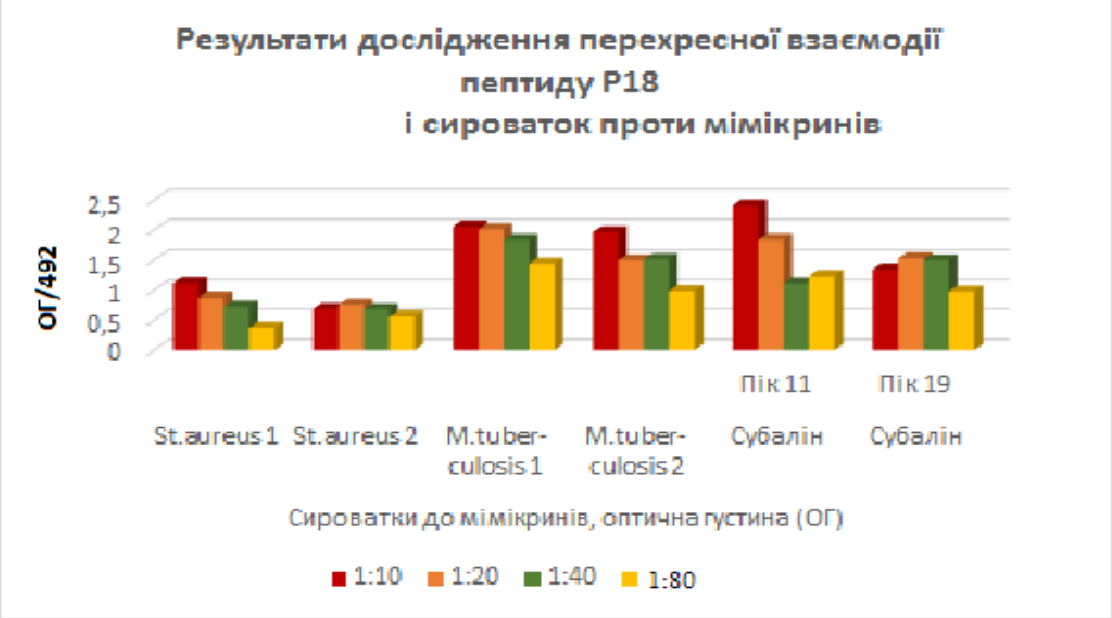


Рисунок 13.3 – Результати дослідження перехресної взаємодії пептиду Р18 і сироваток проти бацилярних біополімерів

В результаті проведених досліджень було показано, синтезований пептид Р18 має високу ступінь спорідненості з бацилярними біополімерами із *St.aureus*,

M.tuberculosis, а також хроматографічними піками з бацилярним біополімером з Субаліну.

Рисунок 13.4 – Взаємодія Р19 з сироватками проти бацилярних біополімерів

Синтезований пептид Р19 також має антигенну спорідненість з бацилярними біополімерами з стафілококу, субаліну, мікоплазми, лімфоїдних клітин SEM.

При вивченні антигенної мімікрії бацилярних біополімерів бактерій було показано, що вони мають антигенний взаємозв'язок з капа (χ) і лямбда (λ) ланцюгами імуноглобуліну та пептидами вірусів, тому були проведені дослідження по визначенню антигенної спорідненості Р18 та χ і λ ланцюгів імуглобуліну класу G (IgG) і пептидів вірусів. Результати наведені на рис 13.5.

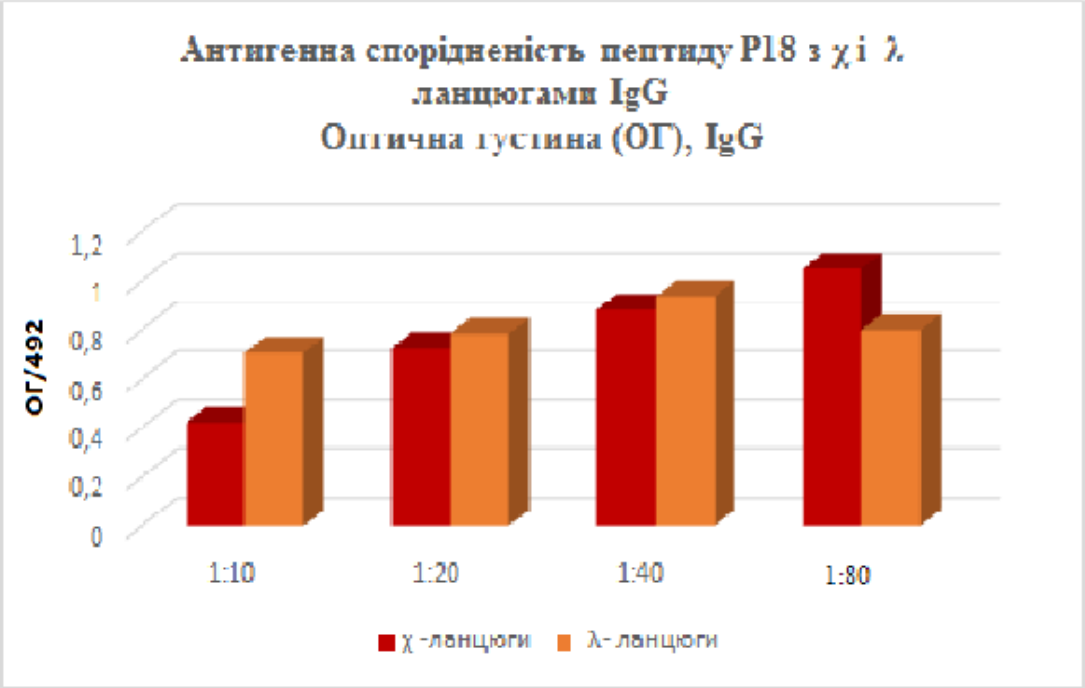


Рисунок 13.5 – Антигенна спорідненість пептиду P18 з χ і λ ланцюгами IgG

Згідно приведених в таблиці даних, чітко відмічається спорідненість між пептидом P18 та χ і λ ланцюгами IgG. Слід відмітити, що для χ ланцюгів виявлена обернена залежність від розведення сироваток, найбільший рівень ОГ відмічався при розведенні 1:80, що може бути пов'язано з рецепторною специфічністю пептиду P18 до χ ланцюгів IgG.

Аналогічні дослідження були проведені для визначення спорідненості між пептидом P18, P19 і різними вірусами. Для цього були використані антитіла проти вірусів: герпесу 1 і 2 типів (ВПГ1 і ВПГ2), герпесу 6 типу (ВПГ6), вірус Епштейн-Барр (ВЕБ), цитомегаловірусу (ЦМВ), грипу (A/H1N1) і аденовірусу (адено), папілома вірусам, токсоплазмозу і сифіліс. Результати перехресної взаємодії антитіл проти P18, P19 наведені на рис. 13.6; 13.7.

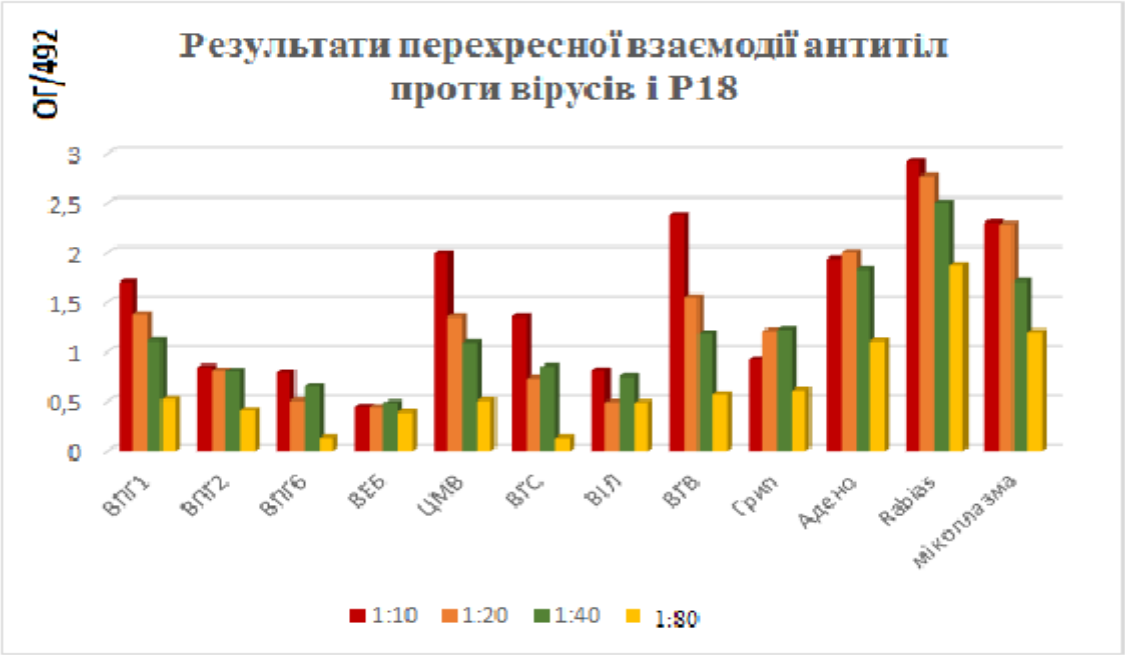


Рисунок 13.6 – Результати перехресної взаємодії антитіл проти вірусів і Р18

При аналізі взаємодії пептиду Р18 з антитілами до вірусів була виявлена найвища спорідненість з пептидами вірусу сказу, аденовірусу, ЦМВ, ВГС, ВПГ1, вірусу грипу. Менший рівень спорідненості виявлено для вірусів ВПГ2, ВПГ6, ВІЛ і найменший – з ВЕБ.

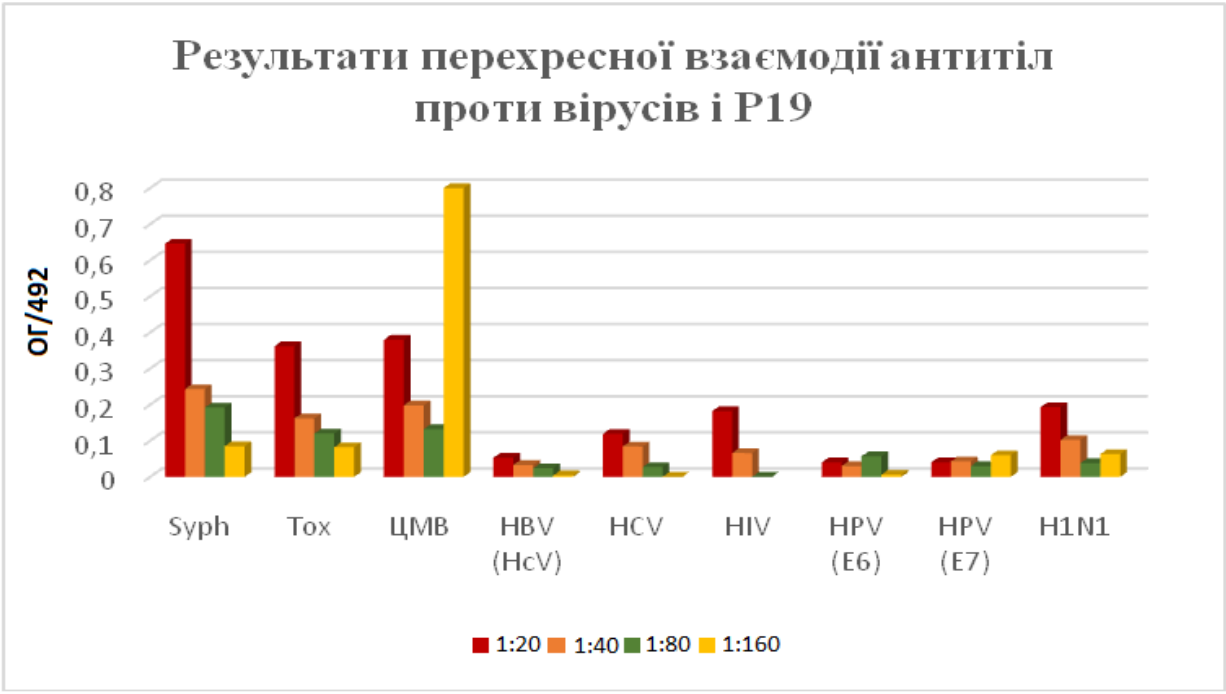


Рисунок 13.7 – Результати перехресної взаємодії антитіл проти вірусів і Р19

При вивченні антигенної спорідненості синтезованого пептиду Р19 антигенна спорідненість відмічалася з антигенами трепонеми, ЦМВ, токсоплазми, HCV, HIV, грип повністю відсутня була взаємодія з антитілами до core-антигену HBV та трансформуючим білкам вірусу папіломи Е6 та Е7 HPV.

Звертаючи увагу на те, що бацилярні біополімери – це продукт метаболізму клітин і те, що найбільша гомологія пептиду бацилярних біополімерів виявлена з рецептором епідермального росту, проведені дослідження з моноклональними антитілами до рецепторів клітин, α та γ-інтерферону та рецептору епідермального росту. Результати представлені у табл. 13.2.

Таблиця 13.2 – Р19 з сироваткою до клітинних рецепторів до пептидів: p53, P Rb, pBEgFR, P16NK49, CD118, CD119.

Назва сироватки	**Розведення сироваток**			
	1/20	**1/40**	**1/80**	**1/160**
p53	0,071	0,038	0,034	0,071
P Rb	0,080	0,049	0,032	0,064
pBEgFR	0,168	0,080	0,056	0,050
P16NK49	0,063	0,030	0,030	0,020
CD118	0,057	0,048	0,030	0,027
CD119	0,072	0,041	0,032	0,025

В результаті проведених досліджень було показано, що пептид Р19 не взаємодіє з моноклональними антитілами до α та γ-інтерферонів та протипухлинних пептидів p53 та pRb та трансформуючого пептиду P16NK49.

Одержані результати взаємодії бацилярного біополімеру Р19 з рецептором епідермального фактору росту ми перевірили в перехресній взаємодії з антитілами до синтезованих пептидів Р18 і Р19, рецептору епідермального фактору росту, бацилярних біополімерів бактерій та лімфоїдних клітин. Результати представлені на рис. 13.8.

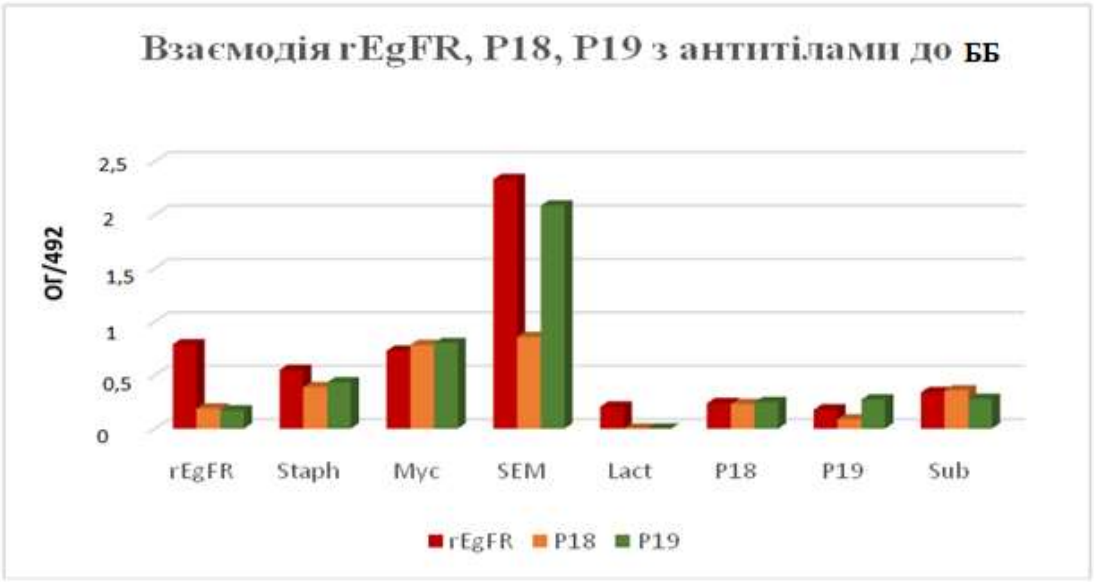


Рисунок 13.8 – Взаємодія rEgFR, P18, P19 з антитілами до ББ і вірусам

Аналізуючи одержані результати досліджень, слід визнати, що рецептор епідермального фактору росту взаємодіє з сироватками до бацилярних біополімерів бактерій та синтезованими пептидами P18 і P19, Тому наступним етапом роботи була перевірка взаємодії сироваток до бацилярних біополімерів бактерій і клітин, та синтезованих пептидів P18 і P19 в діагностичних тест-системах. Результати досліджень представлені в на рис. 13.9.

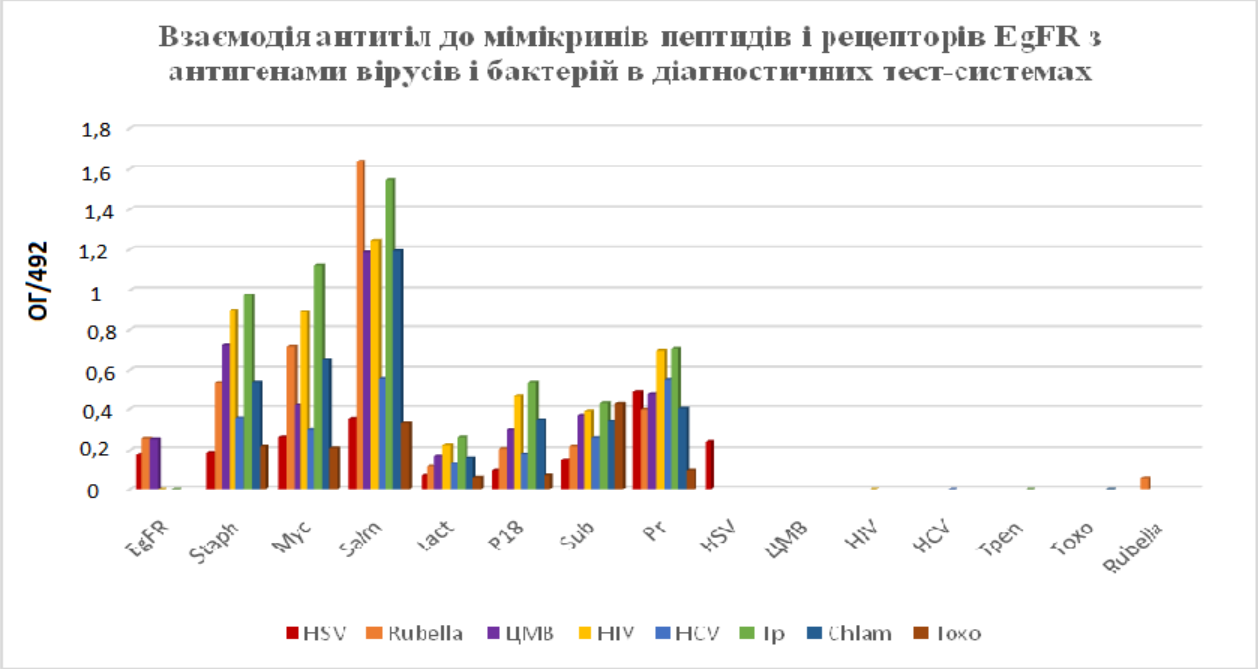


Рисунок 13.9 – Взаємодія антитіл до бацилярних біополімерів пептидів і рецепторів EgFR з антигенами вірусів і бактерій в діагностичних тест-системах

Представлені результати досліджень виявили феномен взаємодії сироваток до рецептору епідермального фактору росту до бацилярних біополімерів бактерій, клітин та синтезованому пептиду Р18 з антигенами в діагностичних системах визначення антитіл до HSV, Rubella, HIV, HCV, ЦМВ, Тр. Це означає, що інфіковані вірусом клітини мають ще один рецептор (REgFR) для взаємодії з вірусом, який можливо відіграє роль в репродукції вірусів, а також в отримані хибно-позитивних результатів при діагностиці.

