

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ БАД «РАДАЛЕЯ» В ОТНОШЕНИИ КОРОНАВИРУСА ОС43 И ВИРУСА ГЕРПЕСА

Келин Леонид Валерьевич.

Кандидат экономических наук, директор ООО «Северный стиль», г. Москва. Тел. 8(383)220-84-77, kelins@mail.ru

Ефремов Анатолий Васильевич.

Доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, Засл. деятель науки РФ, Директор АНО «Международная оздоровительная клиника», г. Новосибирск, eav48@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследования противовирусной активности БАД Радаля in vitro в отношении вируса герпеса и коронавируса человека ОС43. Показано наличие противовирусной активности БАД в отношении обоих изученных в настоящей работе вирусов, при использовании по лечебно-профилактической схеме в экспериментах in vitro на культуре клеток. Значения химиотерапевтического индекса препарата превышают 17 и 57,4 для вирусов герпеса и коронавируса ОС43, соответственно.

Ключевые слова: Радаля, противовирусное действие, коронавирус ОС43, вирус герпеса

DETERMINATION OF CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL EFFECT OF RADALEA DIETARY SUPPLEMENT COMPONENTS IN RELATION TO OS43 CORONAVIRUS AND HERPES VIRUS

Leonid V. Kelin. Candidate of Economic Sciences, Director, LLC "Northern Style", Moscow. Tel. 8(383)220-84-77, kelins@mail.ru

Efremov Anatoly Vasilyevich. Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Distinguished Scientist of the Russian Federation, Director of the ANO "International Wellness Clinic", Novosibirsk, eav48@yandex.ru

Annotation. The article presents the results of a study of the antiviral activity of the dietary supplement Radalea in vitro against the herpes virus and human coronavirus OS43. The presence of antiviral activity of the drug against both viruses studied in this work has been shown when used according to the therapeutic and prophylactic scheme in in vitro experiments on cell culture. The values of the chemotherapeutic index of the drug exceed 17 and 57.4 for herpes viruses and coronavirus OS43, respectively.

Keywords: Radalea, antiviral effect, OS43 coronavirus, herpes virus,

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей статье применяются следующие термины с соответствующими определениями, сокращения и обозначения:

МТТ-тест - микротетразолиевый тест

ТИД50 - 50 % тканевая инфекционная доза - доза вируса, вызывающая заражение 50 % клеток

ЦТД50 - 50 % цитотоксичная доза - доза препарата, вызывающая гибель половины клеток

ХТИ - Химиотерапевтический индекс (также селективный индекс) - показатель широты терапевтического действия лекарственного средства либо БАД, указывает на разницу между токсической и эффективной концентрациями. Чем выше значение этого индекса, тем более перспективным противовирусным средством считается препарат.

ЭД50 – средняя эффективная доза – доза препарата, которая уменьшает количество вируса

Вирусные заболевания являются острой медико-социальной проблемой, затрагивающей все человечество. В настоящее время наблюдается глобальное распространение инфекции COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2. Высокая контагиозность данного возбудителя, большое количество летальных исходов, а также отсутствие доступных этиотропных средств терапии говорят о необходимости разработки новых лекарственных препаратов, предназначенных для её лечения [1.2]. В последние годы расширяется поиск и исследование биологически активных препаратов с противовирусной активностью. Все большее применение в качестве лечебных препаратов в противовирусной терапии находят нуклеазы микроорганизмов. В частности, установлено, что рибонуклеазы обладают противовирусной активностью в отношении таких РНК-содержащих вирусов, как вирусы гриппа, полиомиелита, клещевого энцефалита; дезоксирибонуклеазы тормозят размножение ДНК-содержащих вирусов. В настоящее время для лечения вирусных заболеваний в медицинской практике применяют фармацевтические препараты нуклеаз: при клещевом энцефалите используют «Рибонуклеазу», препарат «Дезоксирибонуклеазу» - при герпетических кератитах, остром катаральном воспалении верхних дыхательных путей аденовирусной природы, при поражениях, вызванных вирусом герпеса 1 и 2 типа. Ведутся работы по выделению и характеристике секретируемых РНКаз бактерий рода *Pseudomonas*. Показано, что внеклеточная рибонуклеаза *Bacillus cereus* эффективна против вируса табачной мозаики.

