

## ПРОТИАДЕНОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ПРЕПАРАТУ НЕОФЛАЗИД *IN VITRO*

*О.Ю. Повниця<sup>1</sup>, Л.О. Білявська<sup>1</sup>, Ю.Б. Паньківська<sup>1</sup>,  
К.С. Науменко<sup>1</sup>, Л.Б. Зелена<sup>1</sup>, С.Д. Загородня<sup>1</sup>, В.П. Атаманюк<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup>НВК «ЕКОФАРМ», пр. Степана Бандери, буд. 9-В, Київ, 04073, Україна  
e-mail: [povnitsa@ukr.net](mailto:povnitsa@ukr.net)

Понад 70 серотипів аденовірусів людини викликають різноманітні інфекційні захворювання, що в разі імунodefіцитних станів призводять до високого ризику розвитку генералізованої форми вірусної інфекції. Асортимент препаратів, яким властива антиаденовірусна дія, на сьогодні досить обмежений та представлений в основному синтетичними речовинами. Недоліком існуючих синтетичних антивірусних препаратів є їх висока токсичність. **Мета.** Дослідити протиаденовірусну дію препарату природного походження Неофлазид (нової субстанції препарату Протефлазид), його біологічно активного компонента БАРП (природної біологічно активної речовини) і БАР СА (синтетичного аналогу БАРП). **Методи.** Для визначення цитотоксичних, віруліцидних і антиаденовірусних властивостей речовин використовували МТТ-аналіз (колориметричний метод з використанням 3(4,5-диметилтриазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду). Методом ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) визначали рівень накопичення вірусної ДНК в клітинах. Інфекційні титри аденовірусу, синтезованого в присутності речовин, визначали за кінцевою точкою розведення вірусу, що викликає 50% ЦПД (цитопатогенну дію) в моношарі клітин. **Результати.** Цитотоксична концентрація ( $CC_{50}$ ) в культурі клітин А 549 для препарату Неофлазид, речовин БАРП та БАР СА становила 10 мкг/мл, 76 мкг/мл та 43 мкг/мл, відповідно. Речовини не мали вираженої віруліцидної дії. Препарат Неофлазид, речовини БАРП та БАР СА повністю пригнічували утворення інфекційного аденовірусу в концентраціях 7,1 мкг/мл, 30 мкг/мл та 10 мкг/мл, відповідно. **Висновки.** Препарат Неофлазид НВК «Екофарм» (Київ, Україна), біологічно активний компонент (БАРП) та його синтетичний аналог (БАР СА) мають здатність пригнічувати утворення інфекційного аденовірусу, що дає перспективу для проведення відповідних клінічних випробувань.

*Ключові слова:* неофлазид, флавоноїди, аденовірус, антивірусна дія.

Відомо понад 70 серотипів аденовірусів людини, які викликають різні за тяжкістю перебігу і клінічними проявами інфекційні захворювання з ураженням очей, респіраторного, гастроентерального чи уrogenітального трактів [1-4]. Високий ризик розвитку аденовірусної інфекції має місце у реципієнтів після пересадки стовбурових клітин; у імунodefіцитних осіб, що приймають імуносупресивну терапію після трансплантації органів; у ВІЛ-інфікованих з розвитком генералізованої форми аденовірусної інфекції та високою летальністю. Наразі не існує специфічного ліцензованого препарату для лікування аденовірусних інфекцій [5-8]. В сучасній медичній практиці використовуються препарати в основному хімічного походження [1,5-11], проте їх асортимент досить обмежений. Найбіль-

