

- duced keratitis. Virol J 2024, 21, 118, doi:10.1186/s12985-024-02384-0.
49. Yu, C.; He, S.; Zhu, W.; Ru, P.; Ge, X.; Govindasamy, K. Human cytomegalovirus in cancer: the mechanism of HCMV-induced carcinogenesis and its therapeutic potential. Front Cell Infect Microbiol 2023, 13, 1202138, doi:10.3389/fcimb.2023.1202138.
 50. Zeng, A.H.; Ou, Y.Y.; Guo, M.M.; Dai, X.; Zhou, D.Z.; Chen, R. Human embryonic lung fibroblasts treated with artesunate exhibit reduced rates of proliferation and human cytomegalovirus infection in vitro. J Thorac Dis 2015, 7, 1151-1157, doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.07.05.
 51. Zhang, S.M.; Rehling, D.; Jemth, A.S.; Throup, A.; Landazuri, N.; Almlöf, I.; Gottmann, M.; Valerie, N.C.K.; Borhade, S.R.; Wakchaure, P.; et al. NUDT15-mediated hydrolysis limits the efficacy of anti-HCMV drug ganciclovir. Cell Chem Biol 2021, 28, 1693-1702 e1696, doi:10.1016/j.chembiol.2021.06.001.
 52. Zhong, P.; Agosto, L.M.; Munro, J.B.; Mothes, W. Cell-to-cell transmission of viruses. Current opinion in virology 2013, 3, 44-50, doi:10.1016/j.coviro.2012.11.004.

УДК: 547.992.2

РУТАН – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Салихов Ш.И.¹, Карамов Э.В.², Ощепкова Ю.И.¹, Федякина И.Т.², Гайдаров А.О.², Тенцов Ю.Ю.², Дергоусов А.А.², Тургиев А.С.², Иванов А.В.³

¹ Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова АН РУз, г. Ташкент,

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта» Российской академии наук, г. Москва

XULOSA

Tadqiqotning maqsadi. Rutan va uning tarkibiy qismlarining in vitro sharoitida gripp virusi ko'payishini bostirish qobiliyatini baholash uchun tajribalarning dastlabki natijalarini tahlil qilish.

Materiallar va tadqiqot usullari. MDCK hujayra kulturasida A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 gripp virusi yordamida Rutan preparati va uning tarkibiy qismlarining in vitro sharoitida gripp virusining ko'payishini bostirish ta'sirini o'rganish.

Olingan natijalar. Rutan (O'zbekiston Respublikasida koronavirus infeksiyasini davolash uchun tasdiqlangan) preparatining faolligi va uning tarkibiy qismlari o'rganildi. Dori vositalarining aksariyati nisbatan yuqori faollikka ega ekanligi va keyingi rivojlanish mezonlariga javob berishi ko'rsatildi.

Xulosa. Olingan natijalar shuni ko'rsatadiki, turli xil ta'sir mexanizmlari orqali bir-biriga bog'liq bo'lmagan virus oilalarining replikatsiyasini bostiradigan polifenollar mavjud bo'lgan Rutan farmakopeya preparati keng spektrli antiviral vosita sifatida foydalanish uchun istiqbolli nomzod hisoblanadi.

Kalit so'zlar: Rutan, sumak polifenollar.

Растущее число новых и возвращающихся вирусных зоонозов и прогнозируемое наличие в природных резервуарах около 1.7 миллиона неизвестных ви-

SUMMARY

Purpose of research. Conducting an analysis of preliminary results of experiments to assess the ability of Rutan and its components to suppress the reproduction of the influenza virus in vitro.

Material and research methods. Study of the effect of the drug Rutan and its components to suppress the reproduction of the influenza virus in vitro using the influenza virus A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 in MDCK cell culture.

Results. The activity of Rutan (approved as a treatment for coronavirus infection in the Republic of Uzbekistan) and its components was studied. Most of the drugs were shown to have relatively high activity and meet the criteria for further development.

Conclusion. The obtained results suggest that the pharmacopoeial drug Rutan, which contains polyphenols that suppress the replication of viruses of unrelated families through various mechanisms of action, is a promising candidate for use as a broad-spectrum antiviral agent.

Keywords: Rutan, sumac polyphenols.

русов млекопитающих и птиц, до половины которых могут начать паразитировать в организме человека [5], позволяют считать невозможным своевременное

создание эффективных средств борьбы с этими многочисленными патогенами в рамках традиционной парадигмы разработки противовирусных препаратов. Отсюда интерес к противовирусным препаратам широкого спектра действия, способным подавлять несколько вирусов за счёт воздействия на общие процессы в их жизненном цикле, а не на конкретные вирусные белки. Данное направление получило название «инвариантного по отношению к конкретному патогену» (threat-agnostic).

