

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА.

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2024 р.

**АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ ОФІЦІНАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ
ЗАСОБІВ РІЗНОГО ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ПРОФІЛЮ *IN VITRO*
ПРОТИ ВІРУСУ ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТУ**

Кваліфікаційна робота
студентки 2 року магістратури
денної форми навчання
за спеціальністю біологія
ЗОЗУЛІ Єлизавети Віталіївни
Науковий керівник від кафедри
к.б.н., асистент ДУНІЧ А.А.

Робота виконана на базі Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, під керівництвом к.б.н., старшого дослідника, старшого наукового співробітника відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів Н.М. ЖОЛОБАК.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IFN	–	Інтерферон
cDC	–	Звичайні дендритні клітини
pDCs	–	спеціалізовані плазмоцитоїдні дендритні клітини
ISG	–	Інтерфероном стимульовані гени
VSV	–	Вірус везикулярного стоматиту
TLR	–	Toll-подібні рецептори
ATC	–	Anatomical Therapeutic Chemical classification system
АПФ/АСЕ	–	Ангіотензинперетворюючий фермент
АФІ	–	Активний фармацевтичний інгредієнт
CC ₅₀	–	50 % цитотоксична концентрація
IC ₅₀	–	50% інгібуюча концентрація
ХТІ	–	Хіміо-терапевтичний індекс
ТЦД ₅₀	–	Тканнина-цитотоксична доза вірусу, яка викликає 50% деструкцію моношару клітин

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА ІНТЕРФЕРОНУ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА ОЧІКУВАНІ ПРОЯВИ У ЕКСПЕРИМЕНТІ	7
1.1. Інтерферони, активація імунної відповіді, роль в терапії	7
1.1.1 Характеристика інтерферонів.....	7
1.1.2. Активація імунної відповіді	8
1.2. Характеристика досліджених лікарських засобів та діючих речовин. 10	
1.2.1. Загальна характеристика фармакологічних груп досліджених лікарських препаратів та допоміжних речовин у їх складі	10
1.2.2. N06A X22: Агомелатин. Характеристика та дослідження антивірусної активності	17
1.2.3. C05C A53: Діосмін, комбінації. Характеристика та дослідження антивірусної активності	21
1.2.4. C09B B04: Периндоприл та амлодипін. Характеристика та дослідження антивірусної активності	23
1.2.5. A10B B09: Гліклазид. Характеристика та дослідження антивірусної активності	26
1.3. Вірус везикулярного стоматиту (VSV).....	27
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	29
2.1. Модельні об'єкти	29
2.1.1. Вірус.....	29
2.2. Матеріали	29
2.2.1. Культура клітин	29
2.2.2. Зразки.....	29

2.3. Методи	30
2.3.1. Культивування культури клітин	30
2.3.2. Аналіз цитотоксичності препаратів	31
2.3.3. Визначення антивірусної дії зразків в модельній системі MA-104/VSV за лікувальної схеми	34
2.3.4. Визначення антивірусної дії зразків в модельній системі MA-104/VSV за профілактичної схеми	36
2.3.5. Спектрофотометричний аналіз.....	37
2.3.6. Статистичні методи обробки даних.....	38
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	39
3.1 Тестування цитотоксичності досліджених препаратів	39
3.2 Антивірусна активність досліджених препаратів	47
3.2.1 Антивірусна активність досліджених препаратів за лікувальною схемою	47
3.2.2. Антивірусна активність досліджених препаратів за профілактичною схемою	50
ВИСНОВКИ.....	56
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	57

ВСТУП

Актуальність роботи полягає у неймовірній важливості дослідження шляхів медикаментозного лікування вірусних інфекцій. Дослідження антивірусної активності лікарських препаратів різних фармакологічних груп є важливим напрямком досліджень вірусології, особливо на даний момент. Вірусні інфекції становлять значну загрозу для здоров'я людей, поява нових вірусних інфекцій також є актуальною проблемою сьогодення, тому пошук ефективних препаратів для боротьби з вірусами є важливим завданням.

Один з підходів, що використовують для пошуку антивірусних препаратів – це тестування відомих препаратів різних фармакологічних груп на антивірусну активність, оскільки згідно з базою даних реєстрації лікарських засобів США (FDA) на кінець 2021 року кількість зареєстрованих діючих речовин у лікарських препаратах перевищує 20 000 [1], а враховуючи той факт, що FDA реєструє не усі діючі речовини, то їх у десятки разів більше, що надає нам можливість зекономити час та фінанси у пошуках серед вже відомих нам активних речовин, замість того, або паралельно з розробкою нових антивірусних препаратів, на що витрачається неймовірна кількість часу та коштів.

Серед успішних прикладів тестування препаратів різних фармакологічних груп вже відомі дослідження, що продемонстрували, що антибіотики можуть мати певну ефективність проти вірусів, які викликають захворювання дихальних шляхів, такі як грип та COVID-19 [2, 3]. Інші дослідження у цій сфері також продемонстрували, що такі різні препарати, як: хлорохін, що являє собою антиревматичний та антипротозойний препарат; чи азитроміцин, що належить до групи макролідних антибіотиків, можуть проявляти антивірусну активність [4, 5].

Отже, пошук ефективних препаратів для лікування вірусних захворювань є важливим завданням, особливо в контексті недавньої пандемії COVID-19. Дослідження антивірусної активності різних лікарських препаратів може

допомогти виявити нові можливості для лікування вірусних захворювань і зменшення ризику їх поширення серед населення.

Тому метою роботи було дослідити препарати різних фармакологічних груп щодо їх можливої антивірусної активності в модельній системі вірус везикулярного стоматиту (VSV) – культура клітин MA-104. Серед обраних препаратів: антидепресант, ангіопротектор, інгібітор АПФ і блокатор кальцієвих каналів.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ІНТЕРФЕРОНУ, ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА ОЧІКУВАНІ ПРОЯВИ У ЕКСПЕРИМЕНТІ

1.1. Інтерферони, активація імунної відповіді, роль в терапії

1.1.1 Характеристика інтерферонів

Інтерферони – група сигнальних глікопротеїнів, які зустрічаються лише у хребетних, належать до великого класу цитокінів із різноманітними біологічними функціями, включаючи антивірусну, антипроліферативну, імуномодулюючу дію і цитотоксичну дію. Людські ІФН діють як секретовані ліганди для специфічних рецепторів клітинної поверхні, що призводить до транскрипції сотень стимульованих ІФН генів. Вони поділяються на 3 великі категорії на основі взаємодії з рецепторами [6].

Інтерферони (ІФН) класифікують, поділяючи на три основні групи (типи I, II і III) на основі гомології послідовності, що відповідає еволюційній спорідненості, використанню рецепторів і функціональній активності цих цитокінів. Сімейство IFN типу II включає лише одного члена, IFN- γ , який має прозапальні та імуномодулюючі функції, відмінні від IFN типів I та III. IFN типу I спочатку були ідентифіковані на основі їх антивірусної активності, але згодом було з'ясовано, що вони мають антипромотивну та імуномодулюючу дію, а також відіграють важливу роль у регуляції інфекцій, викликаних невірусними патогенами. Майже через 50 років після відкриття IFN III типу було не зовсім зрозуміло, чому організм підтримує, здавалося б, надлишкові шляхи антивірусного захисту [7].

1.1.2. Активация імунної відповіді

Реакція інтерферону (IFN) є основною і першою лінією захисту від вірусів. Розпізнавання вірусної інфекції сенсорами вродженого імунітету активує відповіді на інтерферони I та III типу. Інтерферони типу I, тобто IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , у людей асоціюються з експресованим у всіх тканинах аутокринним і паракринним способом рецептором інтерферону I типу (IFNAR). Це активує потужний антивірусний захисний каскад реакцій, зумовлених активацією сотень стимульованих інтерфероном генів (ISG), здатних перешкоджати кожному етапу реплікації вірусу [8]. Інтерферон III типу (IFN- λ) зв'язується з рецептором інтерферону III типу (IFNLR), і переважно експресується на епітеліальних і деяких мієлоїдних клітинах [9]. У той час, як IFN типу I та III індукують подібні характеристики ISG, доставка IFN типу I призводить до швидшої індукції та зниження експресії ISG [7].

IFN типу I та III забезпечують у клітині формування стану антивірусної резистентності, а також активують адаптивні імунні відповіді на віруси [10]. З іншого боку, успішні вірусні патогени розробили механізми ухилення від імунного розпізнавання та методи інгібування функції IFN та ISG. Багато вірусних білків призначені для модуляції IFN відповіді хазяїна. Ці механізми були детально вивчені для SARS-CoV і MERS-CoV [11, 12, 13]. Однак важливо зазначити, що результати передачі сигналу IFN визначені не лише вірусними факторами, а й факторами, залежними від організму господаря. Особливо передача сигналів IFN типу I може бути шкідливою через їх системну прозапальну дію [10]. Отже, є відповідь IFN захисною чи патогенною при SARS та MERS, залежить від умов, які індукують активацію сигналізації IFN.

Рекомбінантні та пегільовані IFN- α та IFN- β використовуються для лікування різноманітних захворювань, включаючи розсіяний склероз та вірусний гепатит [7]. Хоча рекомбінантний IFN- λ ще не схвалений для будь-яких показань, він проходить клінічні випробування для вірусного гепатиту. Взагалі інтерферон I типу (IFN-I), заслуговує на особливу увагу, оскільки є

найсильнішим антивірусним засобом, що належить до цитокінів і захищає від тяжких наслідків вірусної інфекції [14, 15].

Залежні та незалежні антивірусні ефекторні програми спрямовані на різні етапи життєвого циклу вірусу, включаючи реплікацію вірусного геному, транскрипцію та трансляцію. Найважливішими антивірусними ефекторними молекулами є білок резистентності до міксовірусу (Mx), який спрямований на капсид, що входить в процес реплікації [16], 2,5'-олігоаденілатсинтаза (OAS) і РНКаза L, які руйнують вірусну РНК, тоді як протеїнкіназа R (PKR) і еукаріотичний фактор ініціації 2 ($eIF2\alpha$) обмежують трансляцію вірусних білків [17]. На додачу до власне антивірусної активності, IFN-I бере участь у кількох імунних регуляторних мережах, таких як активація вродженого імунітету, активація НК-клітин, праймінг CD8 Т-клітин, а також в імуносупресивних механізмах – наприклад, це роль інтерлейкіну-10 (IL-10) та лігандів запрограмованої клітинної смерті 1 (PD-L1) [18]. Посилена і тривала активність IFN-I призводить до надмірної активації імунної системи, що може призвести до тяжкого аутоімунного захворювання [19].

Під час вірусної інфекції передача сигналів через рецептори розпізнавання патогенів (PRR), таких як Toll-подібні рецептори (TLR) або ген I, що індукується ретиноевою кислотою (RIG-I), індукує IFN-I, що призводить до продукції IFN-I [20]. Кілька типів клітин здатні продукувати IFN-I, однак спеціалізовані плазмоцитоїдні дендритні клітини (pDCs) виробляють велику кількість IFN-I, а індукція IFN-I в цих клітинах відрізняється від інших типів клітин. У ранніх ендосомах pDC контакт з вірусною РНК або ДНК призводить до активації TLR7 та/або TLR9, активації IRF7 та швидкої продукції IFN-I [21]. Звичайні дендритні клітини (cDCs) також оснащені TLR7/9 і молекулами сигнального каскаду IRF7, однак, у порівнянні з pDCs, cDC виробляють меншу кількість IFN-I після активації TLR7/9. Дійсно, під час вірусної інфекції cDC головним чином генерують IFN-I після активації RIG-I. Одним із пояснень цієї різниці у продукції IFN-I між cDC та pDC є передача сигналів FcεR1γ та DAP12, які пригнічують активацію IRF7 у cDC.

Передача сигналів PI3K-AKT і mTOR є ключовими вродженими імунними регуляторами, які можуть модулювати індукцію IFN-I і переключати рDC на високу продукцію IFN-I [19]. Однак механізми, що лежать в основі потенційної диференціальної активації AKT/mTOR, пов'язаної з відмінностями в здатності cDC продукувати IFN-I, ще не з'ясовані.

1.2. Характеристика досліджених лікарських засобів та діючих речовин

1.2.1. Загальна характеристика фармакологічних груп досліджених лікарських препаратів та допоміжних речовин у їх складі

Для усіх лікарських препаратів, які є на даний час на фармацевтичному ринку, розроблена міжнародно прийнята класифікація – АТХ-класифікація (АТС-classification), що поділяє різні препарати за їх приналежністю до різних фармакологічних груп. Саме тому для початку необхідно визначитися з термінологією.

Отже, АТС (**Anatomical Therapeutic Chemical classification system**) – це міжнародна система класифікації лікарських засобів, яка використовується для організації інформації про ліки та для стандартизації їх використання. Ця система була розроблена спільно Міжнародною організацією зі стандартизації (ISO) та Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO).

Система класифікації АТС має три рівні:

- Перший рівень: систематична класифікація лікарських засобів за органами та системами, на які вони впливають (Рис. 1.1). Перший рівень позначається буквою з якої починається код того чи іншого препарату.

- Другий рівень: фармако-терапевтична підгрупа, що визначає фармакологічну дію лікарського засобу

• третій рівень: хімічна підгрупа, що визначає хімічну структуру лікарського засобу.

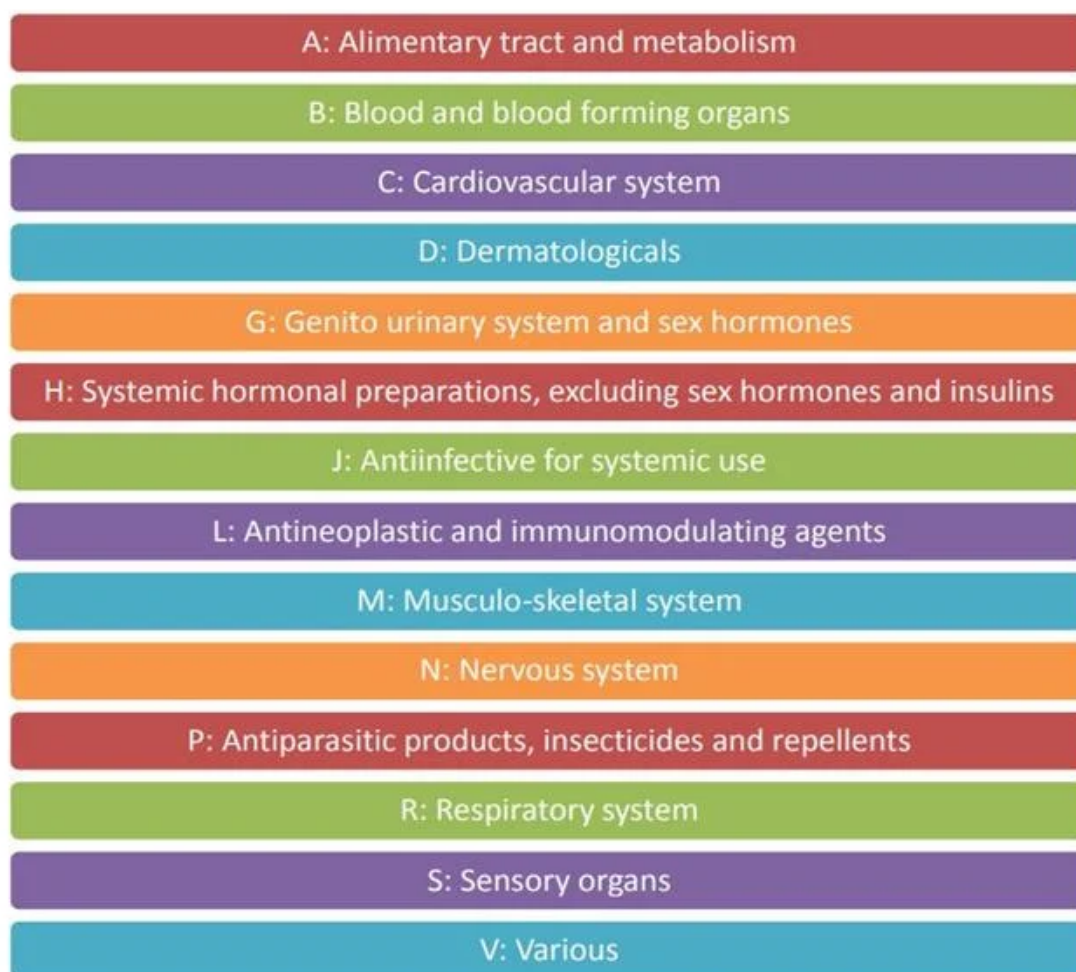


Рис. 1.1. Позначення першого рівня класифікації АТС для лікарських засобів. Кожна буква відповідає певним системам та органам організму на які діє препарат.