шою групою сполук, що виявляє активність проти ДНК-вмісних вірусів, є ациклічні нуклеозиди, до яких належать похідне цитозину, відоме як препарат Цидофовір. Після трансплантації органів застосовують препарати Ганцикловір (цимевен, цитовен) – ациклічний аналог нуклеозиду 2'-дезоксигуанозину та Валганцикловір. В публікаціях зустрічаються неоднозначні висновки про можливість застосування в разі захворювань, спричинених аденовірусами препарату Рибавірин – аналогу рибозиду імідазолкарбоксиміду, фосфат якого є ключовим продуктом біосинтезу пуринових нуклеотидів. Використання рибавірину та цидофовіру для лікування дисемінованої аденовірусної інфекції часто було малоефективним та призводило до смерті пацієнтів. Задовільні результати було отримано в доклінічних та клінічних дослідженнях препарату Брінцидофовір (СМХ001) – похідне цидофовіру, яке містить ліпіди та, на відміну від цидофовіру, має вищу біологічну активність та меншу нефротоксичність. Серйозним недоліком існуючих синтетичних антиаденовірусних препаратів є їх висока токсичність, побічна дія та пригнічення імунної системи пацієнтів [1]. Останнім часом зросла зацікавленість дослідників до речовин природного походження з широким спектром фармакологічних властивостей, які не мають токсичності та побічних дій синтетичних препаратів. В світовій літературі є багато публікацій щодо протимікробних, противірусних, апоптоз- та імуномодуючих властивостей речовин, отриманих із вищих рослин, токсинів членистоногих та гідробіонтів [12-16]. Препарат Протефлазид, розроблений НВК «Екофарм» (Україна), містить карбонові кислоти та флавоноїдні глікозиди, виділені з диких злаків *Deschampsia caespitosa* L. (щучка дерниста) та *Calamagrostis epigeios* L. (війник наземний) [17]. З літературних джерел відомо, що флавоноїди можуть бути природними хіміопротекторами онкологічних захворювань (геністеїн, кварцетин), деякі з них мають антивірусні властивості, оскільки здатні інгібувати зворотну транскриптазу і ДНК-полімерази вірусів (ретровіруси, герпесвіруси), можливо, вони можуть впливати і на інші ферменти вірусів та клітин. Для препарату Протефлазид показана імуномодуюча та противірусна дія відносно широкого кола ДНК- та РНК-вмісних вірусів (герпес-, пікорна-, ортоміксо-, гепадна-, папова- корона-, рино-, тога-, параміксо-, аренавірусів людини) [18-20].

Метою роботи було дослідити протиаденовірусну дію препарату природного походження Неофлазид (нової субстанції препарату Протефлазид), його біологічно активного компонента БАРП (природної біологічно активної речовини) і БАР СА (синтетичного аналогу БАРП).

**Матеріали і методи.** *Речовини:* препарат Неофлазид – містить 7,1 мг діючої речовини в 1 мл розчину та до 50% етилового спирту. БАРП – природна біологічно активна речовина (сума флавоноїдів з концентрацією діючої речовини 120 мкг/мл в 10% розчині етилового спирту). БАР СА – синтетичний аналог БАРП, що містить 100 мкг/мл діючої речовини та 10% етилового спирту. Речовини надані науково-виробничою компанією (НВК) «Екофарм» (Україна). *Референс-препарат:* противірусний засіб для системного застосування, синтетичний нуклеозидний аналог гуаніну – Цимевен (500 мг ганцикловіру – ліофілізат для приготування розчину для інфузій), виробник (Hoffman-La Roche, Switzerland). На середовищі

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, USA) готували розчин препарату з концентрацією 1 мг/мл та стерилізували фільтрацією через фільтри з діаметром пор 0,22 мкм (Thermo Scientific, США). *Культура клітин*. Використовували культуру клітин А 549 (клітини карциноми легень людини), отриману з Банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ, Україна). Для культивування клітин використовували поживне середовище, що складалося з 45% DMEM (Sigma, США), 45% RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma, USA) та 10% інактивованої прогріванням при 56°C ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, USA), антибіотиків – пеніциліну та стрептоміцину (по 100 мкг/мл). Умови культивування відповідали рекомендаціям каталогу Європейської колекції культур клітин тварин і людини. *Вірус*. Еталонний штамп аденовірусу серотипу 5 (HAdV-5) одержаний з колекції Інституту мікробіології Будапештського медичного університету (Будапешт, Угорщина). В дослідженнях використовували пул аденовірусу з титром  $7 \times 10^{+7}$  БУО/мл (бляшкоутворюючих одиниць/мл). *Цитотоксичність*. Неофлазид, БАРП та БАР СА досліджували в межах концентрацій 1,13 – 710 мкг/мл; 7,5 – 60 мкг/мл; 6,25 – 50 мкг/мл, відповідно. Речовини розводили середовищем DMEM до відповідних концентрацій під час експерименту. Референс-препарат Ганцикловір досліджували в концентраціях 62 – 1000 мкг/мл. Визначали цитотоксичність 0,313-5% етилового спирту як розчинника досліджуваних речовин. Для визначення життєздатності клітин застосовували МТТ (колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин) [21]. Використовували 96 лункові плашки із сформованим моношаром клітин А 549 через 24 год росту. Видаляли поживне ростове середовище та вносили по 200 мкл речовин, розчинених в середовищі DMEM (Sigma, USA) без сироватки, використовуючи різні концентрації речовин. Дослідження проводили в 3х повторях. Через 24 год проводили візуальну оцінку дії речовин та вносили по 20 мкл розчину 3(4,5-диметилтріазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (МТТ, Sigma, USA) в концентрації 5 мг/мл, витримували 3 год при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>, видаляли середовище, вносили по 150 мкл /лунку 96° етилового спирту та витримували в термостаті-шейкері протягом 15 хв. Визначали оптичну густину зразків спектрофотометрично на рідері Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, USA) при довжині хвилі 540 нм. Вираховували відсоток живих клітин для кожної концентрації речовини порівняно з контролем – клітини без додавання речовин. Значення концентрації речовини, за якої відбувається 50% інгібування росту популяції клітин (CC<sub>50</sub>), було визначено на основі дозозалежних кривих за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel для Pentium Pro. *Дослідження віруліцидної дії* речовин проводили за класичною схемою [22]. Вірусну суспензію (з титром -  $7 \times 10^7$  БУО/мл) змішували з рівним об'ємом маточного розчину речовини та інкубували при 37°C протягом 30 та 150 хв., відбираючи зразки для визначення інфекційного титру вірусу. Моношар добових клітин А 549 інфікували серійними 10х розведеннями вірусомісного матеріалу в об'ємі 50 мкл/лунку в 3-х повторях. Як контроль використовували суміш вірусу з рівним об'ємом підтримуючого середовища, яке витримували в тих же умовах. Через 5 дб культивування, з появою вираженої цитопатогенної дії (ЦПД) вірусу в контролі, до лу-

