

# Разработка способа оценки противовирусной активности лекарственных препаратов

Б.А. Имамалиев, Р.Р. Шокодилов

ООО Научный центр «Med Standart»,

Республика Узбекистан, 100049, Ташкент, Алмазарский район, ул. Карасарай 343

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Имамалиев Бахтиер Алишерович** – руководитель научно-исследовательского центра ООО «Med Standart», доктор филологии (PhD) по фармацевтическим наукам. Тел: +9 (9893) 516-60-81; +9 (9871) 248-04-66. E-mail: teokrat\_1985@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-7526-5105*

**Шокодилов Рахмонжон Расулжонович** – фармаколог, ООО Научный центр «Med Standart». Тел.: +9 (9890) 353-36-06. E-mail: abdurakhmon95@gmail.com. *ORCID: 0000-0003-0858-2159*

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** На сегодняшний день для экспериментальной оценки противовирусной активности лекарственных препаратов применяют ряд методов *in vitro* и *in vivo*, основанных на использовании штаммов вирусов. Однако недостатком всех этих методов является непостоянная доступность экспериментатору того или иного штамма вируса, что затрудняет оценку противовирусной активности препарата.

**Цель исследования.** Разработка способа оценки противовирусной активности лекарственных препаратов без использования штаммов вирусов.

**Материал и методы.** Авторы предполагают, что противовирусные препараты будут оказывать защитное действие на эритроциты в условиях осмотического гемолиза, так же, как на клетку в условиях вирусной атаки клетки. Следует сказать, что в литературе не представлены сведения о защитных свойствах противовирусных средств в условиях осмотического гемолиза, что делает данную разработку уникальной.

В разработке был использован способ, основанный на оценке осмотической активности эритроцитов по новому назначению.

**Результаты.** По результатам эксперимента установлено, что эталонные противовирусные лекарственные препараты оказывают защитное действие на клетки крови в условиях осмотического гемолиза.

**Заключение.** Разработан новый способ, основанный на способности противовирусного препарата оказывать защитное действие на эритроциты в условиях осмотического гемолиза, который может быть рекомендован для экспериментального изучения противовирусной активности лекарственных препаратов, обладающих противовирусным действием.

**Ключевые слова:** противовирусная активность, способ, осмотический гемолиз, эритроциты.

**Для цитирования:** Имамалиев Б.А., Шокодилов Р.Р. Разработка способа оценки противовирусной активности лекарственных препаратов. Фармация, 2022; 71 (5): 51–55. <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-05-08>

## DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ASSESSING DRUGS ANTIVIRAL ACTIVITY

B.A. Imamaliev, R.R. Shokodirov

Scientific Center «Med Standart LLC», Karasaray street 343, Almazar district, Tashkent, 100049, Republic of Uzbekistan

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Imamaliev Bakhtiyor Alisherovich** – Head of Scientific Center «Med Standart LLC». PhD Pharmaceutical Sciences. Tel: +9 (9893) 516-60-81; +9 (9871) 248-04-66. E-mail: teokrat\_1985@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-7526-5105*

**Shokodirov Rakhmonjon Rasuljonovich** – pharmacologist, Scientific Center Scientific Center «Med Standart LLC». Tel.: +9 (9890) 353-36-06. E-mail: abdurakhmon95@gmail.com. *ORCID: 0000-0003-0858-2159*

## SUMMARY

**Introduction:** to date, for the experimental evaluation of the antiviral activity of drugs, a number of *in vitro* and *in vivo* methods based on the use of virus strains is used. However, the disadvantage of all these methods is that it does not always happen that one or another virus strain is available to the experimenter, which makes it difficult to assess the antiviral activity of the drug.

Purpose of the study: development of a method for evaluating the antiviral evaluation of drugs, without the use of virus strains.

**Material and methods:** the authors suggest that antiviral preparations will have a protective effect on erythrocytes under conditions of osmotic hemolysis, as well as have a protective effect on the cell under conditions of a viral attack of the cell. It should be noted that the literature does not provide information on the protective properties of antiviral agents under conditions of osmotic hemolysis, which makes this development unique.