Растительные полифенолы являются объектом возрастающего интереса вирусологов [4], так как лишены токсичности и обладают рядом уникальных свойств; особого внимания заслуживают способность одного и того же полифенола подавлять вирусы, принадлежащие к неродственным семействам [18], и наличие нескольких точек приложения активности в жизненном цикле конкретного вируса [14] (при этом часть таких «мишеней» может представлять собой клеточные, а не вирусные структуры [16], что снижает вероятность формирования резистентных штаммов [8]).

Ранее было показано, что полифенолы Сумаха дубильного *Rhus coriaria* являются высокоэффективными ингибиторами репликации SARS-CoV-2 [20]. На их основе был создан препарат Рутан, разрешённый к применению в Республике Узбекистан в качестве средства лечения коронавирусной инфекции. Для оценки соответствия критериям широкого спектра действия и возможности разработки средства профилактики / лечения вирусных инфекций, инвариантного по отношению к возбудителю, нами начато изучение активности растительных полифенолов в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов, вызывающих широко распространённые социально значимые заболевания и относящихся к разным семействам. В настоящем сообщении анализируются предварительные результаты экспериментов по оценке способности Рутана и его компонентов подавлять репродукцию вируса гриппа *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые препараты. Препарат Рутан исследовали в виде фармакопейной субстанции, представляющей собой сумму водорастворимых полифенолов Сумаха дубильного – 1,2,3,4,6-пента-О-галлоил-β-D-глюкозы (R5), 3-бис-О-галлоил-1,2,4,6-тетра-О-галлоил-β-D-глюкозы (R6), 2,4-бис-О-галлоил-1,3,6-три-О-галлоил-β-D-глюкозы (R7) и 2,3,4-бис-О-галлоил-1,6-ди-О-галлоил-β-D-глюкозы (R8), массовые доли которых составляют 39.2%, 14.8%, 26.3%, 8.4% и 6.7%, соответственно [20]. Для приготовления маточных растворов исследуемых препаратов использовался ДМСО.

Клетки. В работе использована культура клеток MDCK (Всероссийская коллекция клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Данная клеточная линия чувствительна к заражению различными видами вируса гриппа и

успешно используется для титрования инфекционной активности вируса и изучения антивирусных свойств веществ различной природы. Культивирование клеток осуществлялось в питательной среде Игла (MEM; Институт полиомиелита РАН) с двойным набором аминокислот и 5 об. % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 10 мМ L-глутамина (Sigma, США) и 4% гентамицина (Gibco, США). Клетки вносили в 96-луночные культуральные плоскостонные планшеты (Costar, США) по 18000 / лунку в объеме 100 мкл свежеприготовленной среды и культивировали 48 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ до формирования монослоя.

Вирус. Исследования выполнялись с использованием вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1) pdm09 (Всероссийская коллекция клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Вирусы культивировали в аллантаоисной полости 9-10-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36 °C.

Определение инфекционного титра вируса проводили согласно методам, рекомендованным Минздравом России и ВОЗ [1, 2]. Полностью сформированный монослой клеток MDCK в 96-луночных планшетах (Costar, США) заражали 10-кратными разведениями вируса. Каждое разведение исследовали в 4 повторностях. Перед заражением клетки дважды промывали средой без сыворотки. Адсорбцию вируса проводили в течение 1 ч при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Несорбированный вирус отмывали 2 раза по 5 минут средой без сыворотки, после чего добавляли поддерживающую среду (MEM с двойным набором аминокислот, 0.2% альбумина и трипсина, обработанного TPCK (Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл). Зараженные клетки инкубировали в термостате с 5% CO₂ в течение 48 часов при 37°C до полного проявления цитопатического действия (ЦПД), выражавшегося в изменении морфологии клеток (наблюдаемого с помощью светового микроскопа). Расчет титра проводили по методу Спирмана-Кербера в модификации И.П. Ашмарина (ФГБНУ ФИЦВиМ, отдел Государственной коллекции микроорганизмов, СОП-00574-01):

$$\lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ мл} = \lg D_n - \sigma (\sum Li - 0.5),$$

где lgTCID₅₀ – разведение вируса, способное вызвать ЦПД в половине инфицированных культур клеток; D_n – минимальное испытываемое разведение, вызывающее ЦПД в 100% инфицированных культур клеток; σ – логарифм кратности разведения, равный 1; Li – отношение числа культур клеток с проявлением ЦПД в испытываемых разведениях к общему числу инфицированных культур клеток в этом разведении; ∑ Li – сумма значений Li, найденная во всех испытываемых разведениях, показавших результат от 100% до 0% культур клеток с ЦПД. Биологическая активность использованных вирусных стоков составляла 105 – 106 TCID₅₀/0.1 мл.

