

Ингибирующие эффекты специфической комбинации природных соединений на SARS-CoV-2 и его варианты альфа, бета, гамма, дельта, каппа и мю

Европейский журнал
микробиологии и
иммунологии

АНА ГОЦ, АЛЕКСАНДРА НЕДЗВЕЦКИ*,
ВАДИМ ИВАНОВ, СВЕТЛАНА ИВАНОВА И
МАТИАС РАТ

DOI:
10.1556/1886.2021.00022
© 2021 Автор (-ы)

Исследовательский институт доктора Рата (Dr. Rath Research Institute), 5941 Optical Ct., San Jose, CA 95138, USA (США)

Получено: 30 ноября 2021 г. • Принято: 20 декабря 2021 г. • Принято:

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



РЕЗЮМЕ

Несмотря на наличие вакцин, COVID-19 продолжает распространяться по всему миру, чему в значительной степени способствуют возникающие мутации SARS-CoV-2. Проведенное нами ранее исследование показало, что специфическая комбинация соединений растительного происхождения может ингибировать связывание SARS-CoV-2 с его рецептором ACE2 и контролировать ключевые клеточные механизмы инфицирования вирусом. В этом исследовании оценивали эффективность определенной смеси растительных экстрактов и микроэлементов против исходного SARS-CoV-2 и его вариантов альфа, бета, гамма, дельта, каппа и мю. Наибольшую эффективность продемонстрировала композиция, содержащая витамин С, N-ацетилцистеин, ресвератрол, теафлавин, куркумин, кверцетин, нарингенин, байкалин и экстракт брокколи, которая на 90 % ингибировала связывание рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2 с его клеточным рецептором ACE2. Обработка этой композицией *in vitro* тестируемых псевдотипированных вариантов в течение 1 ч до введения в клетки легких человека или одновременно с введением приводила к 60-процентному ингибированию их проникновения в клетки. Кроме того, эта композиция значимо ингибировала другие клеточные механизмы инфицирования вирусом, включая активность вирусного RdRp, фурина и катепсина L. Эти результаты демонстрируют эффективность природных соединений против SARS-CoV-2, включая его мутантные формы, благодаря плейотропным механизмам. Результаты исследования показывают, что одновременное ингибирование нескольких механизмов инфицирования вирусом клеток-хозяев может оказаться эффективной стратегией предотвращения инфекции SARS-CoV-2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

SARS-CoV-2, варианты, RdRp, фурин, катепсин L

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на наличие вакцин и радикальные меры, принимаемые общественным здравоохранением, инфекция SARS-CoV-2 продолжает распространяться [1]. По данным ВОЗ, по состоянию на 31 августа 2021 г. в мире зарегистрировано почти 217 млн случаев заболевания, которые привели к смерти более 4,51 млн человек [2]. В течение одного года пандемии появилось несколько вариантов вируса SARS-CoV-2, в том числе: вариант B.1.1.7 (альфа) в Великобритании, вариант B.1.315 (бета) в Южной Африке, вариант P.1 (гамма) в Бразилии и мутантные формы в Индии, так называемые линии B.1.617.1 (каппа) и B.1.617.2 (дельта) [3]. Все эти варианты распространились в другие страны, причем каждая мутация потенциально может привести к появлению новых вариантов, как, например, возникший в Японии вариант R.1 с мутацией E484K, локализованной в S-белке («шипе»), которая придает «повышенную устойчивость» к антителам, вырабатываемым в ответ на существующие вакцины [4], а также мутация D614G, придающая повышенную контагиозность и имеющаяся у всех других вариантов, превосходящих штамм альфа [5]. Отчеты о клинических исследованиях также показывают, что британский вариант способен заражать пациентов, привитых вакциной, разработанной против оригинального SARS-CoV-2. Таким образом, это ставит под сомнение любые заявления об универсальной эффективности вакцины [6].