In the development, a method was used based on the assessment of the osmotic activity of erythrocytes for a new purpose.

**Results:** according to the results of the experiment, it was found that reference antiviral preparations have a protective effect on blood cells under conditions of osmotic hemolysis.

**Conclusion:** a new method has been developed based on the ability of an antiviral drug to have a protective effect on erythrocytes under conditions of osmotic hemolysis, which can be recommended for experimental study of the antiviral activity of medicinal and pharmacological preparations with antiviral activity.

**Key words:** antiviral activity, method, osmotic hemolysis, erythrocytes.

**For reference:** Imamaliyev B.A., Shokodirov R.R. Development of a method for assessing drugs antiviral activity. Farmatsiya, 2022; 71 (5): 51–55. <https://doi.org/10/29296/25419218-2022-05-08>

## Введение

На сегодняшний день для экспериментальной оценки противовирусной активности лекарственных препаратов (ЛП) применяют ряд методов *in vitro* и *in vivo*, основанных на использовании штаммов вирусов [1–6]. Однако недостатком всех этих методов является непостоянная доступность экспериментатору того или иного штамма вируса, что затрудняет оценку противовирусной активности ЛП. Также содержание и выделение референтных штаммов вирусов – весьма трудная задача, так как для этого нужно специальное разрешение и специальные условия, а в экспериментальной оценке противовирусной активности применимы только референтные штаммы вирусов, так как иначе результат не является стандартизованным. Однако у многих разработчиков ЛП возникает необходимость в проведении скрининговой оценки противовирусной активности ЛП при ограниченных лабораторных возможностях и непригодных существующих методах. Поэтому возникает задача разработки методов экспериментального изучения противовирусной активности ЛП без применения штаммов вирусов.

Таким образом, возникает актуальная задача в разработке способа оценки противовирусной активности без использования штаммов вирусов.

Целью исследования являлось разработка способа оценки противовирусной активности лекарственных препаратов без использования штаммов вирусов.

## Материал и методы

Исследования были проведены согласно требованиям действующего регионального стандарта GLP «Надлежащая лабораторная практика», а также с соблюдением всех норм и правил Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и научных целей.

**Сущность разработки.** Авторы предполагают, что противовирусные ЛП будут оказывать

защитное действие на эритроциты в условиях осмотического гемолиза, также, как и оказывают защитное действие на клетку в условиях вирусной атаки клетки. Следует сказать, что в литературе не представлены сведения о защитных свойствах противовирусных средств в условиях осмотического гемолиза, что делает данную разработку уникальной.

Авторы использовали метод, основанный на оценке осмотической активности эритроцитов [7] по новому назначению.

Для экспериментальной оценки разработанного способа нами были использованы эталонные противовирусные ЛП:

- фавипиравир (противовирусный ЛП для лечения коронавирусной инфекции);
- ацикловир (противовирусный ЛП для лечения герпеса);
- ремдесивир (противовирусный ЛП для лечения вируса Эбола, вируса лихорадки Ласса, вируса Нипах, вируса Хендра);
- софосбувир (противовирусный ЛП для лечения гепатита С);
- тенефовир (противовирусный ЛП для лечения гепатита В и ВИЧ);
- осельтамивир (противовирусный ЛП для лечения гриппа);
- циклоферон (меглюмина акридонацетат, противовирусный ЛП интерферониндуцирующего действия).

2 мл 1% взвеси эритроцитов на физиологическом растворе помещали в пробирку, в эритроцитарную взвесь добавляли 0,1 мл лекарственного ЛП по следующей схеме (табл. 1). Контрольная проба включала 2 мл 1% взвеси эритроцитов на физиологическом растворе и 0,1 мл физиологического раствора.