Определение цитотоксического действия препаратов. Из планшетов с монослоем клеток MDCK удаляли надосадочную жидкость и дважды промывали средой MEM без сыворотки. Кратные разведения исходных растворов препаратов готовили в 24-луночных планшетах путем разведения на 8 лунок, начиная с разведения 1:10 до 1:1280. Полученные разведения препаратов (каждое – в объёме 250 мкл) переносили в 96-луночный планшет для иммунологических реакций (Costar, США), а оттуда с помощью многоканальной пипетки вносили по 200 мкл в лунки планшетов с клетками. Каждое разведение тестировали в 4 параллельных лунках. После инкубации с препаратами (в течение 48 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂) клетки микроскопировали, оценивая визуально состояние клеточного монослоя (нарушение целостности монослоя, наличие поврежденных и нежизнеспособных клеток). Каждая точка тестировалась в 4 параллельных лунках. В лунки контроля клеток вносили рабочую среду. Далее удаляли культуральную среду из планшетов и в каждую лунку к монослою культуры клеток добавляли по 100 мкл среды и 20 мкл реагента CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation (Promega, США), основу которого составляет 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолия внутренняя соль (MTS). После инкубации в течение 3 часов при 37°C результаты учитывали на автоматическом ридере (Bio-Rad, США) при длине волны 490 нм, используя референс-фильтр – 630 нм. Полумаксимальную цитотоксическую концентрацию препаратов (CC50) определяли из кривых зависимости количества мёртвых / повреждённых клеток от концентрации по уравнениям нелинейной регрессии (4 параметра).

Определение противовирусной активности препаратов проводили так же, как и исследования цитотоксичности, с той разницей, что разведения препаратов вносили в лунки с клетками в объёме

100 мкл, после чего в течение 1 часа в каждую лунку добавляли по 100 TCID₅₀ вирусосодержащего материала в объёме 100 мкл, а затем планшеты с клеточными культурами инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Каждое разведение испытывали в 2 параллельных лунках. Каждый эксперимент ставили трижды. По окончании периода инкубации определяли титр вируса в каждой лунке. О противовирусной активности препаратов судили по разнице в титрах вируса в контроле и опыте, выраженной в логарифмах ($\Delta \lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ мл}$):

$$A = A_k - A_o,$$

где A_k и A_o – титры вируса ($\lg \text{TCID}_{50}$) в контроле и опыте соответственно. Индекс защиты, или коэффициент ингибирования (КИ) рассчитывали по формуле:

$$\text{КИ} = [(A_k - A_o) / A_k] \times 100 (\%).$$

Полумаксимальную эффективную концентрацию препаратов (IC₅₀) определяли из кривых зависимости КИ от концентрации по уравнениям нелинейной регрессии (4 параметра). Индекс селективности (химioterапевтический индекс) рассчитывали по формуле:

$$\text{SI} = \text{CC50} / \text{IC50}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Противовирусный эффект принято считать удовлетворительным, а препарат – заслуживающим дальнейшей разработки и проведения экспериментов на животных, если $\Delta \lg \text{TCID}_{50} \geq 2.0$, КИ $\geq 50\%$, а SI > 8 [1,2]. Как видно из таблиц 1 и 2, Рутан и полифенолы R7 и R8 активно подавляют репликацию вируса гриппа в культуре перmissive клеток и отвечают всем трём критериям, предъявляемым к перспективным противовирусным соединениям. При этом обращает на себя внимание чрезвычайно высокая противовирусная активность полифенола R8, обладавшего наименьшей цитотоксичностью и снижавшего титр инфекционного вируса более чем в 10 тысяч раз.

Таблица 1

Активность исследуемых препаратов против вируса гриппа

	A_k ($\lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ мл}$)	A_o ($\lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ мл}$)	$A_k - A_o$ ($\Delta \lg \text{TCID}_{50}/0.1 \text{ мл}$)	КИ, %
Рутан	5.0	2.5	2.5	50%
R5	5.0	3.5	1.5	30%
R6	5.0	4.0	1.0	20%
R7	5.0	2.25	2.75	55%
R8	6.0	1.75	4.25	71%

Таблица 2

Индексы селективности исследуемых препаратов

	IC50, мкг/мл	CC50, мкг/мл	SI
Рутан	12.44	144.3	11.6
R5	8.85	86.34	9.8
R6	>50	93.13	< 2
R7	2.13	191.01	89.7
R8	0.8	233	291.3