Кожен лікарський засіб має свій унікальний код АТС, який складається з 7 символів і включає перший рівень, другий рівень та третій рівень класифікації [22]. Наприклад, код АТС для аспірину – АСЕ04D.

Задля реалізації дослідження антивірусної активності препаратів різних фармакологічних груп були обрані препарати з таких груп:

1. **N06A:** Психоаналептики. Інші антидепресанти (група 1), а саме **N06A X22:** Агомелатин.
2. **C05C:** Засоби, що впливають на серцево-судинну систему, ангіопротектори, капіляростабілізуючі засоби, а саме **C05C A53:** Діосмін, комбінації.
3. **C09B:** Інгібітори АПФ, комбінації. Інгібітори АПФ та блокатори кальцієвих каналів (група 3), а саме **C09B B04:** Периндоприл та амлодипін
4. **A10B:** Засоби, що впливають на травну систему і метаболізм. Протидіабетичні засоби. Цукрознижувальні засоби, за винятком інсулінів. Сульфонаміди, похідні сечовини (група 2), а саме **A10B B09:** Гліклазид.

Досліджувані препарати з наведених груп були обрані за принципом визначеної раніше необхідності у подальших дослідженнях, оскільки активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) обраних препаратів вже були протестовані на можливу антивірусну активність проти деяких вірусів та мали обнадійливі результати, але проведених досліджень надто мало для можливості стверджувати, що ці АФІ мають антивірусну активність, тому проведене дослідження може бути ще одним кроком до підтвердження або спростування теорії про наявність в цих молекул антивірусної активності.

Серед різних фармакологічних груп препаратів було обрано по одному препарату, дослідження якого було проведено. Оскільки виключно активні речовини отримати надто складно маючи ті рівні доступу, що є у студента, то було прийнято рішення тестувати цільну формулу, яку є можливість отримати у вигляді таблеток та проаналізувати властивості АФІ за умови присутності допоміжних речовин у складі готової лікарської форми, тобто визначити, чи є у взятих готових лікарських форм препарату антивірусна активність.

Порівняльна таблиця складу досліджених препаратів (Таблиця 1.1) дає нам змогу переглянути які складові є у кожному препараті окремо та побачити, що деякі допоміжні речовини зустрічаються в усіх або принаймні

двох обраних для дослідження препаратах. Наприклад, лактози моногідрат та кремнію діоксид колоїдний безводний присутні в усіх трьох досліджених препаратах.

Таблиця 1.1. Хімічний склад досліджених препаратів.

Речовини	№ 1	№ 2	№ 3	№4
Агомелатин	+	-	-	-
Діосмін	-	-	-	-
Гесперидин	-	+	-	-
Прендоприлу аргінін	-	-	+	-
Амлодипіну бесилат	-	-	+	-
Гліклазид	-	-	-	+
Лактози моногідрат	+	-	+	+
Кремнію діоксид колоїдний безводний	+	-	+	+
Гіпромелоза	+	+	-	-
Магнію стеарат	-	+	+	+
Кукурудзяний крохмаль	+	-	-	-
Повідон	+	-	-	-
Натрію крохмальгліколят (тип А)	+	+	-	-
Стеаринова кислота	+	-	-	-
Заліза оксид жовтий (E172)	+	+	-	-
Гліцерин	+	+	-	-
Макрогол 6000	+	+	-	-
Титану діоксид (E171)	+	+	-	-
Целюлоза мікрокристалічна	-	+	+	+

Примітка. Зелені комірки вказують на діючі речовини препаратів та їх наявність; помаранчеві комірки позначають перелік допоміжних речовин у препаратах та їх наявність.

Лактози моногідрат – це кристалічна форма лактози, яка містить одну молекулу води на одну молекулу лактози. Ця речовина використовується як зв'язуючий та наповнювальний компонент у формулюванні лікарських препаратів та харчових добавок. Вона є незамінним компонентом багатьох таблеток, капсул та порошків, а також використовується в складі розчинів для розчинення інших речовин [23]. З наявної інформації, моногідрат лактози являє собою неактивну речовину та не має зафіксованої антивірусної активності в будь-яких відомих на сьогодні дослідженнях.

Кремнію діоксид колоїдний безводний – допоміжна речовина в фармацевтичній промисловості, використовується як плоский розпушувач, антиагломерант та стабілізатор емульсій. Однією з його головних переваг є висока поверхнева активність та відносно низька густина, що робить діоксид кремнію корисним для покращення подрібнення порошків та забезпечення рівномірного розподілу компонентів лікарських засобів у формулах [24]. Інформації щодо наявності у цієї речовини антивірусної активності немає, як і відомостей про фармакокінетику цієї допоміжної речовини.

Такі речовини як гіпромелоза та магнію стеарат зустрічаються у двох досліджених препаратах. Гіпромелоза наявна у препараті, що відноситься до групи антидепресантів (група 1) та у препараті, що відноситься до групи протидіабетичних засобів (група 2). В той час, як магнію стеарат є допоміжною речовиною у препараті другої та третьої групи.

Гіпромелоза – це полімерна суміш етилцелюлози та гідроксипропілметилцелюлози, яка використовується як стабілізатор, загущувач та розчинник в фармацевтичній промисловості [23]. За літературними даними, гіпромелоза не має прямої антивірусної активності, проте використовується як складова антивірусних препаратів, тож можна зробити припущення, що вона не впливає на активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) антивірусних препаратів.

Магнію стеарат – допоміжний компонент у фармацевтичній технології, що використовується як змащувальний матеріал для запобігання злипанню та забезпечення гладкості поверхні таблеток [25]. Наукова література не містить відомостей про зафіксовану антивірусну дію цієї речовини.

З порівняльної таблиці хімічного складу досліджених препаратів (Таблиця 1.1.) нам також відомо, що препарат першої групи у складі має такі допоміжні речовини:

кукурудзяний крохмаль – розповсюджена допоміжна речовина у фармацевтичній промисловості і використовується для виготовлення таблеток, капсул, пудри і сиропів [23]. Відомостей про антивірусну активність та взаємодію з активними речовинами у науковій літературі немає;

повідон (полівінілпіролідон або PVP) – це полімер, який широко використовується в фармацевтиці як підсилювач та стабілізатор, а також у виробництві таблеток, капсул, кремів і мазей [23]. Відомо, що повідон у комплексі з йодом демонструє антивірусну активність проти вірусу папіломи людини (HPV). Дослідження цієї сполуки *in vitro*, продемонструвало антивірусну активність повідон-йоду проти деяких штамів HPV [26];

натрію крохмальгліколят (тип А) – одна з важливих фармацевтичних добавок, які використовуються для поліпшення якості та стабільності таблеток, капсул, сиропів, розчинів та інших дозованих форм препаратів. Цей компонент має властивості зниження поверхневого натягу, підвищення розчинності та дисперсності, а також захисту компонентів від вологи [23]. Якщо ж казати за антивірусну активність натрію крохмальгліколяту (типу А), то він не справляє безпосередню антивірусну дію, але може використовуватись у комбінації з іншими речовинами для підвищення їх ефективності проти вірусів [27];

стеаринова кислота – це насичена жирна кислота, яка використовується у фармацевтичній промисловості як емульгатор, стабілізатор та консистентний агент в таблетках, капсулах, кремах і мазях [28]. Може мати

протизапальну дію, яка пов'язана з її здатністю модулювати вироблення різних цитокінів та зменшенням рівня оксидативного стресу [29]. Деякі дослідження показали, що стеаринова кислота може бути корисною у лікуванні запальних захворювань, таких як артрит [30];

заліза оксид жовтий (E172) – є безпечним та широко використовуваним пігментом у фармацевтиці, який використовують для надання жовтого кольору різноманітним препаратам. Він зазвичай входить до складу капсул, таблеток, порошків, мазей та рідинних препаратів [23]. Досліджень щодо можливої антивірусної активності цієї речовини не проводилося;

гліцерин – найчастіше виступає розчинником та емульгатором у фармацевтиці. Використовується в багатьох лікарських формах, включаючи рідинні препарати, краплі для очей, креми та лосьйони для шкіри, та ін. Вважається, що гліцерин може мати певні антимікробні та антивірусні властивості, зокрема, він може підвищувати активність деяких антибіотиків та антивірусних препаратів [23]. Також була продемонстрована висока антивірусна активність гліцерину монолаурату проти оболонкових вірусів, як ВІЛ-1 та вірусу жовтої гарячки в дослідженнях *in vitro* [31];

макрогол 6000 – також відомий як поліетиленгліколь 6000, є полімерним матеріалом, який використовується в фармацевтиці для виготовлення таблеток, кремів, мазей та інших лікарських форм [32]. Наукових досліджень щодо антивірусної активності макроголу 6000 на даний момент немає;

титану діоксид (E171) – широко використовується як пігмент у фармацевтичних препаратах, зокрема у капсулах та таблетках, для покращення їх вигляду та кольору [23, 33]. Однак, деякі дослідження вказують на можливі негативні наслідки від використання титану діоксиду у фармацевтиці, такі як загроза для здоров'я через його потенційну токсичність [34].

У препараті з групи протидіабетичних засобів зустрічається як допоміжна речовина мальтодекстрин, який зазвичай використовують в якості

наповнювача таблеток, харчових продуктів та напоїв для підвищення консистенції, стабілізації та збільшення маси продукту.

Майже така сама ситуація і з мікрокристалічною целюлозою, що є допоміжною речовиною у препараті з третьої групи – Інгібітори АПФ, комбінації. Мікрокристалічна целюлоза є одним з найбільш поширених наповнювачів у фармацевтичній промисловості, що використовується для покращення фізико-механічних властивостей таблеток та забезпечення рівномірного розподілу діючої речовини [35].

Виходячи з огляду допоміжних речовин обраних для дослідження препаратів, допоміжні речовини препаратів з другої групи (Засоби, що впливають на травну систему і метаболізм. Протидіабетичні засоби.) та третьої групи (Інгібітори АПФ, комбінації.) не мають ніякої антивірусної активності та властивостей підсилювання дії АФІ. В той час, як препарат першої групи (Психоаналептики. Інші антидепресанти) має у складі чотири допоміжні речовини, які самі по собі, або у комплексах показували певну антивірусну, або протизапальну активність, що буде враховано в рамках аналізу отриманих результатів.

1.2.2. N06A X22: Агомелатин. Характеристика та дослідження антивірусної активності

N06A X22: Агомелатин (Agomelatine) – є потужним агоністом рецепторів мелатоніну та антагоністом рецепторів серотоніну-2С (5-НТ2С), що було перевірено на тваринній моделі депресії. Являє собою антидепресант, який входить до групи психоаналептиків, згідно з АТС-класифікацією, як вже було вказано вище [36]. Ця сполука належить до класу органічних сполук, відомих як *n*-ацетил-2-арилетиламін та має хімічну формулу $C_{15}H_{17}NO_2$ (рис. 1.2.). Це сполуки, що містять ацетамідну групу, яка *N*-зв'язана з арилетиламіном [37].

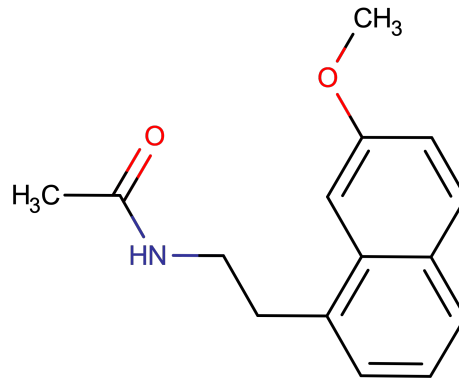


Рис. 1.2. Структурна формула молекули агомелатину

Агомелатин був розроблений у Європі компанією Servier Laboratories Ltd. і поданий до Європейського агентства з лікарських засобів (EMA) у 2005 році [36]. Агомелатин має унікальний механізм дії, оскільки він одночасно стимулює мелатонінові та серотонінові рецептори [38]. Це дозволяє покращити настрій та сон, що робить його особливо корисним у лікуванні депресивних розладів, що супроводжуються порушенням сну [39]. Важливо зауважити, що дія агомелатину на мелатонінові рецептори дуже наближена до дії власне мелатоніну MT1 та MT2, проте не така потужна, як у мелатоніну. Але властивість агомелатину, як антагоніста рецепторів серотоніну 5-HT_{2C} надає йому властивостей підсилення дії мелатоніну.

Щодо антивірусної активності агомелатину, то у дослідженні *in silico* Р.К. Yadalam було проведено тестування агомелатину на його здатність протидіяти SARS-CoV-2. У ході дослідження було з'ясовано, що агомелатин може запобігати проникненню SARS-CoV-2 до клітин через властивість агомелатину до зв'язування з RBD SARS-CoV-2 та ангіотензин перетворюючим ферментом, що призводить до блокування рецепторів та не дозволяє вірусу проникнути у клітину [40]. У дослідженні Е. Сесон [41], проведеному *in vivo* на мишах K18-hACE2, було продемонстровано, що використання агомелатину може затримувати появу важких клінічних симптомів і покращувати виживання мишей K18-hACE2, інфікованих SARS-

CoV-2. Вже у наступному дослідженні Е. Сесон [42] дослідили механізм, який затримує та/чи попереджає диссемінації SARS-CoV-2. У цій роботі було доведено, що агомелатин попереджає проникнення SARS-CoV-2 у мозок, тим самим зменшуючи спричинене вірусом пошкодження дрібних церебральних судин, інфільтрацію імунних клітин і запалення головного мозку. Аналіз результатів проведеного молекулярного моделювання, доповнений експериментальними дослідженнями на клітинах, показав, що проникненню SARS-CoV-2 в ендотеліальні клітини запобігає зв'язування мелатоніну з алостеричним сайтом зв'язування ангіотензин перетворюючого ферменту 2 людини (ACE2), таким чином перешкоджаючи функції ACE2 як рецептору для входу SARS-CoV-2 [42]. Що, власне, частково підтвердили і результати комп'ютерного дослідження Р.К. Yadalam [40].

Через часткову схожість дії агомелатину до дії мелатоніну, зумовлену зв'язуванням з однаковими рецепторами, важливо розглянути також дослідження, що стосуються антивірусної дії мелатоніну, адже шлях взаємодії з клітинами в них однаковий. Мелатонін бере участь у ініціації сну, вазомоторному контролі, реалізує антизбуджуючу дію, справляє імуномодулюючу дію, включаючи протизапальні властивості, антиоксидантну дію та вплив на енергетичний метаболізм, вплив на мітохондріальний потік електронів, регуляцію активності мітохондріальної перехідної пори проникності (mtPTP) [43, 44, 45, 46, 47]. Було проведено кілька клінічних випробувань, що показали, ефективність мелатоніну у запобіганні пошкодженню клітин при гострих станах, таких як сепсис, або асфіксія новонароджених та при хронічних станах, що включають в себе метаболічні та нейродегенеративні захворювання, рак, запалення різної етіології [48, 49, 50, 51, 52, 53]. Варто зауважити, що окрім перерахованих характеристик, у огляді R.J. Reiter було зазначено, що мелатонін знижує токсичність і підвищує ефективність великої кількості ліків, побічні ефекти яких добре задокументовані [54].

Було опубліковано низку звітів, що вивчають здатність мелатоніну захищати від вірусних інфекцій, спричинених наступними вірусами: вірус енцефаломіокардиту (EMCV), вірус лісу Семліки (SFV), ослаблений штам вірусу Західного Нілу (WNV) WN-25, вірус венесуельського енцефаломієліту коней (VEEV) та вірус алеутської хвороби норок (AMDV) [55]. Мелатонін у цих випадках знижував вірусне навантаження у зразках сироватки крові та у мозку, підвищував титри IgM, а також знижував смертність експериментальних тварин. Зокрема, у дослідженні N. Valero [56] продемонстровано, що мелатонін спричинив підвищення стимуляції вироблення ендогенного IFN- γ , IL-1 β , та TNF- α при лікуванні інфекції, викликаній вірусом венесуельського енцефаломієліту коней у мишей. Посилаючись на дослідження E. Bonilla [57], рання стимуляція вироблення IFN- γ мелатоніном свідчить про те, що застосування цього індолеаміну на ранніх стадіях інфекційного процесу може підвищити антивірусну резистентність інфікованого організму.