13.2. Вивчення молекулярно-біологічних властивостей рецептору епідермального фактору росту

Родина білків ErbB включає 4 мембрано-пов'язаних тирозинових протеїнокіназ (типовий представник – рецептор епідермального фактору росту, або ErbB-1, а також ErbB-3 і ErbB-4). Всі вони складаються з позаклітинного ліганд-зв'язуючого домена, трансмембранного домена і внутрішньоклітинного домену. Внутрішньоклітинний домен відповідає за зв'язок з цілим рядом сигнальних білків і має як ліганд-залежні, так ліганд-незалежні активності. HER утворює як гомодимер, так і гетродимери з усіма іншими членами родини ErbB, причому саме HER-2 є найкращим партнером димеризації для інших рецепторів ErbB. Димеризація рецептору призводить до аутофосфорилюванню тирозинових залишків цитоплазматичного домену білка і ініціює ряд сигнальних шляхів.

Зрілий білок складається з 1233 амінокислот, молекулярна маса 137,9 кДа. Включає позаклітинний домен з 7 ділянками N-глікозилірування, трансмембранний фрагмент і цитозольний домен, який складається з протеїнкіназної ділянки і трьох ділянок зв'язування білків.

В базі даних (SmartBlast) провели пошук амінокислотних послідовностей герцептину (Трастузумаб) та порівняли з амінокислотними послідовностями ББ *B. Subtilis*, визначених нами методом Maldi-Toff.

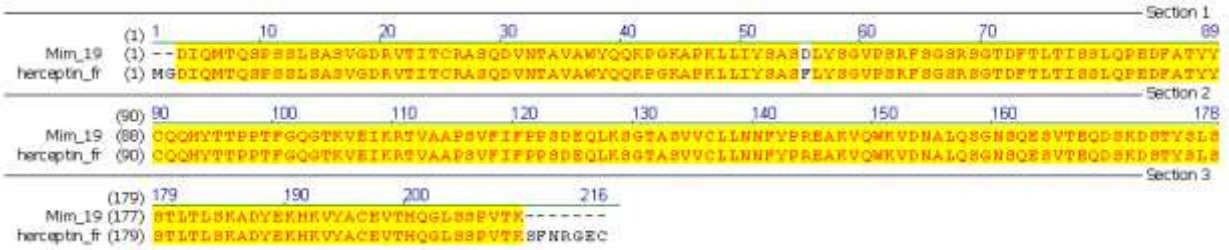


Рисунок 13.10 – Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей бацилярного біополімеру *B. subtilis* і Герцептину

На рис. 13.10 виявлена повна гомологія пептиду бацилярного біополімеру *B. Subtilis* та герцептину по амінокислотним послідовностям 1-207.

На основі амінокислотних послідовностей був зроблений аналіз нуклеотидних послідовностей бацилярного біополімеру. Бацилярний біополімер *B. Subtilis* та герцептину (рис. 13.11) від 1-630 нуклеотидної послідовності.

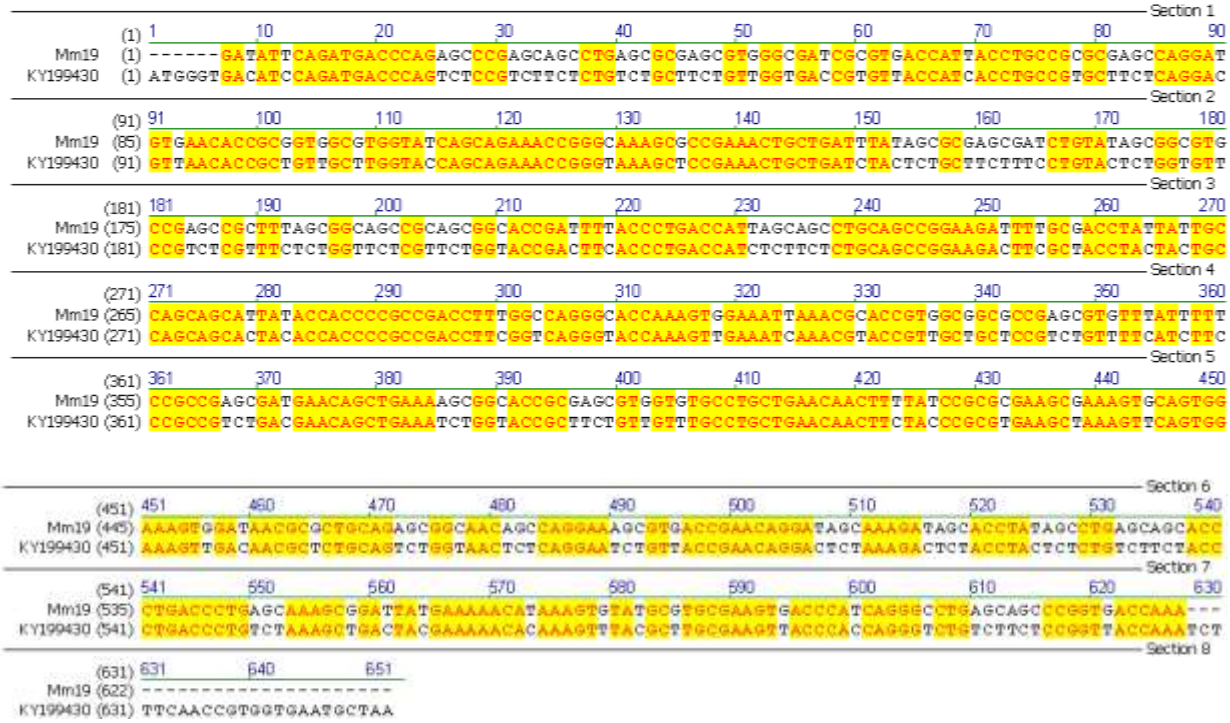


Рисунок 13.11 – Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей бацилярного біополімеру *B. subtilis* і Герцептину

Створені 3Д моделі білків P18 та P19.

Для ідентифікації положення та просторової структури синтезованих пептидів, використано моделі з ProteinDataBank (PDB) ідентифікаційні номери 3ZTJ та 6OGE.

Комп’ютерний аналіз зазначених білкових комплексів дозволив візуалізувати потрібні пептиди та визначитись з їхніми трьохвимірними структурами. (рис 13.12).

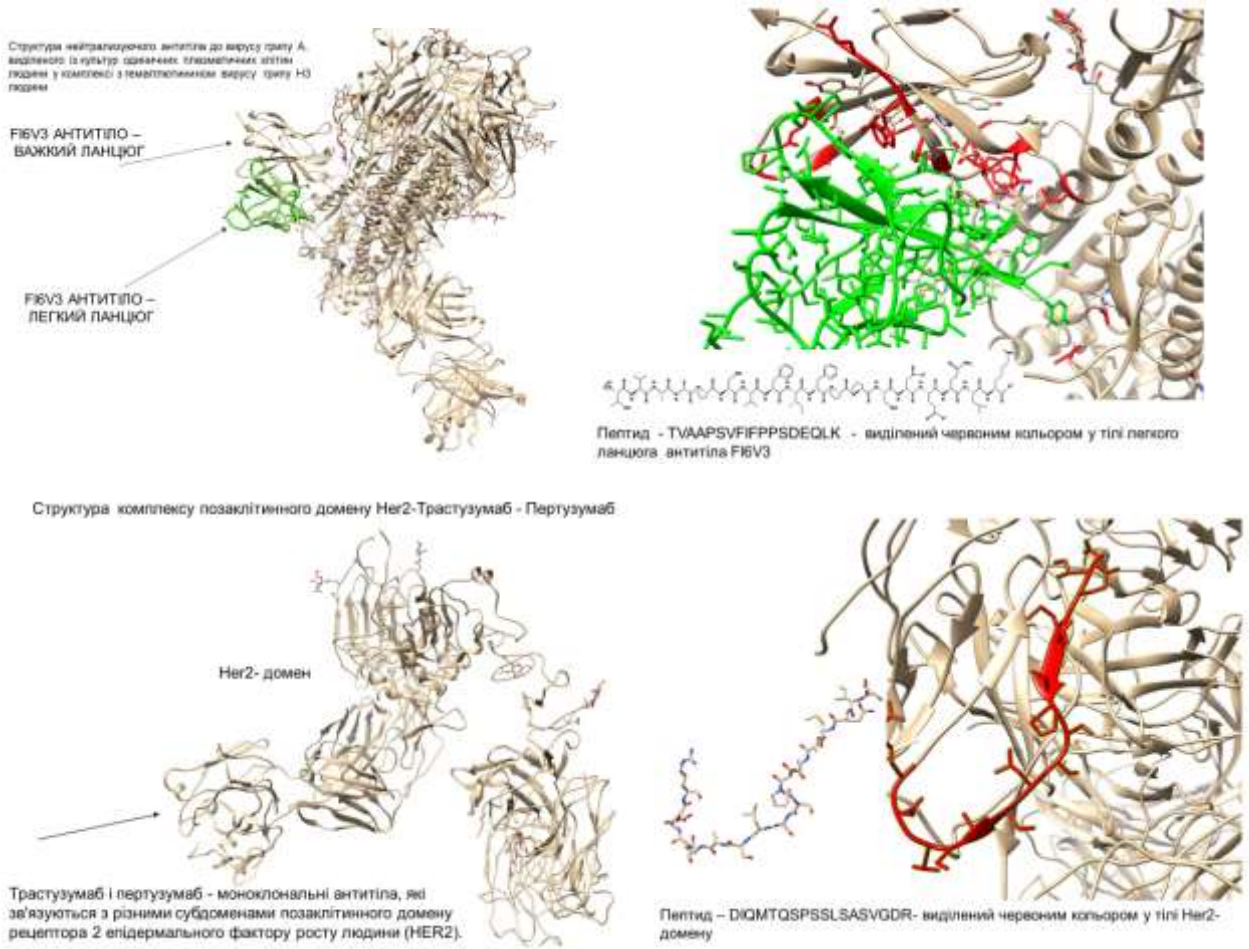


Рисунок 13.12 – 3Д моделі білків Р18 та Р19

Для експериментального підтвердження гомології пептидів *B. Subtilis* з позаклітинним доменом Her-2 Trastuzumab були отримані антиідіотипічні антитіла, які мають «внутрішній образ» антигена і здатні імітувати зовнішний домен EGFR- HER-2 людини тобто трьохмірну структуру антигена.

Визначення HER-2 антигену проводили в тест-системі «HumanEGFR/ ErbB1 ELISAKitforserum, plasma, cell culture supernatants (Sigma).

Кількісне визначення HER-2 проводили в антиідіотипічних сироватках до бацилярних біополімерів (ББ Acholiplasma, ББ lactobacterium, ББ B.Subtilis, ББ Staphilococcus, Р19) рис. 13.13.

Рівень антигену EGFR у тест-системі у антіідіотипічних сироватках до бацилярних біополімерів та пептиду Р19.

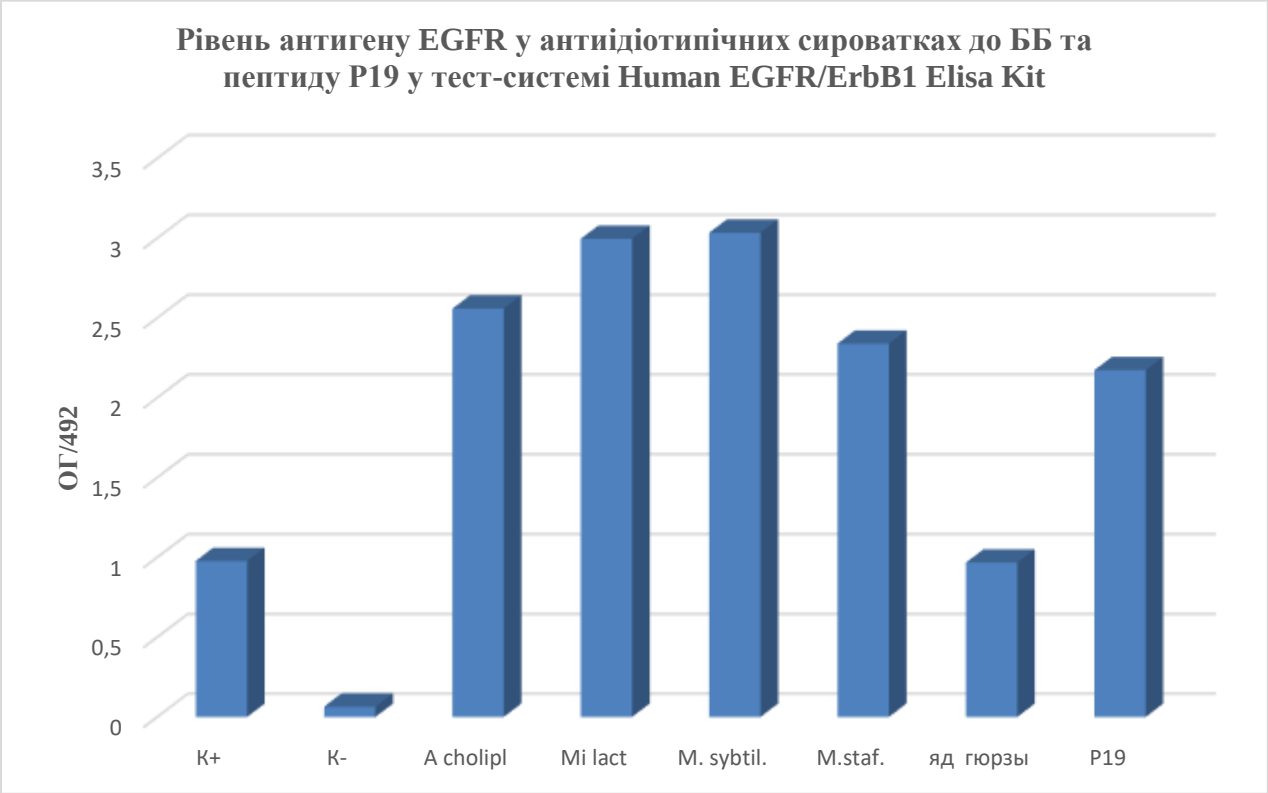


Рисунок 13.13 – Рівень антигену до рецептору епідермального фактору росту у антіідіотипічних сироватках до бацилярних біополімерів

Так як, у попередніх дослідженнях нами була показана гомологія між бацилярними біополімерами та вірусами у тест системі «HumanEGFR/ ErbB1 ELISAKit» for serum, plasma, cell culture supernatant sandur (Sigma), були перевірені і гіперімунні сироватки до вірусів (рис. 13.14). Імуноферментним аналізом було підтверджено, що антиідіотипічні сироватки до бацилярних біополімерів, а також до вірусів герпесу Зостер та вірусу грипу фіксують високий рівень антигену рецептору епідермального фактору росту, сироватки до ВЕБ, HIV, HCV незначний.

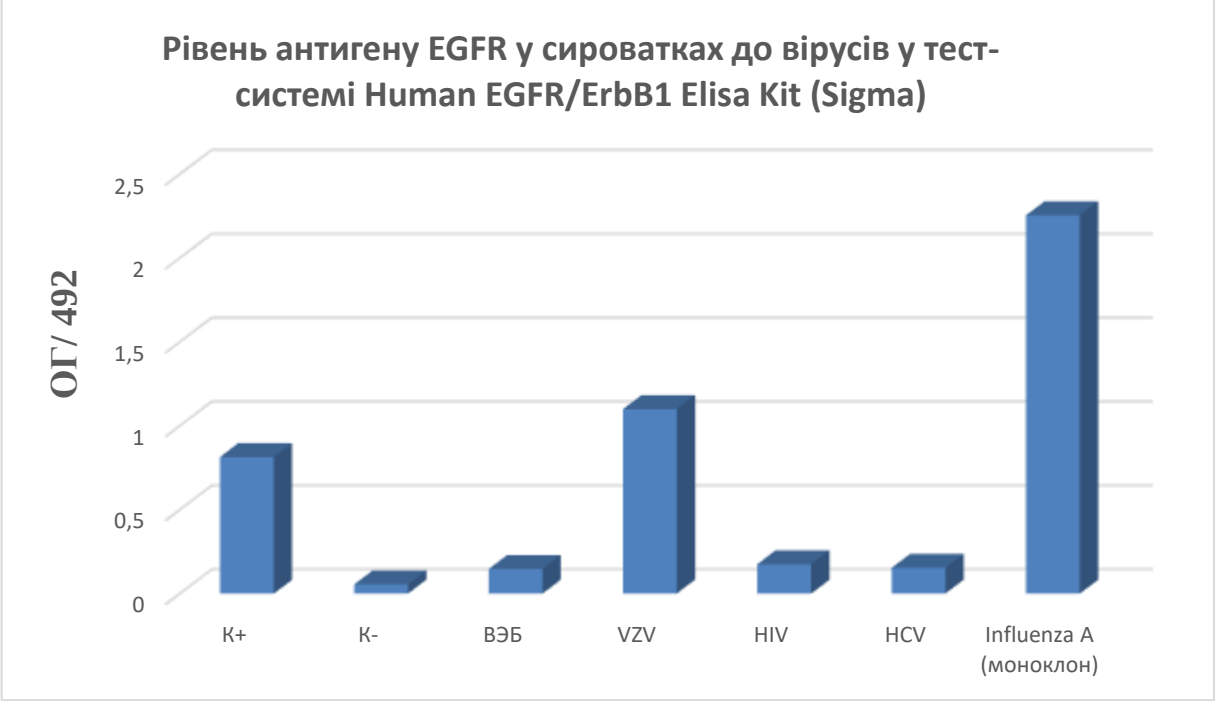


Рисунок 13.14 – Рівень антигену рецептору епідермального фактору росту, сироватки до ВЕБ, HIV, HCV

13.3. Вплив бацилярних біополімерів із стафілококу та Субаліну на синтез ДНК

Реплікація ДНК є одним з найважніших процесів життєдіяльності клітини. Регуляція цього процесу представляє інтерес з однієї сторони для фундаментальної науки, а з іншої – для медицини, так як реплікативні системи вважаються важливішими мішенями для противірусної, антимікробної та протипухлинної терапії.

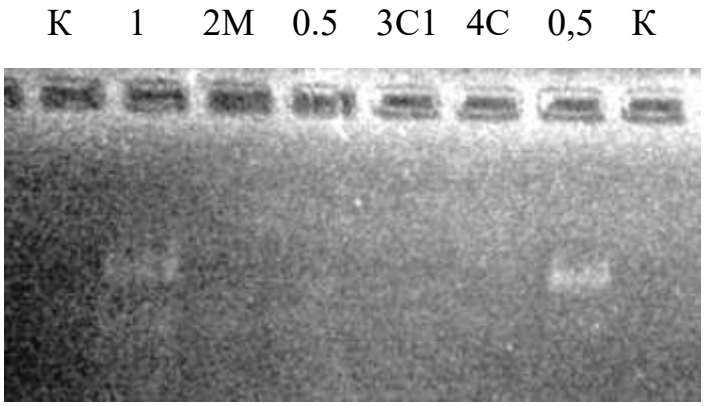


Рисунок 13.15 – Бацилярні біополімери стафілококу і Субаліну

Так як бацилярні біополімери із бактерій мають гомологію з пептидами вірусів, було цікаво виявнити відношення бацилярних біополімерів до ДНК та їх вплив на реплікацію ДНК. В якості модельно реплікативної системи використовувалася полімеразна ланцюгова реакція.

