

УДК 582.284.5; 615.281; 578.832

**ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СУММЫ
ФЛАВОНОИДОВ МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ
(ALCHEMILLA VULGARIS L.) В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА**

¹Филиппова Е.И., ²Кукушкина Т.А., ²Лобанова И.Е., ²Высочина Г.И., ¹Мазуркова Н.А.

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»,
Кольцово, e-mail: filippova_ei@vector.nsc.ru;

²ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад» СО РАН, Новосибирск

Исследована противовирусная активность препаратов № 5 и 6, полученных методом этилацетатного извлечения из подземных органов *Alchemilla vulgaris* L. (манжетки обыкновенной), и препаратов № 7(1) и 7(2), полученных методом этанольного извлечения из надземных частей этого растения, на перевиваемой линии клеток MDCK и аутбредных мышах популяции ICR. Выявлено, что все исследованные препараты подавляют в культуре клеток MDCK размножение вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) на 1,0–2,0 Ig и вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) на 2,5–4,0 Ig. Определены 50% ингибирующие вирус гриппа (H3N2 и H5N1) концентрации препаратов, которые составили от нескольких мкг/мл до 1,0–3,5 десятков мкг/мл, а также индексы селективности, значения которых были от 10,0 до 100,0. В опытах *in vivo* при пероральном введении растительных препаратов мышам, инфицированным вирусом гриппа птиц A/H5N1, в профилактической схеме коэффициент защиты животных составил 44,4; 33,3; 16,7 и 13,3%, а в отношении вируса гриппа человека A/H3N2 – 57,8; 37,8; 33,3 и 41,4% для образцов № 5, 6, 7(1) и 7(2) соответственно. Наибольшую защиту животных, инфицированных вирусом гриппа субтипа H3N2 или H5N1, проявлял экстракт № 5, полученный из корней растения. Препарат сравнения Тамифлю® при введении его мышам, инфицированным вирусом гриппа A/H5N1 и A/H3N2, обеспечивал защиту от гибели 50,0 и 77,8% животных соответственно.

Ключевые слова: *Alchemilla vulgaris* L., сухой экстракт, флавоноиды, противовирусная активность *in vitro* и *in vivo*, вирус гриппа

**ANTIVIRAL PROPERTIES BASED DRUG TOTAL FLAVONOIDS LADY'S MANTLE
(ALCHEMILLA VULGARIS L.) AGAINST INFLUENZA VIRUS**

¹Filippova E.I., ²Kukushkina T.A., ²Lobanova I.E., ²Vysochina G.I., ¹Mazurkova N.A.

¹State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, e-mail: filippova_ei@vector.nsc.ru;
²Central siberian botanical garden SB RAS, Novosibirsk

The antiviral activity of the preparations № 5 and 6 obtained by the ethylacetate extraction from underground organs *Alchemilla vulgaris* L. (common cuff) and preparations № № 7(1) and 7(2) obtained by the ethanol extraction of the aerial parts of the plant was studied for transplantable line MDCK cells and outbred mice of population ICR. It was revealed that all investigated drugs inhibit in MDCK cell culture propagation of the human influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) to 1,0–2,0 Ig and avian influenza virus A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) to 2,5–4,0 Ig. 50% inhibiting influenza virus (H3N2 and H5N1) drug concentrations were identified from a few micrograms/ml to dozens of 1,0–3,5 micrograms/ml, and the selectivity index values were 10.0 to 100.0. The animal protection factor was 44.4, 33.3, 16.7 and 13.3% in experiments *in vivo* when orally administered herbal preparations in mice infected with avian influenza virus A/H5N1 in the prophylactic scheme and in the case of human influenza virus A/H3N2 – 57.8; 37.8; 33.3 and 41.4% for samples № 5, 6, 7(1) and 7(2) respectively. The drug № 5 obtained from the roots of plant showed the greatest protection of animals infected with influenza virus subtype H3N2 or H5N1. Comparator drug Tamiflu® when administered to mice infected with influenza virus A/H5N1 and A/H3N2 provides protection of animals against death 50,0 and 77,8% respectively.