Враховуючи усі описані вище результати досліджень, що були проведені з агомелатином та мелатоніном, передбачалось ймовірне виявлення антивірусної активності цієї діючої речовини, отриманої в результаті розчинення таблетованого лікарського препарату, проти вірусу везикулярного стоматиту в умовах *in vitro*.

1.2.3. C05C A53: Діосмін, комбінації. Характеристика та дослідження антивірусної активності

C05C A53: Діосмін, комбінації (*Diosmine*) – це лікарський препарат, що належить до групи лікарських засобів які містять діосмін, з комбінованою дією. Діосмін є біофлавоноїдом, який активно використовується в медицині, зокрема в лікуванні хвороб судин, таких як варикозна хвороба та хронічна венозна недостатність. Використання діосміну у комбінації з іншими активними речовинами має на меті підвищення його терапевтичного ефекту та оптимізацію лікувального процесу [28]. У роботі використовувався діосмін у комбінації з геспередином.

Діосмін представлений хімічною формулою $C_{28}H_{32}O_{15}$ та належить до класу органічних сполук, відомих як флавоноїди-7-О-глікозиди. Це фенольні сполуки, що містять флавоноїдну частину, яка О-глікозидно пов'язана з вуглеводною частиною в положенні C7 та має молекулярний каркас, що дозволяє віднести його до ароматичних гетерополіциклічних сполук (рис.1.3).

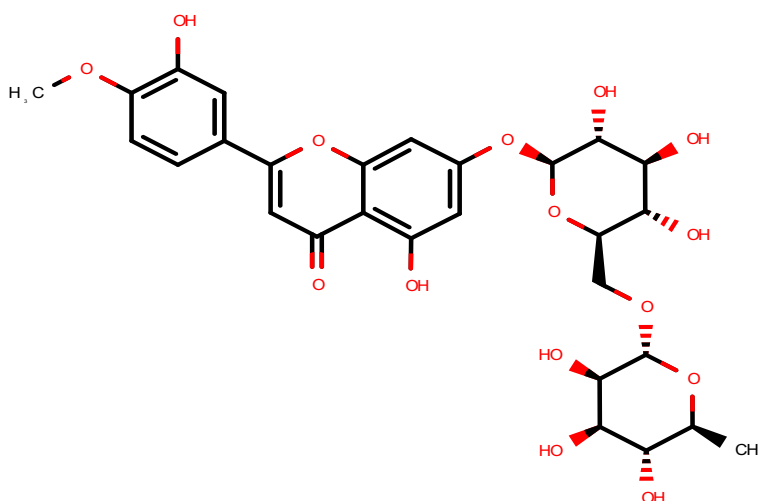


Рис. 1.3. Структурна формула молекули діосміну

Гесперидин у свою чергу є одним з джерел діосміну, тому також належить до класу органічних сполук, відомих як флавоноїди-7-О-глікозиди, проте має у своїй формулі на 2 атоми більше гідрогену, тому його хімічна формула має такий запис – $C_{28}H_{34}O_{15}$. Не дивно і те, що структурна формула молекули гесперидину має таку ж структуру, за винятком того, що атомів гідрогену більше (рис.1. 4).

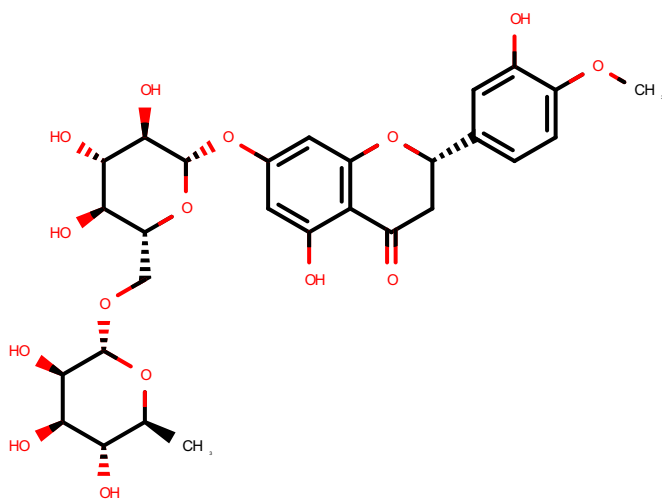


Рис. 1.4. Структурна формула молекули гесперидину

Історія відкриття та початок фармацевтичного застосування діосміну в комбінації з гесперидином датується дослідженнями, проведеними у 1960-х роках. Початково діосмін був виявлений як активна речовина у рослинах роду *Citrus* [58]. Пізніше, у поєднанні з гесперидином – також біофлавоноїдом – виявлено їх синергічні ефекти на судинну систему, що знайшло широке застосування у фармацевтичній практиці [59].

Початкові клінічні дослідження підтвердили ефективність комбінованого застосування діосміну та гесперидину у лікуванні хвороб судин. Результати досліджень свідчили про зменшення кальцифікації стінок судин, покращення мікроциркуляції та зниження проникності судинної стінки [60].

У подальшому, цей комбінований препарат ввійшов у клінічну практику як ефективний і безпечний засіб для лікування захворювань судинної системи, зокрема варикозної хвороби та хронічної венозної недостатності [61]. Проте діосмін у поєднанні з гесперидином, за рахунок своєї біофлаваноїдної природи, мають потенціал у антивірусній терапії. Наприклад, у дослідженні S. Kumar, P.P. Sharma et al. [62] методом молекулярно-динамічного моделювання було виявлено, що білки nsp3 та nsp9 SARS-CoV-2 можуть бути інгібовані гесперидином (nsp3) та діосміном (nsp9) завдяки утворенню комплексів ліганд-білок. У дослідженні Y. Huang [63] вдалося підтвердити отримані S. Kumar, P.P. Sharma et al. [62] результати, оскільки гесперидин та діосмін також демонстрували здатність до зв'язування з неструктурними білками SARS-CoV-2 і, як наслідок, виключалась його здатність до подальшої реплікації.

1.2.4. C09B B04: Периндоприл та амлодипін. Характеристика та дослідження антивірусної активності

C09B B04: Периндоприл та амлодипін (*Perindopril/Amlodipine*) – це комбінований препарат, який використовується для лікування артеріальної гіпертензії. Але вже з назви зрозуміло, що цей препарат складається з двох складових: з периндоприлу та амлодипіну.

Периндоприл (*Perindopril*) – це інгібітор ангіотензин перетворюючого ферменту (АСЕ), який використовують для лікування гіпертензії, застійної серцевої недостатності легкого та помірного ступеня та для зниження ризику серцево-судинних захворювань у пацієнтів з гіпертензією або після інфаркту міокарда. Периндоприл (рис. 1.5а) є потужним конкурентним інгібітором АСЕ, ферменту, відповідального за перетворення ангіотензину I (АТІ) в

ангіотензин II (АІІ). АІІ регулює артеріальний тиск і є ключовим компонентом ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (RAAS) [64]. Периндоприл був розроблений компанією Servier Laboratories в 1980-х роках [65].

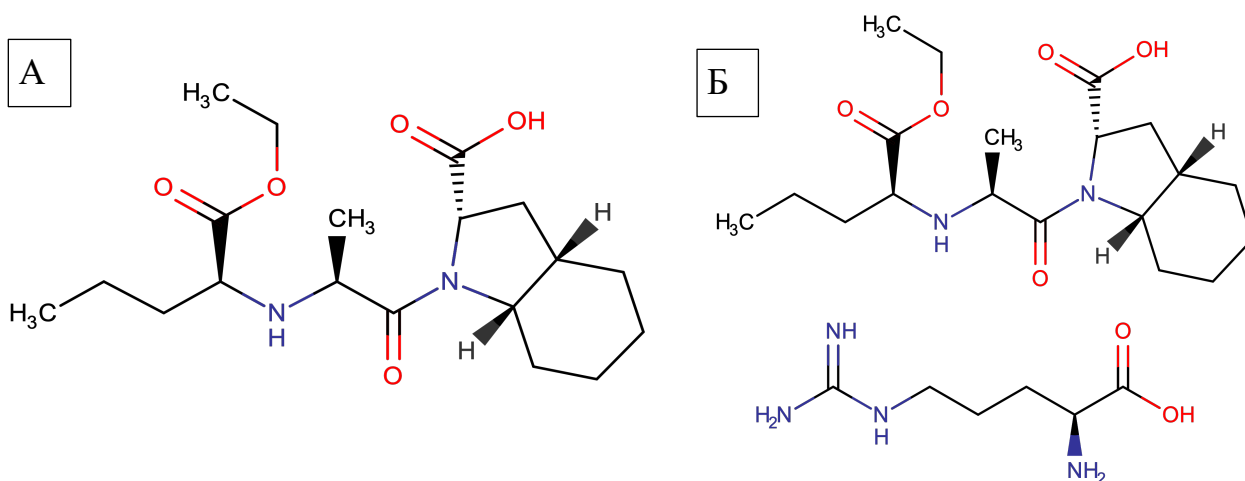


Рис. 1.5. Структурні формули молекули

А – периндоприлу; **Б** – периндоприлу аргініну

У препаратах периндоприл використовується або у своїй стандартній формі, або у покращених формах для покращення фармакокінетики та біодоступності препарату. У обраному для дослідження препараті використана форма периндоприл аргініну (рис. 1.5б), оскільки ця форма має вищу біодоступність.

Амлодипін (*Amlodipine*) – це блокатор кальцієвих каналів, який використовується для лікування гіпертонії та стенокардії. Амлодипін був синтезований компанією Pfizer в 1982 році [66] та схвалений FDA у 1987 році, є популярним антигіпертензивним препаратом, що належить до групи препаратів, які називаються дигідропіридиновими блокаторами кальцієвих каналів (рис. 1.6, А). Завдяки своїй селективності щодо периферичних кровоносних судин дигідропіридинові блокатори кальцієвих каналів пов'язані з меншою частотою пригнічення міокарда та порушень серцевої провідності,

ніж інші блокатори кальцієвих каналів [67]. У випадку, як із периндоприлом, у обраному для дослідження препараті використовується змінена форма амлодипіну, яка має кращу біодоступність, а саме амлодипіну бесилат (рис. 1.6, Б).

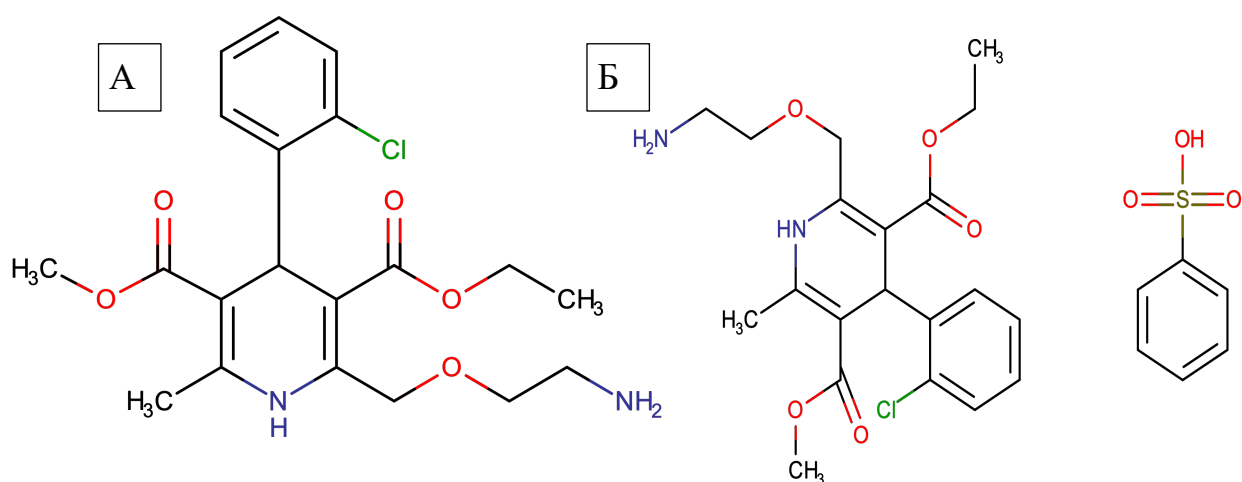


Рис. 1.6. Структурні формули молекули
А – амлодипіну; Б – амлодипін бесилату

Дослідження обох діючих речовин демонстрували обнадійливі результати щодо наявності у них антивірусної дії. Наприклад, у дослідженні Т. Varhoumi [68] при обробці клітин периндоприлом спостерігалось зменшення апоптозу, що був обумовлений білком шипа SARS-CoV-2. Паралельно зі зменшенням апоптозу клітин було зафіксовано пригнічення рівня АФК та експресії МНС-II, індукованої білком S.

Також, слід зауважити, що є дослідження [69], які вказують на підвищення кількості IFN у сироватці крові пацієнтів, які приймали периндоприл. Як згадувалось вище, саме IFN є важливим фактором імунної відповіді організму людини на вірусні інфекції.

Скринінг зареєстрованих діючих речовин щодо їх можливої здатності пригнічувати інфекцію, викликану SARS-CoV-2 проведений Х. Xiao [70]

показав, що для амлодипіну бесилату IC_{50} складає $6.49 \mu M$, що у чотири рази менше, ніж CC_{50} і свідчить про можливість подальшого дослідження та включення цієї діючої речовини в комплексні схеми терапії SARS-CoV-2.

1.2.5. A10B B09: Гліклазид. Характеристика та дослідження антивірусної активності

A10B B09: Гліклазид (*Gliclazide*) – це лікарський препарат, який відносять до групи похідних сульфоніл сечовини, і який використовується для лікування діабету типу 2. Його класифікували по-різному відповідно до його лікарських властивостей, у яких на основі його хімічної структури, гліклазид вважається сульфоніл сечовиною першого покоління через структурну присутність сульфонілмідної групи, здатної вивільняти протон, і присутність однієї ароматичної групи. З іншого боку, зважаючи на показану фармакологічну ефективність, гліклазид вважають похідним сульфоніл сечовини другого покоління, який має вищу ефективність і коротший період напіврозпаду (рис. 1.7). 2,3-гліклазид належить до класу похідних сульфоніл сечовини, які викликають збільшення секреції інсуліну, зумовлену стимуляцією β -клітин [71].

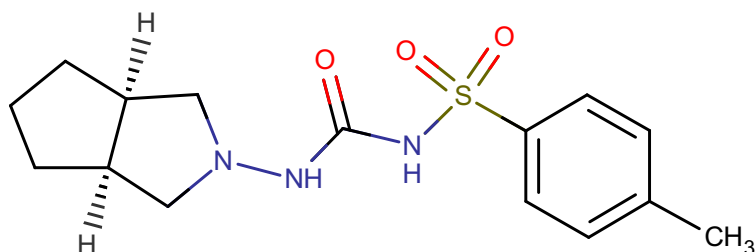


Рис.1.7. Структурна формула молекули гліклазиду

Гліклазид був синтезований вперше в 1969 році компанією Servier Laboratories Ltd. Він зарекомендував себе як ефективний засіб для контролю рівня цукру в крові і був затверджений для медичного застосування в 1984 році [72].

Проте гліклазид продемонстрував і потенціал бути допоміжним препаратом при антивірусній терапії. Наприклад, у дослідженні P.P. Singh Tomar & I.T. Arkin [73] було виявлено, що білок оболонки SARS-CoV-2 може бути інгібований гліклазидом завдяки тому, що оболонковий білок SARS-CoV-2 являє собою потенційний іонний канал з яким може зв'язуватися гліказид. У дослідженні H.G. Yu [74] вдалося підтвердити отримані P.P. Singh Tomar & I.T. Arkin [73] результати, оскільки використання гліказиду у комплексі з емодином показало значне пригнічення реплікації SARS-CoV-2 у варіантах Омікрон та Дельта, саме завдяки інгібуванню каналу Orf3a/E.

1.3. Вірус везикулярного стоматиту (VSV)

Вірус везикулярного стоматиту (VSV) являє собою «-»РНК вірус та належить до родини *Rhabdoviridae*, підродини *Alpharhabdovirinae*, роду *Vesiculovirus* та виду *Vesiculovirus indiana* [75].

Вірус є зоонозним і вражає широкий спектр хребетних тварин. Шляхи передачі вірусу – комахами, а також – між хребетними при прямому контакті. Деякі везикуловіруси викликають везикулярний стоматит у худоби та/або пов'язані з грипоподібними захворюваннями та енцефалітом у людей.

Це також поширений модельний вірус (рис 1.8), який використовується для вивчення властивостей вірусів родини *Rhabdoviridae*, а також для вивчення еволюції вірусів [76].

Геном VSV відносно простий, містить п'ять генів структурних білків і короткі міжгенні області.