Бацилярні біополімери стафілококу (доріжки 1 і 2) і Субаліну (доріжки 3 і 4) в концентрації 40 мкг/мл і 20 мкг/ мл повністю інгібують синтез фрагментів ДНК в ПЛР. При зниженні концентрації в 2 і в 4 рази ефективність інгібування значно падає.

Вплив бацилярних біополімерів стафалококу та Субаліну на ДНК досліджувалася з використанням плазміди pTZ19r.

Умови інкубації ДНК з бацилярними біополімерами стафілококу та Субаліну: 1 час 15мин., використовувалися концентрації – 160, 80, 40 и 20 мкг/мл, ТБЕ буфер (бацилярний біополімер стафілококу – доріжки 1, 2, 3, 4 и Субаліну –доріжки 5,6,7,8). Кількість ДНК в 10 мкл – 250 нг. Електрофорез: ток 13 мА, 2,5 год.

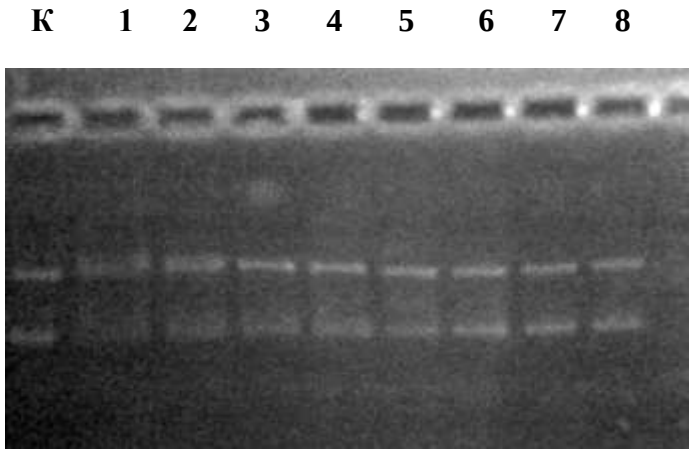


Рисунок 13.16 – Вплив бацилярних біополімерів стафілококу і Субаліну на ДНК в ПЛР

Як видно із представленої електрофореграми бацилярний біополімер стафілококу при високих концентраціях зв’язується з надрізаною формою ДНК, що призводить до зміни її рухомості. Бацилярний біополімер Субаліну скоріше всього не зв’язується з ДНК.

Висновки до розділу 13

На заключення можна підкреслити, що обидва бацилярні біополімери (із стафілококу та Субаліну) ефективно і достовірно інгібують синтез ДНК в модельній системі репликації (ПЛР), але поки ми не можемо судити про його механізм. Можливо бацилярний біополімер, маючи при високих концентраціях, спорідненість до ДНК, може перешкоджати утворенню білково-нуклеїнового комплексу полімераза-ДНК.

14. АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ БАЦИЛЯРНИХ БІОПОЛІМЕРІВ

14.1. Вплив бацилярних біополімерів різного походження на репродукцію сурогатного вірусу – вірусу бичачої вірусної діареї (BVDV)

Визначення максимально переносної концентрації

Для визначення максимально переносної концентрації (МПК) препаратів бацилярних біополімерів використовували клітини MDBK. В дослідах застосовували не менш десяти рядів лунок в плашках з культурою клітин для кожного розведення препарату в поживному середовищі. Плашки з культурами клітин інкубували при 37°С з подачею 5 % CO_2 на протязі 5 днів. Щодня проводили дослідження дослідних та контрольних культур з метою встановлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД).

Ступінь ЦПД визначали по зміні морфології клітин (округлення, зморщування клітин, відторгнення від поверхні лунок продегенерованих клітин) по 4+ плюсовій системі від + до ++++. За максимально переносну концентрацію (МПК) препарату приймали його найбільшу кількість, яка не викликала дегенерацію клітин.

Результати визначення МПК препаратів бацилярних біополімерів

№ 1	ББ Staph.aureus	> 100 мкг/мл
№ 2	ББ із коринебактерій	> 100 мкг/мл
№ 3	ББ із мікобактерій	> 1:10
№ 4	ББ із Bac.subt.	> 1:10
№ 5	ББ із Cand.albicans	> 1:10

Визначення хіміотерапевтичного індексу

Хіміотерапевтичний індекс (ХТІ) препаратів бацілярних біополімерів стосовно BVDV визначали шляхом встановлення співвідношення МПК до мінімально активної концентрації (МАК), що являє собою мінімальну кількість препарату, яка гальмує розвиток вірусспецифічної ЦПД на 50 %. Для визначення МАК тест-вірус у дозі 100 $ТЦД_{50}$/0,1 мл вносили в культуру клітин MDBK і

інкубували протягом 1 год. при 37° С. Після адсорбції вірусу на клітинах його видаляли і клітини відмивали живильним середовищем, після чого в підтримуюче середовище (RPMI-1640 + 2% фетальної сироватки) вносили препарати у розведеннях від 1:20 до 1:1280. Відсутність ЦПД у досліді, при наявності його в контролі вірусу, а також різниця інфекційного титру в досліді у порівнянні з контролем вірусу герпесу, дозволили виявити МАК препаратів.

Результати визначення інфекційного титру BVDV після обробки бацилярним біополімером представлені на рисунках 14.1 – 14.5

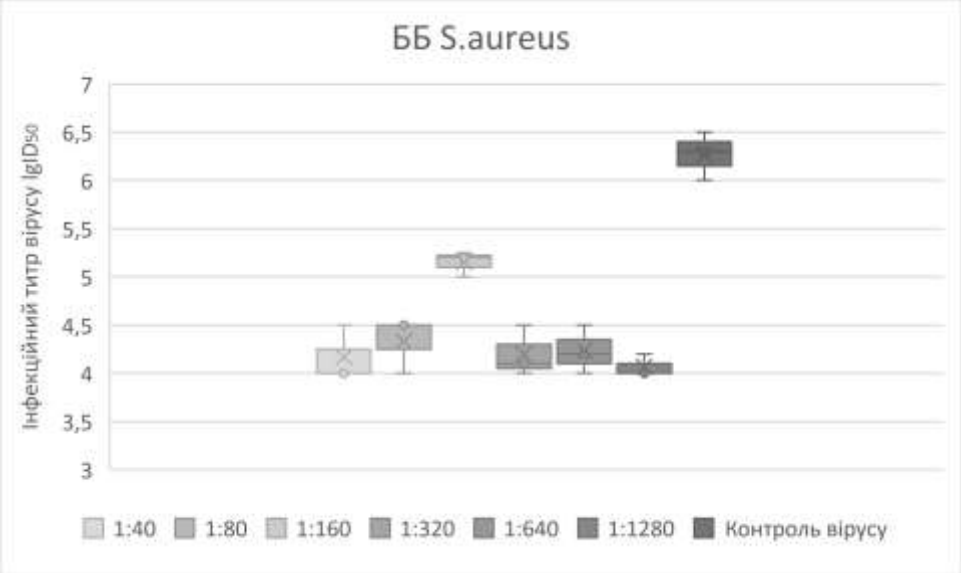


Рисунок 14.1 – Інфекційний титр BVDV після обробки бацилярним біополімером *S.aureus*

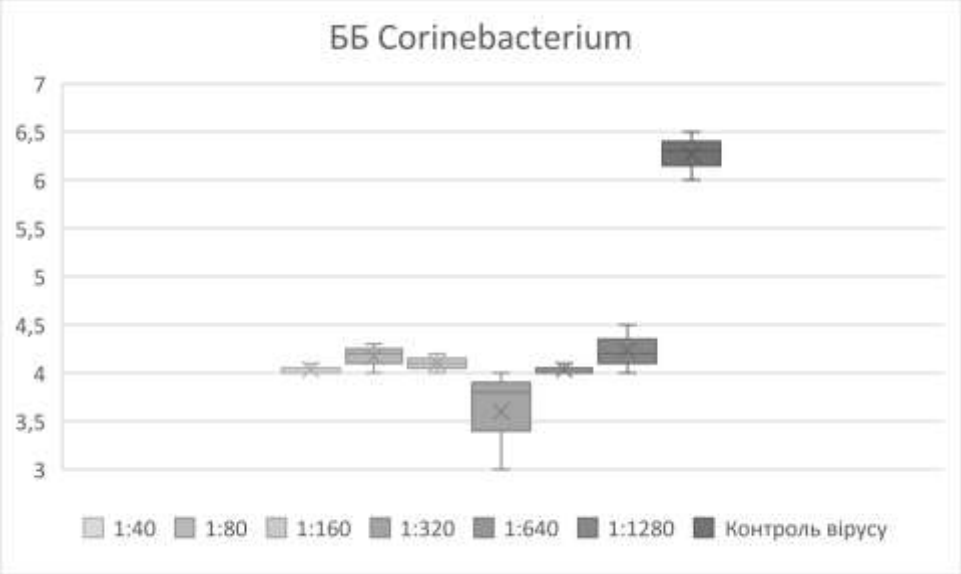


Рисунок 14.2 – Інфекційний титр BVDV після обробки бацилярним біополімером *Corinebacterium*

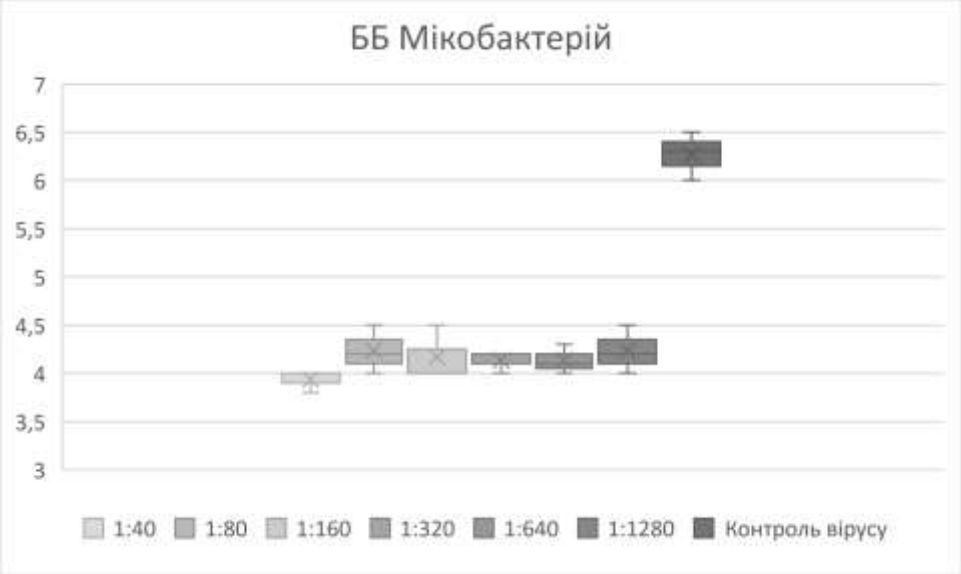


Рисунок 14.3 – Інфекційний титр BVDV після обробки бацилярним біополімером *мікобактерій*

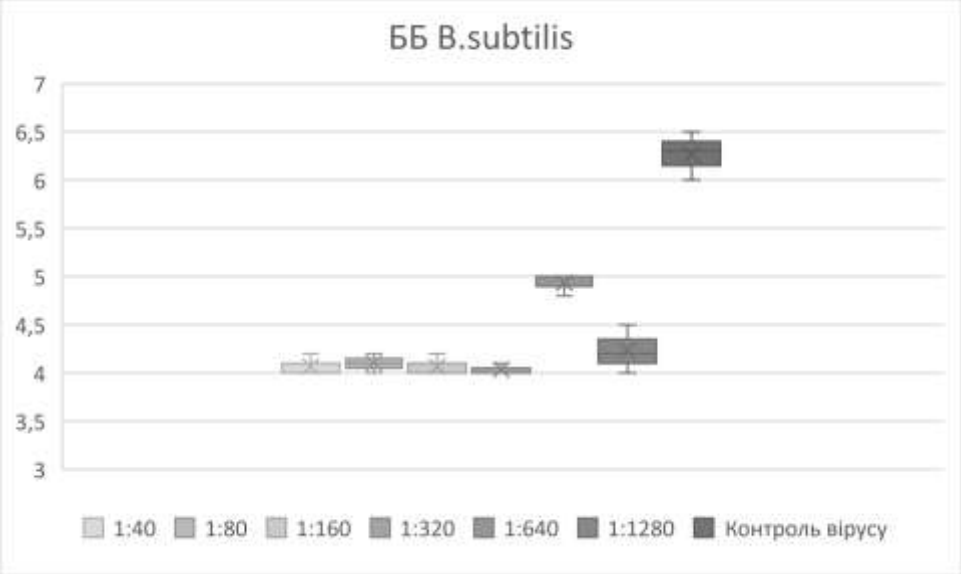


Рисунок 14.4 – Інфекційний титр BVDV після обробки бацилярним біополімером *B.subtilis*

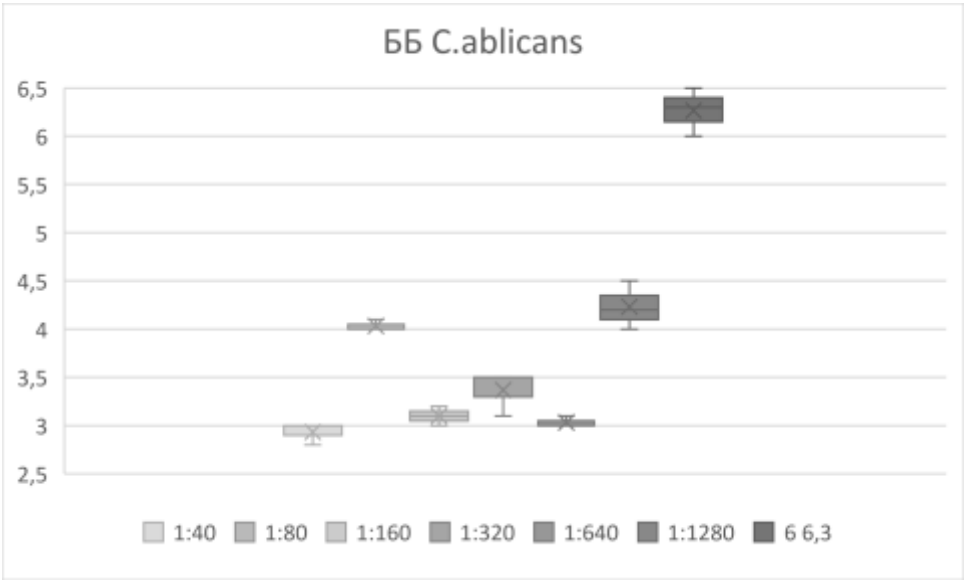


Рисунок 14.5. Інфекційний титр BVDV після обробки бацилярним біополімером *C.ablicans*

Таблиця 14.1 – Результати визначення МПК, МАК і ХТІ препаратів бацилярних біополімерів

Препарат	МПК (розведення препарату або конц., мкг\мл)	МАК (розведення препарату або конц., мкг\мл)	ХТІ Відношення МПК\МАК
1	не токсичний	1:1280 (0,08)	1280
2	не токсичний	1:1280 (0,08)	1280
3	не токсичний	1:1280 (0,08)	1280
4	не токсичний	1:1280 (0,08)	1280
5	не токсичний	1:1280 (0,08)	1280

Досліджені препарати бацилярних біополімерів із бактерій не токсичні, мають високий індекс селективності або хіміотерапевтичний індекс по відношенню до сурогатного вірусу гепатиту С, тобто препарати бацилярних біополімерів можна віднести до високоефективних.

14.2. Вплив бацилярних біополімерів на грипозну інфекцію

Бацилярні біополімери мають антигенну спорідненність з гемаглютиніном вірусу грипу та сіалоспецифічні рецептори, тому ми продовжили свої дослідження на моделі вірусу грипу.

Для визначення антигрипозної активності препарату бацилярних біополімерів із *Staph.aureus in vivo* використовували модель грипозної пневмонії у мишей.

Для цієї мети був використаний штам вірус грипу A/FM/1/47 (H_1N_1), адаптований до легенів білих мишей, який пройшов 15 пасажів на мишах, інфекційний титр – 4,0 lg LD_{50}, 100 % летальність мишей спостерігалася на протязі 5 діб.

Дослідження по визначенню антигрипозної активності бацилярних біополімерів *in vivo* проводили за профілактичною та лікувальною схемами, Неінбредним мишам внутрішньочеревно вводили 0,1 мл препарату(одна група мишей) за 24 години до інтраназального зараження вірусом грипу, адаптованого до легеневої тканини мишей, в дозі 10 LD_{50} (профілактична схема) і через 1 годину після зараження вірусом грипу (лікувальна схема). Одночасно ставили контроль вірусу грипу та препарату таміфлю для профілактичної та лікувальної схеми дослідів. Облік ефективності дії препарату здійснювали по індексу ефективності пригнічення летальності та інфекційного титру вірусу грипу в легеневій тканині мишей. Результати дослідження представлені в таблиці 14.2.

Таблиця 14.2. – Ефект профілактичної та лікувальної дії препарату бацилярного біополімеру на моделі експериментальної грипозної інфекції *in vivo*

Препарат	Кількість мишей	Доза вірусу LD_{50}	Із них загинуло		КЗ	ІЕ	Титр (lg) вирусу грипу в легенях мишей
			Всього	%			
Профілактична схема							
Бацилярний біополімер із стафілококу	10	10,0	0	0	-	100	1,0
Таміфлю	10	10,0	2	20,0	5,0	80	1,5
Вірус грипу	12	10,0	12	100,0	-	-	4,0
Лікувальна схема							
Бацилярний біополімер із стафілококу	10	10,0	2	20,0	5,0	80,0	2,0
Таміфлю	10		3	30,0	3,3	77,0	2,5
Вірус грипу	10		10	100,0			4,0

Аналізуючи представлені в таблиці 14.2 дані, слід відзначити, що препарат Бацилярний біополімер захищає мишей від летальної грипозної інфекції при профілактичній та лікувальній схемах введення.

Індекс ефективності препарату Бацилярний біополімер із стафілококу при одноразовому введенні препарату при лікувальній схемі введення був на рівні 80,0, а пригнічення репродукції вірусу грипу в легеневій тканині дорівнювало 2,0 lg. При профілактичній схемі введення препарату індекс ефективності дорівнював 100,0, а пригнічення репродукції вірусу грипу – 3,0 lg ID_{50}.

Визначення мішеней взаємодії бацилярних біополімерів із клітин та бактерій проводили шляхом аналізу молекулярно-генетичної структури вірусів грипу і вірусів грипу, оброблених препаратами методом ПЛР з розробленими авторами оригінальними праймерами і аналізу білкової структури цих вірусів. Для цієї мети необхідно було отримати в великій кількості по 100 мл (5 матраців на 75мл) кожного варіанта вірусу: №1-вірус грипу A/PR_8, №2- вірус грипу A/PR_8 + ББ HeLa, №3 – вірус грипу A/PR_8 + ББ *Corynebacterium* №4 - вірус грипу A/PR_8 + ББ *B.Subtilis*. Ці чотири пули вірусів концентрували методом діференціального центрифугування, а потім проводили очистку вірусу в градієнті сахарози. В результаті з 100 мл кожного пулу віруса було отримано 1,0 – 1,5 мл концентрованого, очищеного вірусу. Характеристика варіантів вірусів грипу (обробленого препаратами і необробленого препаратами) представлена в таблиці 14.3.