нок плашки вносили розчин МТТ. Подальшу обробку клітин проводили за стандартною методикою. Титри вірусу визначали за кінцевою точкою розведення вірусу, яке викликає 50% ЦПД [21]. Використовуючи функцію прогнозування програми Microsoft Excel, вираховували титри вірусу та індекс пригнічення репродукції вірусу як відношення логарифму титру контрольного зразка (контроль вірусу) до логарифму титру вірусу в присутності досліджуваної речовини. При дослідженні антивірусної активності використовували наступні схеми обробки клітин: до інфікування вірусом; під час адсорбції; після зараження клітин вірусом. Визначення антивірусної дії речовин проводили за стандартною методикою з МТТ, аналізуючи цитопатогенну дію вірусу [22]. Рівень накопичення вірусної нуклеїнової кислоти в клітинах визначали ПЛР (полімеразною ланцюговою реакцією). Виділення ДНК вірусу з лізатів інфікованих клітин, оброблених речовинами, проводили за допомогою комерційного набору ATGC-Gain (Ukrainian Genetic Technologies, Ukraine) згідно інструкції фірми-виробника. Концентрація ДНК вірусу була виміряна Biophotometer (Eppendorf, Germany). Для виявлення ДНК аденовірусу використовували набір АмплиСенс®Adeovirus-EPh (ФБУН ЦНИИ Епидемиологии Роспотребнадзора, Россия), ампліфікатор Mastercycler personal (Eppendorf, USA). Продукти ампліфікації GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Lithuania) були проаналізовані в 1,7% (w/v) агарозному гелі, що містив 0,01% (v/v) броміду етидію. Результати візуалізували в трансільюмінаторі і обраховували в програмі Gel Imager (DNA-technology, Russia). Інфекційний титр вірусу, синтезованого в присутності речовин, визначали за цитопатогенною дією (ЦПД) на клітини за кінцевою точкою розведення вірусу, яке викликає 50% ЦПД [21]. Розведення вірусу, яке зменшує оптичну густину зразка у порівнянні з оптичною густиною контролю клітин на 50% і є титром вірусу та виражається в  $\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$  (тканинна цитопатогенна доза вірусу). Речовини вносили за 1 годину до інфікування клітин А 549 аденовірусом; під час адсорбції вірусу та після зараження в складі підтримуючого середовища. Через 5 діб культивування матеріали відбирали, тричі заморожували-розморожували, центрифугували протягом 20 хв при 3 тисяч об/хв, видаляли осадки клітин, готували серійні 10-кратні розведення та інфікували моношар добових клітини А 549. Через 5 діб культивування до плашок вносили розчин МТТ та визначали оптичні густини зразків, вираховували інфекційний титр вірусу та відсоток пригнічення репродукції вірусу. Зменшення врожаю вірусу за присутності речовини визначали за формулою

$$\% = (\text{титр КВ} - \text{титр Д}) / \text{титр КВ} * 100,$$

де титр КВ – титр контролю вірусу; титр Д – титр дослідного зразка.