Рис. 1.8. Вірус везикулярного стоматиту, електронно-мікроскопічне зображення [77].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Модельні об'єкти

2.1.1. Вірус

У роботі був використаний вірус везикулярного стоматиту (VSV), штам Індіана, який було отримано з колекції вірусів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Цей вірус належить до родини *Rhabdoviridae* та є «–»РНК вірусом, який має зоонозний шлях передачі. Використаний у експерименті VSV був розмножений на моношаровій культурі епітеліальних клітин печінки зеленої мавпи (*Cercopithecus aethiops*) MA-104.

2.2. Матеріали

2.2.1. Культура клітин

У роботі була використана моношарова культура епітеліальних клітин печінки зеленої мавпи (*Cercopithecus aethiops*) MA-104, яка була отримана з колекції культур клітин Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України.

2.2.2. Зразки

У роботі використані розчинені та розведені у 10 мл стерильної дистильованої води (рН=6,8) в стерильних 15 мл пробірках з кришкою вказані нижче таблетовані препарати.

1. N06A X22: Агомелатин (*Agomelatine*). Концентрація речовини у розчині становила 2,5 мг/мл.
2. C05C A53: Діосмін, комбінації (*Diosmine, combinations*). Концентрація речовини у розчині становила 100 мг/мл.
3. C09B B04: Периндоприл та амлодипін (*Perindopril/Amlodipine*). Концентрація речовин у розчині становила 1 мг/мл та 0,5 мг/мл відповідно периндоприлу та амлодипіну.
4. A10B B09: Гліклазид (*Gliclazide*). Концентрація речовини у розчині становила 6 мг/мл.

З метою покращення процесу розчинення застосовували вортексування. Після розведення речовин зразки зберігали у холодильнику при температурі 6°C, відповідно до інструкцій для зберігання препаратів.

Оскільки, таблетовані препарати окрім діючої речовини містили допоміжні речовини, такі як наповнювачі, деякі з яких погано розчинні у воді, то після стабілізації розчину та осадження нерозчинних часток надосад був відібраний у окремі стерильні флакони, які зберігався при температурі 6 °C до проведення аналізу.

2.3. Методи

2.3.1. Культивування культури клітин

Клітини накопичували у культуральних флаконах, поживним середовищем слугувала комбінація двох поживних середовищ Biowest RPMI 1640 та Biowest Medium 199 у співвідношенні 60:40, з додаванням 7,5% FBS (Sigma, USA) та комбінацією антибіотиків та антимікотиків задля уникнення контамінації бактеріями або грибами.

Інкубація культури клітин на матрацах відбувалася у термостатах при температурі 37°C протягом 24-48 годин до утворення моношару, після чого культуру клітин переводили у стан суспензії із застосуванням розчину

Trypsin/EDTA (Sigma, USA) та клітини в концентрації 1×10^5 клітин/мл вносили у 96-лункові плоскодонні планшети, де проводили інкубування ще протягом 24 год до утворення у кожній лунці конфлюентного моношару клітин.

2.3.2. Аналіз цитотоксичності препаратів

Простим методом аналізу цитотоксичності є тест МТТ.

МТТ – це (3[4,5-диметилтіазол-2-yl]-2,5 дифенілтетразоліумбромід), тетразолісвий барвник, який під впливом ферментів мітохондрій – мітохондріальних дегідрогеназ, а також клітинних дегідрогеназ – набуває синьо-фіолетового забарвлення. Тільки живі клітини з живими мітохондріями можуть здійснювати цю реакцію, отже інтенсивність забарвлення прямо пов'язана зі ступенем їх неушкодженості. Цей тест корисний для виявлення загальних цитотоксичних сполук, а також агентів, для яких мітохондрії є специфічними мішенями.

Після утворення моношару у лунках 96-луночних планшетів культуральне середовище видаляли та вносили підтримуюче середовище без добавок, що забезпечувало присутність залишкових слідів сироватки – 1-2% - у лунках планшету (рис. 2.1). До кожної лунки в діапазоні В1-В6 вносили середовище у об'ємі 180 мкл, до лунок в діапазоні С1-С6, D1-D6, E1-E6, F1-F6, G1-F6, H1-H6 вносили 198 мкл, до лунок В7-В12 вносилося 400 мкл, до лунок в діапазоні С7-С12, D7-D12, E7-E12, F7-F12, G7-F12, H7-H12 вносили 180 мкл, до лунок А1-А12, H1-H12 – 100 мкл, до лунок, що були призначені для постановки контролю клітин вносили 100 мкл середовища. Одразу після зміни середовища до лунок В1-В6 вносили по 20 мкл зразка, які у подальшому були розтитровані у напрямку від верхніх до нижніх лунок, згідно до схеми (рис. 2.1). Таким чином у першій лунці було розведення 1:10 зразку, у наступних двократні у відношенні до попередньої лунки. До лунок В7-В12

вносили по 8 мкл зразка, щоб отримати розведення зразка у 1:50, а надалі зразки були розтитровані у лунках С7-С12, D7-D12, E7-E12, F7-F12, G7-F12, H7-H12 відповідно до схеми зверху до низу.

Аналіз кожного зразка проводили у повторностях, як вказано на схемі (рис. 2.1), щоб результати можна було вважати достовірними та виключити можливість хибно-позитивних та хибно-негативних результатів. Для контролю клітин було виділено 24 лунки, що забезпечувало статистично значущу достовірність відмінності отриманих значень у експериментальних лунках відносно показників інтактних клітин.

Розведення		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Розведення
	A	KK												
1:10	B	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1:50
1:20	C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1:100
1:40	D	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1:200
1:80	E	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1:400
1:160	F	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1:800
1:320	G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1:1600
	H	KK												

Рис. 2.1. Схема розташування зразків для визначення їх цитотоксичності у 96-лунковому планшеті.

Примітки: зелені клітинки з позначенням «KK» – контроль клітин. Клітинки з градієнтом від темного до світлішого – напрямок титрування зразків, від найбільшої концентрації зразка до найменшої. У бічних колонках зазначено розведення препарату у середовищі.

Після внесення зразків планшети інкубували у термостаті при температурі 37°C протягом 24 годин. Після інкубації зразків на культурі

клітин МА-104 середовище відбирали та вносили реагент МТТ, який інкубували з клітинами протягом 2 годин при 37°C (відбувалося відновлення 3[4,5-диметилтіазол-2-yl]-2,5 дифенілтетразоліумброміду у формазаан під впливом клітинних дегідрогіназ). Розчин із реагентом видаляли із лунок. Елюцію формазаану із клітин проводили шляхом внесення 0,05 мл ДМСО. Оптичну густина лунок визначали при довжині хвилі 492 нм.

Ще одним методом для визначення загальної кількості адгезованих клітин був популярний у вірусології метод зафарбовування клітин кристалічним фіолетовим.

Тест з кристалічним фіолетовим (КФ-тест) – це простий, неферментативний тест для швидкого аналізу кількості життєздатних адгезованих клітин [78, 79]. Кількість поглинутого барвника залежить від загального вмісту ДНК в культурі та дозволяє оцінити кількість життєздатних клітин. Застосування КФ-тесту дозволяє уникнути можливих хибних результатів у випадку безпосереднього впливу досліджуваних речовин на метаболічну активність клітин, зокрема мітохондріальну активність [80].

Тест полягав у визначенні оптичної густини лунок з клітинами після їх обробки реагентом/барвником. Формула розрахунку кількості клітин за параметром, що визначали:

$$\text{ОГд} / \text{ОГк} \times 100\%,$$

де ОГк – оптична густина розчину у контрольних лунках;

ОГд – оптична густина розчину у дослідних лунках.

Оптичну густина контрольних і дослідних лунок вимірювали на спектрофотометрі з вертикальним променем Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Фінляндія) за довжини хвилі, що відповідає максимуму поглинання барвника – 540 нм.

Короткий виклад методики: після інкубації клітин зі зразками з плати видаляли середовище, вносили 0,5% розчин кристалічного фіолетового

(Sigma-Aldrich, США) в 30% етанолі та фарбували клітини протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Фарбник видаляли, а клітини старанно промивали водою для повного видалення надлишків незв'язаного кристалічного фіолетового, планшети висушували [81]. Оптичне поглинання лунок вимірювали при довжині хвилі 540 нм. Всі проби аналізували у чотирьох повторностях.

2.3.3. Визначення антивірусної дії зразків в модельній системі MA-104/VSV за лікувальної схеми

Лікувальна схема вивчення антивірусної дії зразків передбачає попереднє інфікування сформованого моношару клітин тест-вірусом протягом 30-40 хв для забезпечення його специфічної адсорбції з наступним внесенням до клітин відповідних розведень зразків та обліком розвитку характерної цитопатичної дії (ЦПД) вірусу через 24 год після інфікування клітин.

Після утворення конфлюентного моношару у лунках 96-луночних планшетів ростове культуральне середовище видаляли та до клітин, що були призначені для моніторингу стану контрольних інтактних клітин, вносили безсироваткове середовищеу об'ємі 100 мкл а у лунки, окрім лунок призначених для контролю клітин, вносили суспензію вірусу везикулярного стоматиту (VSV) 100 ТЦД₅₀. Адсорбцію вірусу на клітинах проводили за кімнатної темпратури протягом 30-40 хвилин у захищеному від світла місці.

Одразу після завершення процесу адсорбції вірусу з планшетів видаляли вірус-вмісне середовище та вносили безсироваткове середовище з метою проведення розтитровки відповідних зразків (рис. 2.2) у об'ємі 180 мкл до кожної лунки в діапазоні В1-В6, до лунок в діапазоні С1-С6, D1-D6, E1-E6, F1-F6, G1-F6, H1-H6 вносили по 198 мкл, до лунок В7-В12 вносили по 40 мкл, до лунок в діапазоні С7-С12, D7-D12, E7-E12, F7-F12, G7-F12, H7-H12

вносили по 180 мкл, до лунок А1-А12, Н1-Н12 100 мкл, до лунок, що були визначені для контролю клітин та контролю вірусу вносили по 100 мкл середовища.

Розведення		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Розведення
	A	КК						КВ						
1:10	B													1:50
1:20	C													1:100
1:40	D													1:200
1:80	E													1:400
1:160	F													1:800
1:320	G													1:1600
	H	КВ						КК						

Рис. 2.2. Схема розташування зразків для визначення їх антивірусної активності за лікувальною схемою у 96-лунковому планшеті.

Примітки: зелені клітинки з позначенням «КК» – контроль клітин. Червоні клітинки з позначенням «КВ» — контроль вірусу. Клітинки з градієнтом від темного до світлішого – напрямок титрування зразків, від найбільшої концентрації зразка до найменшої. У бічних колонках зазначено розведення препарату у середовищі.

Одразу після зміни середовища до лунок В1-В6 вносили по 20 мкл зразка, які у подальшому були розтитровані у напрямку від верхніх до нижніх лунок, згідно до схеми (рис. 2.2), таким чином у кожній лунці було розведення 10×2^x зразку у відношенні до попередньої лунки. До лунок В7-В12 вносили по 8 мкл зразка, щоб отримати розведення зразка у 1:50, надалі зразки були розтитровані у лунках С7-С12, D7-D12, E7-E12, F7-F12, G7-F12, H7-Н12 відповідно до схеми зверху до низу.

Аналіз кожного зразка проводили у повторностях, як вказано на схемі (рис. 2.2), щоб результати можна було вважати достовірними та виключити можливість хибно-позитивних та хибно-негативних результатів.

Після внесення зразків планшети інкубували у термостаті при температурі 37°C протягом 24 годин.

2.3.4. Визначення антивірусної дії зразків в модельній системі МА-104/VSV за профілактичної схеми

Профілактична схема вивчення антивірусної активності зразків передбачає попередній 24 год контакт сформованого моношару клітин з відповідними розведеннями зразків з наступним його інфікуванням вірусом. Облік цитопатичної дії вірусу проводять через 24 год за умови 100% збереженості моношару клітин у лунках з контролем клітин та чіткою деструкцією моношару клітин у лунках контролю вірусу.

Після утворення моношару у лунках 96-луночних планшетів відбирали культуральне середовище та вносили безсироваткове середовище у об'ємі 90 мкл до кожної лунки. Одразу після зміни середовища до лунок у 6 та 7 стовпчики вносили 10 мкл зразка у розведеннях від 1:1 до 1:64, які у подальшому були розтитровані у напрямку від центру до бічних лунок, згідно до схеми (рис. 2.3), таким чином у кожній лунці було десятикратне розведення зразку у відношенні до попередньої лунки.

Аналіз кожного зразка проводили у повторностях, як вказано на схемі (рис. 2.3), щоб результати можна було вважати достовірними та виключити можливість хибно-позитивних та хибно-негативних результатів.

Після внесення зразків планшети інкубували у термостаті при температурі 37°C протягом 24 годин.

Після інкубації зразків на культурі клітин МА-104, у лунки вносили суспензію вірусу везикулярного стоматиту (VSV) розведеного у безсироватковому середовищі до 100 ТЦД₅₀, у кількості 100 мкл до кожної

лунки, окрім лунок призначених для контролю клітин. Планшети інкубували 24 години у термостаті при температурі 37°C до розвитку характерної ЦПД вірусу.





	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КК 					1:1	1:1					КВ 
B						1:1	1:1					
C						1:2	1:2					
D						1:4	1:4					
E	КВ 					1:8	1:8					КК 
F						1:16	1:16					
G						1:32	1:32					
H						1:64	1:64					

Рис. 2.3. Схема розташування зразків для визначення їх антивірусної активності за профілактичною схемою у 96-лунковому планшеті.

Примітки: зелені клітинки з позначенням «КК» – контроль клітин. Червоні клітинки з позначенням «КВ» — контроль вірусу. Клітинки з градієнтом від помаранчевого до білого – напрямок титрування зразків, від найбільшої концентрації зразка до найменшої. Числа позначають розведення препарату у середовищі.

2.3.5. Спектрофотометричний аналіз

Після остаточної інкубації зразків з внесеними зразками з кожної лунки планшету відбирали середовище, а клітини фарбували спиртовим розчином кристалічного фіолетового, внесенням у кожну лунку по 80 мкл розчину на 5-10 хвилин. Після завершення часу фіксації фарбник зливали, а планшети промивали 3 рази у холодній воді, щоб видалити надлишок фарбника та отримати точні результати.

Вже після промивання можна було візуально оцінити результати експерименту, орієнтуючись на забарвлення лунок, де насичено-фіолетовий колір лунок свідчив про збереженість моношару клітин, зумовлену антивірусною активністю зразку та про захист клітин від розвитку вірусної цитопатичної дії.

Задля отримання конкретних результатів з числовими значеннями було проведено більш об'єктивний – апаратний метод обліку результатів, а саме – спектрофотометричний аналіз.

Для зняття результатів був використаний Labsystem Multiskan Microplate Reader, яким було відскановано планшети при довжині хвилі 540 нм.

2.3.6. Статистичні методи обробки даних

Усі отримані числові результати були перенесені у програму Excel, де у подальшому були перетворені за допомогою формули обрахунку живих клітин та розподілені по групам відповідно до розшифровки. Також була обчислена IC_{50} та активність для кожного зразка відповідного препарату.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дане дослідження було спрямоване на пошук та перевірку зареєстрованих лікарських засобів різного фармакологічного профілю на наявність у них антивірусної дії, адже важливість пошуку речовин, що можуть бути використані у антивірусній терапії неймовірно важливий, як показали нам обставини останніх кількох років, які так сильно змінив SARS-CoV-2.

Результати цього експерименту продемонстрували нам, що деякі зразки досліджених препаратів здатні проявляти антивірусну активність проти вірусу везикулярного стоматиту (VSV) в умовах *in vitro* та можуть розглядатись як такі, що мають потенціал для подальших досліджень і можливого комплексного використання у рамках профілактики та/чи терапії вірусних захворювань.

3.1 Тестування цитотоксичності досліджених препаратів

Цитотоксичність взятих у дослідження 4-х препаратів була визначена за умови 24 год контакту ряду розведень приготовлених зразків зі сформованим моношаром клітин MA-104.

Тестування на цитотоксичність препаратів за допомогою МТТ-тесту продемонструвало, що агомелатин у культурі клітин MA-104 не пригнічує метаболічну активність у концентраціях, що були використані для постановки дослідження, тобто CC_{50} визначити не вдалось, але можна розглядати, що вона більша 0,25 мг/мл. У відкритих ресурсах інформація щодо CC_{50} для агомелатину відсутня.