Препарат Рутан изначально разрабатывался как средство лечения гриппа, и предполагалось, что его воздействие на вирусы опосредовано индукцией интерферона [3]. В ходе работ по перепрофилированию Рутана в средство лечения COVID-19 нами было показано, что препарат обладает и прямой противовирусной активностью в отношении штамма H1N1 в культуре инфицированных клеток MDCK [20]. Активность компонентов Рутана против вируса гриппа нами не исследовалась, но в культуре клеток Vero E6, инфицированных SARS-CoV-2, для полифенолов R5 – R8 были получены значения IC50, равные 7.49, 5.95, 17.53 и 15.58 мкМ (или 7.04, 6.50, 21.81 и 21.75 мкг/мл), соответственно. Если расположить полифенолы Рутана в порядке убывания активности (увеличения значений IC50), то для SARS-CoV-2 [20] и вируса гриппа H1N1 (Табл. 2) получатся две несопадающие последовательности:

SARS-CoV-2: R6 > R5 >> R8 > R7
H1N1: R8 >> R7 > R5 >> R6

Таким образом, подавление Рутаном репликации вирусов SARS-CoV-2 и гриппа H1N1 имеют совершенно различные молекулярные механизмы. В отношении SARS-CoV-2 наиболее активны R6 и R5 (R8 и R7 в два раза менее активны), тогда как против вируса гриппа H1N1 наиболее активен R8, от которого существенно отстают в активности R7 и R5 (R6 не активен). Противовирусная активность полифенолов R6 – R8 до нас никем не исследовалась (в отличие от полифенола R5, активность которого против вирусов гриппа [7,10,13,15,17,22] и SARS-CoV-2 [6,9,11,19, 21] хорошо изучена).

Полученные нами результаты предполагают, что фармакопейный препарат Рутан, в состав которого входят полифенолы, подавляющие репликацию вирусов неродственных семейств за счёт различных механизмов действия, является перспективным кандидатом на использование в качестве противовирусного средства широкого спектра действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. Министерство здравоохранения и социального развития РФ. ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» под общей редакцией Миронова А.Н., 2012
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева, 2005
3. Салихов, Ш.И.; Мавлянов, С.М.; Абдулладжанова, Н.Г.; Карамов, Э.В. Патент UZ IAP 04524, 2012
4. Arrigoni R. Current view on major natural compounds endowed with antibacterial and antiviral effects. / R. Arrigoni, A. Ballini, E. Jirillo, L. Santacroce // *Antibiotics* (Basel). – 2024. – V. 13. – № 7. – P. 603. doi: 10.3390/antibiotics13070603
5. Carroll D. The global virome project. / D. Carroll, P. Daszak, N.D. Wolfe, G.F. Gao, C.M. Morel, S. Morzaria, A. Pablos-Méndez, O. Tomori, J.A.K. Mazet // *Science*. – 2018. – V. 359. – № 6378. – P. 872-874. doi: 10.1126/science.aap7463
6. Chiou, W.C.; Chen, J.C.; Chen, Y.T.; Yang, J.M.; Hwang, L.H.; Lyu, Y.S.; Yang, H.Y.; Huang, C. The inhibitory effects of PGG and EGCG against the SARS-CoV-2 3C-like protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2022, 591, 130-136, doi:10.1016/j.bbrc.2020.12.106.
7. Derksen, A.; Hensel, A.; Hafezi, W.; Herrmann, F.; Schmidt, T.J.; Ehrhardt, C.; Ludwig, S.; Kuhn, J. 3-O-galloylated procyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of influenza A virus. *PLoS One* 2014, 9, e110089, doi:10.1371/journal.pone.0110089.
8. Eslami M., Arjmand N., Mahmoudian F., Babaeizad A., Tahmasebi H., Fattahi F., Oksenysh V. Deciphering Host–Virus Interactions and Advancing Therapeutics for Chronic Viral Infection. *Viruses* 2025, 17:390. doi: 10.3390/v17030390
9. Ezell, J.; Al-Horani, R.A. Chemically Synthesized 1,2,3,4,6-Pentakis-O-Galloyl-beta-D-Glucopyranoside Blocks SARS-CoV-2 Spike Interaction with Host ACE-2 Receptor. *Med Chem* 2024, 20, 986-991, doi:10.2174/0115734064302693240711114948.
10. Ge, H.; Liu, G.; Xiang, Y.F.; Wang, Y.; Guo, C.W.; Chen, N.H.; Zhang, Y.J.; Wang, Y.F.; Kitazato, K.; Xu, J. The mechanism of poly-galloyl-glucoses preventing Influenza A virus entry into host cells. *PLoS One* 2014, 9, e94392, doi:10.1371/journal.pone.0094392.
11. Jeon, H.; Lee, Y.-G.; Yang, Y.J.; Jeong, Y.J.; Kwon, J.H.; Park, J.-H.; Kim, H.; Kang, S.; Tark, D.; Lee, G.-H.; et al. Anti-SARS-CoV-2 Efficacy of *Elaeocarpus sylvestris* Extract Verified by in silico, in vitro, Preclinical, and Clinical Studies. *SSRN* 2022, doi:10.2139/ssrn.4000447.
12. Jin, Y.H.; Lee, J.; Jeon, S.; Kim, S.; Min, J.S.; Kwon, S. Natural Polyphenols, 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglucose and Proanthocyanidins, as Broad-Spectrum Anticoronaviral Inhibitors Targeting Mpro and RdRp of SARS-CoV-2. *Biomedicines* 2022, 10, doi:10.3390/biomedicines10051170.
13. Joo, Y.H.; Lee, Y.G.; Lim, Y.; Jeon, H.; Kim, E.H.; Choi, J.; Hong, W.; Jeon, H.; Ahrweiler, M.; Kim, H.; et al. Potent antiviral activity of the extract of *Elaeocarpus sylvestris* against influenza A virus in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 2022, 97, 153892, doi:10.1016/j.phymed.2021.153892.
14. Karadeniz F, Kang KH, Park JW, Park SJ, Kim SK. Anti-HIV-1 activity of phlorotannin derivative 8,4''-dieckol from Korean brown alga *Ecklonia cava*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2014;78(7):1151-8. doi: 10.1080/09168451.2014.923282