*Статистична обробка результатів.* Усі дослідження проводили в 3-х повторях, кількість паралельних визначень становила 3 – 4. Розраховували середні значення, стандартне відхилення, похибку середньої величини. Відмінності середніх показників вважали достовірними при  $p < 0,05$ . Обробку результатів досліджень проводили із використанням програми Microsoft Office Excel 2010.

**Результати.** Визначали цитотоксичну дію препарату Неофлазид, БАРП та БАР СА на перещеплювані клітини А 549 (табл. 1). Препарат Неофлазид в концентраціях 12 – 710 мкг/мл був токсичний для клітин А 549. Зі зменшенням концентрації препарату зростала кількість життєздатних клітин. Значення показників цитотоксичності ( $CC_{50}$ ), визначені з використанням функції прогнозування програми Microsoft Excel, становили для препарату Неофлазид – 10 мкг/мл, БАРП – 76 мкг/мл, БАР СА – 43 мкг/мл, для препарату порівняння Ганцикловір – 790 мкг/мл.

Оскільки препарат Неофлазид та речовини БАРП та БАР СА містять етиловий спирт, було встановлено його нетоксичну для клітин концентрацію. В концентрації 5% етиловий спирт проявив низьку токсичність для клітин (кількість життєздатних клітин була більше 85%). Препарат Неофлазид речовини БАРП та БАР СА в найвищих досліджених концентраціях містить 5% етилового спирту.

Таким чином, менш токсичним для клітин А 549 був препарат порівняння Ганцикловір ( $CC_{50}=790$  мкг/мл), більш токсичними були речовини БАРП, БАР СА та препарат Неофлазид ( $CC_{50}$  становила 76 мкг/мл, 43 мкг/мл та 10 мкг/мл, відповідно).

**Таблиця 1**

**Цитотоксична дія препарату Неофлазид, БАРП, БАР СА і препарату порівняння Ганцикловір в клітинах А 549**

Речовина	Концентрація, мкг/мл	Середнє значення, ОГ	Живі клітини, %	$CC_{50}$ , мкг/мл
Неофлазид	710	0,0362±0,0087	9	10
	360	0,0504±0,0017	12	
	180	0,0831±0,0030	19	
	90	0,0625±0,0036	14	
	45	0,0505±0,0011	12	
	23	0,0362±0,0087	9	
	12	0,0675±0,0029	16	
	6	0,2684±0,0113	63	
БАРП	3	0,4017±0,0249	95	76
	60	0,2840±0,0421	67	
	30	0,4800±0,0128	113	
	15	0,4664±0,0113	110	
БАР СА	8	0,4575±0,0205	108	43
	50	0,1727±0,0028	41	
	25	0,3520±0,0198	83	
	13	0,4346±0,0339	103	
Ганцикловір	6	0,5186±0,0023	122	790
	1000	0,3277±0,0055	29	
	500	0,7144±0,0111	64	
	250	0,8918±0,0198	80	
	125	0,9067±0,0293	81	
Етиловий спирт*	62	0,8778±0,0030	79	>5
	5	0,8683±0,0450	85	
	2,5	0,9116±0,0472	92	

Примітка: \* концентрація етилового спирту представлена у відсотках

Віруліцидну дію речовин вивчали за класичною схемою [22]. Титр аденовірусу знижувався через 30 і 150 хв інкубації вірусу з препаратом. Через 30 і 150 хв інкубації вірусу з речовиною БАРП індекс пригнічення репродукції становив 0,95 та 1,03, відповідно. Для речовини БАР СА індекс пригнічення репродукції через 30 та 150 хв становив 0,94 та 0,98, відповідно. Для Неофлазиду – індекс пригнічення репродукції становив 1,29 та 1,06, відповідно (табл. 2). Таке зниження титрів вірусу свідчить про малу віруліцидну дію речовин, оскільки, за загальноприйнятими критеріями ефективності препаратів, лише зменшення титру вірусу на 2 log та більше [23] вважається показником вираженої дії речовини.

**Таблиця 2**  
**Вплив препарату Неофлазид, речовин БАРП та БАР СА**  
**на позаклітинний аденовірус**

Речовина	Час інкубації, хв	Титр вірусу, ТЦД <sub>50</sub> /мл	Індекс пригнічення репродукції аденовірусу
Неофлазид	30	4,5x10 <sup>4</sup>	1,29
	150	6,8x10 <sup>4</sup>	1,06
БАРП	30	1,8x10 <sup>6</sup>	0,95
	150	9x10 <sup>5</sup>	1,03
БАР СА	30	2,4x10 <sup>6</sup>	0,94
	150	1,8x10 <sup>6</sup>	0,98
Контроль вірусу	30	1x10 <sup>6</sup>	0
	150	1,3x10 <sup>6</sup>	0

Таким чином, досліджені речовини слабо інактивували позаклітинний вірус. Препарат порівняння в цих дослідженнях не використовувався, оскільки за літературними даними не має віруліцидних властивостей.