Таблиця 14.3 – Характеристика варіантів вірусів грипу

Назва варіанту вірусу грипу	**ГА активність**	**Інфекційний титр в $lgID_{50}$**
A / PR_8	>1:2048	10,5
A / PR_8 + ББ HeLa	1:1024	8,0
A / PR_8 + ББ Corynebacterium	1:256	6,5
A / PR_8 + ББ B.Subtilis	1:256	7,5

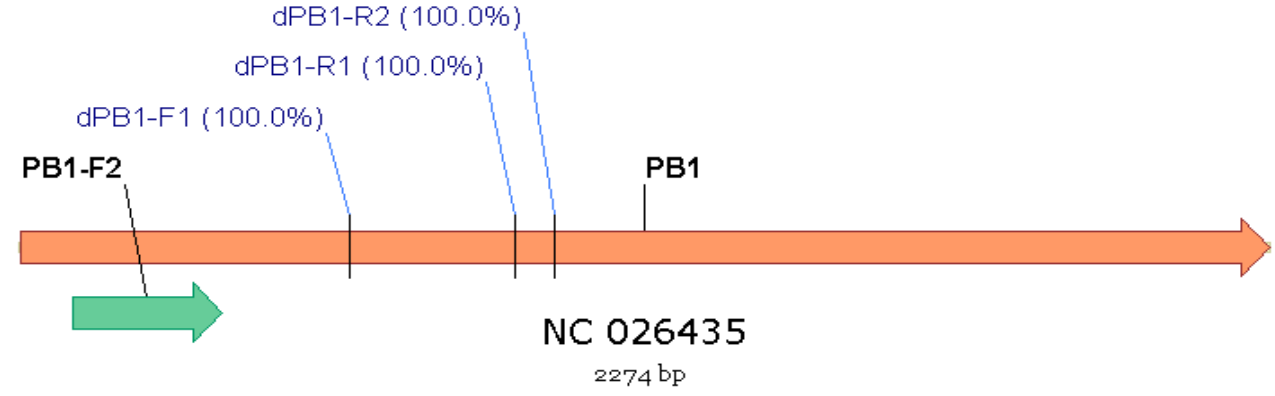
Для проведення молекулярно-генетичного аналізу були розроблені оригінальні праймери до генів PB_1, PB_2, M_1+M_2 і нейрамінідази, одним з авторів цього проекту є Дерябін О.М.

Influenza A virus (A/California/07/2009(H1N1))

dPB1-F 5'- **CACGCAAAGAACAATAGGGAAG** -3' %GC 45.5 Therm. Tm 53.3

dPB1-R2 5'- **CTCGGGTTGATTTCTGGTGAT** -3' %GC 47.6 Therm. Tm 53.0

dPB1-R1 5'- **CTTAGTGTTGTCCCCAGTGATTG** -3' %GC 47.8 Therm. Tm 52.9 фрагмент - 394 п.н.(R2) и 325 п.н. (R1)



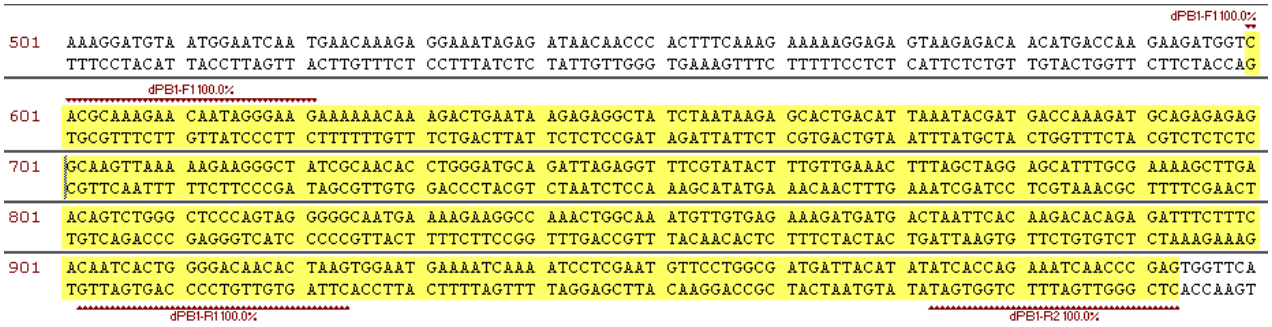
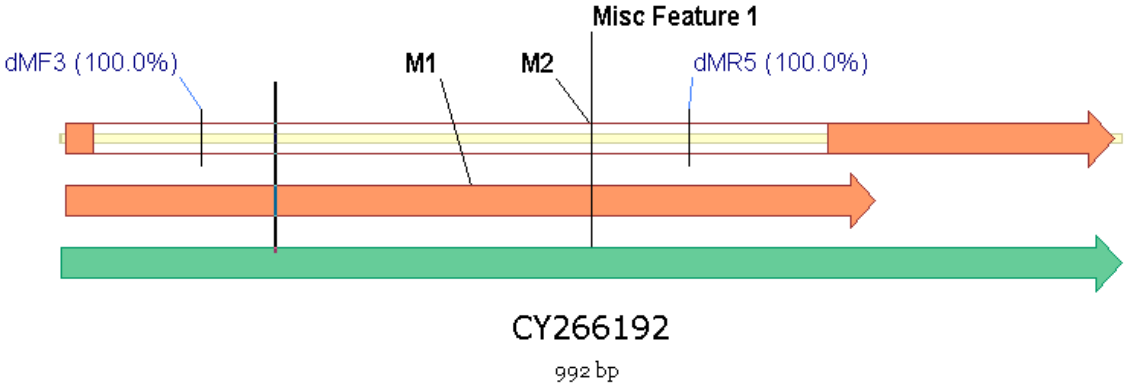


Рисунок 14.6 – Праймери до гену PB_1

Influenza A virus (A/California/07/2009(H1N1)) matrix protein 2 (M2) and matrix protein 1 (M1) genes



dMF3 5'-**TGGAATGGCTAAAGACAAGACC**-3'

%GC	45.5
Therm. Tm	52.6

dMR5 5'-**CTCCGCTGCCTGTTCACTC**-3'

%GC	63.2
Therm. Tm	53.0

Фрагмент - 476 п.н.

```
1    AAGATGAGTC TTCTAACCGA GGTCGAAACG TACGTTCTTT CTATCATCCC GTCAGGCCCC CTCAAAGCCG AGATCGCGCA GAGACTGGAA AGTGTCTTTG
     TTCTACTCAG AAGATTGGCT CCAGCTTTGC ATGCAAGAAA GATAGTAGGG CAGTCCGGGG GAGTTTCGGC TCTAGCGCGT CTCTGACCTT TCACAGAAAC
                                                 dMF3 100.0%
101  CAGGAAAGAA CACAGATCTT GAGGCTCTCA TGGAATGGCT AAAGACAAGA CCAATCTTGT CACCTCTGAC TAAGGGAATT TTAGGATTTG TGTTCACGCT
     GTCCTTTCTT GTGTCTAGAA CTCCGAGAGT ACCTTACCGA TTTCTGTTCT GGTTAGAACA GTGGAGACTG ATTCCCTTAA AATCCTAAAC ACAAGTGCGA
201  CACCGTGCCC AGTGAGCGAG GACTGCAGCG TAGACGCTTT GTCCAAAATG CCCTAAATGG GAATGGGGAC CCGAACAACA TGGATAGAGC AGTTAAACTA
     GTGGCACGGG TCACTCGCTC CTGACGTCGC ATCTGCGAAA CAGGTTTTAC GGGATTTACC CTTACCCCTG GGCTTGTTGT ACCTATCTCG TCAATTTGAT
301  TACAAGAAGC TCAAAAGAGA AATAACGTTC CATGGGGCCA AGGAGGTGTC ACTAAGCTAT TCAACTGGTG CACTTGCCAG TTGCATGGGC CTCATATACA
     ATGTTCTTCG AGTTTTCTCT TTATTGCAAG GTACCCCGGT TCCTCCACAG TGATTCGATA AGTTGACCAC GTGAACGGTC AACGTACCCG GAGTATATGT
401  ACAGGATGGG AACAGTGACC ACAGAAGCTG CTTTTGGTCT AGTGTGTGCC ACTTGTGAAC AGATTGCTGA TTCACAGCAT CGGTCTCACA GACAGATGGC
     TGTCCTACCC TTGTCACTGG TGTCTTCGAC GAAAACCAGA TCACACACGG TGAACACTTG TCTAACGACT AAGTGTCGTA GCCAGAGTGT CTGTCTACCG
501  TACTACCACC AATCCACTAA TCAGGCATGA AAACAGAATG GTGCTGGCTA GCACTACGGC AAAGGCTATG GAACAGATGG CTGGATCGAG TGAACAGGCA
     ATGATGGTGG TTAGGTGATT AGTCCGTACT TTTGTCTTAC CACGACCGAT CGTGATGCCG TTTCCGATAC CTTGTCTACC GACCTAGCTC ACTTGTCCGT
                                                                                                 dMR5 100.0%
601  GCGGAGGCCA TGGAGGTTGC TAATCAGACT AGGCAGATGG TACATGCAAT GAGAACTATT GGGACTCATC CTAGCTCCAG TGCTGGTCTG AAAGATGACC
     CGCCTCCGGT ACCTCCAACG ATTAGTCTGA TCCGTCTACC ATGTACGTTA CTCTTGATAA CCCTGAGTAG GATCGAGGTC ACGACCAGAC TTTCTACTGG
     dMF5 100.0%
701  TTCTTGAAAA TTTGCAGGCC TACCAGAAGC GAATGGGAGT GCAGATGCAG CGATTCAAGT GATCCTCTCG TCATTGCAGC AAATATCATT GGGATCTTGC
     AAGAACTTTT AAACGTCCGG ATGGTCTTCG CTTACCCTCA CGTCTACGTC GCTAAGTTCA CTAGGAGAGC AGTAACGTCG TTTATAGTAA CCCTAGAACG
801  ACCTGATATT GTGGATTACT GATCGTCTTT TTTTCAAATG TATTTATCGT CGCTTTAAAT ACGGTTTGAA AAGAGGGCCT TCTACGGAAG GAGTGCCTGA
     TGGACTATAA CACCTAATGA CTAGCAGAAA AAAAGTTTAC ATAAATAGCA GCGAAATTTA TGCCAAACTT TTCTCCCGGA AGATGCCTTC CTCACGGACT
901  GTCCATGAGG GAAGAATATC AACAGGAACA GCAGAGTGCT GTGGATGTTG ACGATGGTCA TTTTGTCAAC ATAGAGCTAG AGTAAAAAAC TA
     CAGGTACTCC CTTCTTATAG TTGTCCTTGT CGTCTCACGA CACCTACAAC TGCTACCAGT AAAACAGTTG TATCTCGATC TCATTTTTTG AT
```

Рисунок 14.7 – Праймери до генів M_1+M_2

Перевірка роботи праймерів до генів PB1, M1+M2 виявила їх специфічність.

Таблиця 14.4 – Оригинальні праймери для виявлення та ідентифікації вірусу грипу людини (H1N1) методом ПЛР в режимі реального часу у класичному варіанті

	Прай-мер	5’ - mod	Последовательность	3’ - mod	Tm	% GC	Ген
1	dPB2-Probe	**FAM**	TGGGAGATCAATGGCCCTGAGTCAGTGC	**BHQ1**	69,2	63	**PB2** (Real Time PCR & Classic PCR)
2	dPB2-F2	-	TCCCGAAGAAGTCAGTGAAACG	-	50,0	54,3	
3	dPB2-R1	-	GCTTCTGGTTGCCTTAGGGAC	-	57,1	60	

Таблиця 14.5 – Оригінальні праймери для виявлення та ідентифікації генетичних елементів вірусу грипу типу А (H1N1)

n\n	Прай-мер	Послідовність (5'-3')	Tm	%GC	Фрагмент п.н.	Таргетний ген
3	dHA-R2	**CCATCCATCTATCATTCCAGTCCA**	56,5	45,8	**658 660**	Гем-аглюти-наза
4	dHA-F1	**AMCAAAGGWGTAACGGCAGCAT**	56,0	47,7		
5	dHAF-PR	**CAAMGGAGTAACGGCRGCAT**	55,8	50,0		

де: M=A/C , R =A/C та W=A/T

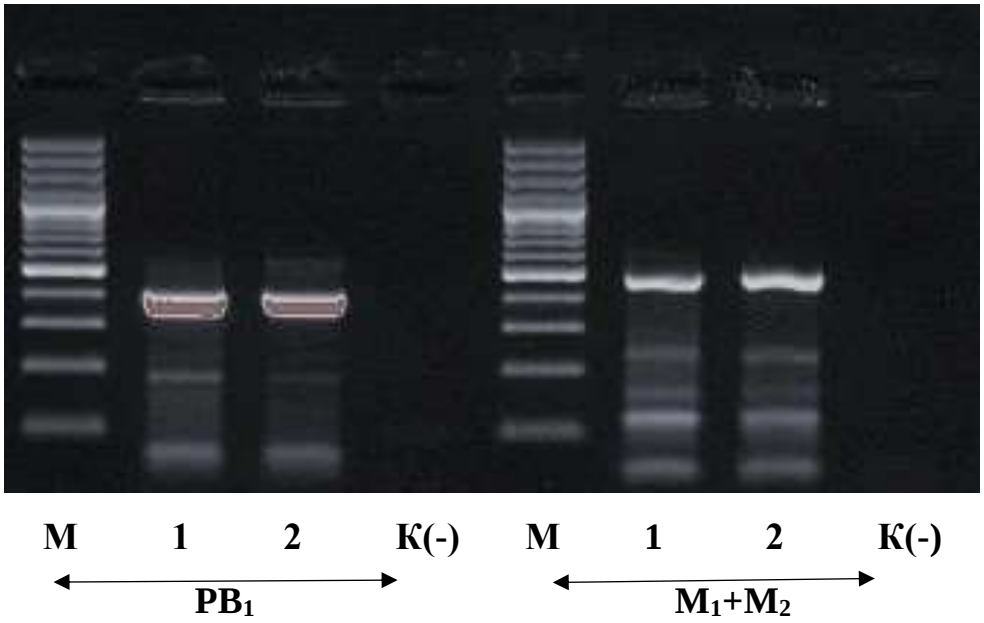
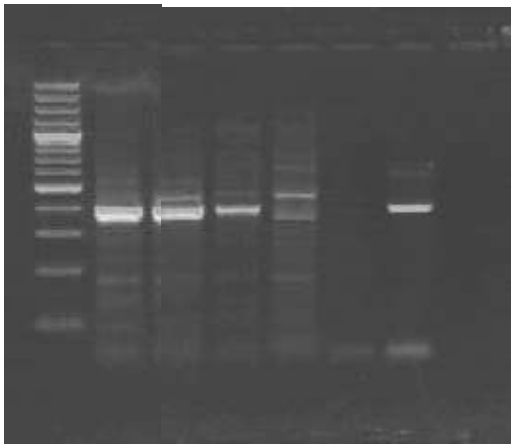


Рисунок 14.8 – Виявлення таргетних генів PB1 и M_1+M_2 вирусу грипу. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами dPB1/dPB2 та dMF/dMR (Ta=55 °C), *Варіанти:* №1 – A/FM/H_1N_1, №2 – A/PR_8 + ББ HeLa, “К – ” негативний контроль, М- маркер розмірів фрагментів ДНК (“QuickLoad®Purple 100 bpDNALadder” BioLabs, UK)
Матеріали концентровані та очищені зональним центрифугуванням.

PB1 H_1N_1 (**394** п.н.)



M1M2 (**476)** п.н.

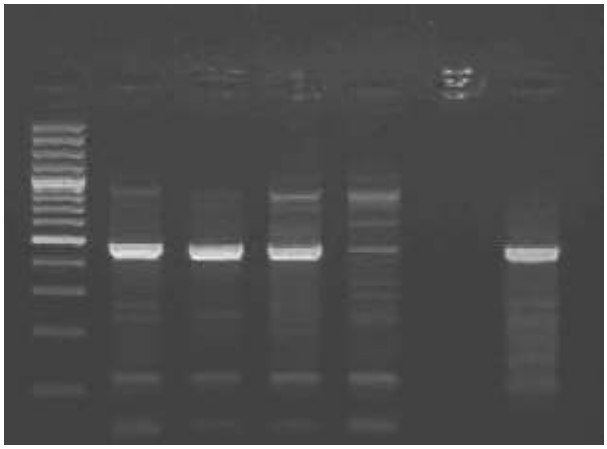


Рисунок 14.9 – Варіанти: 1 – А-PR8; 10 – А-PR8 + ББ HeLa (1:20); 11 – А-PR8 + ББ *Corinebact* (1:20); 12 – А-PR8 + ББ *B.Subtilis* (1:20).

PB2 H1N1

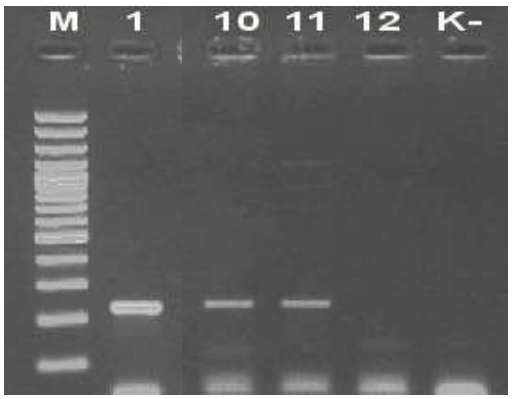


Рисунок 14.10 – Розмір фрагменту ДНК PB2 – **229** п.н. *Варіанти*: 1 – А-PR_8; 10 – А-PR_8 + ББ HeLa (1:20); 11 – А-PR_8 + ББ *Corinebact* (1:20); 12 – А-PR_8 +ББ *Subtilis* (1:20).

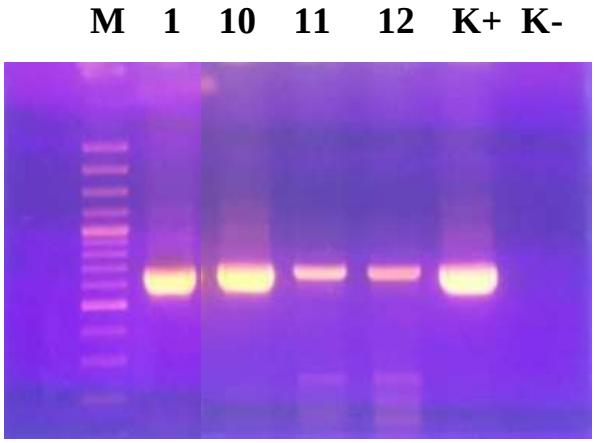


Рисунок 14.11 – *Варіанти*: 1 – А-PR_8; 10 – А-PR_8 + ББ HeLa (1:20); 11 – А-PR_8 + ББ *Corinebact* (1:20); 12 – А-PR_8 + ББ *Subtilis* (1:20).

При аналізі представлених електрофореграм виявлена повна блокада генів вірусу грипу А-PR-8 . PB_1, PB_2, М та інгібіція гену гемаглютиніну бацилярним біополімером *B.Subtilis* та інгібіція генів PB_1, PB_2, НА бацилярним біополімером *Corynebacterium*.

14.3. Дослідження антивірусної активності зразків препаратів на моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС)

Коронавіруси трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) пасували на різних культурах характеризували по інфекційному титру. Результати представлені в таблиці 14.6.