Далее смесь в пробирках аккуратно перемешивали и помещали в термостат на 10 мин при температуре 37°C. Затем пробирки вынимали из термостата, в каждую пробирку наливали 2 мл воды дистиллированной, аккуратно перемешивали и оставляли в термостате еще на 1 ч при темпе-

ратуре 37°C. Пробирки вынимали и центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. Далее отделяли надосадочную жидкость и проводили измерение оптической плотности надосадочной жидкости на спектрофотометре при длине волны 540 нм против холостой пробы (вода), толщина кюветы 1 см.

Критерием оценки противовирусной активности служило уменьшение оптической плотности опытной пробы по сравнению с контролем. Противовирусная активность (%) рассчитывалась по формуле:

$$\% \text{ эффекта} = ([D_o - D_k] / D_k \times 100\%,$$

где  $D_k$  – оптическая плотность раствора контрольной пробы;  $D_o$  – оптическая плотность раствора опытной пробы.

**Приготовление 1% взвеси эритроцитов.** Для приготовления взвеси эритроцитов нами была использована цитратная кровь, заготовленная на 3,8% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9. Цитратную кровь в объеме 5 мл центрифугировали 10 мин при 900 об/мин. Надосадочную жидкость отделяли, к осадку добавляли 8 мл стерильного 0,9% раствора хлористого натрия. Содержимое взбалтывали и центрифугировали 10 мин при 900 об/мин и снова отделяли надосадочную жидкость. Эту операцию (отмывание клеток) повторяли 2 раза. После отмывания надосадочная жидкость была прозрачной, бесцветной, без следов гемолиза. Далее 1 мл осадка клеток смешивали с 99 мл 0,9% раствора хлористого натрия, для получения 1% взвеси эритроцитов.

Результаты обработаны методом вариационной статистики по критерию Стьюдента при  $p=0,05$  [1]. В таблицах приведены средние арифметические значения ( $M$ ), соответствующие им стандартные ошибки среднего значения ( $m$ ), критерий Стьюдента ( $t$ ), количество выборок ( $n$ ), доверительные границы (нижняя доверительная граница – верхняя доверительная граница).

### Результаты и обсуждение

По результатам исследования было установлено (табл. 2), что фавипиравир во всех концентрациях 0,2; 0,0667; 0,033 и 0,02 г/мл статистически достоверно снижает гемолиз эритроцитов. Следует сказать, что наивысший эффект фавипиравира проявляется в концентрации 0,2 г/мл.

Ацикловир во всех концентрациях 0,2; 0,1; 0,033 и 0,02 г/мл, также статистически достоверно снижает гемолиз эритроцитов. Следует ска-

зать, что наивысший эффект ацикловира проявляется в концентрации 0,2 г/мл.

В случае ремдесивира во всех концентрациях 0,1 г/мл, также статистически достоверно снижает гемолиз эритроцитов, однако в концентрации 0,033 г/мл эффект недостоверный. Следует сказать, что наивысший эффект ремдесивир проявляется в концентрации 0,1 г/мл.

Софосбувир во всех концентрациях 0,2; 0,1; 0,033 и 0,02 г/мл также статистически достоверно снижает гемолиз эритроцитов. Следует сказать, что наивысший эффект софосбувира проявляется в концентрации 0,2 г/мл.

В случае тенефовира во всех концентрациях 0,2; 0,1 и 0,033 г/мл также статистически досто-

Таблица 1

### Концентрации ЛП, используемых в исследовании

Table 1

### Drug concentrations used in the study

№ пробы	Лекарственный препарат	Концентрация ЛП, г/мл
1.	Фавипиравир	0,2
2.		0,0667
3.		0,0333
4.		0,02
5.	Ацикловир	0,2
6.		0,1
7.		0,0333
8.		0,02
9.	Ремдесавир	0,1
10.		0,033
11.	Софосбувир	0,2
12.		0,1
13.		0,033
14.		0,02
15.	Тенефовир	0,2
16.		0,1
17.		0,033
18.	Осельтамивир	0,2
19.		0,1
20.		0,033
21.	Циклоферон	0,2
22.		0,1
23.		0,033

верно снижает гемолиз эритроцитов. Следует сказать, что наивысший эффект тенефовира проявляется в концентрации 0,2 г/мл.