Объектом исследования являлся БАД Радалея.

Целью работы является оценка цитотоксичности и противовирусной активности препарата БАД «Радалея» *in vitro* в отношении вируса герпеса и коронавируса ОС-43.

В ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» было проведено исследование противовирусной активности препарата БАД «Радалея» *in vitro* в отношении вируса герпеса и коронавируса человека OC43.

Работа с вирусом SARS-CoV2 требует специальных условий и возможна не во всех исследовательских лабораториях, вследствие чего первоначальный этап поиска и разработки новых лекарственных средств представляется возможным проводить с использованием так называемого суррогатного вируса – близкородственного к необходимому инфекционному агенту штамма, обладающего более низкой патогенностью для человека. В настоящей работе в качестве такого суррогатного патогена используется коронавирус человека OC43, относящийся к тому же роду *Betacoronavirus*, что и SARS-CoV2.

Помимо коронавируса, в ходе проведения настоящей работы будет изучена противовирусная активность препарата в отношении вируса герпеса – одного из самых распространенных в человеческой популяции инфекционных агентов, затрагивающих до 67% обитателей планеты [1].

В задачи исследования входит:

1. Провести оценку противовирусного действия препарата
2. На основании полученных результатов выбрать дозы исследуемого препарата и оценить его противовирусную активность в отношении вируса герпеса и коронавируса OC43.

1. Материалы и методы исследования.

Эксперименты по изучению специфической фармакологической активности БАД «Радалея» *in vitro* проводили согласно Техническому заданию Договора № 14122021 от 14.12.2021 г.

1.1 Исследуемые препараты.

БАД «Радалея» был предоставлен в виде лиофилизированного порошка. После получения хранился при температуре +4оС.

1.2 Вирусы.

Сезонный коронавирус (вариант OC-43, штамм 1902) получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Накоплен на культуре клеток Vero, далее из вирусосодержащей культуральной жидкости готовили серию аликвот. Полученные аликвоты хранились при температуре - 80оС.

Вирус герпеса человека 1 типа, штамм ЕС, получен из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Накоплен на культуре клеток Vero, далее из вирусосодержащей культуральной жидкости готовили серию аликвот. Полученные аликвоты хранились при температуре -80оС.

Культуры клеток. В настоящей работе была использована клеточная культура Vero (почечный эпителий зеленой мартышки), полученная из рабочей коллекции лаборатории химиотерапии вирусных инфекций.

Определение цитотоксичности *in vitro*. Готовили серию 2-х кратных разведений препарата в поддерживающей среде, начиная с 833 у.ед., далее в

лунки вносили растворы исследуемого соединения. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5%CO₂ в течение 4 суток. По окончании срока инкубации клетки отмывали от супернатанта физиологическим раствором (по 100 мкл/лунку).

Далее готовили раствор 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) 0,5 мг/мл растворяли в физиологическом растворе. Полученный раствор вносили в лунки в объеме 100 мкл/лунку. Далее планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 1,5-2 часа, чтобы произошло восстановление соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана. Затем жидкость удаляли, добавляли в лунки по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксид) и осуществляли измерение оптической плотности при длине волны 535 нм. На основании полученных значений оптической плотности вычисляли ЦТД₅₀ (50% цитотоксическая доза) соединения – дозу вещества в лунке, при которой наблюдается 50% деструкция клеточного монослоя.

Оценка противовирусной активности исследуемых соединений.

Противовирусную активность исследуемого препарата, а также препаратов сравнения оценивали по лечебно-профилактической схеме.

Готовили серию трехкратных разведений препарата на поддерживающей среде, после чего наносили на суточный монослой клеточной культуры, после чего инкубировали в течение часа в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5 % CO₂. Далее готовили серию 10-кратных разведений вируса и наносили на клеточный монослой, после чего инкубировали необходимое для каждого вируса время (4-10 суток) при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

По окончании срока инкубации инфекционную активность вируса оценивали с помощью МТТ теста, как описано выше (в разделе «Определение цитотоксичности»).

Титр вирусов рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в 50% тканевых инфекционных дозах (ТИД₅₀) на 100 мкл объёма [2].