Використовуючи метод ПЛР, визначали рівні реплікації вірусної ДНК за присутності різних концентрацій досліджуваних речовин, внесених після інфікування клітин (табл. 3).

**Таблиця 3**  
**Інгібування реплікації аденовірусної ДНК за присутності різних**  
**концентрацій досліджуваних речовин**

Досліджувані речовини	Концентрація речовини, мкг/мл	Інгібування реплікації вірусної ДНК, %
Неофлазид	7,1	23±1,2
	1,42	28±1,1
	0,28	30±1,5
БАРП	30	0
	6	0
	1,2	0
БАР СА	10	0
	2	0
	0,4	50±2,5
Ганцикловір	200	50±2
	40	0

Відсоток інгібування синтезу ДНК аденовірусу визначали по відношенню до контролю вірусу, що прийнятий за 100%. Препарат Неофлазид у концентраціях (0,28 – 10 мкг/мл) на 30-23% пригнічував синтез вірусної ДНК, причому зі зменшенням концентрації показник інгібування зростає. Речовина БАР СА лише в найнижчій досліджуваній концентрації (0,4 мкг/мл) пригнічувала реплікацію вірусної ДНК на 50%, а в більших концентраціях була неактивною. Речовина БАРП не проявила інгібуючого впливу на реплікацію ДНК аденовірусу. Препарат порівняння Ганцикловір в концентрації 200 мкг/мл на 50% пригнічував синтез вірусної ДНК.

Визначали вплив досліджуваних речовин на репродукцію аденовірусу. Використання схеми внесення речовин за деякий час до зараження клітин дозволяє виявити здатність речовини попередити інфікування (профілактичну дію). Клітини А549 за 1 годину до інфікування обробляли різними розведеннями речовин, використовуючи речовини у нетоксичних концентраціях. Множинність інфікування клітин аденовірусом в дослідженні складала 6,5 БУО/клітину. Пригнічення репродукції аденовірусу не перевищувало 7%, що свідчить про відсутність антиаденовірусної дії речовин за використаної схеми їх введення. Аналогічний результат було отримано при визначенні впливу речовин на адсорбцію вірусу (дані не представлені). Досліджували ефективність терапевтичної схеми використання речовин після інфікування вірусом. Речовини в різних концентраціях входили до складу підтримуючого середовища, яке вносили після відмивання клітин від неадсорбованого аденовірусу. Відсоток пригнічення репродукції аденовірусу за цієї схеми введення також був незначним (до 10%). Препарат Ганцикловір в концентраціях 125 – 250 мкг/мл повністю блокував репродукцію вірусу, а в концентраціях 62 та 31 мкг/мл пригнічував на 65% та 57% відповідно (дані не представлені).

Визначення титру аденовірусу, синтезованого *de novo* в присутності речовин, дозволяє виявити вплив речовин на формування інфекційного потомства вірусу та його повноцінність. Показано, що за використання всіх 3-х схем введення у досліджених концентраціях речовини пригнічували утворення повноцінного інфекційного аденовірусу (табл. 4).

Проте виражена антивірусна дія була виявлена лише при внесенні речовин після інфікування в найбільших досліджуваних концентраціях. Виявлено 100% пригнічення утворення інфекційного аденовірусу препаратом Неофлазид, біологічно активним компонентом препарату (БАРП) та синтетичним аналогом (БАР СА) в концентраціях 7,1 мкг/мл, 30 мкг/мл та 10 мкг/мл, відповідно. Про виражений антивірусний ефект свідчить зниження титрів вірусу порівняно з контролем на 2 lg (99% і більше). Препарат порівняння Ганцикловір в концентрації 62 мкг/мл повністю інгібував утворення інфекційного вірусу.

Отже, було досліджено антиаденовірусні властивості препарату НВК «Екофарм» (Україна) Неофлазид (нова субстанція препарату Протифлазид, що містить флавоноїди, представлені у вигляді стійких молекулярних комплексів – тріціна, апігенина, лютеоліна і кверцитина), його біологічно активної речовини (БАРП) і синтетичного аналога (БАР СА). Використання методу редукції вірусної цитопатогенної дії при дослідженні антивірусних властивостей речовин не дозволило виявити значний вплив

речовин на репродукцію аденовірусу. При використанні ПЛР аналізу показано пригнічення реплікації аденовірусної ДНК в присутності різних концентрацій препарату Неофлазид (0,28 – 7,1 мкг/мл) та синтетичного аналогу біологічно активної речовини (БАР СА) в концентрації 0,4 мкг/мл. Речовина БАРП не впливала на рівень накопичення ДНК аденовірусу.