*Автор, ответственный за переписку.
Dr. Rath Research Institute BV, 5941
Optical Ct., San Jose,
CA 95138, USA (США)
Тел.: þ1 408 567 5050.
Электронная почта:
author@drath.com



Недавно были получены данные о том, что новый вариант мю и вариант R.1 могут избегать воздействия антител, образующихся после применения вакцин против оригинального SARS-CoV-2 [7]. Таким образом, не является неожиданным тот факт, что в связи с быстро появляющимися мутациями SARS-CoV-2 и необходимостью разработки новых вакцин потенциально для каждого нового варианта, а также с вытекающими научными, экономическими и социальными последствиями такой стратегии окончательно взять продолжающуюся пандемию COVID-19 под контроль будет затруднительно.

Был тщательно изучен механизм проникновения SARS-CoV-2 в клетку, и установлено, что он опосредуется S-белком, расположенным на поверхности вируса. S-белок представляет собой тример с тремя рецептор-связывающими головками S1, расположенными на верхушке ножки S2, слитой с тримерной мембраной [8]. Белок-шип S1 на SARS-CoV-2 содержит рецептор-связывающий домен (RBD), который связывается с клеткой-мишенью с помощью человеческого рецептора ACE2 (hACE2), присутствующего на поверхности многих типов клеток, и протеолитически активируется протеазами человека. Проникновение в клетки-хозяева является важной детерминантой инфекционности вируса и патогенеза инфекции [9—11].

В процессе инфицирования SARS-CoV-2 клеток участвует несколько ферментативных белков хозяина, в том числе трансмембранная сериновая протеаза 2 (TMPRSS2), фурин, катепсин L, а также РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), катализирующая размножение вирусной РНК [12]. РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) — это консервативный по своей структуре вирусный фермент, не имеющий гомологов в клетке-хозяине. Она представляет интерес для разработки селективных ингибиторов как потенциально более безопасная альтернатива для лечения COVID-19, не влияющая непосредственно на белки клеток человека [13].

Применение природных соединений благодаря их широкому плейотропному действию дает возможность с высоким пределом безопасности контролировать несколько механизмов, связанных с инфекцией SARS-CoV-2. С момента появления COVID-19 эффективность таких соединений в качестве ингибиторов была показана в нескольких исследованиях [14—17]. В наших предыдущих исследованиях также была установлена эффективность воздействия соединений растительного происхождения на несколько клеточных механизмов инфицирования SARS-CoV-2 [18—20]. В настоящем исследовании проводилась оценка эффективности определенной комбинации микроэлементов и растительных экстрактов против недавно появившихся мутантных форм SARS-CoV-2 и активности ключевых ферментов, участвующих в вирусном процессинге в альвеолярных клетках человека. Этот подход направлен на одновременное ингибирование нескольких клеточных механизмов инфицирующей способности SARS-CoV-2, независимо от мутации и/или подтипа, и тем самым открывает новые возможности для глобального контроля пандемии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии, вирусные частицы и антитела

Клетки A549 и VeroE6 были получены из Американской коллекции типовых культур (Манассас, штат Виргиния, США). Клетки hACE2/A549 (т. е. клетки A549 со стабильной гиперэкспрессией рецептора ACE2 человека) и псевдотипированные частицы с инкапсулированным S-белком SARS-CoV-2 и eGFP-люциферазой были приобретены у

GenScript (Пискаатауэй, штат Нью-Джерси, США). Псевдотипированная Δ G-люцифераза (G* Δ G-люцифераза) rVSV была получена от Kerafast (Бостон, штат Массачусетс, США). Альфа-, бета-, гамма-, дельта-, каппа-, мю- и голые псевдотипированные частицы SARS-CoV-2 с eGFP-люциферазой были получены от BPS Bioscience (Сан-Диего, штат Калифорния, США). Все остальные соединения были получены от Sigma (Сент-Луис, штат Миссури, США), за исключением экстракта брокколи, который был получен от Bulk Supplements (Хендерсон, штат Невада, США).