Проте, нами було помічено цікавий ефект, що агомелатин у всіх досліджуваних розведеннях стимулював метаболічну активність та адгезію клітин навіть у безсироватковому середовищі, адже відсоток виживаності

клітин у лунках з такими розведеннями був на 30-50% вище, ніж у лунках контролю клітин (рис. 3.1). Отримані результати корелюють із нашими попередніми дослідженнями цитотоксичності цього ж препарату (рис. 3.5), де у розведеннях 1:100, 1:1000 також було виявлено вищий відсоток виживаності клітин на 20-30% відносно контролю інтактних клітин.

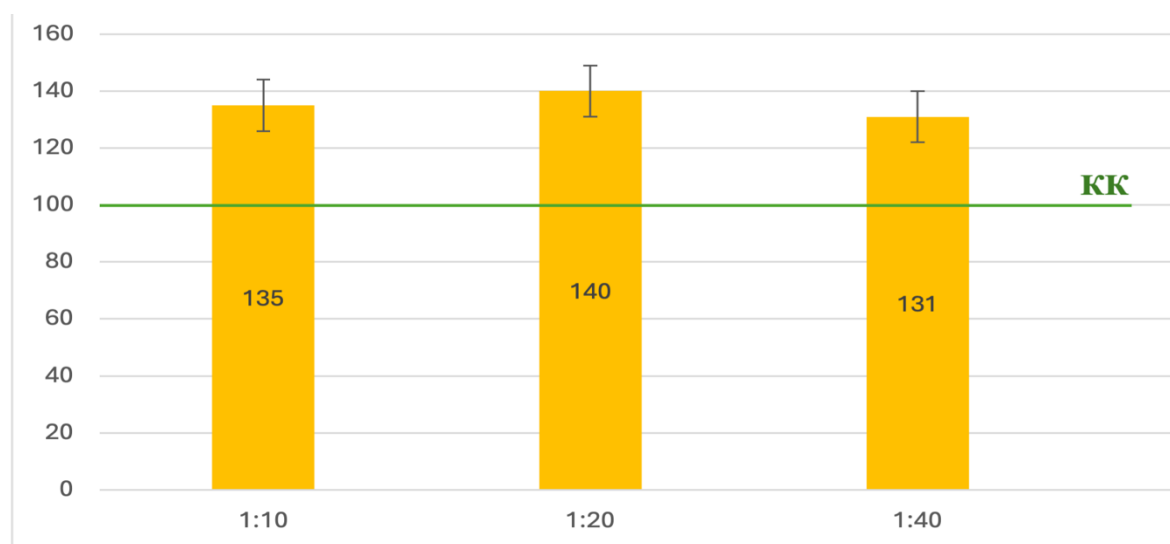


Рис 3.1. Метаболічна активність клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразком препарату агомелатин

Примітки: по осі абсцис – розведення зразка препарату агомелатин; по осі ординат – відсоток метаболічно активних клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104.

Для діосміну результати МТТ-тесту схожі, як і для агомелатину, проте показники більшого відсотку метаболічної активності клітин порівняно з контролем клітин були виявлені у розведенні зразка 1:40 (рис 3.2). Відкриті ресурси також не містили інформації щодо показника CC_{50} для цього препарату.

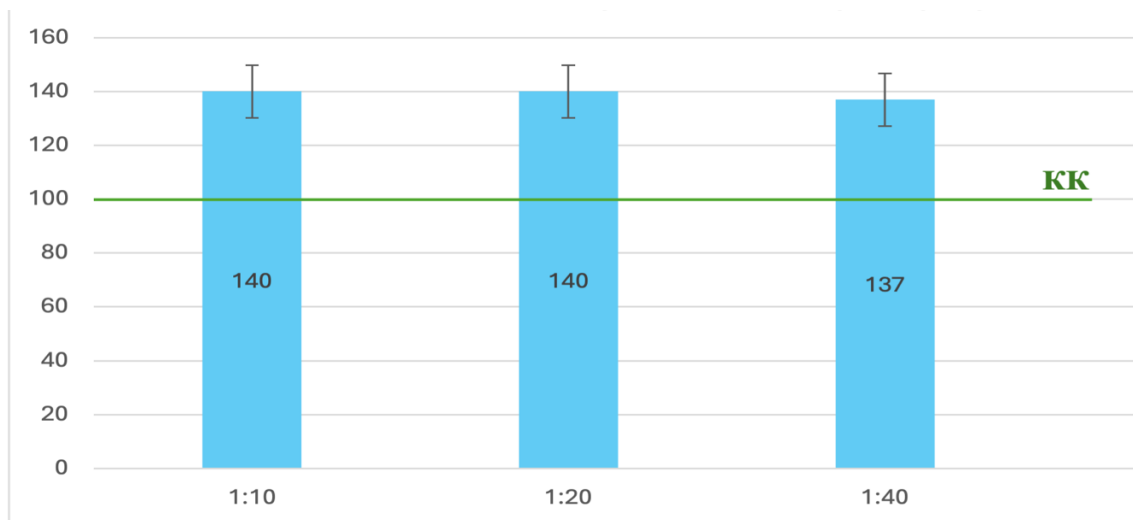


Рис. 3.2. Метаболічна активність клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразком препарату діосмін.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразка препарату діосмін; по осі ординат – відсоток метаболічно активних клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104

Для препарату периндоприл з амлодипіном було визначено CC_{50} : у лунці з розведенням 1:20 відсоток метаболічної кативності клітин становив 51% (рис. 3.3), у більших розведеннях відсоток метаболічної активності клітин вже становив 64%, що свідчить про те, що CC_{50} для препарату периндоприл з амлодипіном становить відповідно $\sim 0,025$ та $\sim 0,013$ мг/мл для периндоприлу та амлодипіну. Отримані значення є нижчими, ніж за результатами дослідження цитотоксичності, отриманих раніше (рис. 3.6), оскільки використані при постановці досліду цього року концентрації дозволили визначити більш точні значення.

За результатами МТТ-тесту вплив препарату гліклазид на метаболічну активність клітин МА-104 схожий, як і для агомелатину (рис. 3.5), проте показники більшого відсотку виживаності у клітин порівняно з контролем клітин виявлено у розведенні 1:1000 (рис. 3.4).

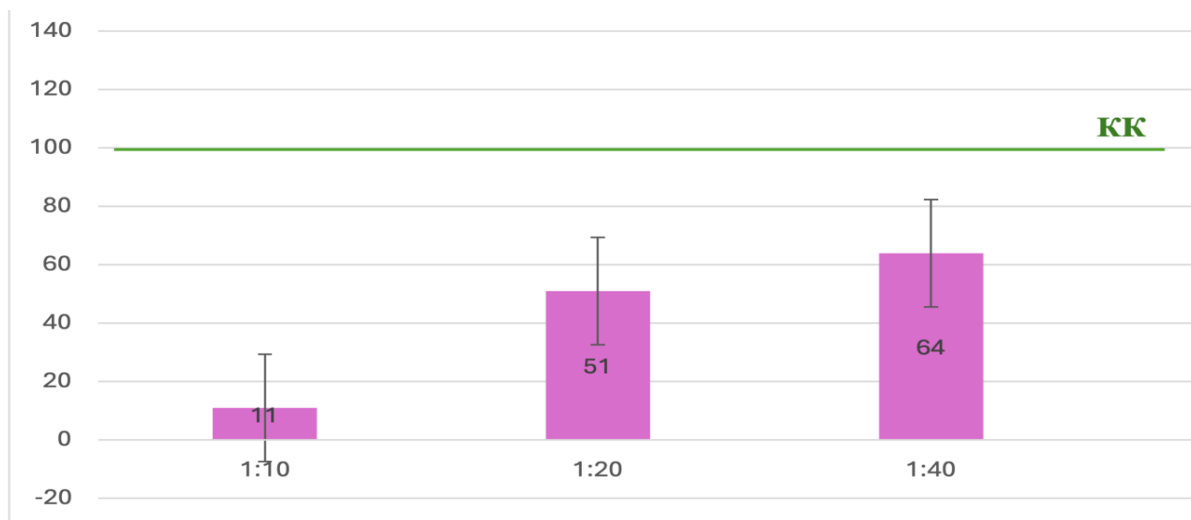


Рис. 3.3 Метаболічна активність клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразком препарату периндоприл з амлодипіном.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразка препарату периндоприл з амлодипіном; по осі ординат – відсоток метаболічно активних клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104.

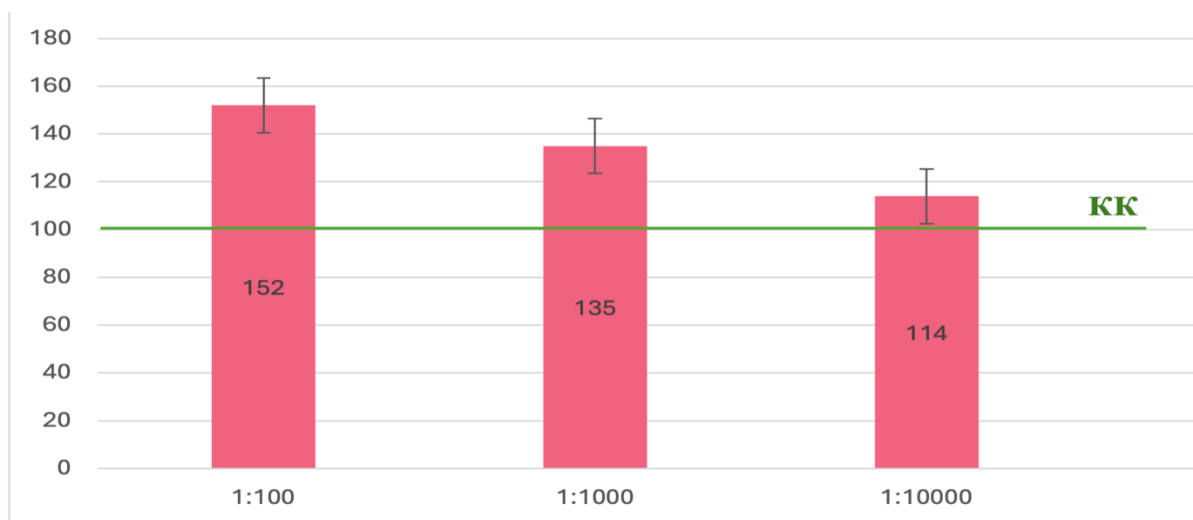


Рис. 3.4. Метаболічна активність клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразком препарату гліклазид

Примітки: по осі абсцис – розведення зразка препарату гліклазид; по осі ординат – відсоток метаболічно активних клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104.

Варто зауважити, що при первинному дослідженні цитотоксичності препарату агомелатин CC_{50} прийняли $>0,025$ мг/мл, проте надалі значення було відкореговано до більш точного завдяки повторному тестуванню цитотоксичності, а саме $CC_{50} >0,25$ мг/мл. Також, завдяки повторному проведенню дослідження цитотоксичності з використанням вужчого діапазону розведень вдалося підтвердити та відкорегувати значення CC_{50} для препарату периндоприл із амлодипіном, де показник при первинному тестуванні становив 0,01 мг/мл та 0,005 мг/мл периндоприлу та амлодипіну відповідно (рис. 3.6), а повторне тестування дало такі показники: 0,025 мг/мл та 0,013 мг/мл відповідно (рис. 3.3).

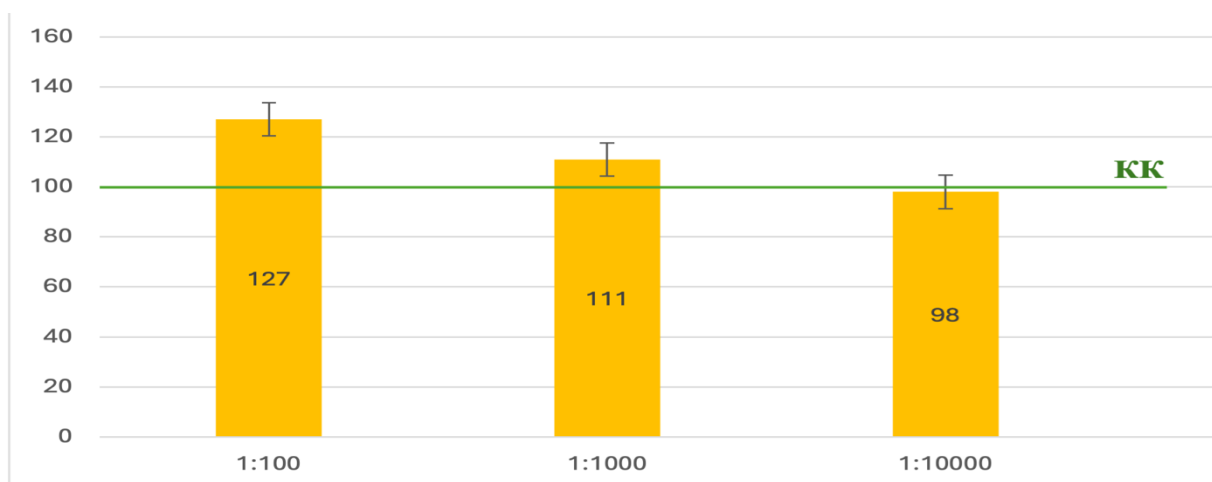


Рис. 3.5. Метаболічна активність клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразком препарату агомелатин

Примітки: по осі абсцис – розведення зразка препарату агомелатин; по осі ординат – відсоток метаболічно активних клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104.

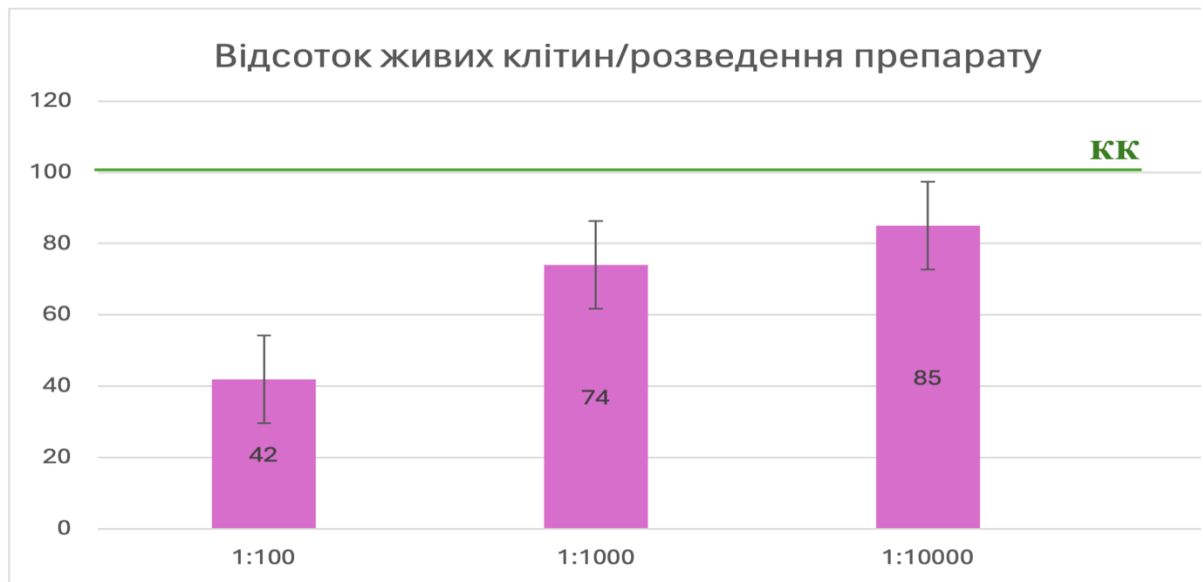


Рис. 3.6. Метаболічна активність клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразком препарату периндоприл з амлодипіном.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразка препарату периндоприл з амлодипіном; по осі ординат – відсоток метаболічно активних клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104.

Цитотоксичність препарату периндоприл з амлодипіном може пояснюватися тим, що амлодипін має здатність зупиняти клітинний цикл завдяки впливу на кіназні каскади [83].

Хоча відкриті джерела і повідомляють про те, що периндоприл майже не має цитотоксичності [82], проте конкретні дані щодо цитотоксичності периндоприлу не наводяться, тому варто вважати, що цитотоксичність CC_{50} периндоприлу у умовах дослідження, а саме у вказаних концентраціях та комбінації з іншою активною речовиною – амлодипіном, залишається у вказаному діапазоні показника.