Таблиця 14.6. – Інфекційний титр вірусу ТГС в культурах клітин

Культура клітин	Інфекційний титр БОЕ
ST_5	$3,9x10^7$ БОЕ/мл
$СНЕВ_{100}$	$3,1x10^7$ БОЕ/мл
$НСП_{100}$	$4,3x10^7$ БОЕ/мл
$КЩЗ_{100}$	$1,4x10^8$ БОЕ/мл

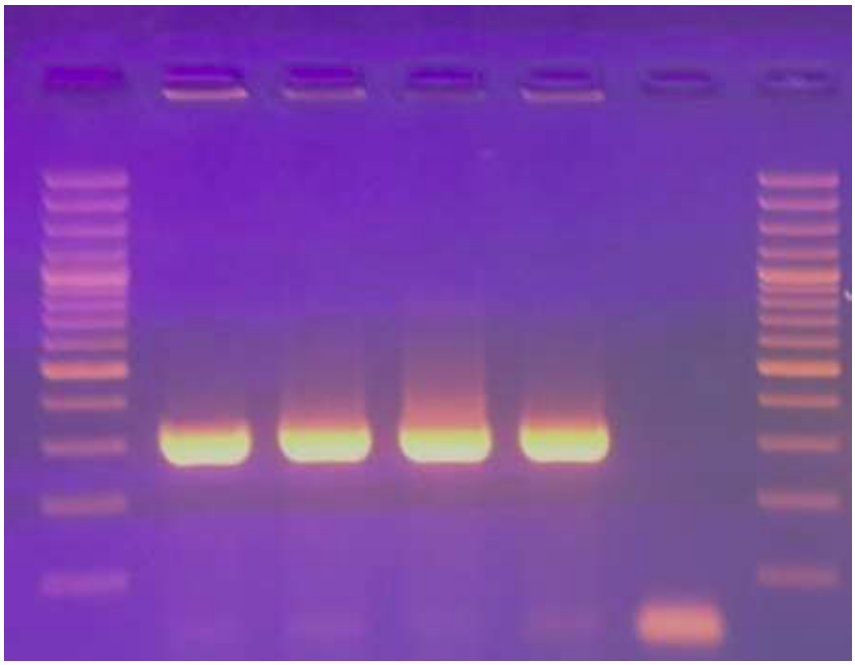
Рисунок 14.12 – Негативні колонії вірусу трансмісивного гастроентериту свиней шт. D_{52-100} КЩЗ

Реакцію віруснейтралізації проводили в 96 лункових планшетах "Costar" (США), за методом H.Laude, з використанням в якості позитивного контролю референтної гіперімунної сироватки N6926, цього ж автора.

Виявлення РНК вірусу трансмісивного гастроентериту свиней шт. D52 методом зворотної-полімеразної цепної реакції (ЗТ-ПЛР)

Виділення РНК виконували за допомогою набору «Рибо-сорб» згідно з інструкцією виробника (АмпліСенс, РФ).

Реакцію зворотної транскрипції виконували за допомогою набору "RevertAidTM H MinusFirstStrandcDNASynthesisKit" згідно з інструкцією виробника (ThermoScientific, Литва). Для ПЛР були використані специфічні до гену нуклеопротеїна олігонуклеотидних праймерів наступної послідовності: прямий Uni_1 (5'-TGCACTGATCAATGTGCTAG-3 ') і зворотній Uni_2 (5'-TGAAAACACTGTGGCACCCTT-3"). Фрагмент, ампліфікованого розміром 309 П.М. .. М - маркер "100 bpPlus DNA Ladder" ("ThermoFisherScientific", Литва). Вірус ТГС з різних культур пропасірували в культурі СНЕВ і провели аналіз продуктів ампліфікації проводився шляхом розподілу фрагментів ДНК в 1,5% гелі агарози.



М 1 3а 4 6а К- М

Рисунок 14.13 – Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації вірусу трансмісивного гастроентериту свиней з праймером до гену нуклеопротеїна олігонуклеотидних праймерів наступній послідовності: прямий Uni_1 (5'-TGCACTGATCAATGTGCTAG-3') і зворотній Uni_2 (5'-TGAAAACACTGTGGCACCCTT-3 "). Фрагмент, ампліфікованого розміром 309 П.М. .. М - маркер "100 bpPlus DNA Ladder" ("ThermoFisherScientific", Литва)., М - маркер розмірів фрагментів РНК, №1 - штам коронавіруса Д52 із кк НСП, №3а - штам коронавіруса Д52 із кк СНЕВ, №4 - Д52 в культурі клітин ST- тестикул поросят, №6а - Д52 в культурі щитовидної залози свиней (КВЩ)

Електронно-мікроскопічна характеристика

Вихідний препарат ТГС

Для трансмісійної єлектронной мікроскопії зразки напосились на інертну вуглецеву підкладку товщиною 10А та розміщалися на опорній ситці. Реєстрація зображення проводилась при низьких прискорючих напрумаг з метою запобігання пошкодження препаратів електронним променем. (Для всіх досліджених зразків підготовка проб однакова).

На зображеннях зафиксовано частки препарату ТГС, форма часток сферична, розмір часток 75-200нм. (на зображенні сірі сферичні частки та їх коагуляти) переважно розташовані по краях субстату (фото мікроструктура ТГС).

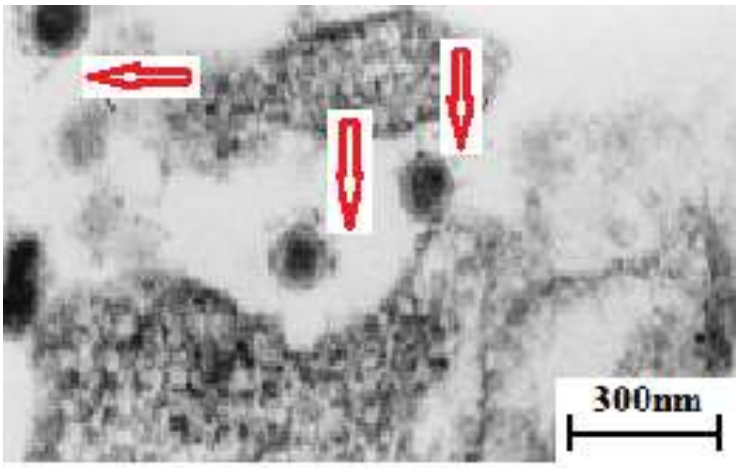


Рисунок 14.14 – ТЕМ зображення вихідного препарату ТГС

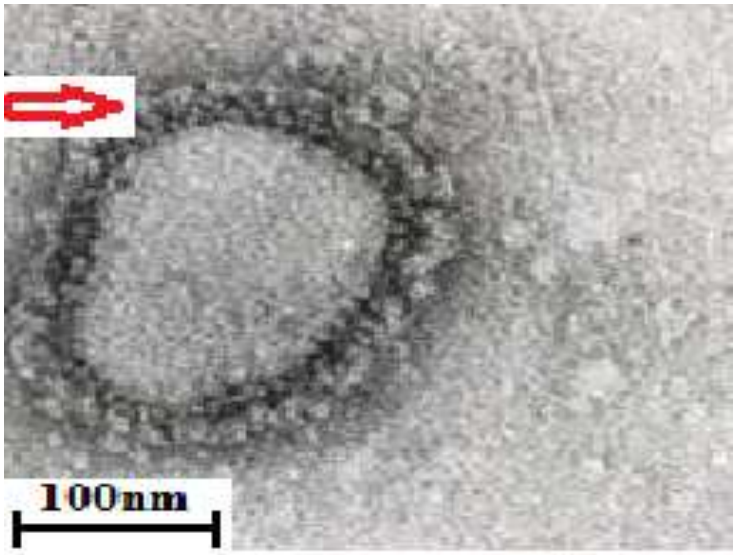


Рисунок 14.15 – ТЕМ мікроструктура вихідного препарату TGS , частки помічені стрілками

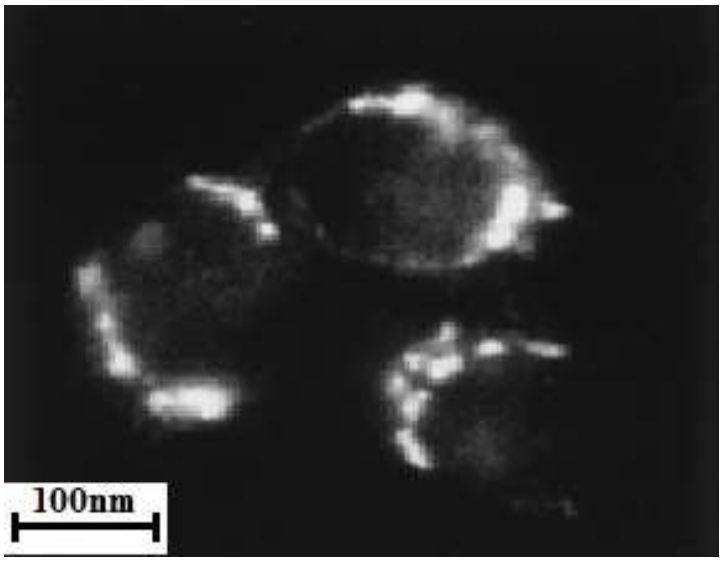


Рисунок 14.16 – Зображення часток TGS в темному полі

Для дослідження були взяті мультітаргетні препарати, які впливають на РНК- та ДНК синтез та протеазну активність, систему вродженого противірусного імунітету – флавоноїди- Протефлазід, Неофлазід, БАРп.

Вплив препаратів на репродукцію коронавірусу (ТГС) вивчали з використанням схеми одночасного введення вірусу ТГС та досліджуваних зразків, тобто під час адсорбції ТГС на клітини.

Для вивчення антикоронавірусної активності досліджуваних препаратів використовували перещеплювану культуру клітин СНЕВ та штам вірусу трансмісивного гастроентериту свиней з інфекційним титром 8,5 lg ID_{50}. Клітини вирощували в плашках на середовищі RPMI-1640 + 10% фетальної сироватки при температурі 37^0С в термостаті з подачею CO_2. Відбирали добові культури клітин СНЕВ. Для визначення EC_{50} тест-вірус у дозі 100 $ТЦД_{50}$/0,1 мл вносили в культуру клітин і інкубували протягом 60 хв при 37^0С. Після адсорбції вірусу на клітинах, залишки його видаляли, клітини промивали живильним середовищем, після чого в підтримуюче середовище (RPMI-1640 + 2% фетальної сироватки) вносили препарати в різних концентраціях. Культури інкубували в термостаті з подачею CO_2 протягом 5 діб, щодня контролюючи за допомогою мікроскопа і відзначаючи репродукцію вірусу по цитопатогенній дії ТГС на клітини СНЕВ в порівнянні з контрольними культурами вірусу ТГС, де моношар не піддавався ніяким впливам.

Цитопатогенна дія коронавірусу ТГС на клітини морфологічно проявляється в утворенні дрібноклітинної дегенерації.

Через 5 діб збирали культуральне середовище з лунок планшету і в ньому визначали інфекційний титр вірусу.

Визначення антикоронавірусної активності досліджуваних препаратів (EC_{50}) в культурі клітин СНЕВ представлено в наступних графіках.

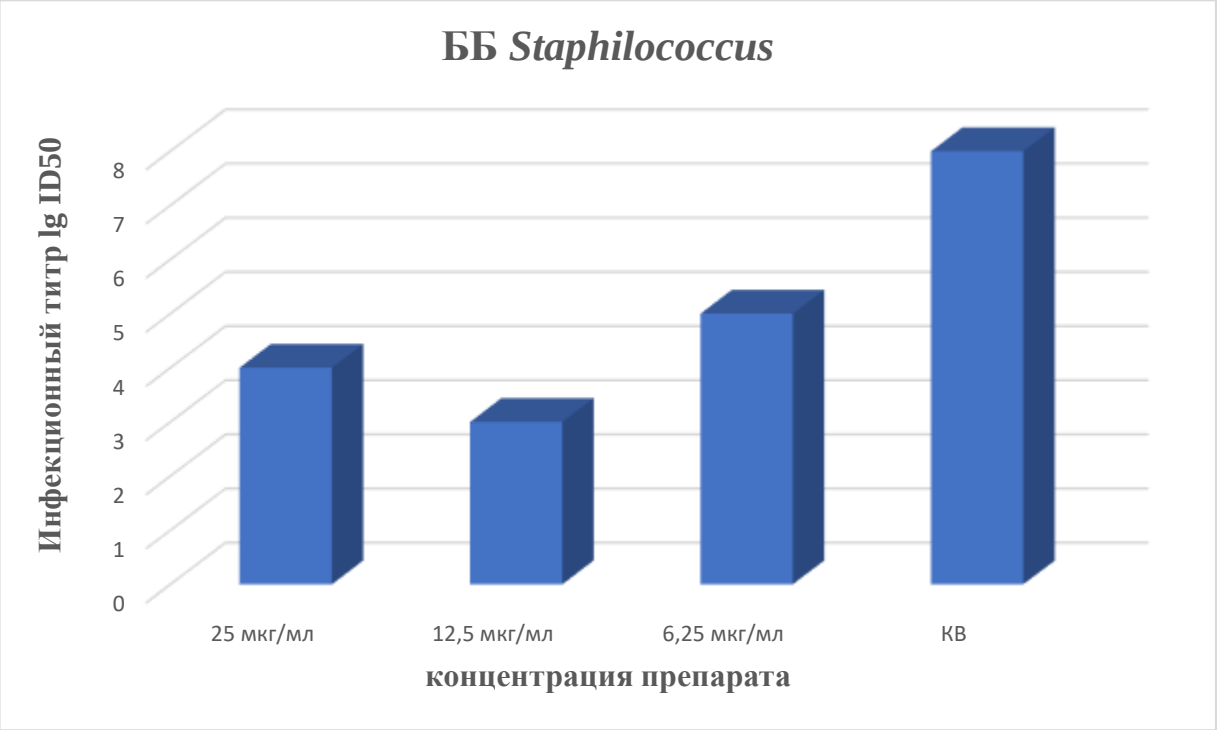


Рисунок 14.17 – Антикоронавірусна активність бацилярного біополімеру *Staphylococcus aureus*

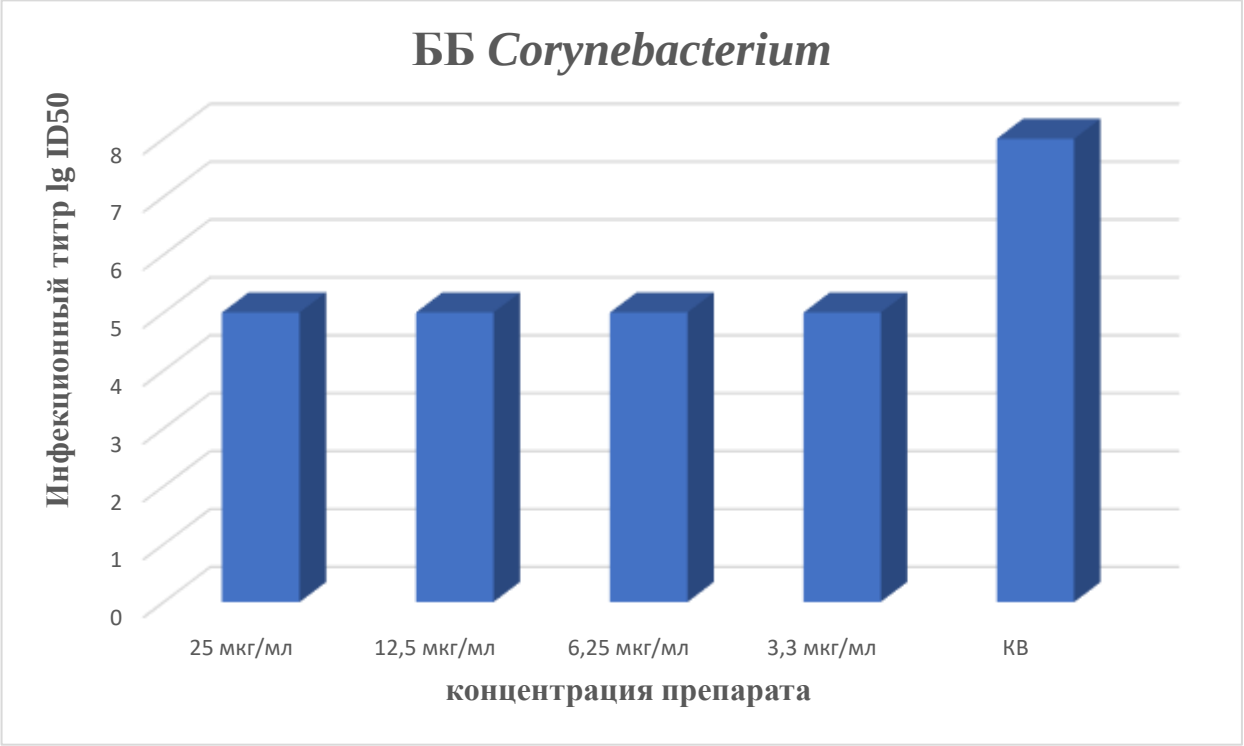


Рисунок 14.18 – Антикоронавірусна активність бацилярного біополімеру *Corynebacterium*

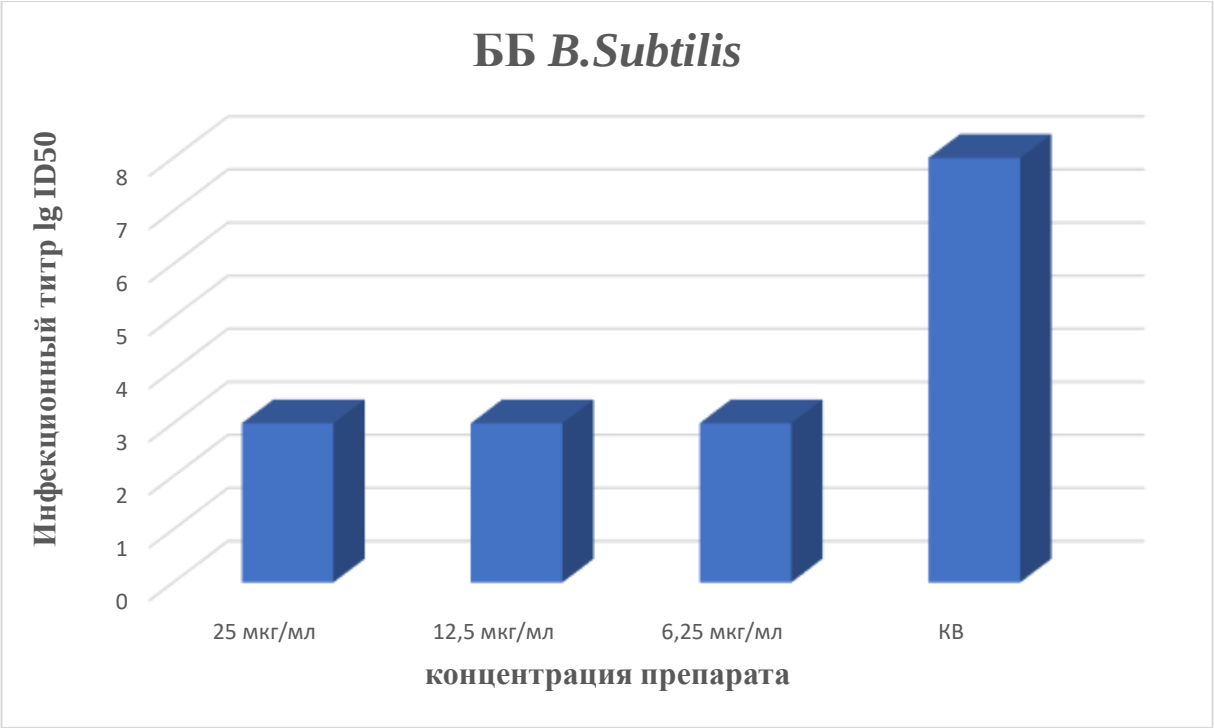


Рисунок 14.19 – Антикоронавірусна активність бацилярного біополімеру *B.Subtilis*

Згідно з отриманими результатами було встановлено, що досліджувані речовини статистично достовірно інгібують репродукцію коронавірусу ТГС.