Keywords: *Alchemilla vulgaris* L., dry extract, flavonoids, antiviral activity *in vitro* and *in vivo*, influenza virus

В настоящее время для предотвращения и лечения гриппа наряду с вакцинацией как наиболее эффективным противоэпидемическим средством против данной инфекции применяются химиопрофилактика и химиотерапия. Для этих целей в клинической практике имеется широкий спектр иммуномодулирующих, патогенетических и симптоматических средств наряду с препаратами специфической противогриппозной терапии. Последние в основном представлены химическими соединениями

двух групп, отличающихся по мишеням и механизму действия в жизненном цикле вируса гриппа. Препараты первой группы – римантадин и амантадин – блокируют белок M2 вируса гриппа, играющий роль ионного канала в вирусной мембране, препятствуя тем самым процессу расщепления гемагглютинаина и слияния мембран вируса и лизосомальной вакуоли [14]. Препараты второй группы – озельтамивир, занамивир, перамивир и ланинамивир – направлены на ингибирование вирусной нейраминидазы –

фермента, необходимого для почкования вирусных частиц [15]. Обе группы препаратов имеют свои недостатки. В отношении производных адамантана можно отметить сравнительно высокую токсичность и узкий спектр действия (активны только против гриппа А). По сравнению с ними для ингибиторов нейраминидазы характерны несколько меньшая клиническая эффективность и высокая стоимость синтеза, что делает эти препараты менее доступными для широкого использования. Кроме этого, существенным недостатком для препаратов обеих групп является формирование резистентных вариантов вируса.

Поэтому поиск и внедрение в клиническую практику лекарственных средств для профилактики и лечения гриппа продолжает оставаться чрезвычайно актуальным.

В последнее десятилетие во многих странах мира наблюдается повышенный интерес к препаратам, в том числе и противовирусным, растительного происхождения, что обусловлено поливалентностью и мягкостью терапевтического действия биологически активных веществ (БАВ) растений, а также низкой токсичностью растительных препаратов, вследствие чего они могут применяться в течение длительного времени.

Известно, что биологическая активность лекарственных растений напрямую зависит от преимущественного содержания в них тех или иных действующих веществ, а также от комплекса сопутствующих соединений. Особый интерес представляют фенольные соединения, которые найдены почти во всех известных к настоящему времени высших растениях. Препараты на основе фенольных соединений обладают широким спектром биологической активности, в том числе антимикробной и противовирусной [11, 12].

Целью данной работы являлось изучение в культуре клеток и на лабораторных животных противовирусных свойств препарата, полученного на основе суммы флавоноидов из манжетки обыкновенной, в отношении вируса гриппа.

Материалы и методы исследования

В работе использовали водные растворы препаратов из надземных и подземных органов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris L.*), собранной в фазу бутонизации – начала цветения на Семинском перевале Горного Алтая в 1997 году.

Препараты 5 и 6 получали из подземных органов манжетки путем извлечения 50-кратным объемом этилацетата, как описано в [1].

Препарат 7(1) был получен путем этанольного извлечения из сырой массы надземной части манжетки, как описано в [5].

Наряду с препаратами 5, 6, 7(1) были проведены испытания сухого экстракта 7(2) из надземной

части манжетки, собранной в Кемеровской области в 2012 году. Этот экстракт был получен из сухой измельченной травы методом четырехкратной дробной мацерации 70%-м этиловым спиртом при температуре 60°C при соотношении сырья к экстрагенту 1:50 (общее время экстракции – 4 ч.). Охлажденный этанольный экстракт фильтровали, упаривали и высушивали при температуре 60°C.

Качественный анализ образцов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа «Agilent-1200» с диодноматричным детектором и системы сбора и обработки данных ChemStation. Для разделения использовали колонку Zorbax SB-C18, размером 4,6×150 мм, с диаметром частиц 5 мкм, применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1%) изменялось от 50 до 52% за 56 мин. Скорость потока элюента 1 мкл/мин. Температура колонки 26°C. Объем вводимой пробы 5 мкл. Детектирование осуществляли при $\lambda = 360$ нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос. ч) и бидистиллированную воду. Растворы стандартных образцов готовили в концентрации 10 мкг/мл в этиловом спирте. Состав фенольных соединений определяли, сопоставляя времена удерживания пиков веществ и спектральных данных. Проводили сравнение с литературными данными.

Количественное определение флавонолов проводили по методике В.В. Беликова и М.С. Шрайбер [3], в которой использована реакция комплексообразования флавонолов с хлоридом алюминия. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-26 при $\lambda = 415$ нм. Концентрацию флавонолов находили по калибровочному графику, построенному по рутину.

Содержание катехинов определяли спектрофотометрическим методом. Использовали способность катехинов давать малиновое окрашивание с раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте. Плотность раствора измеряли на спектрофотометре СФ-26 при $\lambda = 504$ нм. Пересчетный коэффициент рассчитан по (+) – катехину «Sigma» [6].