Осельтамивир во всех концентрациях 0,2; 0,1; и 0,033 г/мл также статистически достоверно снижает гемолиз эритроцитов. Следует сказать, что наивысший эффект осельтамивира проявляется в концентрации 0,1 г/мл.

В случае циклоферона во всех концентрациях 0,2; 0,1 и 0,033 г/мл также статистически достоверно снижает гемолиз эритроцитов. Следу-

ет сказать, что наивысший эффект циклоферона проявляется в концентрации 0,2 г/мл.

Полученные результаты доказывают, что противовирусные ЛП оказывают защитное действие на клетки крови в условиях осмотического гемолиза. Следует отдельно подчеркнуть, что по механизму действия противовирусные ЛП прямого действия делятся на препятствующие проникновению вируса в клетку, размножению вируса внутри клетки и выходу копий вируса из клетки, иными словами, суть противовирусного действия противовирусного ЛП – это защита клетки от атаки вирусов. Исходя из полученных данных, можно сделать логический вывод, что цитозащитное действие противовирусных ЛП также может быть использовано в условиях осмотического гемолиза для оценки противовирусной активности, что подтверждается экспериментально.

Так как данный способ является уникальным и носит изобретательский характер, то авторами была подана заявка на патентование данного изобретения (заявка на изобретение РУзб. IAP 20200526 Имамалиев Б.А., Шокодилов Р.Р. Способ экспериментального изучения противовирусной активности).

### Заключение

Разработанный новый способ, основанный на способности противовирусного ЛП оказывать защитное действие на эритроциты в условиях осмотического гемолиза, может быть рекомендован для экспериментального изучения противовирусной активности ЛП, обладающих противовирусным действием.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

### Литература

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012; 944.
2. Лебедева В.В., Федякина И.Т., Латышев О.Е., Бурцева Е.И., Кулес И.В., Блинов Д.В., Елисеева О.В., Ларичев В.Ф., Гараев Т.М., Гребенникова Т.В. Противовирусная активность бензидамина гидрохлорида в отношении SARS-CoV-2 на модели in vitro. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021; 20 (3): 83–90. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-3-83-90>

Таблица 2

Результаты измерения оптической плотности (M±tm; p=0,05; n=6)

Table 2

Optical density measurement results (M±tm; p=0.05; n=6)

Группа	Концентрация ЛП г/мл	Оптическая плотность	% эффекта
Контроль	–	0,68750 (0,65380±0,72120)	–
Фавипиравир	0,2	0,21083 (0,19802±0,22364)	69,3%
	0,0667	0,27083 (0,25996±0,28171)	60,6%
	0,033	0,40083 (0,37605±0,42561)	41,7%
	0,02	0,47667 (0,45619±0,49715)	30,7%
Ацикловир	0,2	0,23717 (0,22832±0,24601)	65,5%
	0,1	0,38067 (0,35244±0,40889)	44,6%
	0,033	0,45717 (0,43801±0,47632)	33,5%
	0,02	0,55700 (0,53607±0,57793)	19,0%
Ремдесивир	0,1	0,62033 (0,60821±0,63246)	9,8%
	0,033	0,69433 (0,68337±0,70529)	1,0%
Софосбувир	0,2	0,61317 (0,59490±0,63144)	10,8%
	0,1	0,61350 (0,60994±0,61706)	10,8%
	0,033	0,62400 (0,61091±0,63709)	9,2%
	0,02	0,64900 (0,64377±0,65423)	5,6%
Тенефовир	0,2	0,31800 (0,31192±0,32408)	53,7%
	0,1	0,36033 (0,35338±0,36729)	47,6%
	0,033	0,40950 (0,39337±0,42563)	40,4%
Осельтамивир	0,2	0,46650 (0,45452±0,47848)	32,1%
	0,1	0,43917 (0,42215±0,45619)	36,1%
	0,033	0,51700 (0,49294±0,54106)	24,8%
Циклоферон	0,2	0,51000 (0,49572±0,52428)	25,8%
	0,1	0,55567 (0,53094±0,58040)	19,2%
	0,033	0,58033 (0,53779±0,62288)	15,6%