Критерієм оцінки інгібірувальної активності антивірусних препаратів в системах *in vitro* є індекс селективності (IS) препаратів і зниження інфекційного титру на 1,5-2,0 lg $ТЦД_{50}$.

У таблиці 14.7 представлені підсумовувані результати досліджень за визначенням CC_{50}, EC_{50}, IS досліджуваних речовин.

Таблиця 14.7 – Показники CC_{50}, EC_{50}, IS при визначенні антивірусної активності досліджуваних бацилярних біополімерів в культурі клітин СПЕВ на моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней.

Назва препарату	**CC_{50} мкг/мл**	**EC_{50} мкг/мл**	**IS**	**Інгібіція інфекційного титру в lg ID_{50}**
Бац. біополімер Bac. subtilis	200	6,2	32,24	5,0
Бац. біополімер Staph. aureus	200	6,2	32,24	3,0-5,0
Бац. біополімер Corinebacterium	200	3,1	32,24	3,0

14.4. Дослідження антигерпетичної активності зразків препаратів в культурі клітин ВНК

Антигерпетичну активність визначали в культурі клітин ВНК, інфікованих вірусом герпесу ІІ типу ВН2. Результати досліджень представлені в таблиці 14.8.

Таблиця 14.8 – Антивірусна (ВПГ ВН2) активність препаратів в культурі клітин ВНК

Розведення	Бацилярні біополімери				
	ББ Lact	ББ Тр2 HeLa	ББ HeLa	ББ Sub	ББ Staph
1:20	5,0	6,0	7,0	5,0	7,0
1:40	6,0	3,0	4,0	3,0	3,5
1:80	6,0	3,5	3,0	4,0	4,5
1:160	7,0	3,5	3,0	4,0	4,0
1:320	7,0	3,0	3,0	7,0	4,0
1:640	7,0	3,0	2,0	3,0	6,0
КВ	9,0	8,0	8,5	8,0	8,0

Бацилярні біополімери з культурального середовища клітин HeLa, трансфекованих плазмідою та нетрансфекованих, та бактерій *Staphylococcus aureus 209, Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* ефективно інгібували на 2,0-4,0 lg $ТЦД_{50}$.

15. АКТИВІНІСТЬ ПЕПТИДІВ Р18, Р19

15.1. Антивірусна активність пептидів р18, р19

Для визначення цитотоксичної дози пептидів Р18, Р19 використовували культури клітин МДСК, ВНК, МДВК. В досліджувані культури вносили розведення пептидів Р18, Р19 в концентраціях від 500 до 3,9 мкг/мл, культивували культури в термостаті з подачею CO_2 при температурі 37 ^oC протягом 5 діб. Щодня контролювали в культурах наявність або відсутність цитопатичної дії (ЦПД) за допомогою мікроскопа. Ступінь ЦПД визначали по зміні морфології клітин (округлість, зморщеність, відторгнення від поверхні лунок дегенерованих клітин) по 4+ системі від + до ++++. За максимально переносну концентрацію (МПК) препарату , за цитотоксичну дозу (CC_{50}) приймали його найбільшу концентрацію, яка не викликала дегенерацію клітин. Найбільша концентрація пептидів Р18, Р19 500 мкг/мл не викликала дегенерації клітин, тобто МПК або CC_{50}була вища ніж 500 мкг/мл (табл. 15.1).

Таблиця 15.1 – Визначення МПК (CC_{50}) для пептидів Р18, Р19 на культурах клітин

Культура клітин	Розведення в мкг/мл									
	500		250		125		62,5		31,25	
	Пептиди									
	Р18	Р19	Р18	Р19	Р18	Р19	Р18	Р19	Р18	Р19
МДСК	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
ВНК	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
МДВК	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Примітка. 0 – відсутність ЦПД, 10 – кількість лунок.

Цитотоксична доза для пептидів Р18, Р19 вища 500 мкг/мл.

Визначення ефективної антивірусної концентрації пептидів Р18 і Р19 проводили на моделях експериментальних вірусних інфекцій грипу, герпесу та гепатиту С *in vitro.*

Для грипозної інфекції була використана модель перещеплюваних клітин нирок собаки МДСК і штам вірусу грипу A/FM/1/47 H1N1. Для герпетичної інфекції були застосовані перещеплювана культура клітин нирки кроля ВНК та вірус герпесу 2 типу. Експериментальною моделлю гепатиту С був сурогатний вірус гепатиту С – вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД), який культивується в культурі клітин МДВК. Результати визначення антивірусної ефективної концентрації представлені в табл. 15.2, рис. 15.1.

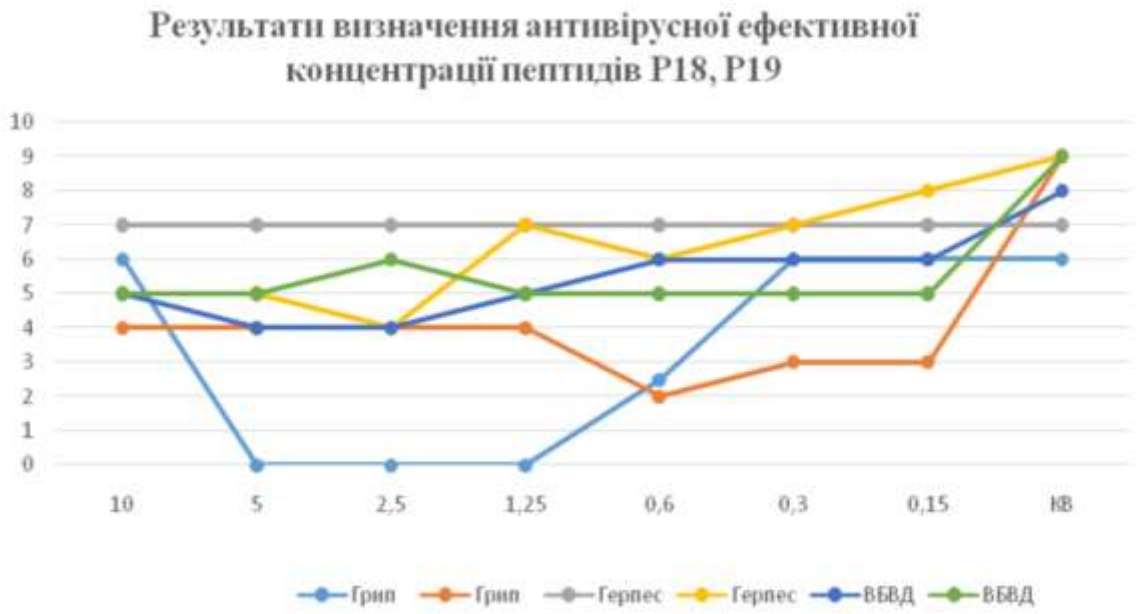


Рис. 15.1. Визначення антивірусної ефективної концентрації пептидів Р18, Р19

Таблиця 15.2 – Результати визначення антивірусної ефективної концентрації пептидів Р18, Р19

Розве-дення	Грип інфекційний титр $lgID_{50}$		ВПГ2 інфекційний титр $lgID_{50}$		ВБВД інфекційний титр $lgID_{50}$	
	Р18	Р19	Р18	Р19	Р18	Р19
1:10	6,0	4,0	7,0	5,0	5,0	5,0
1:5	0,0	4,0	7,0	5,0	4,0	5,0
1:2,5	0,0	4,0	7,0	4,0	4,0	6,0
1:1,25	0,0	4,0	7,0	7,0	5,0	5,0
0,625	2,5	2,0	7,0	6,0	6,0	5,0
0,311	6,0	3,0	7,0	7,0	6,0	5,0
0,150	6,0	3,0	7,0	8,0	6,0	5,0
КВ	6,0	9,0	7,0	9,0	8,0	9,0

Аналізуючи результати отримані при визначені ефективної концентрації пептиду Р18 слід відмітити, що Р18 в концентраціях 5,0-6,25 мкг/мл ефективно інгібував репродукцію вірусу грипу A/FM/1/47 H1N1, а сурогатного вірусу гепатиту С (ВБВД) в концентрації 0,15 мкг/мл та був не ефективний по відношенню вірусу герпесу 2 типу (ВПГ2). Пептид Р19 ефективно інгібував репродукцію всіх досліджуваних вірусів.

15.2. Вплив пептиду Р18 на мітотичний режим клітин НГВЩ

Наші попередні дослідження показали, що бацилярні біополімери бактерій при обробці ними клітин НГВЩ не впливали на їх мітотичний режим. Тому цей тест був використаний нами для дослідження впливу пептиду Р18 на інтактні та інфіковані вірусами грипу, герпесу 2, гепатиту С, ВІЛ клітини НГВЩ. Пептид Р18 вносили в лунки плашок в концентрації 10 мкг/мл та 1 мкг/мл. Паралельно визначали інфекційний титр відповідних вірусів. Результати проведених досліджень представлені в табл. 15.3.

Таблиця 15.3 – Вплив препарату Р18 та вірусів мітотичний режим клітин НГВЩ

Вплив	**Мітот. режим, ‰**	**КВКтк**	**КВКв**	**Аном. мітози, %**	**КВКтк**	**КВКв**	**Інф. титр, $lgID_{50}$**
Р18 (1:100)	48,0	4,8	1,02	21,3	0,82	0,42	
Р18 (1:1000)	47,0	4,7	1,0	22,4	0,87	0,44	
Р18 (1:100)+ вір.грипу	44,0	4,4	0,93	31,2	1,21	0,62	0
Р18 (1:1000)+ вір.грипу	26,0	2,6	0,55	50,0	1,94	1,0	0
Контр.вір. грипу	10,0	1,0	0,21	50,0	1,94	1,0	4,8
Р18 (1:100)+ вір.герпес	14,0	0,93	0,29	35,7	1,38	0,64	7,0
Р18 (1:1000)+ вір.герпес	16,0	1,06	0,34	50,0	1,94	0,9	7,0
Контр.вір. герпесу	15,0	1,0	0,31	55,0	2,14	1,0	7,0
Р18 (1:100)+ ВГС ДНК	43,0	0,80	0,91	37,2	1,44	0,57	0
Р18 (1:1000)+ ВГС ДНК	45,0	0,84	0,95	26,6	1,03	0,41	0

Вплив	Мітот. режим, ‰	КВКтк	КВКв	Аном. мітози, %	КВКтк	КВКв	Інф. титр, $lgID_{50}$
Контр.ВГС ДНК	53,0	1,0	1,12	64,4	2,5	1,0	1,0
Р18 (1:100)+ ВІЛ	52,1	0,97	1,10	40,4	1,57	0,85	1,0
Р18 (1:1000)+ ВІЛ	46,0	0,86	0,97	34,0	1,32	0,72	0
Контр. ВІЛ	53,3	1,0	1,13	47,2	1,82	1,0	1,0
Контроль тканини	47,0		1,0	25,7	1,0	0,54	

В результаті проведених досліджень було показано, що пептид Р18 в дозах 10 мкг/мл та 1 мкг/мл не впливав на мітотичний режим інтактних клітин НГВЩ та інфікованих вірусом грипу (в дозі 10 мкг/мл), гепатиту С (в дозах 10 мкг/мл та 1 мкг/мл), ВІЛ інфекції в дозі 1 мкг/мл. В культуральному середовищі інфікованих та оброблених пептидом Р18 культур визначали інфекційний титр вірусів. Результати проведених досліджень, представлені в табл. , відповідають характеристиці мітотичного режиму інтактних клітин у випадку ефективності пептиду Р18, або інфікованих вірусом клітин у випадку не ефективності пептиду Р18.

Вплив пептиду Р19 на мітотичний режим визначали в культурі клітин МДСК неінфікованих та інфікованих вірусом грипу А(Н1N1)47. Результати досліджень представлені в таблиці 15.4.

Таблиця 15.4 – Вплив пептиду Р19 та вірусу грипу на мітотичну активність клітин МДСК

Вплив Р19 та Р19+вірус грипу	Мітотичний індекс в ‰			Аномальні мітози в %		
	‰	КВК тк	КВК вір	%	КВК тк	КВК вір
Р19(1:20)	11,0	0,91	2,2	27,2	1,08	0,68
Р19(1:20)+ вірус	13,0	1,08	2,6	26,0	1,04	0,65
Р19(1:100)+ вірус	11,0	0,91	2,2	27,2	1,08	0,68
Р19(1:200)+ вірус	10,0	0,83	2,0	30,0	1,2	0,75
Контроль вірус	5,0	0,41	1,0	40,0	1,6	1,0
Контроль клітин	12,0	1,0	2,4	25,0	1,0	0,62

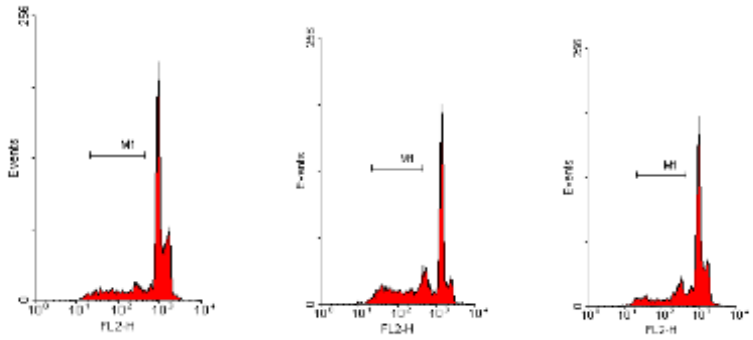
В результаті проведених досліджень було показано, що пептид Р19 не впливає на мітотичний режим неінфікованих клітин та нормалізує мітотичний режим інфікованих вірусом грипу клітин МДСК, що зв'язано з інгібіцією репродукції вірусу грипу.

Цитофлюорометричним методом визначали розподіл клітин за фазами клітинного циклу та апоптозу в інтактних клітинах та клітинах оброблених бацилярними біополімерами.

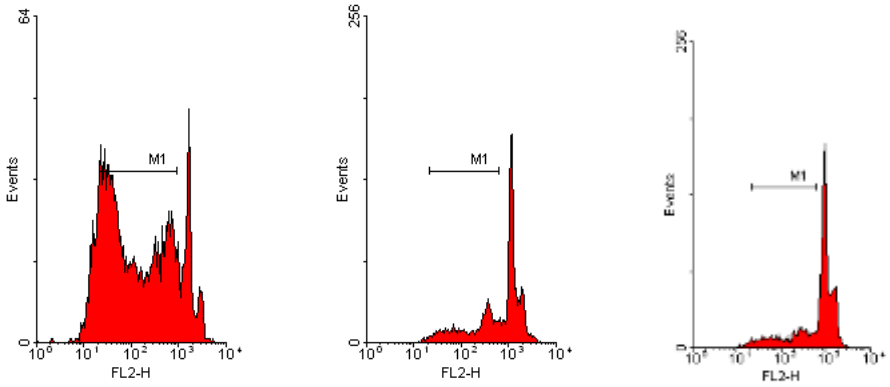
Після культивування *in vitro* вміст гіподіплоїдних (апоптотичних) клітин у зразках визначали методом проточної цитометрії після фарбування клітин розчином пропідія йодиду («Sigma», США). Суспензію клітин відмивали в PBS і фіксували в холодному 70% етанолі. Зафіксовані клітини відмивали від етанолу в PBS. До осадку клітин додавали інкубаційну суміш для фарбування, яка містить пропідія йодид (кінцева концентрація 20 мкг/мл) і РНКазу А (кінцева концентрація 100 мкг / мл), 0,1% цитрат натрію і 0,1% Тритон Х-100. Інкубували при кімнатній температурі 30 хв. Після закінчення інкубації суміш розбавляли 1: 5 PBS і вносили в пробірки для цитофлуориметрії. Флуоресценцію клітин вимірювали на цитофлуориметріFACSCalibur («Becton Dickinson», США). У кожній пробі підраховували не менше 10 тис. клітин. Мертві клітини і їх фрагменти виключали з аналізу. Для кількісної оцінки змісту гіподіплоїдних клітин застосовували програму CELLQuest PRO («BD Biosciences Pharmingen», США) рис. 15.2. У тих же пробах визначали розподіл клітин за фазами клітинного циклу за допомогою програми ModFit LT 2.0. Розподіл за фазами аналізували для всіх клітин, виключаючи гіподіплоїдні. Про проліферативну активність клітин судили за сумою процентного вмісту клітин в фазах S і G2 / М.(табл. 15.5)

Бацилярні біополімери на клітинах Jurkat

Контроль		20,9
Б.б. Субаліну	1:5	37,5
Б.б. Субаліну	1:10	26,0



Б.б. HeLa1	1:5	72,1
Б.б. HeLa1	1:10	37,2
Б.б. HeLa1	1:20	27,4



Б.б. HeLa2	1:5	57,6
Б.б. HeLa2	1:10	29,9

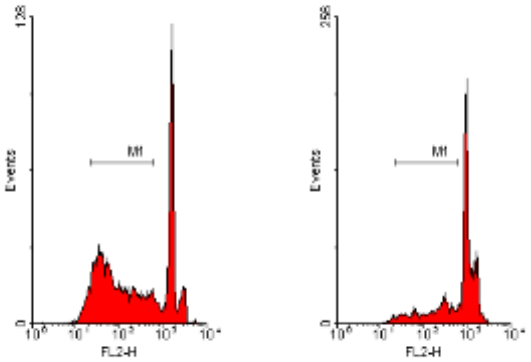


Рис. 15.2 – Бацилярні біополімери на клітинах Jurkat

Таблиця 15.5 – Розподіл клітин за фазами клітинного циклу

	G0/G1	S	G2/M
Jurkat контроль	54,5	39,4	6,1
Субалін 1:5	77,4	17,4	5,2
Субалін 1:10	61,9	33,1	5,0
HeLa1 1:10	61,3	30,2	8,5
HeLa1 1:20	58,6	34,7	6,7
HeLa2 1:5	81,7	10,2	8,1
HeLa2 1:10	57,6	36,4	6,0

При використанні препаратів бацилярних біополімерів (Bac. Subt., HeLa1, HeLa2) був виявлений значний проапоптотичний ефект на клітинах Jurkat, при чому для бацилярних біополімерів *Bac. subt.* Цей ефект виявлявся в менших концентраціях (розведення 1:5, вихідна концентрація 0,17 мг/мл), ніж для бацилярних біополімерів з HeLa (розведення 1:5 і 1:10, вихідна концентрація близько 1 мг/мл). У бацилярних біополімерів з HeLa в розведенні 1:20 проапоптотичний ефект вже не виявлявся. Апоптоз при дії бацилярних біополімерів з HeLa був значним, складаючи 72,1% для бацилярних біополімерів HeLa1 в розведенні 1: 5 і 57,6% для бацилярних біополімерів HeLa2 в розведенні 1:5 (при значенні в контролі в тій же часовий точці 20,9%).