Для определения танинов применяли реакцию с 2%-м водным раствором аммония молибденовокислого. Интенсивность образовавшейся окраски измеряли на спектрофотометре СФ-26 при $\lambda = 420$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Расчет танинов производили по государственному стандартному образцу (ГСО) танина [9].

Определение токсичности (максимально переносимых концентраций – МПК и 50% токсических концентраций – TC_{50}) этанольных и этилацетатных извлечений манжетки обыкновенной проводили на клетках MDCK, полученной из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», как описано нами ранее [7].

Определение антивирусной активности растительных экстрактов проводили в культуре клеток MDCK и на аутбредных мышах популяции ICR массой 14–16 г, полученных из Питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и адаптированного к лабораторным мышам вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), полученных из Коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Мышей подвергали эвтаназии в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [8].

В экспериментах *in vitro* антивирусную активность экстрактов определяли по их способности ингибировать продукцию вируса гриппа зараженными клетками в сравнении с контрольной инфицированной культурой (без экстракта). Для этого на клеточный монослой MDCK вносили образцы экстрактов в разных концентрациях в момент их заражения вирусом (множественность заражения составляла 0,01 ТЦД₅₀/кл.). Через 48 ч после заражения клеток вирусом гриппа и обработки их образцами растительных экстрактов брали пробы культуральной жидкости, в которых определяли титры вируса гриппа на клетках MDCK [7], рассчитывали и выражали их в lg ТЦД₅₀/мл (десятичных логарифмах 50%-х тканевых цитопатических доз в мл) по методу Рида и Менча [13]. Затем высчитывали индекс подавления репродукции (ИПР) вируса под влиянием экстрактов:

$$\text{ИПР} = \text{Титр вируса}_{\text{контроль}} - \text{Титр вируса}_{\text{опыт}} \text{ (lg) [7].}$$

Кроме этого, в культуре клеток были определены 50% эффективные дозы (IC₅₀) и индексы селективности (SI) экстрактов, как представлено в [7].

В опытах по изучению протективных свойств растительных препаратов в отношении вируса гриппа А использовали профилактическую схему: препараты вводили перорально мышам (по 200 мкл/мышь) за час до заражения вирусом гриппа А/Н3N2 или А/Н5N1 в дозе 10 ЛД₅₀ (50%-х летальных доз *in vivo*) (ЛД₅₀ определяли, как описано в [2]), далее препараты вводили 2 раза в сутки в течение 5 суток. За животными наблюдали в течение 14 суток. Высчитывали процент выживаемости животных в опыте и контроле и коэффициент защиты (КЗ) мышей. КЗ высчитывали по формуле

$$\% \text{ гибели мышей в контроле} - \% \text{ гибели мышей в опыте}$$

При определении средней продолжительности жизни (СПЖ) в каждой группе учитывали число мышей, проживших определенное количество дней после заражения до гибели, и число выживших животных. За максимальный срок жизни выживших животных принимали 14 сут.

Статистическую обработку проводили стандартными методами с помощью пакета прикладных компьютерных программ «Statistica 6,0» [4, 10]. Сравнение титров вируса в контроле и опыте проводили по t-критерию Стьюдента, сравнение коэффициента защиты мышей в инфицированных группах под действием препарата манжетки проводили по Chi-square критерию, а СПЖ животных – по U-критерию Манна – Уитни [4, 10].

Результаты исследования и их обсуждение

Приводим краткую характеристику препаратов, полученных из надземных и подземных органов растений манжетки обыкновенной.

Препараты № 5 и 6, выделенные из подземных органов манжетки обыкновенной, представляют собой порошок розоватого цвета, состоящий в основном из катехинов и лейкоантоцианов (70%). Методом ВЭЖХ в препарате № 5 идентифицированы (+) – катехин и галловая кислота, в препарате № 6 – (+) – катехин.

Препарат № 7(1) из надземных органов манжетки – это порошок желто-зеленого цвета, состоящий из суммы флавоноидов (71%). Обнаружено не менее 30 соединений, из которых идентифицированы рутин, авикулярин, кверцетин, кемпферол и (–) – катехин.

Препарат № 7(2) представляет собой сухой экстракт коричневого цвета, в составе которого содержится не менее 21 соединения. Идентифицированы авикулярин, (+) – катехин, галловая, гентизиновая, феруловая кислоты и кумарин эскулетин.