3. Мазуркова Н.А., Проценко М.А., Филиппова Е.И., Кукушкина Т.А., Высочина Г.И., Лобанова И.Е., Мазурков О.Ю., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П. Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, полученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2019; 8 (4): 9–15. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15>

4. Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Одноров А.И. Оценка противовирусной активности соединения 2HCl\*H-His-Rim в сравнении с противовирусным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae). Вопросы вирусологии. 2019; 64 (6): 268–73. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>

5. Зарубаев В.В., Слита А.В., Синегубова Е.О. и др. Противовирусная активность энисамия йодида в отношении вирусов гриппа и ОРВИ in vitro на различных клеточных линиях. Терапевтический архив. 2020; 92 (11): 45–50. <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000872>

6. Чернакова Г.М., Майчук Д.Ю., Клещева Е.А., Мезенцева М.В., Руссу Л.И., Суетина И.А., Исаева Е.И. Изучение in vitro противовирусной активности пиклоксидина 0,05% (на примере аденовируса). Офтальмология. 2020; 17 (3s): 634–9. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-3S-634-639>

7. Урбанова Е.З., Гуляев С.М., Николаев С.М., Туртуева Т.А. Мембраностабилизирующий эффект экстракта *Phlojodicarpus Sibiricus*. Сибирский медицинский журнал. 2013; 8: 104–5.

Hydrochloride against SARS-CoV-2 in vitro Model. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2021; 20 (3): 83–90. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-3-83-90> (in Russian).

3. Mazurkova N.A., Protsenko M.A., Filippova E.I., Kukushkina T.A., Vysochina G.I., Lobanova I.E., Mazurkov O.Yu., Shishkina L.N., Agafonov A.P. Investigation of the Antiviral Activity of Experimental Samples Obtained from the Grass and Roots of *Alchemilla vulgaris* L. Against Vaccinia Virus and Ectromelia Virus. Drug development & registration. 2019; 8 (4): 9–15. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15> (in Russian).

4. Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Odnorov A.I. Assessment of the antiviral activity of 2HCl\*H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae). Problems of Virology. 2019; 64 (6): 268–73. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273> (in Russian).

5. Zarubaev V.V., Slita A.V., Sinigubova E.O., et al. Anti-viral activity of enisamium iodide against viruses of influenza and ARVI's on different cell lines. Therapeutic Archive. 2020; 92 (11): 45–50. <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000872> (in Russian).

6. Chernakova G.M., Maychuk D.Yu., Klesheva E.A., Mezentseva M.V., Russu L.I., Suetina I.A., Isaeva E.I. In Vitro Study of Picloxadine 0,05% Antiviral Activity (on the Example of Adenovirus). Ophthalmology in Russia. 2020; 17 (3s): 634–9. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2020-3S-634-639> (in Russian).

7. Urbanova E.Z., Gulyaev S.M., Nikolaev S.M., Turtueva T.A. Membrane stabilizing effect of *Phlojodicarpus Sibiricus* extract. Siberian Medical J. 2013; 8: 104–5 (in Russian).

## References

1. Guidelines for pre-clinical study of medicinal products. Part One. Ed. A.N. Mironov. Moscow: Grief and K, 2012; 944 (in Russian).

2. Lebedeva V.V., Fedyakina I.T., Latyshev O.E., Burtseva E.I., Kukes I.V., Blinov D.V., Eliseeva O.V., Larichev V.F., Garaev T.M., Grebennikova T.V. Antiviral Activity of Benzydamine

*Поступила 3 мая 2022 г.*

*Received 3 May 2022*

*Принята к публикации 24 июня 2022 г.*

*Accepted 24 June 2022*