Для адекватної оцінки відповіді клітин на контакт із досліджуваними зразками препаратів було застосовано тест з кристалічним фіолетовим, який дозволяє оцінити загальну кількість адгезованих клітин. Такий підхід забезпечує розуміння кореляції отриманих у МТТ-тесті значень метаболічної активності із значеннями загальної кількості клітин у КФ-тесті (рис. 3.7-3.8).

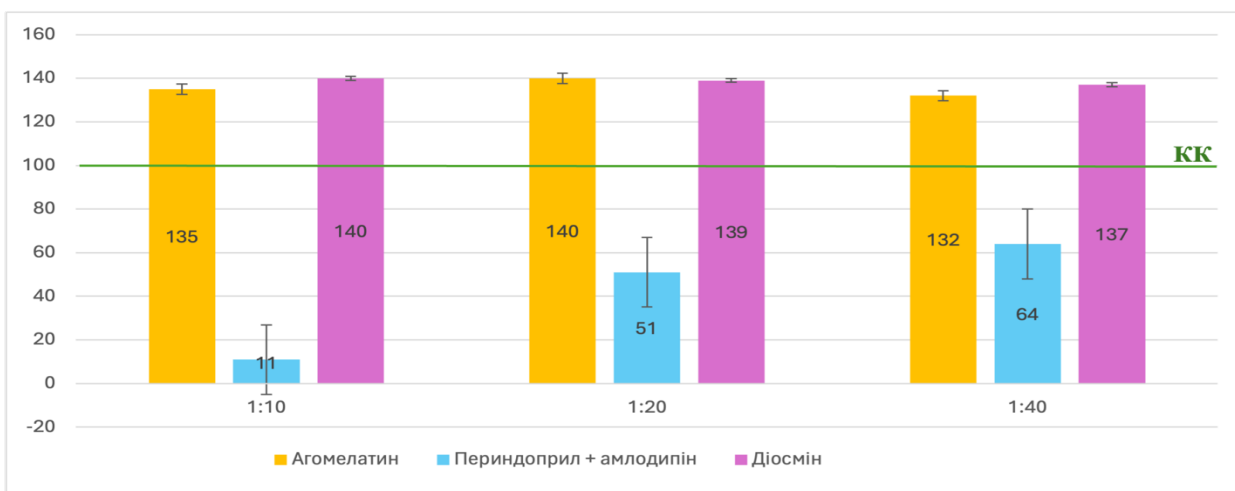


Рис. 3.7. Відсоток життєздатних адгезованих клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразками препаратів агомелатину, периндоприлу з амлодипіном, діосміну.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків препаратів; по осі ординат – відсоток життєздатних адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104.

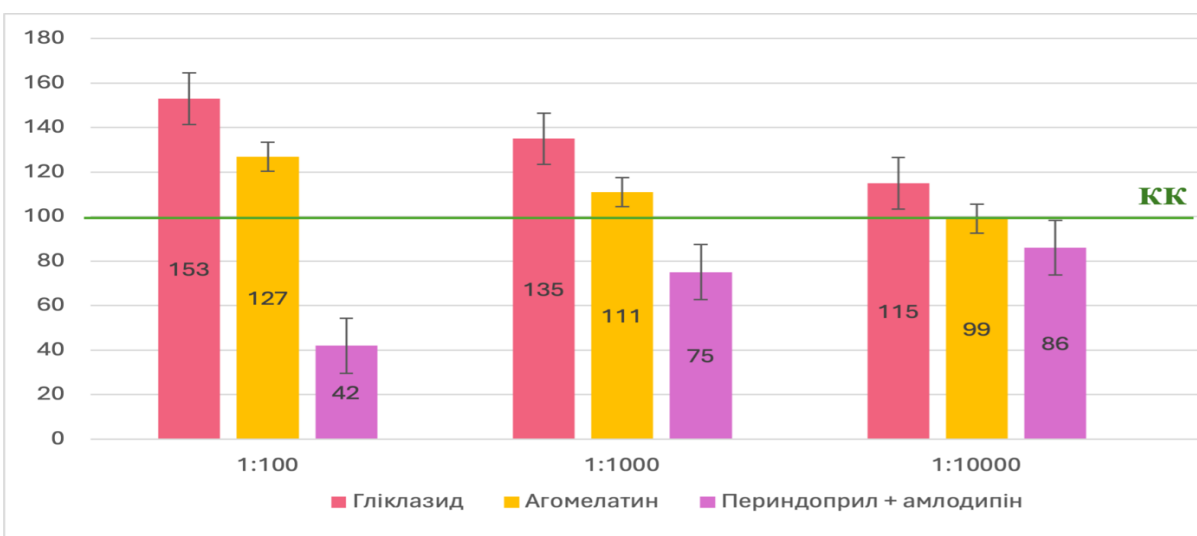


Рис. 3.8. Відсоток життєздатних адгезованих клітин МА-104 за умови 24 год контакту зі зразками препаратів гліклазиду, агомелатину, периндоприлу з амлодипіном.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків препаратів; по осі ординат – відсоток життєздатних адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних, КК – контроль культури клітин МА-104.

Тестування на цитотоксичність препаратів за допомогою тесту з кристалічним фіолетовим продемонструвало, що збереженість моношару клітин після контакту зі зразками практично не відрізняється від результатів, отриманих у МТТ-тесті. Тобто три із 4-х взятих у дослідження препаратів у високих концентраціях справляють ріст- та метаболізм-стимулюючу дію на культуру клітин МА-104. І тільки препарат периндоприл з амлодипіном справляють цитотоксичну дію, пропорційно зменшуючи як загальну кількість адгезованих клітин, так і їх метаболічну активність.

3.2 Антивірусна активність досліджених препаратів

3.2.1 Антивірусна активність досліджених препаратів за лікувальною схемою

Дослідження препаратів на можливу антивірусну дію проти вірусу везикулярного стоматиту у лікувальній схемі продемонструвало, що у препарату агомелатин можливо є інгібуюча дія до VSV, а саме до розведення препарату агомелатину у 1:10 препарат демонструє виживаність клітин до 20%, коли наступне доступне розведення 1:20 демонструє виживаність клітин на рівні контролю вірусу (рис. 3.9).

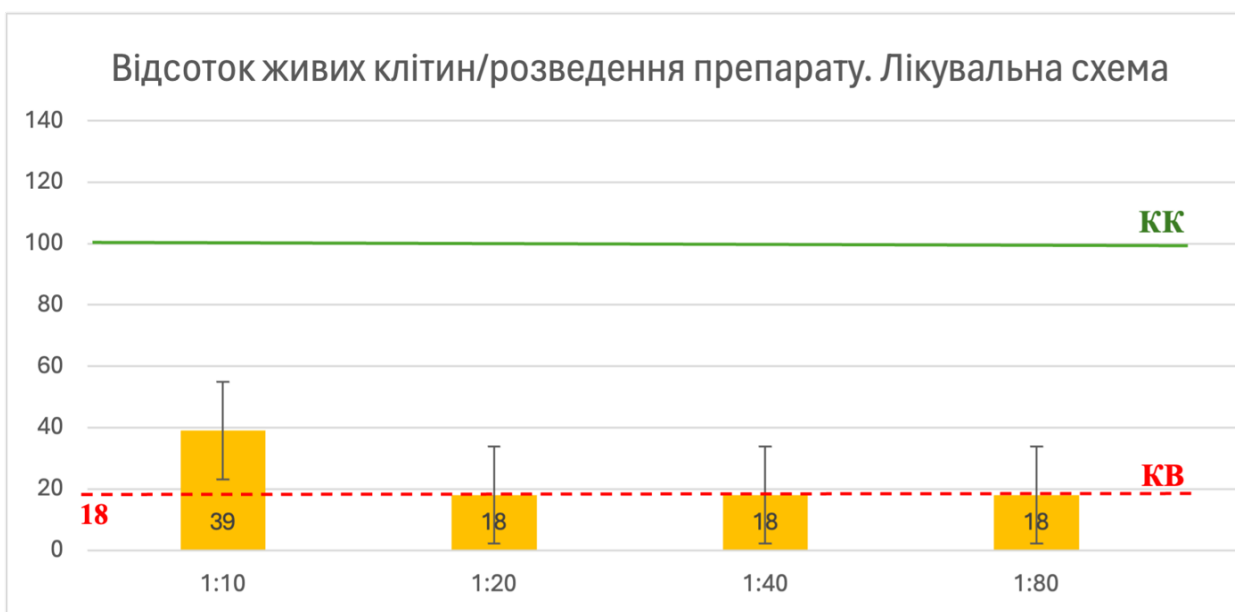


Рис. 3.9. Показники антивірусної активності препарату агомелатину у системі вірус-клітина VSV/MA-104 за лікувальної схеми.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків, по осі ординат – відсоток живих адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних клітин; зелена лінія – контроль клітин; червоний пунктир – контроль вірусу

За результатами, отриманими при застосуванні лікувальної схеми, варто вважати, що можливо IC_{50} для агомелатину у лікувальній схемі знаходиться вище за використані розведення зразка лікарського засобу.

Препарат діосмін у дослідженні не продемонстрував наявності будь-якої інгібуючої дії до вірусу везикулярного стоматиту: антивірусна активність не виявлена в жодному із досліджених розведень, показники виживаності клітин для цього препарату були в межах контролю вірусу (рис. 3.10). Необхідно зауважити, що у контролі вірусу зберігається до 18% живих адгезованих клітин. IC_{50} за лікувальної схеми внесення до клітин для препарату діосмін в робочих розведеннях визначити неможливо.

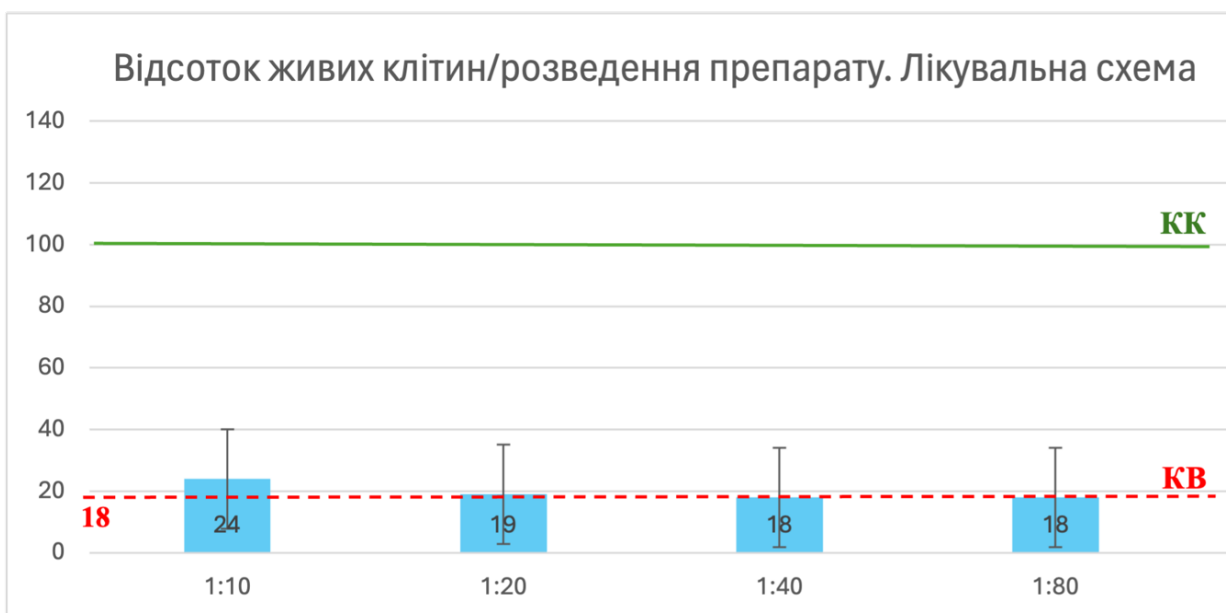


Рис. 3.10. Показники антивірусної активності зразка препарату діосмін у системі вірус-клітина VSV/MA-104 за лікувальної схеми.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків, по осі ординат – відсоток живих адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних клітин; зелена лінія – контроль клітин; червоний пунктир – контроль вірусу

Найвищу інгібуючу дію проти VSV продемонстрував препарат периндоприл з амлодипіном, не зважаючи на цитопатичний ефект (МТТ-тест та КФ-тест), який був спричинений ним у розведеннях 1:10 та 1:20. Показник

виживаності клітин у розведенні 1:40 становив 50%, у наступному розведенні 1:80 становив 30% і демонстрував показник у 25% у розведенні 1:100 (рис. 3.11).

Зважаючи на результати, отримані для препарату периндоприл з амлодипіном в лікувальній схемі, IC_{50} становить близько 0,01 мг/мл та 0,0063 мг/мл для периндоприлу та амлодипіну відповідно.

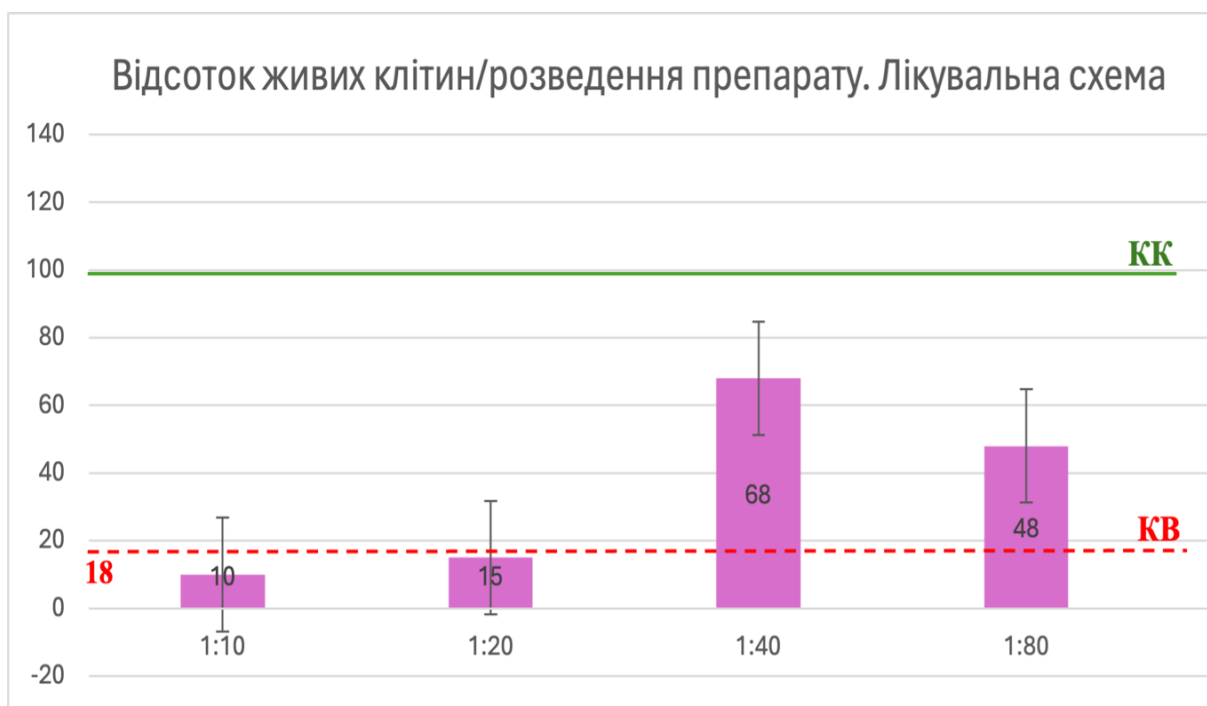


Рис. 3.11. Показники антивірусної активності препарату периндоприл з агомелатином у системі вірус-клітина VSV/MA-104 за лікувальної схеми.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків, по осі ординат – відсоток живих адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних клітин; зелена лінія – контроль клітин; червоний пунктир – контроль вірусу.

Реалізація антивірусної активності препарату периндоприл з амлодипіном може бути пояснена кількома механізмами, один з яких – вплив на ангіотензин перетворюючий фермент II [64], який використовується деякими вірусами, от як SARS-CoV-2, як вхідний рецептор. З іншого боку, можливо, препарат здатен впливати на баланс ангіотензинів, зокрема

збільшувати рівні ангіотензину 1-7, який має протизапальні властивості. Вказаний комплекс може зменшувати вірус-індуковане запалення. Можливий механізм реалізації антивірусної активності амлодипіну в той же час залишається надто загальним: його загалом описують, через участь амлодипіну у зменшенні системного запалення та непрямий вплив на імунну відповідь, без урахування зафіксованої антивірусної активності [70], що свідчить про необхідність подальшого дослідження механізму реалізації антивірусної активності цієї речовини.