Исследование токсичности экстрактов, полученных из корней (образцы № 5 и 6) и надземной части (образцы № 7(1) и 7(2)) растения, показало, что все препараты малотоксичны для клеток MDCK, максимально переносимые концентрации (МПК) на этих клетках для всех экстрактов составили 250 мкг/мл.

При исследовании ингибирования репродукции вируса гриппа в клетках MDCK препаратами из манжетки по профилактической схеме было показано, что препараты № 5 и 6, полученные из корней растения, по сравнению с образцами № 7(1) и 7(2) из его надземных органов в отношении вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) проявили более выраженный антивирусный эффект (ИПР вируса гриппа H3N2 под действием препаратов № 5 и 6 составили 2,0 и 1,95 lg соответственно, тогда как под действием препарата № 7(1) и экстракта № 7(2) – только 1,5 и 1,0 lg соответственно). В отношении другого штамма – А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) так же, как и в отношении А/Aichi/2/68, все исследуемые препараты, полученные как из корней, так и из надземной части манжетки с использованием технологии очистки и концентрирования флавоноидных компонентов, обнаружили более выраженную антивирусную активность по сравнению с таковой для экстракта № 7(2) (ИПР вируса гриппа H5N1 под действием образцов № 5, 6 и 7(1) составили 4,0 lg, а под действием экстракта № 7(2) – 2,5 lg) (табл. 1).

В дальнейших исследованиях были определены TC₅₀ и IC₅₀ препаратов из манжетки в отношении используемых штаммов вируса гриппа и SI, представляющие собой отношение TC₅₀ к IC₅₀ (табл. 2). Как видно из таблицы, все растительные образцы подавляют размножение вируса гриппа А/Н3N2 в клетках MDCK. Значения IC₅₀ составляли 7,0; 14,0; 20,0 и 23,0 мкг/мл, а SI – 71,4; 35,7; 22,5 и 15,2 для образцов № 5, 6, 7(1) и 7(2) соответственно (табл. 2). Оценка эффективности этих же образцов в отношении вируса гриппа А/Н5N1 показала, что значения IC₅₀ для них были ниже по сравнению

со значениями данного показателя в отношении вируса гриппа А/Н3N2 и составляли 5,0; 10,0; 15,0 и 35,0 мкг/мл для образцов № 5, 6, 7(1) и 7(2) соответственно,

при этом SI были выше и составляли 100,0; 50,0 30,0 и 10,0 соответственно, что говорит о низкой токсичности этих препаратов для клеток MDCK.

Таблица 1

Противовирусный эффект препаратов на основе суммы флавоноидов из различных органов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) в культуре клеток MDCK

Вирус гриппа	Орган растения, из которого получен экстракт	Номер образца	Концентрация экстракта, мкг/мл	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /мл (M ± m, n = 3)	Индекс подавления репродукции вируса (Титр _{контроль} – Титр _{опыт}), lg
A/Aichi/2/68 (H3N2)	Корни	5	250	1,50 ± 0,11*	2,00
			100	2,10 ± 0,23*	1,40
			50	3,45 ± 0,31	0,05
		6	250	1,55 ± 0,13*	1,95
			100	2,50 ± 0,15	1,00
			50	3,50 ± 0,11	0
	Надземные органы	7(1)	250	2,00 ± 0,17*	1,50
			100	2,70 ± 0,21	0,80
			50	3,50 ± 0,22	0
		7(2)	250	2,50 ± 0,14	1,00
			100	2,75 ± 0,20	0,75
			50	3,50 ± 0,18	0
	Без экстракта			–	3,50 ± 0,31
A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)	Корни	5	250	0#	4,00
			100	1,50 ± 0,16#	2,50
			50	2,10 ± 0,12#	1,90
		6	250	0#	4,00
			100	1,00 ± 0,22#	3,00
			50	1,80 ± 0,25#	2,20
	Надземные органы	7(1)	250	0#	4,00
			100	1,70 ± 0,11#	2,30
			50	4,00 ± 0,25	1,00
		7(2)	250	1,50 ± 0,22#	2,50
			100	2,50 ± 0,18#	1,50
			50	3,00 ± 0,15	1,00
	Без экстракта			–	4,00 ± 0,69

Примечания: *, # – достоверное отличие от соответствующего контроля (без экстракта) по t-критерию Стьюдента при p ≤ 0,05; M – среднее, m – ошибка среднего; n – число повторов.