**Таблиця 4**

**Вплив різних концентрацій речовин на показники інфекційності синтезованого *de novo* аденовірусу**

Речовини	Концентрація, мкг/мл	Титр вірусу, ТЦД <sub>50</sub> /мл	Інгібування, %	Дія за існуючими критеріями ефективності
Неофлазид*	7,1	2x10 <sup>2</sup>	100	<b>виражена</b>
	1,42	6,6x10 <sup>4</sup>	98	помірна
	0,28	9,6x10 <sup>4</sup>	97	помірна
	0,06	8,4x10 <sup>4</sup>	98	помірна
БАРП	30	0	100	<b>виражена</b>
	6	7,5x10 <sup>4</sup>	98	помірна
	1,2	7,5x10 <sup>4</sup>	98	помірна
	0,06	9,1x10 <sup>4</sup>	97	помірна
БАР СА	10	0	100	<b>виражена</b>
	2	7,7x10 <sup>4</sup>	98	помірна
	0,4	6,8x10 <sup>4</sup>	98	помірна
	0,08	7,4x10 <sup>4</sup>	98	помірна
Ганцикловір	62	0	100	<b>виражена</b>
	31	3x10 <sup>3</sup>	99	<b>виражена</b>
Контроль вірусу		3,5x10 <sup>6</sup>		

**Обговорення.** За даними Л.Г. Пальчиковської і співавторів [17] мішенню флавоноїдів слугують вірусні ферменти – транскриптаза і протеаза. Виявлено високу пригнічуючу активність діючої речовини препарату Протефлазид на синтез РНК *in vitro* в модельній транскрипційній системі бактеріофага Т7 та придушення процесу ампліфікації: значення ІС<sub>90</sub>, при якому діюча речовина повністю пригнічує синтез ДНК, становить 8 мкг/мл. Нами показано, що препарат Неофлазид, речовини БАРП та БАР СА на 100% пригнічували утворення інфекційного аденовірусу *de novo* в концентраціях 7,1 мкг/мл, 30 мкг/мл та 10 мкг/мл, відповідно. На нашу думку, антивірусна дія речовин пов'язана з впливом на пізні стадії аденовірусної репродукції, а саме – синтез, дозрівання пізніх вірусних білків та формування вірусних капсидів. За присутності досліджуваних речовин не виключена можливість утворення значної кількості дефектного вірусу, який не має інфекційних властивостей. Ще одним механізмом противірусної дії препарату Протефлазид може бути його інтерферогенна активність. Слід зазначити значну стійкість аденовірусів до інтерферону. В системі *in vitro* лише  $\gamma$ -IFN пригнічує синтез вірусних білків та інфекційного вірусу



[24]. За даними авторів [25] препарат Протефлазид *in vitro* стимулює продукцію інтерферону ( $\alpha$ - і  $\gamma$ -IFN) у лейкоцитах та перещеплених культурах клітин. Тому в противірусній активності Неофлазиду може бути задіяний і цей механізм.

Таким чином, нова субстанція препарату Протефлазид з каліброваним вмістом діючої речовини – препарат Неофлазид НВК «Екофарм» (Україна), його біологічно активний компонент (БАВП) та синтетичний аналог (БАВ СР) мають здатність пригнічувати утворення інфекційного аденовірусу, що дає перспективу для проведення відповідних клінічних випробувань.

## АНТИАДЕНОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА НЕОФЛАЗИД *IN VITRO*

*О.Ю. Повниця<sup>1</sup>, Л.О. Белявская<sup>1</sup>, Ю.Б. Паньковская<sup>1</sup>,  
К.С. Науменко<sup>1</sup>, Л. Б. Зеленая<sup>1</sup>, С.Д. Загородняя<sup>1</sup>, В.П. Атаманюк<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им.Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