На основании полученных результатов рассчитывали ЕС₅₀ препарата (50% эффективную концентрацию) и ХТИ (отношение ЦТД₅₀ к ЕС₅₀). Препарат считался эффективным в случае, если значение ХТИ превышало 10. Вторым показателем активности соединений служила разница в титрах в максимально переносимой концентрации, препарат считался эффективным в случае, если она составляла более 2 lg ТИД₅₀.

Статистическая обработка. Статистический анализ полученных данных проводили в программах Microsoft Office и GraphPad Prism.

2. Результаты исследования.

Цитотоксичность соединений не была выявлена ни в одной из исследованных концентраций, вследствие чего для проведения расчетов в качестве ЦТД₅₀ использовали значение >833.

Результаты исследования противовирусной активности препарата представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты исследования противовирусной активности компонентов БАД «Радалея» в отношении вирусов герпеса и коронавируса ОС43 in vitro.

Дозировка препарата, усл.ед.	Титр вируса, lg	ТИД 50 %	Снижения титров вируса по сравнению с контролем ЕС50 (мкг/мл) ХТИ
Вирус герпеса			
0	4,17±0,58	-48,8	>17
10	4,33±0,29	-46,78	
31	4,00±0,50	31,87	
93	3,83±0,29	53,584	
277	3,00±0,50	93,19	
833	2,17±0,29	99,00	
Коронавирус ОС-43			
0	5,00±0,00	-14,5	>57,4
10	4,83±0,29	31,87	
31	3,83±0,29	93,19	
93	3,33±0,29	97,85	
277	1,17±0,58	99,99	
833	0,50±0,00	99,997	

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что расчетный показатель ХТИ (химиотерапевтический индекс) превышает пороговое значение 10 в отношении обоих исследованных вирусов, при этом активность в отношении коронавируса ОС43 проявлена сильнее, чем в отношении вируса герпеса.

По второму показателю противовирусной активности (снижению титра вируса) значение 2 lg ТИД50 достигается в случае вируса герпеса только в максимальной использованной дозировке - 833 усл.ед., а в случае коронавируса ОС43 – в дозировках 277 и 833 усл.ед.

Заключение

В результате проведенного исследования выявлено, что значения химиотерапевтического индекса препарата превышают 17 и 57,4 для вирусов герпеса и коронавируса ОС43, соответственно, что существенно выше порогового значения, равного 10.

Таким образом, показано наличие противовирусной активности БАД «Радалея» в отношении обоих изученных в настоящей работе вирусов при использовании препарата по лечебно-профилактической схеме в экспериментах in vitro на культуре клеток.

Список литературы:

1. Всемирная организация здравоохранения / Вирус простого герпеса. Электронный ресурс (дата обращения 23.12.2021).
2. Christian, P., Carstens, E., Domier, L., Johnson, K., Nakashima, N., Scotti, P., van de Wilk, F., 2002. Dicitroviridae ICTVdb Index of Viruses.
3. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных.- Washington, D.C.: National Akademy Press.- 1996.- 138 С.
4. Шах Махмуд Р., Ильинская О.Н. Противовирусная активность биназы в отношении вируса пандемического гриппа А (H1N1) // Acta Naturae. 2013. Т. 5, С. 49–56.
5. Cianci C., Gerritz S.W., C. Deminie, M. Krystal. Influenza nucleoprotein: promising target for antiviral chemotherapy // Antiviral Chem. Chemother. – 2013. – N 23. – P. 77-91.
6. Dong G., Peng C., Luo J., et al. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902–2013): frequency and distribution of M2 gene mutations // PloS One.- 2015.-V 10. N (3). Published online 2015 Mar 13; e0119115.
7. Fiore A.E., Fry A., Shay D., Gubareva L., Bresee J.S., Uyeki T.M. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza // MMWR Recomm Rep.- 2011. N 60. – P. 1-24.
8. Kamble K.D., Pinjare V.S. Extra cellular ribonuclease production from *Pseudomonas* species // Asian J J.Exp. Biol. Sci. 2012. №3. С. 810–815.
9. Mondal D. Rimantadine // Reference Module in Biomedical Sciences. – 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.99410-8.
10. Zhou W.W., Niu T.G. / Purification and some properties of an extracellular ribonuclease with antiviral activity against tobacco mosaic virus from *Bacillus cereus* // Biotechnol. Lett., 2009. № 31. С. 101–105.