Таблица 2

Антивирусный эффект препаратов на основе суммы флавоноидов из различных органов *Alchemilla vulgaris* L. в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа

Номер препарата	50% токсическая концентрация для клеток MDCK (ТС ₅₀ , мкг/мл)	50% эффективная концентрация (IC ₅₀ , мкг/мл) в отношении вируса гриппа:		Индекс селективности (SI) препаратов в отношении вируса гриппа:	
		A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)	A/Aichi/2/68 (H3N2)	A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)	A/Aichi/2/68 (H3N2)
5	500	5,0	7,0	100,0	71,4
6	500	10,0	14,0	50,0	35,7
7(1)	450	15,0	20,0	30,0	22,5
7(2)	350	23,0	35,0	15,2	10,0

Таблица 3

Протективные свойства препаратов на основе суммы флавоноидов из различных органов *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вируса гриппа в опытах на мышах

Номер препарата	Показатели выживаемости мышей при инфицировании 10 ЛД ₅₀ вируса гриппа:		
	A/chiken/Kurgan/05/2005 (H5N1)		
	Количество и % выживших мышей	КЗ, %	СПЖ (M ± Sm)
5 (n = 9)	4 и 44,44	44,44 [#]	12,4 ± 3,88*
6 (n = 9)	3 и 33,33	33,33 [#]	11,8 ± 3,42*
7(1) (n = 12)	2 и 16,66	16,66 [#]	10,8 ± 3,17*
7(2) (n = 15)	2 и 13,33	13,33	9,9 ± 2,7*
Тамифлю (контроль) (n = 10)	5 и 50,00	50,00 [#]	12,6 ± 3,6*
Контроль (без препарата) (n = 10)	0 и 0,00	–	8,0 ± 1,33
	A/Aichi/2/68 (H3N2)		
5 (n = 9)	8 и 80	57,78 [#]	14,2 ± 3,79*
6 (n = 9)	6 и 60	37,78	12,6 ± 4,4*
7(1) (n = 12)	4 и 44,44	33,34	11,4 ± 4,36*
7(2) (n = 15)	4 и 36,36	41,41	11,1 ± 4,0*
Тамифлю (контроль) (n = 10)	10 и 100	77,78 [#]	16,0 ± 0,0*
Контроль (без препарата) (n = 10)	2 и 22,22	–	7,6 ± 4,8

Примечания: КЗ – коэффициент защиты; СПЖ – средняя продолжительность жизни, M – среднее, Sm – стандартное отклонение; [#]отличие от контроля при p ≤ 0,05 по Chi-square критерию; *отличие от контроля при p ≤ 0,05 по U-критерию Манна – Уитни, n – число мышей в группе.

В опытах по изучению протективных свойств препаратов в отношении вируса гриппа установлено, что введение мышам образцов № 5, 6, 7(1) и 7(2) до заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68 и после заражения в течение 5 суток вызывало их значительную защиту (выживаемость животных составила 80,0; 60,0; 44,4 и 36,4% соответственно) (табл. 3).

В инфицированных группах сравнения (введение Тамифлю) и контрольной группе (без препарата) выжило 100 и 22,2% животных соответственно. В аналогичных исследованиях с вирусом гриппа A/chiken/Kurgan/05/2005 установлено, что введение мышам образцов № 5, 6, 7(1) и 7(2) и препарата сравнения Тамифлю защищало от гибели 44,4; 33,3; 16,7; 13,3 и 50,0% животных соответственно при 100% гибели мышей в контроле. Следует отметить, что препарат № 5, полученный из корней растения, проявил наибольшую защиту мышей от гибели при инфицировании их одним из двух используемых штаммов вируса гриппа (КЗ относительно A/H5N1 и A/H3N2 составил 44,4 и 57,8% соответственно) (табл. 3).

Заключение

Препараты на основе *Alchemilla vulgaris* L. проявляют выраженную антигриппозную активность в культуре клеток MDCK и в модели на лабораторных мышах, в связи с чем они

могут быть использованы для создания новых эффективных противовирусных препаратов против данной инфекции.

Список литературы

1. Азовцев Г.Р., Изюмов Е.Г., Зыков А.А. Способ получения Р-витаминного препарата. Авт. свид. № 1073966. – 1983.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические исследования в микробиологических исследованиях. – Л., 1962.
3. Беликов В.В., Шрайбер М.С. Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация. – 1970. – № 1. – С. 66–72.
4. Закс Л. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. – С. 598.
5. Кукушкина Т.А., Жанаева Т.А., Зыков А.А., Обухова Л.А., Селянитская В.Г. Способ получения Р-витаминного средства. Патент № 2128516. 1999.
6. Кукушкина Т.А., Зыков А.А., Обухова Л.А. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. – СПб., 2003. – С. 64–69.
7. Мазуркова Н.А., Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Лобанова И.Е., Высочина Г.И. Высшие растения как основа для разработки противогриппозных препаратов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – № 4. – С. 55–56.
8. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. – Washington, D.C.: National Academy Press; 1996. 138.
9. Федосеева Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае // Химия растительного сырья. – 2005. – № 2. – С. 45–50.