<sup>2</sup>НПК «ЭКОФАРМ», пр. Степана Бандеры, 9-В, Киев, 04073, Украина

### Резюме

Более 70 серотипов аденовирусов человека вызывают различные инфекционные заболевания, которые в случае иммунодефицитных состояний приводят к высокому риску развития генерализованной формы вирусной инфекции. Ассортимент препаратов с антиаденовирусными активностями на сегодня достаточно ограничен и представлен в основном синтетическими веществами, недостатком которых является их высокая токсичность. **Цель.** Изучить антиаденовирусное действие препарата Неофлазид, его биологически активного компонента (БАВП) и синтетического аналога БАВП (БАВ СР). **Методы.** Для определения цитотоксических, вирулицидных и антиаденовирусных свойств веществ использовали МТТ-анализ. Методом ПЦР анализа определяли уровень накопления вирусной ДНК в клетках. Инфекционный титр вируса, синтезированного в присутствии веществ, определяли по конечной точке разведения вируса, вызывающего 50% ЦПД. **Результаты.** Цитотоксическая концентрация ( $CC_{50}$ ) в культуре клеток А 549 для препарата Неофлазид, веществ БАВП и БАВ СР составляла 10 мкг/мл, 76 мкг/мл и 43 мкг/мл, соответственно. Исследуемые вещества не имели выраженного вирулицидного действия. Неофлазид, БАВП и БАВ СР полностью подавляли образование инфекционного аденовируса в концентрациях 7,1 мкг/мл, 30 мкг/мл и 10 мкг/мл, соответственно. **Выводы.** Препарат Неофлазид НПК «Экофарм» (Киев, Украина), его биологически активное вещество (БАВП) и синтетический аналог (БАВ СР) обладают способностью подавлять образование инфекционного аденовируса, что дает перспективу для проведения соответствующих клинических испытаний.

*Ключевые слова:* Неофлазид, флавоноиды, аденовирус, антивирусное действие.

## ANTI-ADENOVIRAL ACTIVITY OF NEOFLAZID *IN VITRO*

O.Yu. Povnitsa<sup>1</sup>, L.O. Biliavska<sup>1</sup>, Yu.B. Pankivska<sup>1</sup>, K.S. Naumenko<sup>1</sup>,  
L.B. Zelena<sup>1</sup>, S.D. Zagorodnya<sup>1</sup>, V.P. Atamanyuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

<sup>2</sup>SMC "ECOPHARM" Ltd, 9-V Stepan Bandera ave., Kyiv, 04073, Ukraine

### Summary

More than 70 types of human adenovirus cause various infectious diseases, which in the case of immunodeficiency conditions lead to a high risk of developing a generalized form of a viral infection. The assortment of drugs with anti-adenoviral effect is very limited. High toxicity is the main problem of existing synthetic antiviral drugs. **Aim.** Study of cytotoxic, virucidal and anti-adenoviral effect of the drug Neoflazid (new substance of Proteflazid with a calibrated content of the active substance), its biologically active substance (BASP) and its synthetic analog (BAS SA). **Methods.** To determine the cytotoxic, virucidal and anti adenoviral effects of the substances, MTT assay was used. The level of accumulation of the viral nucleic acid in the cells was determined by PCR analysis. The infectious titer of the virus, synthesized in the presence of substances, was determined by cytopathic action on the cells at the end point of the virus breeding, which causes 50% CPE. **Results.** The cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) in the A 549 cells for the drug Neoflazid, the substances BASP and BAS SA were 10  $\mu\text{g/ml}$ , 76  $\mu\text{g/ml}$ , and 43  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The test substances did not have a pronounced virucidal effect. Titration of the adenovirus synthesized by *de novo* in the presence of substances revealed an anti-adenoviral property, since the drug Neoflazid, BASP and BAS SA declaimed completely the formation of infectious adenovirus at concentrations of 7.1  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$ , and 10  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. **Conclusions.** The drug Neoflazid of SMC "Ekopharm" (Kiev, Ukraine), its biologically active substance (BASP) and its synthetic analog of BASP (BAS SA) are able to inhibit the formation of infectious adenovirus, which gives the prospect for appropriate clinical trials.

*Keywords:* Neoflazid, flavonoids, adenovirus, antiviral activity.

1. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014; 27(3):441–62.
2. Hage E, Liebert G, Bergs U, Ganzenmueller T, Heim A. Human mastadenovirus type 70: a novel, multiple recombinant species D mastadenovirus isolated from diarrhoeal faeces of a haematopoietic stem cell transplantation recipient. *Journal of Gen Virology*. 2015; 96(9):2734–42.
3. Grosso F, Stoilov P, Lingwood C, Brown M, Cochrane A. Suppression of adenovirus replication by cardiotoxic steroids. *Journal of Virology*. 2017; 91 (3):1623–39.
4. Epiphanova NV, Navikova NA. [The role of adenoviruses in the occurrence of acute intestinal infection in children (Analytical Review)] *Medial*. 2014; 2 (12):45–57. Russian.
5. Kinchington PR, Romanowski EG, Gordon YJ. Prospects for adenovirus antivirals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 55:424–429.
6. Lenaerts L, Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections. *Antiviral Res*. 2006; 71:172–180.
7. Wold WSM, Toth K. New drug on the horizon for treating adenovirus. *Expert Opin Pharmacother*. 2015; 16 (14):2095–99.