Слід зауважити, що такі показники IC₅₀ для зразка препарату периндоприл з амлодипіном є релевантними лише в якості комплексу, оскільки кожна з двох діючих речовин не була протестована окремо на інгібуючу дію до VSV.

3.2.2. Антивірусна активність досліджених препаратів за профілактичною схемою

Профілактична схема дослідження антивірусної активності зразків препаратів в умовах *in vitro* передбачає попередній 24 год контакт зразків зі сформованим моношаром клітин з його наступним інфікуванням тест-вірусом.

Дослідження препаратів на можливу антивірусну дію проти вірусу везикулярного стоматиту за профілактичною схемою продемонструвало, що у препараті агомелатину присутня інгібуюча дія до VSV, а саме у розведенні 1:100 препарат демонструє виживаність клітин до 51%, коли наступне доступне розведення 1:128 демонструє лише 28% збереженість моношару клітин (рис. 3.12). З отриманих результатів можна зробити висновок, що IC₅₀ агомелатину становить близько 0,25 мг/мл.

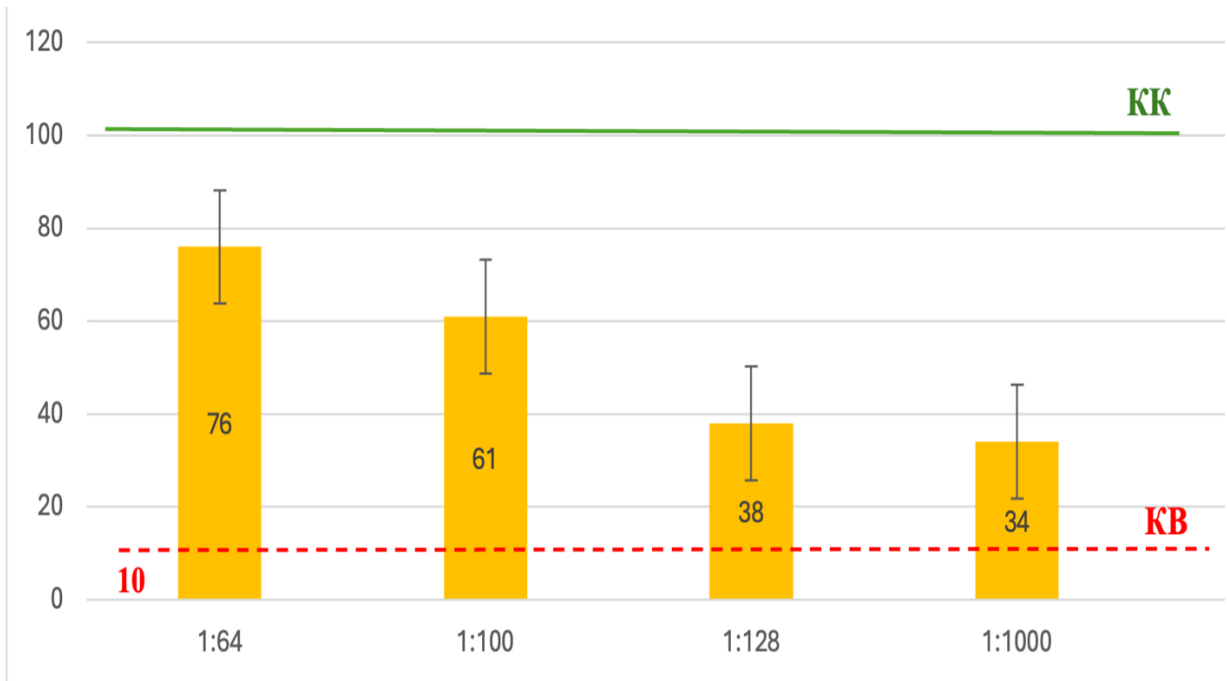


Рис. 3.12. Показники антивірусної активності препарату агомелатину у системі вірус-клітина VSV/MA-104 за профілактичної схеми.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків, по осі ординат – відсоток живих адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних клітин; зелена лінія – контроль клітин; червоний пунктир – контроль вірусу

Препарат гліклазиду у дослідженні також продемонстрував наявність інгібуючої дії до вірусу везикулярного стоматиту. Проте інгібуюча дія препарату гліклазиду порівняно менша від препарату агомелатину, показники виживаності клітин для цього препарату склали 40% у розведенні 1:64, а у розведенні 1:100 показник виживаності клітин складав 31% (рис. 3.13). Необхідно зауважити, що у лунках контролю вірусу зберігається до 10% живих адгезованих клітин, тому IC_{50} для препарату гліклазиду в робочих розведеннях встановити не вдалося.

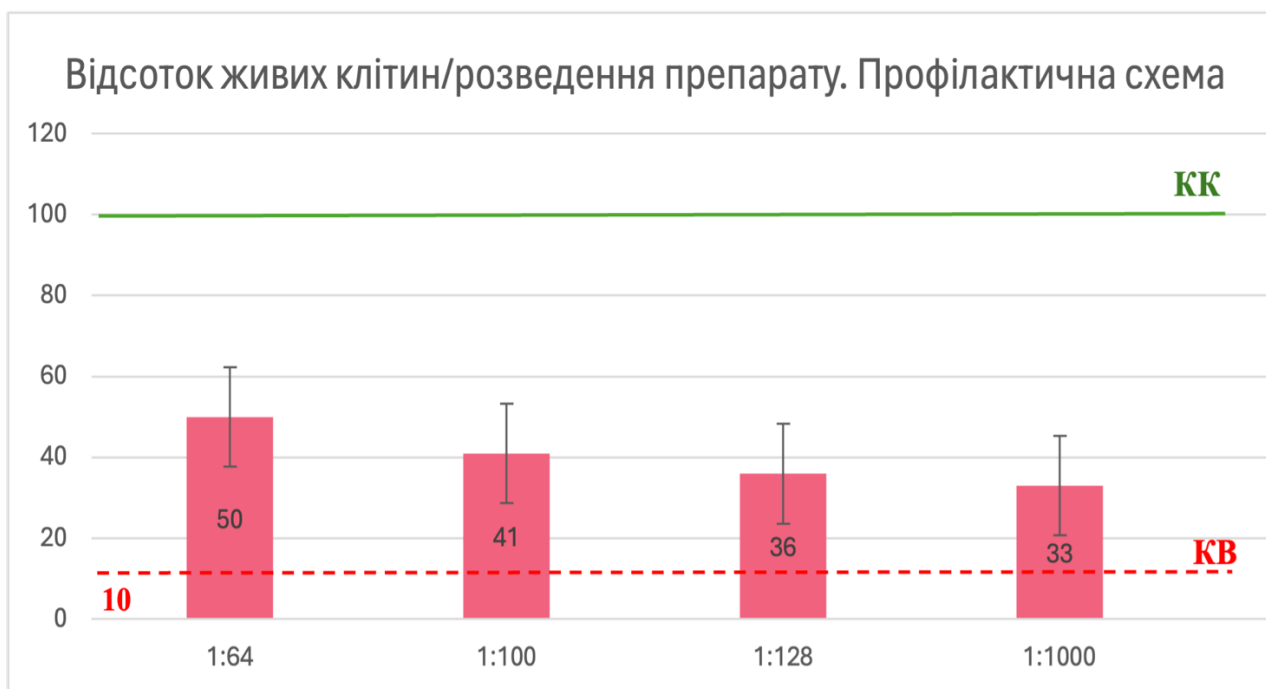


Рис. 3.13. Показники антивірусної активності препарату гліклазиду у системі вірус-клітина VSV/MA-104 за профілактичної схеми.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків, по осі ординат – відсоток живих адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних клітин; зелена лінія – контроль клітин; червоний пунктир – контроль вірусу

Найвищу інгібуючу дію проти VSV продемонстрував препарат периндоприл з амлодипіном, у якого показник виживаності клітин навіть у розведенні 1:1000 складав 53%, у найближчому доступному розведенні показник виживаності клітин становив ~36% (рис. 3.14). Виходячи з результатів, отриманих для зразка препарату периндоприл з амлодипіном, IC_{50} становить близько 0,001 та 0,0005 мг/мл для периндоприлу та амлодипіну відповідно.

Слід зауважити, що для такі показники IC_{50} для препарату периндоприл з амлодипіном є релевантними лише в якості комплексу, оскільки окремо кожна з двох діючих речовин не була протестована на інгібуючу дію до VSV.

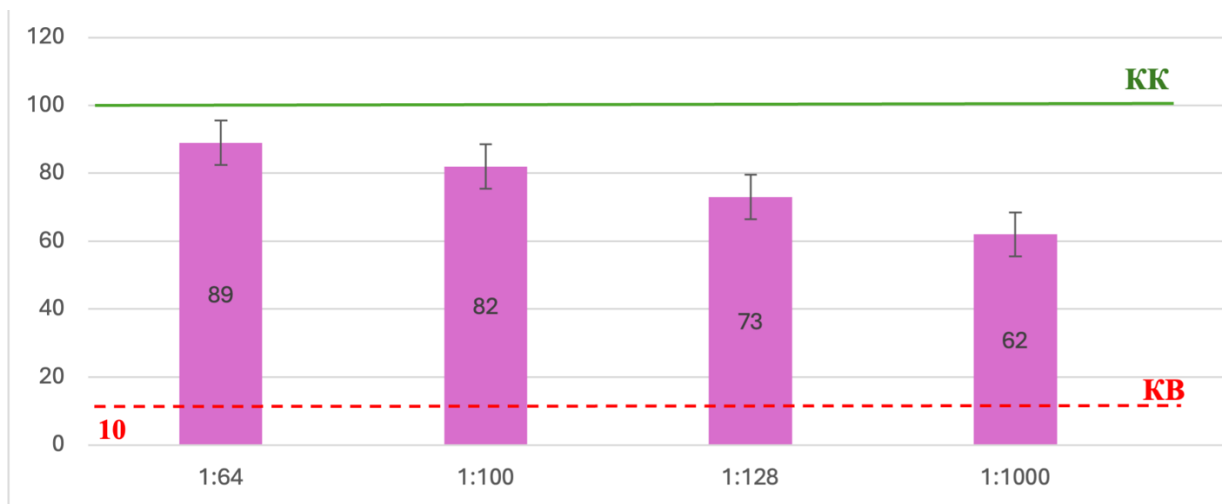


Рис. 3.14. Показники антивірусної активності препарату периндоприлу з амлодипіном у системі вірус-клітина VSV/MA-104 за профілактичної схеми.

Примітки: по осі абсцис – розведення зразків, по осі ординат – відсоток живих адгезованих клітин, розрахованих відносно контрольних інтактних клітин; зелена лінія – контроль клітин; червоний пунктир – контроль вірусу

З метою узагальнення всього комплексу отриманих результатів створена таблиця 3.1, яка дозволяє проаналізувати цитотоксичність та антивірусну активність в модельній системі MA-104/VSV чотирьох взятих у дослідження препаратів.

Таблиця 3.1.

Порівняльна таблиця антивірусної активності *in vitro* досліджених препаратів

Препарат	CC ₅₀	Лікувальна схема		Профілактична схема	
		IC ₅₀	XTI	IC ₅₀	XTI
Агомелатин	>0,25	~0,25	1	>0,25	1
Гліклазид	>0,06	-	-	~0,09	0,8
Діосмін	>10	-	-	-	-
Периндоприл та амлодипін	0,025 та 0,013	0,01 та 0,0063	2,5	0,001 та 0,0005	25

На підставі представлених в Таблиці 3.1 даних можна зробити висновок, щодо перспективності подальшого дослідження препарату периндоприл з амлодипіном з метою подвійного використання, оскільки його ХТІ за профілактичною схемою становить 25. ХТІ агомелатину, який також проявляв певну антивірусну активність за лікувальною та профілактичною схемою є суттєво нижчим та не відповідає вимогам, які висуваються до препаратів з антивірусною активністю. Аналогічний висновок і для препарату гліклазид. Препарат діосмін не проявив жодної антивірусної дії.

Наступним завданням може бути дослідження активних складників, а саме: периндоприлу та амлодипіну поодиночі, аналіз їх індивідуальної цитотоксичності та антивірусної активності кожної з цих речовин у порівнянні з комплексом.

Таким чином, проведене нами дослідження демонструє, що тестування зареєстрованих лікарських засобів різного фармакологічного профілю є швидким та простим способом розширення портфелю препаратів для антивірусної терапії та може бути гарним допоміжним інструментом, адже на розробку антивірусних препаратів зазвичай йде багато часу та ресурсів.

Проаналізувавши усі отримані результати можна чітко зазначити, що два з досліджених препаратів реалізують антивірусну активність в модельній системі VSV/MA-104 у лікувальній та профілактичній схемі та є потенційними кандидатами для подальшого дослідження та підтвердження їх антивірусної активності в умовах *in vivo*.

Препарат периндоприл з амлодипіном продемонстрував антивірусну активність за межами CC_{50} , що свідчить про те, що цей препарат може бути розглянутий як можливий складовий компонент в рамках профілактики та/чи терапії вірусних захворювань.

І надалі доцільним та актуальним залишається проведення більш детального дослідження антивірусної активності цих препаратів, дослідження

їх впливу на організм в цілому під час використання в рамках терапії вірусних захворювань.

Саме дослідження таких властивостей препаратів різних фармакологічних груп дозволить нам в подальшому реагувати на такі виклики, як SARS-CoV-2, швидше та ефективніше.

ВИСНОВКИ

1. Вперше проведено комплексне дослідження токсичності та антивірусної активності за профілактичною та лікувальною схемами в модельній системі MA-104/VBS чотирьох широко застосовуваних офіційних препаратів різних фармакологічних груп та показано наявність суттєвої антивірусної активності у препараті периндоприлу з амлодипіном.
2. На культурі клітин MA-104 визначено цитотоксичну концентрацію CC_{50} зразка препарату амлодипін з периндоприлом: $\sim 0,025$ мг/мл периндоприлу та $\sim 0,013$ мг/мл амлодипіну. Для зразків препаратів агомелатину, діосміну та гліклазиду за умови їх 24 годин контакту з клітинами MA-104, цитотоксичності не виявлено.
3. Відсоток виживаності клітин культури MA-104 за дослідження цитотоксичності при обробці препаратами агомелатину, діосміну та гліклазиду у всіх досліджених розведеннях був вище на 11-52% порівняно з контролем культури клітин, що свідчить про їх стимулюючу дію на метаболічну активність та ріст клітин.
4. У лікувальній схемі препарат діосміну не виявив інгібуючої дії проти VSV у досліджуваних розведеннях. Препарат агомелатину має потенційну антивірусну активність, певний відсоток живих клітин порівняно з контролем вірусу спостерігався у розведенні 1:64, де концентрація становила 0,25 мг/мл.
5. Препарат периндоприлу з амлодипіном продемонстрував значущу антивірусну активність в модельній системі VSV/MA-104. Показник ХТІ у лікувальній схемі становить – 2,5 у профілактичній – 25.
6. Препарати периндоприл з амлодипіном і агомелатин мають потенціал для подальших досліджень в умовах *in vivo*, як можливі засоби в рамках профілактики та/чи терапії вірусних захворювань, викликаних РНК-вмісними вірусами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fda.gov. (2020). *Orange Book: Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations*. [online] Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/index.cfm>.
2. Langford, B.J., So, M., Raybardhan, S., Leung, V., Soucy, J.-P.R., Westwood, D., Daneman, N. and MacFadden, D.R. (2021). Antibiotic prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(4). doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.018>.
3. Skolimowska, K., Gilchrist, M., Satta, G., Cooke, G. and Holmes, A. (2020). Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals With Coronavirus: A Rapid Review To Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9). doi:<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530>.
4. Choudhury A, Mukherjee S. (2020) In silico exploration of some antibiotics as potential inhibitors of RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn.*;1-12. doi:<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1805424>.
5. Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., Shi, Z., Hu, Z., Zhong, W. and Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, 30(3), pp.269–271. doi:<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
6. Jean, S.-S., Lee, P.-I. and Hsueh, P.-R. (2020). Treatment options for COVID-19: The reality and challenges. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(3). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.034>.
7. Lewczuk, N., Zdebik, A. and Bogusławska, J. (2019). Interferon Alpha 2a and 2b in Ophthalmology: A Review. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 39(5), pp.259–272. doi:<https://doi.org/10.1089/jir.2018.0125>.
8. Lazear, H.M., Schoggins, J.W. and Diamond, M.S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, [online] 50(4), pp.907–923. doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>.