Препарати бацилярних біополімерів (*Bac.Subt*., HeLa1, HeLa2) виявили виражений ефект що до перерозподілу вмісту клітин Jurkat по фазах клітинного циклу. Так, бацилярний біополімер з *Bac. subt.* в розведенні 1:5 збільшував вміст клітин в G0 / G1 більш ніж на 20% при зниженні вмісту клітин в фазі S на таку ж величину. Ще більш значним був ефект бацилярних біополімерів HeLa - максимальний ефект перерозподілу клітин на користь фази G0/G1 склав більше 25% при різкому зменшенні вмісту клітин в фазі S. Фазоспеціфічні ефекти бацилярних біополімерів були дозозалежними та понижувались при зменшенні концентрації. Сумарне зменшення проліферативного індексу досягалось за рахунок зниження вмісту клітин у фазі S при незмінному вмісті у фазі G2/M.

15.3. Роль впливу рецептору епідермального фактору росту на інфекційний титр вірусів

Зважаючи на те, що бацилярні біополімери бактерій і клітин, та хімічно синтезовані пептиди Р18 і Р19 мають амінокислотну гомологію та антигенну спорідненість з рецептором епідермального фактору росту, було закономірно вивчити, яку роль грає цей рецептор в репродукції ДНК та РНК вірусів. Дослідження проводили на експериментальних моделях *in vitro* вірусів грипу та герпесу. Результати проведених досліджень представлені в таблиці 2.14.

Таблиця 15.6 – Визначення впливу рецепторів епідермального фактору росту на інфекційний титр вірусів грипу та герпес

Эксперим. модель	Інфекційний титр вірусів $lgID_{50}$					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Контроль вірусу
ВНК+HSV	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	7,0
МДСК+ А(H1N1)47	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	10,0

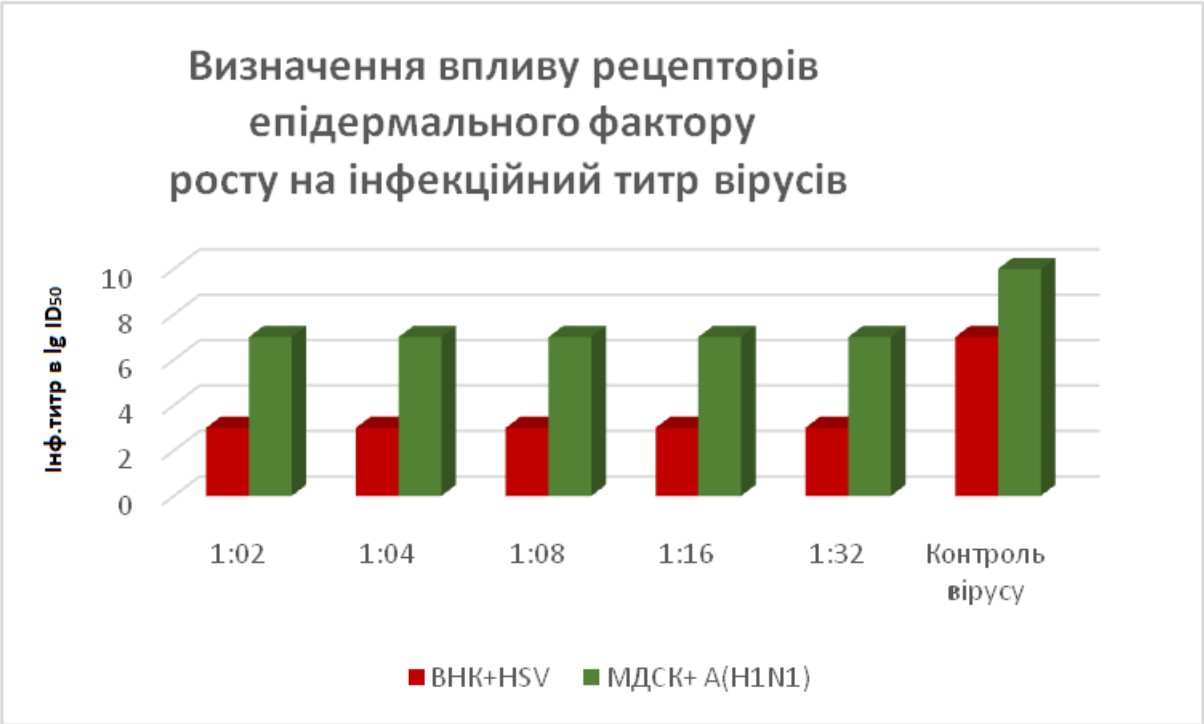


Рис. 15.3 – Визначення впливу рецепторів епідермального фактору росту на інфекційний титр вірусів

Висновки до розділу 15

Результати проведених досліджень є достовірним доказом того, що рецептори епідермального фактору росту беруть участь в репродукції ДНК- і РНК-вірусів (герпес і грип), тому що інгібування репродукції вірусів на 2,0 $lgID_{50}$ визначає 99%, а в інших експериментах визначено інгібування репродукції вірусів на 4,0 та 3,0 $lgID_{50.}$

ВИСНОВКИ

1. На основі проведеної ідентифікаці та кількісного визначення біологічно активних речовин (БАР) рослинного походження у лікарській рослинній сировині було підібрано кількісний та якісний склад збору ЛРС для створення препарату, до якого входитимуть: коренів лабазнику шестипелюсткового, коренів лопуху справжнього, плодів софори японської, трави підмареннику справжнього та трави льонку звичайного.

2. Використовуючи методи технології рослинних препаратів було проведено розробку лабораторної технології отримання комплексного рослинного препарату із високим вмістом БАР. У зв'язку з поставленою задачею була вивчена ступінь витягання БАР збору в залежності від концентрації спирто водної суміші, часу настоювання і ступеня подрібнення сировини. Аналізуючи отримані дані можна зробити висновок, що оптимальним часом екстракції є 36-48 годин, ступінь подрібнення сировини 3-5 мм. Зміна концентрації спирту 35-45 % істотного впливу на кількість екстрактивних речовин не надає.

3. Було напрацьовано три серії препарату у вибраних умовах на різних серіях рослинної сировини. Отримані зразки були піддані фітохімічному вивченню. Об'єктами такого вивчення з'явилися: екстрактивні речовини, наявність (якісно) іридоїдів підмаренника, алкалоїдів льонку, флавоноїдів підмареннику та софори, дубільних речовин лабазника і гідроксикоричних кислот, амінокислот лопуху та софори, а також кількісний вміст поліфенольних сполук, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот і полісахаридів. Дані групи речовин прямо або непрямо відповідають за біологічну дію передбачуваного препарату, його аналітичну стандартизацію (розробку методів контролю якості).

4. Розроблений лабораторний регламент отримання бацилярних біополімерів- мімікринів з культурального середовища різних мікроорганізмів. Основні етапи виробництва бацилярних біополімерів складаються з градієнтної екстракції етанолом, прогрівання при 100 ºС з послідуючою гельфільтрацією, діалізом та концентрацією препаратів. Визначені амінокислотний та вуглеводний склад бацилярних біополімерів.

5. Виділені бацилярні біополімери- мімікруючі пептиди з культурального середовища нових продуцентів *Staphylococcus aureus 209, Bacillus subtilis, Lactobacterium,* охарактеризовані по антигенній спорідненості з бацилярними біополімерами- мімікруючими пептидами інших продуцентів і пептидами вірусів, визначена цитотоксични концентрація для бацилярних біополімерів в культурак клітин МДСК, ВНК, МДБК, СНЕВ чутливих до вірусів.

6. В результаті досліджень молекулярної структури бацилярних біополімерів- мімікринів була розроблена методика виділення активних пептидів з бацилярних біополімерів- мімікрину *Staphylococcus aureus*та *Bacillus subtilis*, яка складається з:

- хроматографічного аналізу препаратів бацилярних біополімерів-мімікринів в системі HPLC;

- виявлені у фракціях активних структур бацилярних біополімерів-мімікринів методом ІФА;

- вакуумному висушуванні активних пиків фракцій;

- послідуючим електрофоретичним аналізом цих фракцій;

- визначенні мас-спектрів хроматографічних піків;

- пошук в базі даних NCBI серед білків всіх організмів гомологічних пептидів для синтезу необхідного мімотопу.

7. Хроматографічний профіль пептидів мімікринів включає 3 домінуючі піки з молекулярною масою 50,0 – 55 кДа; 44 кДа; 22 кДа. При пошуку в базі NCBI серед білків всіх організмів з мас-спектрами хроматографічних піків 11 і 19 з молекулярною масою 43,9 – 44,0 кДа виявлені гомологічні пептиди: Fc фрагменти важкого ланцюга IgG, білком зв’язування з рецептором вірусу гепатиту В та фрагменти важкого ланцюга анти-HIV, χ ланцюгів IgG, кристалічною структурою нейтралізуючого фрагменту антитіла зв’язуючого з гемаглютиніном Н3 вірусу грипу, пептид 1-207 складений методом sequence coverage з гомологічних послідовностей бацилярного біополімеру *B. Subtilis*, який відповідає моноклональному антитілу Трастозумаб зв’язаного з позаклітинним доменом рецептора 2 епідермального фактору росту.

Експериментально підтверджена гомологія Мі *B. Subtilis* з позаклітинним доменом HER-2 + герцептин (Трастозумаб) методом імуноферментного аналізу.

8. Визначені гомологічні пептиди з 5 немодифікованих пептидів, які повністю співпадали за амінокислотною послідовністю, відібрані та синтезовані пептиди NH2-NVAAPSVESFPPSDEQLK-COOH та NH2-DIQMTQSPSSLSASVGDR-COOH, які були названі Р18, Р19. Одержані фізико-хімічні характеристики пептиду Р18: молекулярна вага – 1946,26 кДа методом мас-спектрометрії, ступінь очистки препарату 70% HPLC-хроматографією; пептиду Р19: молекулярна вага 1879,04, >70% ступінь чистоти HPLC, проведена ідентифікація в Maldi-Toff, одержані 3Д моделі пептидів Р18, Р19. Показано, що синтезовані пептиди Р18 та Р19 мають високу ступінь спорідненості з бацилярними біополімерами- мімікруючими пептидами бактерій, лімфіоїдних клітин SEM, χ і λ ланцюгами IgG, пептидами вірусів, рецептором епідермального фактору росту.

9. Виявлений феномен взаємодії сироваток до рецептору епідермального фактору росту, бацилярним біополімерам-мімікруючим пептидам бактерій, клітин та синтезованому пептиду Р18 з антигенами в діагностичних системах визначення антитіл до HSV, Rubella, HIV, HCV, ЦМВ, Тр., що означає, що інфіковані вірусом клітини мають ще один рецептор (REgFR) для взаємодії з вірусом, який можливо відіграє роль в репродукції вірусів, а також в отримані хибно-позитивних результатів при діагностиці.

10. Показана антивірусна активність бацилярних біополімерів (ББ) проти вірусу герпесу, сурогатного вірусу гепатиту С (вірус бичачої вірусної діареї), а також вірусу грипу та коронавірусу ТГС. Встановлено високий індекс селективності або хіміотерапевтичний індекс по відношенню до вірусу герпесу, грипу, сурогатного вірусу гепатиту С та коронавірусу ТГС, тобто бацилярні біополімери можна віднести до високоефективних антивірусних препаратів. Встановлено, що препарат бацилярний біополімер захищає мишей від летальної грипозної інфекції при профілактичній та лікувальній схемах введення на рівні стандартного препарату Таміфлю.

11. Визначено вплив бацилярних біополімерів на процеси деструкції та проліферації. Показано, що бацилярні біополімери виявляли значний проапоптотичний ефект на клітинах Jurkat та інгібували проліферативну активність клітин.

12. Визначена антивірусна та антипроліферативна активність бацилярних біополімерів на моделях вірусних інфекцій грипу, герпесу та сурогатного вірусу гепатиту С, коронавірусу ТГС. При вивченні впливу бацилярних біополімерів різного походження на мітотичний режим клітин, заражених вірусами встановлено, що всі одержані бацилярні біополімери при зараженні клітин ВГС, ВПГ, ТГС та вірусом грипу (які змінювали мітотичний індекс та збільшували кількість патологічних форм мітозу) підтримували рівень мітотичного індексу та кількість патологічних мітозів до рівня контрольних показників.

13. Проведені дослідження антивірусної активності розчину препарату Лалосопіл, який є екстрактом багатьох трав та коренів рослин, активною структурою якого є різноманітні групи біологічно активних речовин, переважаючими є флавоноїди, на експериментальних моделях вірусів герпесу, сурогатного вірусу гепатиту С (ВБВД) та коронавірусу ТГС *in vitro* виявили високу антивірусну активність до всіх досліджуваних вірусів. Було показано, що розчин препарату Лалосопіл є активним інгібітором репродукції вірусів герпесу, сурогатного вірусу гепатиту С (ВБВД) та коронавірусу ТГС з індексом селективності 80, 160, 160, відповідно.

14. В результаті проведених експериментальних досліджень було показано ефективність лікувального засобу Лалосопіл при профілактичній та лікувальній схемі дослідження при генітальному герпесі. Було показано, що розчин препарату Лалосопіл в розведенні 1:100 при комбінованій схемі введення (*per os* + аплікація препарату) затримує початок розвитку перших симптомів та скорочує час розвитку хвороби. Індекс лікувальної дії препарату Лалосопіл знаходиться на рівні референтного антигерпетичного препарату Віролекс. Механізм антигерпетичної дії препарату Лалосопіл здійснюється за рахунок індукції αІФНу, інгібіції синтезу РНК та ДНК.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Компендиум 2006. Лекарственные препараты. Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. 2006. т. 1 – 1023 с., т.2 – 367 с.
2. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник. Під ред. А. М. Гродзінського. – К.: УРЕ, 1990.– 554 с.
3. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия/под редакцией Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой.- СПб.-Спецлит.- 2004.-765 с
4. Лекарственные растения Украины / Ивашкин Д.С., Катина З.Ф., Рыбачук И.З., Иванов В.С., Бутенко Л.Т. - Киев: Урожай, 1975. - 360 с.
5. Растения для нас/ Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. - Санкт-Петербург: Учебная книга, 1996. - 654 с.Фитотерапия в клинике внутренних болезней. Под редакцией Б.А.Самуры.- Издательство НфаУ, Золотые страницы, Харьков 2003 г, -416 с.
6. Фитотерапия в клинике внутренних болезней. Под редакцией Б.А.Самуры.- Издательство НфаУ, Золотые страницы, Харьков 2003 г, -416 с.
7. Shimon Ben-Shabat, Ludmila Yarmolinsky, Daniel Porat, Arik Dahan . Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies Drug Delivery and Translational Research . 2019;10: 354–367.
8. Jassim SAA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. Journal of Applied Microbiology. 2003; 95(3):412-27.
9. Ojo OO, Oluyege JO, Famurewa O. Antiviral properties of two Nigerian plants. African Journal of Plant Science. 2009; 3(7):157-159.
10. Liu A.L., Du G.H. et al. Antiviral Properties of Phytochemicals. Dietary phytochemicals and microbs. 2012: 93-126
11. Zhi-Gang Sun*, Ting-Ting Zhao, Na Lu, Yong-An Yang, Hai-Liang Zhu. Research Progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2019; 19 (10): 826-832.
12. Flavia M. Michelini , Laura E. Alché , Carlos A. Bueno. Virucidal, antiviral and immunomodulatory activities of β-escin and Aesculus hippocastanum extract. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2018; 70 (11): 1561-1571.

13. Ghoke, S.S., Sood, R., Kumar, N. et al. Evaluation of antiviral activity of Ocimum sanctum and Acacia arabica leaves extracts against H9N2 virus using embryonated chicken egg model. BMC Complement Altern Med. 2018; 18(1): 174.
14. Vuyolwethu Khwaza, Opeoluwa O. Oyedeji and Blessing A. Aderibigbe. Antiviral Activities of Oleanolic Acid andIts Analogues. Molecules 2018; 23(9): 2300 doi: 10.3390.
15. Muhammad Akram, Imtiaz Mahmood Tahir, Syed Muhammad Ali Shah, et al. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. Phytotherapy Research. 2018; 32 (5): 811-822.
16. de Oliveira, J.R., Camargo, S.E.A. & de Oliveira, L.D. Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. Journal of Biomedical Science. 2019; 26 (5) : doi: 10.1186/s12929-019-0499-8.
17. Hwa-Jung Choi . Chemical Constituents of Essential Oils Possessing Anti-Influenza A/WS/33 Virus Activity. Osong Public Health and Research Perspectives 2018; 9(6): 348-353.
18. M J Tohmé , M C Giménez , A Peralta , M I Colombo , L R Delgui. Ursolic acid: A novel antiviral compound inhibiting rotavirus infection in vitro. Int J Antimicrob Agents . 2019;54(5):601-609.
19. Bo-YangLi ,YangHu, JianLi, KaiShi,Yu-FengShe, BinZhu, Gao-XueWang . Ursolic acid from Prunella vulgaris L. efficiently inhibits IHNV infection in vito and in vivo. Virus Research 2019;273:197741.
20. Guo, S., Bao, L., Li, C. et al. Antiviral activity of iridoid glycosides extracted from Fructus Gardeniae against influenza A virus by PACT-dependent suppression of viral RNA replication. Scientific Reports. 2020; 10:1897.
21. Qian Wei, Rong Zhang, Qin Wang, Xin Jia Yan, Quan Wei Yu, Fu Xia Yan. Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from Forsythia suspense. Journal Natural Product Research 2020; 34(9): 1320-1325.
22. Wang Z, Xia Q, Liu X, Liu W, Huang W, Mei X, Luo J, Shan M, Lin R, Zou D, Ma Z. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of

Forsythia suspensa (Thunb.) Vahl: A review. J Ethnopharmacol. 2018; 10: 210:318-339.

23. Jungmoo Huh, Jae Hyoung Song, Seong Ryeol Kim, Hyo Moon Cho, Hyun-Jeong Ko. Heejung Yang. Lignan Dimers from Forsythia viridissima Roots and Their Antiviral Effects. J. Nat. Prod. 2019; 82(2): 232–238.
24. Mirna Meana Dias , Ohana Zuza , Lorena R Riani, Priscila de Faria Pinto , Pedro Luiz Silva Pinto, Marcos P Silva , Josué de Moraes et al. In vitro schistosomicidal and antiviral activities of Arctium lappa L. (Asteraceae) against Schistosoma mansoni and Herpes simplex virus-1. Biomed Pharmacother 2017; 94:489-498.
25. Yang Hu, Wei-Chao Chen, Yu-Feng Shen, Bin Zhu, Gao-Xue Wang. Synthesis and antiviral activity of a new arctigenin derivative against IHNV in vitro and in vivo. Fish & Shellfish Immunology. 2019;92: 736-745.
26. Yujie Zhong, Chengni Jin, Xiaorui Wang, Xuan Li, Jiahui Han, et al. Protective effects of apigenin against 3-MCPD-induced renal injury in rat. Chemico-Biological Interactions . 2018; 296: 9-17.
27. Nitin Khandelwal, Yogesh Chander, Ram Kumar, Thachamvally Riyesh et al. Antiviral activity of Apigenin against buffalopox: Novel mechanistic insights and drug-resistance considerations. Antiviral Research. 2020;181:104870.
28. Haiyan Yan, Linlin Ma, Huiqiang Wang, Shuo Wu, Hua Huang, Zhengyi Gu, Jiandong Jiang, Yuhuan Li. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression. Journal of Natural Medicines. 2019; 73:487–496.
29. Ran Yu, Liang Chen, Rong Lan, Rong Shen, Peng Li. Computational screening of antagonists against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. International Journal of Antimicrobial Agents. 2020; 56(2):106012.
30. Rosalia Ferracane, Giulia Graziani, Monica Gallo, Vincenzo Fogliano, Alberto Ritieni. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (Arctium lappa) seeds, roots and leaves. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010;51(2): 399-404.