8. Strand M. The discovery of antiviral compounds targeting adenovirus and herpes simplex virus. Assessment of synthetic compounds and natural products. Doctoral thesis, Department of Clinical Microbiology, Virology, Umeå University. 2014.
9. De Clercq E. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates: the magic of the phosphonate bond. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82:99–109.
10. Naesens L, Lenaerts L, Andrei G, Snoeck R, Van Beers D, Holy A, et al. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(3):1010–16.
11. Lankester AC, Heemskerk B, Claas ECJ, Schilham MW, Beersma MF, Bredius RG, et al. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38(11):1521-25.
12. Da Silva AC, Kratz JM, Farias FM, Henriques AT, Dos Santos J, Leonel RM., et al. In vitro antiviral activity of marine sponges collected off *Brasillian coast*. *Biol.Pharm. Bull.* 2006; 29(1):135-40.
13. Nosach LN, Povnitsa OYu, Rudneva II, Shauda VG. [Application of water extracts from cysts of *Artemia* as an antiviral agent with anti-adenoviral and anti-herpetic activity] Ukraine Patent 87251. June 25, 2009. Russian.
14. Rushikesh S, Pravin P, Seetharama J. Peptides, Peptidomimetics, and polypeptides from marine sources: A wealth of natural sources for pharmaceutical applications. *Mar. Drugs.* 2017; 15:124-61.
15. Strand M, Carlsson M, Uvell H, Islam K, Edlund K, Cullman I, et al. Isolation and characterization of anti-adenoviral secondary metabolites from marine actinobacteria. *Mar. Drugs.* 2014; 12(2):799-821.
16. da Mata EC., Mourao CB, Rangel M, Schwartz EF. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 2017; 23:3-15.
17. Palchikovskaya LG, Vasilchenko OV, Platonov MO, Starosyla D B, Porva JI, Rymar S J, et al. [Antiviral properties of plant flavonoids inhibitors of DNA and RNA synthesis]. *Biopolymers and cell.* 2013; 29 (2):150-6. Ukrainian.
18. Pechenka AM, Grinevich AI, Kryuchko TA, Shaginyan VR, Solomakha LN [Proteflasid: specific activity against hepatitis C virus in preclinical studies; efficiency and safety in the treatment of hepatitis B and C in clinical practice (systematic review)]. *Clinical Infectiology and Parasitology.* 2015; 2(13):80-99. Russian.
19. Kurbanov DD, Musabayev EI, Aripdzhovan DS. [Proteplaside is new in the treatment of viral infections (HPV, HSV, CMV) in obstetrics, gynecology and perinatology. Methodical recommendations]. Tashkent: 2007. Russian.
20. Kaminsky V, Chernyshov V, Grynevych O, Benyuk V, Kornatskaya A, Shalko M, et al. Proteflazid and local immunity in diseases caused by human papillomavirus, herpesvirus and mixed urogenital Infections. *Pol Med J.* 2017; 42(249):110-15.
21. Kodama E, Shigeta S, Suzuki T, De Clercq E. Application of gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Research.* 1996; 31:159-64.
22. Nosach LN, Povnitsa OYu. [Preclinical study of specific antiviral action of drugs in cell culture on the adenovirus model. Methodical recommendations]. *Bulletin of Pharmacology and Pharmacy.* 2007; 9:52-64. Russian.

23. Shcherbinskaya AM, Dyachenko NS, Rybalko SL, Nosach LN, Dyadyun ST, Vrinchanu NA. [Antiviral Study of Potential Medicines. In: Stefanov A.V. editors Preclinical studies of drugs. Methodical recommendations]. Kiev: Avicenna; 2002:394-420. Russian
24. Dzyublyk IV, Dyachenko NS, Rybalko SL, Shcherbinskaya AM, Nosach LM, Voronenko SG, Poroghnitsky VG. [Manual on chemotherapy of viral infections. Educational and methodical manual for doctors]. Kyiv Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of Ukraine Kyiv: 2004. Ukrainian.
25. Zavelevich M, Dyadyun S, Ribalko S. [Interferonogenic and apoptosis-modulating activity of the drug protelazid]. Visnik Vinnickogo derzhavnogo Universitetu. 2002; 6 (2):281-3. Russian.

Отримано 14.03.2018