9. Schoggins, J.W. and Rice, C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology*, 1(6), pp.519–525. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>.
10. Kotenko, S.V., Rivera, A., Parker, D. and Durbin, J.E. (2019). Type III IFNs: Beyond antiviral protection. *Seminars in Immunology*, 43, p.101303. doi:<https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101303>.
11. Ho, H.H. and Ivashkiv, L.B. (2006). Role of STAT3 in Type I Interferon Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), pp.14111–14118. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m511797200>.
12. Millet, J.K. and Whittaker, G.R. (2015). Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus research*, [online] 202, pp.120–134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.021>.
13. Nelemans, T. and Kikkert, M. (2019). Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections. *Viruses*, 11(10), p.961. doi:<https://doi.org/10.3390/v11100961>.
14. Totura, A.L. and Baric, R.S. (2012). SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Current Opinion in Virology*, [online] 2(3), pp.264–275. doi:<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.04.004>.
15. Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264(5167), pp.1918–1921. doi:<https://doi.org/10.1126/science.8009221>.
16. Schneider, W.M., Chevillotte, M.D. and Rice, C.M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*, 32(1), pp.513–545. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>.

17. Haller, O., Staeheli, P. and Kochs, G. (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, 89(6-7), pp.812–818. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.015>.
18. Silverman, R.H. (2007). Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. *Journal of Virology*, [online] 81(23), pp.12720–12729. doi:<https://doi.org/10.1128/JVI.01471-07>.
19. Namir Shaabani, Duhan, V., Vishal Khairnar, Asmae Gassa, Ferrer-Tur, R., Dieter Häussinger, Recher, M., Gennadiy Zelinsky, Liu, J., Dittmer, U., Trilling, M., Scheu, S., Hardt, C., Lang, P.A., Honke, N. and Lang, K.S. (2016). CD169⁺ macrophages regulate PD-L1 expression via type I interferon and thereby prevent severe immunopathology after LCMV infection. *Cell death and disease*, 7(11), pp.e2446–e2446. doi:<https://doi.org/10.1038/cddis.2016.350>.
20. Duhan, V., Vishal Khairnar, Simo Kitanovski, Hamdan, T.A., Klein, A.D., Lang, J., Ali, M., Adomati, T., Bhat, H., Friedrich, S.-K., Li, F., Krebs, P., Futerman, A.H., Addo, M.M., Hardt, C., Hoffmann, D., Lang, P.A. and Lang, K.S. (2021). Integrin Alpha E (CD103) Limits Virus-Induced IFN-I Production in Conventional Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*, 11. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607889>.
21. Pantel, A., Teixeira, A., Haddad, E., Wood, E.G., Steinman, R.M. and Longhi, M.P. (2014). Direct Type I IFN but Not MDA5/TLR3 Activation of Dendritic Cells Is Required for Maturation and Metabolic Shift to Glycolysis after Poly IC Stimulation. *PLoS Biology*, 12(1), p.e1001759. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001759>.
22. Bao, M. and Liu, Y.-J. (2012). Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein & Cell*, 4(1), pp.40–52. doi:<https://doi.org/10.1007/s13238-012-2104-8>.
23. for, C. (1993). *Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification Index*.

24. Sheskey, P.J., Hancock, B.C., Moss, G.P., Goldfarb, D.J. and American Pharmacists Association (2020). *Handbook of pharmaceutical excipients*. London: Pharmaceutical Press ; Washington, D.C.
25. Cabot Corporation. (n.d.). *Products and Applications*. [online] Available at: <https://www.cabotcorp.com/products> [Accessed 9 May 2024].
26. Cosmetics Info. (n.d.). *Magnesium Stearate*. [online] Available at: <https://cosmeticsinfo.org/ingredient/magnesium-stearate> [Accessed 9 May 2024].
27. M. Römisch, Meier, W., R. Kimmig and Hepp, H. (1996). 13-cis Retinolsäure und Interferon α 2a als Palliativtherapie beim vorbehandelten, rezidivierenden Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri und Vulva. *Thieme-Praxis-Report. Geburtshilfe und Frauenheilkunde/Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 56(10), pp.520–524. doi:<https://doi.org/10.1055/s-2007-1023277>.
28. Ahn, J. and Flamm, S. (2004). Peginterferon- α 2b and ribavirin. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2(1), pp.17–25. doi:<https://doi.org/10.1586/14787210.2.1.17>.
29. go.drugbank.com. (n.d.). *Stearic acid*. [online] Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB03193>.
30. Mu, Q., Guo, H., Ye, Z. and Spencer, S. (2023). *Inflammation and Autoimmunity: From Gut to Remote Tissues*. Frontiers Media SA.
31. Li J, Li J, Shen Y (2018). Stearic acid-modified graphene oxide nanosheets: a potential candidate for the effective treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Nanomedicine*: 13:2289-2306. doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S161529>.
32. Welch, J.L., Xiang, J., Okeoma, C.M., Schlievert, P.M. and Stapleton, J.T. (2020). Glycerol Monolaurate, an Analogue to a Factor Secreted by Lactobacillus, Is Virucidal against Enveloped Viruses, Including HIV-1. *mBio*, 11(3). doi:<https://doi.org/10.1128/mbio.00686-20>.
33. The United States pharmacopeia. 37th revision : the national formulary. 32nd ed. (2019). Rockville: United States Pharmacopeial Convention.

34. Paulo Pereira (mikrobiolog (2019). *Quality Management and Quality Control*.
35. Jia, G., Wang, Y., Ba, T., Li, Y., Pu, J., Chen, T., Song, Y., Gu, Y., Qian, Q. and Yang, J. (2014). Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters*, 226(3), pp.314–319. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.020>.
36. Schmiedel, R. (2017). *USP 41 - NF 36 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2018 Main edition plus Supplements 1 and 2*. Stuttgart Deutscher Apotheker Verlag.
37. go.drugbank.com. (n.d.). *Agomelatine*. [online] Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06594>.
38. PubChem (n.d.). *Agomelatine*. [online] pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82148#section=Depositor-Supplied-Synonyms> [Accessed 12 May 2024].
39. Lang, U.E. and Borgwardt, S. (2013). Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, [online] 31(6), pp.761–777. doi:<https://doi.org/10.1159/000350094>.
40. Montgomery, P and Milling, C (2010). Agomelatine efficacy and tolerability in the treatment of depression. *Expert opinion on pharmacotherapy*,. (11(13)), pp.2215–2226. doi:<https://doi.org/10.1517/14656566.2010.511863>.
41. Yadalam, P.K., Balaji, T.M., Varadarajan, S., Alzahrani, K.J., Al-Ghamdi, M.S., Baeshen, H.A., Alfarhan, M.F.A., Khurshid, Z., Bhandi, S., Jagannathan, R., Patil, V.R., Raj, A.T., Ratnayake, J. and Patil, S. (2022). Assessing the therapeutic potential of agomelatine, ramelteon, and melatonin against SARS-CoV-2. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5), pp.3140–3150. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.049>.

42. Cecon, E., Isabelle, C., Sophie Le Poder, Real, F., Zhu, A., Tu, L., Maria Rosa Ghigna, Klonjkowski, B., Morgane Bomsel, Jockers, R. and Dam, J. (2021). Therapeutic potential of melatonin and melatonergic drugs on K18-*hACE2* mice infected with SARS-CoV-2. *Journal of pineal research*, 72(1). doi:<https://doi.org/10.1111/jpi.12772>.
43. Cecon, E., Fernandois, D., Renault, N., Coelho, C.F.F., Wenzel, J., Bedart, C., Isabelle, C., Gallet, S., Le Poder, S., Klonjkowski, B., Schwaninger, M., Prevot, V., Dam, J. and Jockers, R. (2022). Melatonin drugs inhibit SARS-CoV-2 entry into the brain and virus-induced damage of cerebral small vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(7). doi:<https://doi.org/10.1007/s00018-022-04390-3>.
44. Reiter R.J. (1991). Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News in Physiology Science*, 6, pp.223–227.
45. Jou, M.-J., Peng, T.-I., Yu, P.-Z., Jou, S.-B., Reiter, R.J., Chen, J.-Y., Wu, H.-Y., Chen, C.-C. and Hsu, L.-F. (2007). Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 43(4), pp.389–403. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2007.00490.x>.
46. Hardeland R, and Poeggeler B. (2008). Melatonin beyond its classical functions. *Open Physiology Journal* , 1, pp.1–23.
47. Rudiger Hardeland and Coto-Montes, A. (2010). New Vistas on Oxidative Damage and Aging. *The Open biology journal*, 3(1), pp.39–52. doi:<https://doi.org/10.2174/1874196701003010039>.
48. Acuna Castroviejo, D., C. Lopez, L., Escames, G., Lopez, A., A. Garcia, J. and J. Reiter, R. (2011). Melatonin-mitochondria Interplay in Health and Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(2), pp.221–240. doi:<https://doi.org/10.2174/156802611794863517>.
49. de Castro-Silva, C., de Bruin, V.M.S., Cunha, G.M.A., Nunes, D.M., Medeiros, C.A.M. and de Bruin, P.F.C. (2010). Melatonin improves sleep and

- reduces nitrite in the exhaled breath condensate in cystic fibrosis â a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Journal of Pineal Research*, 48(1), pp.65–71. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2009.00726.x>.
50. Luigi Fabrizio Rodella, Filippini, F., Bonomini, F., Bresciani, R., Reiter, R.J. and Rezzani, R. (2010). Beneficial effects of melatonin on nicotine-induced vasculopathy. 48(2), pp.126–132. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2009.00735.x>.
51. Park, S.-Y., Jang, W.-J., Yi, E.-Y., Jang, J.-Y., Jung, Y., Jeong, J.-W. and Kim, Y.-J. (2010). Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *Journal of Pineal Research*, 48(2), pp.178–184. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2009.00742.x>.
52. Chen, C.F., Wang, D., Reiter, R.J. and Yeh, D.Y. (2010). Oral melatonin attenuates lung inflammation and airway hyperreactivity induced by inhalation of aerosolized pancreatic fluid in rats. *Journal of Pineal Research*, 50(1), pp.46–53. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2010.00808.x>.
53. Gitto, E., Aversa, S., Reiter, R.J., Barberi, I. and Pellegrino, S. (2010). Update on the use of melatonin in pediatrics. *Journal of Pineal Research*, 50(1), pp.21–28. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2010.00814.x>.
54. Bonnefont-Rousselot, D. and Collin, F. (2010). Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278(1), pp.55–67. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.008>.
55. Reiter, R.J., Tan, D., Sainz, R.M., Mayo, J.C. and Lopez-Burillo, S. (2002). Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(10), pp.1299–1321. doi:<https://doi.org/10.1211/002235702760345374>.
56. Boga, J.A., Coto-Montes, A., Rosales-Corral, S.A., Tan, D.-X. and Reiter, R.J. (2012). Beneficial actions of melatonin in the management of viral infections: a new use for this ‘molecular handyman’?. *Reviews in Medical Virology*, 22(5), pp.323–338. doi:<https://doi.org/10.1002/rmv.1714>.

57. Valero, N., Bonilla, E., Pons, H., Chacin-Bonilla, L., Añez, F., Espina, L.M., Medina-Leendertz, S. and Tamayo, J.G. (2002). Melatonin induces changes to serum cytokines in mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(3), pp.348–351. doi:[https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90121-5](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90121-5).
58. Bonilla, E., Valero, N., Chacin-Bonilla, L. and Medina-Leendertz, S. (2004). Melatonin and viral infections. *Journal of Pineal Research*, 36(2), pp.73–79. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1600-079x.2003.00105.x>.
59. Citrus Flavonoids. (2008). *Pharmacognosy Reviews*, 2(3), pp.90–96.
60. Cos, P., Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D. and Vlietinck, A. (2004). Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11(10), pp.1345–1359. doi:<https://doi.org/10.2174/0929867043365288>.
61. Gohel, M. and Davies, A. (2009). Pharmacological Agents in the Treatment of Venous Disease: An Update of the Available Evidence. *Current Vascular Pharmacology*, 7(3), pp.303–308. doi:<https://doi.org/10.2174/157016109788340758>.
62. Jantet, G. (2002). Chronic Venous Insufficiency: Worldwide Results of the RELIEF Study. *Angiology*, 53(3), pp.245–256. doi:<https://doi.org/10.1177/000331970205300301>.
63. Kumar, S., Sharma, P.P., Upadhyay, C., Kempaiah, P., Rathi, B. and Poonam (2021). Multi-targeting approach for nsp3, nsp9, nsp12 and nsp15 proteins of SARS-CoV-2 by Diosmin as illustrated by molecular docking and molecular dynamics simulation methodologies. *Methods*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.02.017>.
64. Huang, Y., Zhou, W., Sun, J., Ou, G., Zhong, N. and Liu, Z. (2022). Exploring the Potential Pharmacological Mechanism of Hesperidin and Glucosyl Hesperidin against COVID-19 Based on Bioinformatics Analyses and Antiviral

- Assays. *The American Journal of Chinese Medicine*, 50(02), pp.351–369.
doi:<https://doi.org/10.1142/s0192415x22500148>.
65. go.drugbank.com. (2005). *Perindopril*. [online] Available at:
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00790>.
66. Servier - Our History. (n.d.). Available at: <https://servier.com/en/our-history/>.
67. Anon, (n.d.). *Announces FDA Approval of NORVASC (amlodipine besylate) for the Treatment of Hypertension*. Pfizer. [online] Available at:
https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer_inc_announces_fda_approval_of_norvasc_amlodipine_besylate_for_the_treatment_of_hypertension.
68. DrugBank (2024). *Amlodipine*. [online] go.drugbank.com. Available at:
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00381>.
69. Tlili Barhoumi, Bandar Alghanem, Hayat Shaibah, Mansour, F.A., Alamri, H.S., Akiel, M.A., Fayhan Alroqi and Boudjelal, M. (2021). SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Potential Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (Perindopril). *Frontiers in immunology*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728896>.
70. Madej, A., DÄbek, J., Majewski, M. and Szuta, J. (2018). Effect of perindopril and bisoprolol on IL-2, INF- γ , hs-CRP and T-cell stimulation and correlations with blood pressure in mild and moderate hypertension. *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 56(09), pp.393–399. doi:<https://doi.org/10.5414/cp203249>.
71. Xiao, X., Wang, C., Chang, D., Wang, Y., Dong, X., Jiao, T., Zhao, Z., Ren, L., Dela Cruz, C.S., Sharma, L., Lei, X. and Wang, J. (2020). Identification of Potent and Safe Antiviral Therapeutic Candidates Against SARS-CoV-2. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586572>.

72. go.drugbank.com. (n.d.). *Agomelatine*. [online] Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06594>.
73. Servier Laboratories. (n.d.). Gliclazide: A history. Available at: <https://www.servier.com/en/medicines/gliclazide-a-history/>
74. Singh Tomar, P.P. and Arkin, I.T. (2020). SARS-CoV-2 E protein is a potential ion channel that can be inhibited by Gliclazide and Memantine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 530(1), pp.10–14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.206>.
75. Yu, H.-G., Sizemore, G., Martinez, I. and Perrotta, P. (2022). Inhibition of SARS-CoV-2 Viral Channel Activity Using FDA-Approved Channel Modulators Independent of Variants. *Biomolecules*, 12(11), pp.1673–1673. doi:<https://doi.org/10.3390/biom12111673>.
76. Anon, (n.d.). *Indiana vesiculovirus*. [online] Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/202/rhabdoviridae-figures.
77. LIBRARY, D.K.B.P. (n.d.). *Vesicular stomatitis virus, TEM - Stock Image - C016/4244*. [online] Science Photo Library. Available at: <https://www.sciencephoto.com/media/517835/view> [Accessed 15 May 2024].
78. Saotome, K., Morita, H., & Umeda, M. (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro*, 3(4), 317–321.
79. Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 251-258.
80. Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Bielawski, K., Dziubek, K., Miltyk, W., ... Filipczak, N. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS ONE*, 11(5), e0155772.

81. Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 251-258.
82. Fu, B., Dou, X., Zou, M., Lu, H., Wang, K., Liu, Q., Liu, Y., Wang, W., Jin, M. and Kong, D. (2022). Anticancer Effects of Amlodipine Alone or in Combination With Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in pharmacology*, 13. doi:<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.902305>.
83. Papanagnou, P., Baltopoulos, P. and Tsironi, M. (2015). Marketed nonsteroidal anti-inflammatory agents, antihypertensives, and human immunodeficiency virus protease inhibitors: as-yet-unused weapons of the oncologists' arsenal. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, p.807. doi:<https://doi.org/10.2147/tcrm.s82049>.