31. Yao, C., Xi, C., Hu, K. et al. Inhibition of enterovirus 71 replication and viral 3C protease by quercetin. Virology Journal. 2018;116 doi.org/10.1186/s12985-018-1023-6.
32. Ruben Manuel Luciano Colunga Biancatelli, Max Berrill, John D. Catravas, Paul E. Marik. Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). Front. Immunol., 2020;19. doi: 10.3389/fimmu.2020.01451.
33. Chae Hyun Kim, Jung-Eun Kim, Yoon-Jae Song. Antiviral Activities of Quercetin and Isoquercitrin Against Human Herpesviruses. Journal Molecules. 2020;25:2379.
34. Paolino Ninfali, Antonella Antonelli, Mauro Magnani , Emanuele Salvatore Scarpa. Antiviral Properties of Flavonoids andDelivery Strategies. Journal Nutrients. 2020;12; 2534.
35. Antonella Di Sotto, Paola Checconi, Ignacio Celestino, Marcello Locatelli, Stefania Carissimi, Marta De Angelis et al. Antiviral and Antioxidant Activity of a Hydroalcoholic Extract from Humulus lupulus L. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018; ID 5919237.
36. Pratik Das , Ranabir Majumder , Mahitosh Mandal , Piyali Basak. In-Silico approach for identification of effective and stable inhibitors for COVID-19 main protease (M^{pro}) from flavonoid based phytochemical constituents of Calendula officinalis. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2020 . DOI: 10.1080/07391102.2020.1796799.
37. Lin Wang, Junke Song, Ailin Liu, Bin Xiao, Sha Li, Zhang Wen et al. Research Progress of the Antiviral Bioactivities of Natural Flavonoids. Natural Products and Bioprospecting. 2020; 10: 271–283.
38. Jelena Katanić, Eva-Maria Pferschy Wenzig, Vladimir Mihailović, Tatjana Boroja, San-PoPan et al. Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of Filipendula vulgaris Moench extracts. Food and Chemical Toxicology. 2018;122: 151-162.
39. Huijie Chen, Ishfaq Muhammad, Yue Zhang, Yudong Ren, Ruili Zhang, Xiaodan Huang, Lei Diao, Haixin Liu, Xunliang Li et al. Antiviral Activity Against

Infectious Bronchitis Virus and Bioactive Components of Hypericum perforatum L. Front. Pharmacol. 2019. doi: 10.3389/fphar.2019.01272.

40. Rodolfo S. Barboza, Ligia M. M. Valente, Thiago Wolff, Iranaia Assunção-Miranda, Rômulo L. S. Neris et al. Antiviral Activity of Faramea hyacinthina and Faramea truncata Leaves on Dengue Virus Type-2 and Their Major Compounds. Chemistry & Biodiversity. 2018; 15(2). doi: 10.1002/cbdv.201700393
41. Michiyuki Yonekawa, Masumi Shimizu, Atsushi Kaneko, Jiro Matsumura, Hidemi Takahashi. Suppression of R5-type of HIV-1 in CD4+ NKT cells by Vδ1+ t cells activated by flavonoid glycosides, hesperidin and linarin. Scientific Repo Rts. 2019; 9:750.
42. Erdan Luo, Daiyan Zhang, Hua Luo, Bowen Liu, Keming Zhao, Yonghua Zhao et al. Treatment efficacy analysis of traditional Chinese medicine for novel coronavirus pneumonia (COVID-19): an empirical study from Wuhan, Hubei Province, China. Chin Med.. 2020; 34 doi: 10.1186/s13020-020-00317-x.
43. Lvjie Xu, Wen Jiang, Hao Jia, Lishu Zheng, Jianguo Xing, Ailin Liu, Guanhua Du. Discovery of Multitarget-Directed Ligands Against Influenza A Virus From Compound Yizhihao Through a Predictive System for Compound-Protein Interactions. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020; doi: 10.3389/fcimb.2020.00016.
44. Shaza H. Aly, Ahmed M. Elissawy, Omayma A. Eldahshan, Mohamed A. Elshanawany, Thomas Efferth, Abdel Nasser B.Singab. The pharmacology of the genus Sophora (Fabaceae): An updated review. Phytomedicine 2019;64: DOI: 10.1016/j.phymed.2019.153070.
45. Gang Ren, Guotao Ding, Hongyan Zhang, Haipeng Wang, Zengjun Jin, Guoxing Yang, Yonghong Han, Xia Zhang, GuiyingLi, Weihao Li. Antiviral activity of sophoridine against enterovirus 71 in vitro. Journal of Ethnopharmacology. 2019; 236(5): 124-128.
46. Andrea A. Stierle, Donald B. Stierle, Daniel Decato, Nigel D. Priestley, Jeremy B. Alverson et al. The Berkeleylactones, Antibiotic Macrolides from Fungal Coculture. J. Nat. Prod. 2017; 80(4):1150–1160.
47. Deyrup M., Sidwell R., Little R. et al. Improved delivery through biological membranes. Synthesis and antiviral activity of a series of ribavirin chemical

delivery systems: 2’ and 3’ derivatives. Antiviral Chem. and Chemother. 1991; 2: 337–356.

48. Ryu Y.B., Curtis Long M.J., Kim J.H., Jeong S.H., Yang M.S., Lee K.W., Lee W.S., Park K.H. Pterocarpans and fl avanones from Sophora fl avescens displaying potent neuraminidase inhibition. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008;18: 6046–6049.
49. Paolino Ninfali, Antonella Antonelli, Mauro Magnani, Emanuele Salvatore Scarpa. Antiviral Properties of Flavonoids andDelivery Strategies. Nutrients. 2020;12: 2534
50. Chloé Dimeglio, Jean-Michel Mansuy, Sandrine Charpentier, Isabelle Claudet, Jacques Izopet. Children are protected against SARS-CoV-2 infection. Journal of Clinical Virology. 2020;128(6): 104451.
51. Rajesh Naithani, Loredana C. Huma, Louis E. Holland, Deepak Shukla, David L. McCormick, Rajendra G. Mehta, Robert M. Moriarty. Antiviral Activity of Phytochemicals: A Comprehensive Review. Journal Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2008;8(11): 1106 – 1133.
52. Maria Russo, Stefania Moccia, Carmela Spagnuolo, IdoloTedesco, Gian Luigi Russo. Roles of flavonoids against coronavirus infection. Chemico-Biological Interactions. 2020;328 (9): 109211.
53. RanYu, Liang Chen, Rong Lan· Rong Shen, Peng Li. Computational screening of antagonists against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. International Journal of Antimicrobial Agents. 2020;56(2): 106012.
54. Fujimoto KJ, Nema D, Ninomiya M, Koketsu M, Sadanari H, Takemoto M, Daikoku T, Murayama T. An in silico-designed flavone derivative, 6-fluoro-4'-hydroxy-3',5'-dimetoxyflavone, has a greater anti-human cytomegalovirus effect than ganciclovir in infected cells. Antiviral Research. 2018;154:10-16.
55. Münch, J., Ständker, L., Adermann, K., Schulz, A., Schindler, M., Chinnadurai, R., … Kirchhoff, F. (2007). Discovery and Optimization of a Natural HIV-1 Entry Inhibitor Targeting the gp41 Fusion Peptide. Cell, 129(2), 263–275. doi:10.1016/j.cell.2007.02.042

56. Галкін О.Ю., Котов А.Г. Фармакогностичне вивчення та стандартизація коренів лопуху великого (Arctium lappa L.) // Український медичний альманах. 2011;4(1):55-57.
57. Bouhlali, Eimad Dine Tariq et al. “Phytochemical compositions and antioxidant capacity of three date (Phoenix dactylifera L.) seeds varieties grown in the South East Morocco.” Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2017;16:350-357.
58. LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0 (https://doi.org/10.1038/227680a0)
59. REED, L. J., & MUENCH, H. (1938). A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS12. American Journal of Epidemiology, 27(3), 493–497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
60. Дьякова Н.А. Разработка и валидация экспресс-методики выделения и количественного определения водорастворимых полисахаридов листьев лопуха большого Arctium lappa // Химия растительного сырья. – 2018. – №4. – С.81-87.
61. Галкін, О.Ю., Котов, А.Г. Розробка методик ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів у плодах софори японської (Sophora japonica L.) Pharmaceutical review . 2014;(4):77-81.
62. Ковалева Л. Г., Сампиев А. М., Хочава М. Р., Никифорова Е. Б. Современное состояние и перспективы дальнейшего исследования плодов софоры японской // Актуальные проблемы медицины. – 2012. – №20. – С. 163-170.
63. Дудченко Л. Г., Козьяков А. С., Кривенко В. В. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения: Справочник / Отв. ред. К. М. Сытник. — К.: Наукова думка, 1989. — 304 с.
64. Дамянова С., Стоянова А., Бардаров В., Димитров И. Химический состав эфирного масла и абсолю из календулы, выращиваемой в Болгарии // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2005. – №1. – С. 111-112.

65. Дослідження полісахаридів трави підмаренника справжнього / І.Л. Шинковенко, Т. В. Ільїна, А. М. Ковальова, А. М. Комісаренко // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. - 2017. - Вип. 28. - С. 152-159.
66. Кирьянов А.А., Кривут Б.А., Перельсон М.Е. Хроматоспектрофотометрический метод определения ацетилпектолинарина в растительном сырье, готовом продукте и лекарственной форме // Хим.-фарм. журн..1976; X(3): 75-79.
67. Foudah, A. et al. “Development and validation of a high-performance thin-layer chromatographic method for the quantitative analysis of vitexin in Passiflora foetida herbal formulations.” Saudi Pharmaceutical Journal. 2019;27:1157 – 1163.
68. Quintão NL, Meyre-Silva C, Silva GF, et al. Aleurites moluccana (L.) Willd. Leaves: Mechanical Antinociceptive Properties of a Standardized Dried Extract and Its Chemical Markers. Evid Based Complement Alternat Med. 2011; Article ID 179890.
69. Bouhlali, Eimad Dine Tariq et al. “Phytochemical compositions and antioxidant capacity of three date (Phoenix dactylifera L.) seeds varieties grown in the South East Morocco.” Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2017;16:350-357.
70. Иванов Д.И., Иванова Н.Н., Артюшкина Е.П. Минеральный состав корневого сельдерея как продукта функционального питания в зависимости от погодных русловий // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. – №1 (135). – С. 23-27.
71. Копытько Я.Ф. Химический состав, применение и стандартизация Petroselinum crispum настойки гомеопатической матричной // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016; (2): 23-28.
72. Вельма В. В. Дослідження флавоноїдів в коренях петрушки листкової та кореневої // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2015; 24(5): 57-61.

73. Казарновский Л.С., Каравай Н.Я., Лазарева К.В., Выделение и изучение действующих веществ их растений лабазника // Тр. Харьк. фармац. ин-та. 1962.Вып.2.С.23-26.
74. Геніг Г.Я., Ладна Л.Я., Фітохімічне дослідження гадючника вязолистного і шетипелюсткового флори Львівскої області / Фармац.журн. 1980. №1. С.50-52.
75. Л.С. Демидова, Б.А.Кривут,/ Динамика накопления ацетилпектолинарина в Linaria vulgaris Mill. в Подмосковье.// Хим.-фарм. журн., 1977, т.X1, №11, С. 95-98.
76. Борисов М. И. Фенольные соединения рода подмаренник // Материалы 2-го Всесоюз. сим-поз. по фенольным соединениям. Алма-Ата, 1973. С. 162—168.
77. Борисов М. И., Беликов В. В., Исакова Т. И. Количественное содержание флавоноидов в растениях родов Asperula L. и Galium L. // Растит, ресурсы. 1975. Т. 11, вып. 3. С. 351—358.
78. Борисов М. И., Ковалев В. Н., Зайцев В. Г. Химический состав Galium verum //Химия природ, соедин. 1971. № 4. С. 529—530.
79. Литвиненко В. И., Борисов М. И. Исследование иридоидов в некоторых представителях семейства мареновых // Материалы 2-го Всесоюз. съезда фармацевтов. Рига, 1974. С. 226—227.
80. Справочник ВИДАЛЬ. Лекарственные препараты в России. – М.: Астра Фарм Сервис, 2005. .– 1168 с.
81. Растительные лекарственные средства. Под ред. Н.П. Максютиной К, «Здоровья» 1985. – 279 с.
82. Борисов М. И. Иридоиды отечественных растений семейства мареновых // Современные проблемы фармацевтической науки и практики. Киев, 1972. С. 679—681.
83. К.Г. Лупу./Динамика содержания алкалоидов у льнянки обікновенной, произрастающих в Молдавии.// Растит.ресурсы, 1973, т.1X, вып.2, С. 206-208.

84. А.В.Патудин, Л.П.Смирнова, В.И.Глызин и А.И.Баньковский. Поиски пектолинарина и ацетилпектолинарина родов Linaria Mill Salvia и L. .// Растит.ресурсы, 1975, т. X1, вып.2, С. 204-209.
85. Bojthe-Horvath K. et al. Investigations on iridoids of Galium verum / K. Bojthe-Hor-vath, A. Kocsis, M. Varga-Balazs, F. Hetenyi, P. Tetenyi, L. Mathejr//Planta med. 1980. Vol. 39, N 3. P. 267.
86. Raynaud /., Mnajed H. Les gtycosides flavoniques de Galium verum L. (Rubiace-es) //C. r. Acad. sci. D. 1972. T. 274, N 11. P. 1746—1748.
87. Турова А. Д. Лекарственные растения СССР и их применение. Изд 2-е, М.,
88. Лекарственные средства. М.Д. Машковский. 13-издание.– М.: Медицина, 1997.– т. I.– 736 с; т. II.– 688 с.
89. Солодовниченко Н.М., Журавльов М.С., Ковальов В.М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати: Навч. посіб. - 2-е вид. -Х.: Вид-во НФаУ, 2003. - 408 с.
90. Bryant E.T. A note of the differentiation between flavonoid glycoside and their aglicones // J.Amer.Chem.Soc. - 1950. - Vol. 39, N 2. - P. 481-488.
91. Державна Фармакопея України /Державне підприємство “Науково-експертний Фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
92. Вопросы введения в Государственную Фармакопею Украины монографии «Ноготков цветки» // Котов А.Г., Котова Э.Э., Тихоненко Т.М., Воловик В.Г/ Фармаком.- 2005.- № 2/3.- С. 128-134.
93. РЛС- Энциклопедия лекарств 8-е изд.- М.: РЛС-2000, 2001.- с.771
94. Руководство 42-3.1:2004. Руководства по качеству. Лекарственные средства. Фармацевтическая разработка. Киев. Министерство здравоохранения Украины. 2004.
95. Фарминдекс’ 98- лекарственные препараты.- Киев: НПП “Морион LTD”,1998.-с.744.
96. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Готовые лекарственные средства. Руководства по качеству. Рекомендации PIC/S/Под

редакцией Н.А.Ляпунова, В.А. Загория, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой .- К.: МОРИОН, 2001- 472 с

97. Надлежащая производственная практика лекарственных средств/Под редакцией Н.А.Ляпунова, В.А. Загория, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой .- К.: МОРИОН, 1999- 896 с.
98. Максютина Н.П., Литвиненко В.И. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений // Фенольные соединения и их биологические функции. - М., 1968. - С. 7-26.
99. Бандюкова В.А. Применение цветных реакций для обнаружения флавоноидов путем хроматографии на бумаге // Растит. ре сурсы. - 1965. - Т. 1, N 4. - С.38.
100. Блажей В., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. - М.: Мир, 1977. - 235с.
101. Barton D.H., Hesse R.H., Rechet M.M. The mechanism of the Barton reaction // Chem. Soc. Perkin transact 1.- 1979. - N10. - P. 1159-1163.
102. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
103. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. - М.: Высш. шк., 1974. - 211с.
104. Борисов М. И., Дороговоз С. М., Павлий А. И. Химическое и фармакологическое исследование фенольных соединений некоторых видов Sorbus L., Bidens L., Galium L. // Материалы 2-го Всесоюз. съезда фармацевтов. Рига, 1974. С. 221—222.
105. Галкина С.П., Мару А.П. Органические кислоты и микроэлеменыт белых кореньев // Консервная и овощная пром-сть. 1978. №3. С.26-27.
106. Вайсбергер А.В. Установление структуры органических соединений физическими и химическими методами. - М.: Химия, 1967. - 249 с.
107. Виноградова Т.А., Гажев Б.Н., Виноградов В.М., Мартынов В.К Практическая фитотерапия С.П., «Нева». 1998 – 638 с.
108. Хайс И.М., Мацек К. Хроматография на бумаге. - М.: ИЛ, 1962. - 851с.

109. Шталь Э. Хроматография в тонком слое.-М.: Мир,1965.-508с.
110. А.А.Кирьянов, Б.А.Кривут, М.Е.Перельсон./ Хроматоспектрофотометрический метод определения ацетилпектолинарина в растительном сырье, готовом продукте и лекарственной форме.// Хим.-фарм. журн., 1976, т.X, №3, С. 75-79.
111. Ковальов В.М.., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин/ За ред. В.М. Ковальова.- Харків: Прапор, 2000.- 703 с.
112. Лекарственные растения Государственной фармакопеи/под редакцией И.А. Самылиной .- М., “АНМИ”, 1999.- 496 с.
113. Мамчур Ф.І. Довідник з фітотерапії. 2-е изд., перераб. И доп.-К.:Здоров´я, 1986.-280 с.
114. Палов М.Энциклопедия лекарственных растений. Пер с немец. М. Мир 1998.– 467 с.
115. Литвиненко М. М. и др. Количественное определение флавоноидов, иридоидов и антрахи-ноидов в некоторых видах ясменника и подмаренника / М. М. Литвиненко, В. В. Беликов, Т. И. Исакова, М. И. Борисов, Н. С. Журавлев // Материалы 3-го Всесоюз. симпоз. по фенольным соединениям. Тбилиси, 1976. С. 100.
116. Nikolaenko I.V., Goncharenko V.S., Shimko N.N., Galkin A.Yu. Isolation of surface antigen of hepatites B virus. Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal, 2007, 79(2), 114–122.
117. Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P. An attempt to unify the structure of polymerases // Protein Eng.–1990.–3, N 6.–P. 461–467
118. Tunitskaya V. L., Kochetkov S. N. Structural-functional analysis of bacteriophage T7 RNA polymerase // Biochemistry (Mosc).– 2002.–67, N 10.–P. 1124–1135
119. Palchykovska L. G., Alexeeva I. V., Kostina V. G., Platonov M. O., Negrutska V. V., Deriabin O. M., Tarasov O. A., Shved A. D. New amides of phenazine-1-carboxylic acid: antimicrobial activity and structure-activity relationship // Ukr. Biokhim. Zh.– 2008.–80, N 3.–P. 140–147
120. Stankiewicz-Drogon A., Palchykovska L. G., Kostina V. G., Alexeeva I. V., Shved A. D., Boguszewska-Chachulska A. M. New acridone-4-carboxylic acid

derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection // Bioorg. Med. Chem.–2008.–16, N 19.–P. 8846–8852.

121. Palchykovska L. G., Alexeeva I. V., Platonov M. O., Kostenko O. M., Usenko L. S., Negrutska V. V., Shved A. D. New 1,2,4-triazine bearing compounds: molecular modelling, synthesis and biotesting // Biopolym. Cell.–2009.–25, N 6.–P. 491–499

122. De Logu A., Palchykovska L. H., Kostina V. H., Sanna A., Meleddu R., Chisu L., Alexeeva I. V., Shved A. D. Novel N-aryl- and Nheteryl phenazine-1-carboxamides as potential agents for the treatment of infections sustained by drug-resistant and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis // Int. J. Antimicrob. Agents.–2009.–33, N 3.–P. 223–229