15. Li, J.; Yang, X.; Huang, L. Anti-Influenza Virus Activity and Constituents. Characterization of *Paeonia delavayi* Extracts. *Molecules* 2016, 21, doi:10.3390/molecules21091133.
16. Liu Q, He Q, Tao X, Yu P, Liu S, Xie Y, Zhu W. Resveratrol inhibits rabies virus infection in N2a cells by activating the SIRT1/Nrf2/HO-1 pathway. *Heliyon*. 2024 Aug 22;10(17):e36494. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e36494
17. Liu, G.; Xiong, S.; Xiang, Y.F.; Guo, C.W.; Ge, F.; Yang, C.R.; Zhang, Y.J.; Wang, Y.F.; Kitazato, K. Antiviral activity and possible mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus. *Arch Virol* 2011, 156, 1359-1369, doi:10.1007/s00705-011-0989-9.
18. Musarra-Pizzo M, Pennisi R, Ben-Amor I, Mandalari G, Sciortino MT. Antiviral Activity Exerted by Natural Products against Human Viruses. *Viruses*. 2021 May 4;13(5):828. doi: 10.3390/v13050828
19. Pattaro-Junior, J.R.; Araujo, I.G.; Moraes, C.B.; Barbosa, C.G.; Philippsen, G.S.; Freitas-Junior, L.H.; Guidi, A.C.; de Mello, J.C.P.; Peralta, R.M.; Fernandez, M.A.; et al. Antiviral activity of *Cenostigma pluviosum* var. *peltophoroides* extract and fractions against SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn* 2023, 41, 7297-7308, doi:10.1080/07391102.2022.2120078.
20. Salikhov SI, Abdurakhmonov IY, Oshchepkova YI, Ziyaviddinov JF, Berdiev NS, Aisa HA, Shen J, Xu Y, Xu HE, Jiang X, Zhang L, Vypova NL, Allaberganov DS, Tagayalieva NA, Musabaev EI, Ibadova GA, Rajabov IB, Lokteva LM. Repurposing of Ratan showed effective treatment for COVID-19 disease. *Front Med. (Lausanne)*. 2023 10:1310129. doi: 10.3389/fmed.2023.1310129
21. Tan, H.; Ma, C.; Wang, J. Invalidation of dieckol and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose (PGG) as SARS-CoV-2 main protease inhibitors and the discovery of PGG as a papain-like protease inhibitor. *Med Chem Res* 2022, 31, 1147-1153, doi:10.1007/s00044-022-02903-0.
22. Zhang, T.; Lo, C.Y.; Xiao, M.; Cheng, L.; Pun Mok, C.K.; Shaw, P.C. Anti-influenza virus phytochemicals from *Radix Paeoniae Alba* and characterization of their neuraminidase inhibitory activities. *J Ethnopharmacol* 2020, 253, 112671, doi:10.1016/j.jep.2020.112671.