10. Халафян А.А. Statistica 6. Статистический анализ данных. – 2-е изд. – М.: ООО «Бином-Пресс»; 2010.

11. Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Ng L.T., Lin C.C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro // *Antiviral Research*. – 2002. – Vol. 55. – P. 53–62.

12. Du J., He Zh.-D., Jiang R.-W., Ye W.-C., Xu H.-X., But P. P.-H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. // *Phytochemistry*. – 2003. – Vol. 62. – P. 1235–1238.

13. Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating 50% endpoints // *Am. J. Hyg.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493–497.

14. Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives // *Antiviral Res.* – 1998. – Vol. 37. – P. 83–95.

15. Woodhead M., Lavanchy D., Johnston S., Colman P., Fleming D. Neuraminidase inhibitors: progress in the management of influenza // *Int. J. Clin. Pract.* – 2000. – Vol. 54(9). – P. 604–610.

References

1. Azovcev G.R., Izjumov E.G., Zykov A.A. Sposob polucheniya R-vitaminogo preparata. Avt. svid. no. 1073966. 1983.

2. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statisticheskie issledovaniya v mikrobiologicheskikh issledovaniyah. L., 1962.

3. Belikov V.V., Shrajber M.S. Metody analiza flavonoidnyh soedinenij // *Farmacija*. 1970. no. 1. pp. 66–72.

4. Zaks L. Statisticheskoe ocenivanie. M.: Statistika, 1976. pp. 598.

5. Kukushkina T.A., Zhanaeva T.A., Zykov A.A., Obuhova L.A., Seljatitskaja V.G. Sposob polucheniya R-vitaminogo sredstva. Patent no. 2128516. 1999.

6. Kukushkina T.A., Zykov A.A., Obuhova L.A. Manzheta obyknovennaja (*Alchemilla vulgaris* L.) kak istochnik lekarstvennyh sredstv // *Aktualnye problemy sozdaniya novyh lekarstvennyh preparatov prirodnoho proishozhdenija*. SPb., 2003. pp. 64–69.

7. Mazurkova N.A., Filippova E.I., Makarevich E.V., Lobanova I.E., Vysochina G.I. Vysshie rasteniya kak osnova dlja razrabotki protivogrippoznyh preparatov // *Voprosy biologicheskoi, medicinskoj i farmacevticheskoi himii*. 2014. no. 4. pp. 55–56.

8. Rukovodstvo po sodержaniyu i ispolzovaniju laboratornyh zhivotnyh. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996. 138.

9. Fedoseeva L.M. Izuchenie dubilnyh veshhestv podzemnyh i nadzemnyh organov badana tolstolistnogo (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), proizrastajushhego na Altai // *Himija rastitel'nogo syrja*. 2005. no. 2. pp. 45–50.

10. Halafjan A.A. Statistica 6. Statisticheskij analiz danyh. 2-e izd. M.: ООО «Бином-Пресс»; 2010.

11. Chiang L.C., Chiang W., Chang M.Y., Ng L.T., Lin C.C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro // *Antiviral Research*. 2002. Vol. 55. pp. 53–62.

12. Du J., He Zh.-D., Jiang R.-W., Ye W.-C., Xu H.-X., But P. P.-H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. // *Phytochemistry*. 2003. Vol. 62. pp. 1235–1238.

13. Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating 50% endpoints // *Am. J. Hyg.* 1938. Vol. 27. P. 493–497.

14. Scholtissek S., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives // *Antiviral Res.* 1998. Vol. 37. pp. 83–95.

15. Woodhead M., Lavanchy D., Johnston S., Colman P., Fleming D. Neuraminidase inhibitors: progress in the management of influenza // *Int. J. Clin. Pract.* 2000. Vol. 54(9). pp. 604–610.

Рецензенты:

Белявская В.А., д.б.н., профессор, заведующая сектором отдела научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями особо опасных инфекций, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово;

Лебедев Л.Р., д.м.н., заведующий лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков, Институт медицинской биотехнологии, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», г. Бердск.