Композиции растительного происхождения

Комбинации природных соединений, изученные в этом исследовании, представлены в таблице 1. Исходные растворы этих комбинаций готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) с концентрацией 50 мг/мл и хранили при температуре -20°C до проведения анализа. Для экспериментов маточный раствор разбавляли до конечных концентраций, указанных на рисунках, 1 \times фосфатно-солевым буфером (1 \times ФСБ), рекомендованным производителем используемого набора (анализы ферментной активности) или соответствующей средой для культивирования клеток (клеточные анализы).

Связывание псевдотипированных вирионов SARS-CoV-2 с рецептором hACE2

Эксперимент проводили согласно ранее опубликованной нами методике [18, 19]. Вкратце, исходный псевдотипированный вирион с инкапсулированным S-белком SARS-CoV-2 и eGFP-люциферазой или его варианты инкубировали при температуре 37°C с 0—100 мг/мл смеси V в течение 1 часа перед добавлением в монослой клеток hACE2/A549 или добавляли одновременно к клеткам hACE2/A549. Клетки инкубировали еще 48 ч при температуре 37°C . После 48-часового периода инкубации эффективность трансдукции количественно оценивали путем регистрации активности люциферазы с использованием системы анализа люциферазы (Promega, Мэдисон, штат Висконсин, США) и спектрофлуориметра (Tecan Group Ltd., Меннедорф, Швейцария). Положительным контролем были голые псевдотипированные частицы SARS-CoV-2 с eGFP-люциферазой, а отрицательным контролем были псевдотипированные частицы rVSV с Δ G-люциферазой. Данные представлены в виде % от контроля без добавления смеси V (среднее \pm стандартное отклонение (SD), n = 5).

Анализ активности RdRp in vitro

Активность RdRp in vitro оценивали с использованием набора для анализа РНК-полимеразы SARS-CoV-2 (ProFoldin, Хадсон, штат Массачусетс, США).

Таблица 1. Протестированные в исследовании комбинации растительных экстрактов и микроэлементов

Вещество	Смесь А	Смесь В	Смесь С	Смесь V	Смесь E
Экстракты зеленого чая	+	+	+		
Ресвератрол	+	+	+	+	+
Экстракт брокколи	+	+	+	+	+
Куркумин	+	+	+	+	+
Кверцетин	+	+	+	+	+
Нарингенин	+	+	+	+	+
Байкалин	+	+	+	+	+
Теафлавин	+			+	+
Витамин С	+	+	+	+	+
N-ацетилцистеин	+	+		+	
Фукоидан			+		+

в соответствии с протоколом изготовителя. Вкратце, 0,5 г/л 50 × рекомбинантного RdRp или 20 г/л клеточного лизата [для трансдукции клеток лентивирусом с RdRp SARS-CoV-2 и eGFP-люциферазой (GenScript, Пискаутауэй, штат Нью-Джерси, США) и клетки VeroE6 высевали в 6-луночный планшет в присутствии полной питательной среды и обрабатывали 8 мкл/мл полибрена (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 30 минут с последующим добавлением лентивируса с RdRp SARS-CoV-2 и eGFP-люциферазой при множественном заражении (MOI = 5) [ранее полученные предварительные результаты показали, что при этом MOI может быть достигнуто почти 100 % частота трансдукции] и с инокуляцией с центрифугированием при 1 000 × g в течение 1,5 часа. Через 24 ч инкубации при температуре 37 °C клетки подпитывали свежей полной питательной средой. Через 48 ч после инокуляции клетки отделяли с помощью 1 mM ЭДТА, трижды промывали 1 × ФСБ с добавлением 3 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)], инкубировали с 2,5 мкл 50 × буфера, 20 мкл воды (только при использовании рекомбинантного фермента RdRp) и 1,0 г/л смеси V с концентрациями 0—100 мкг/мл в течение 15 мин при комнатной температуре с последующим добавлением мастер-микса, содержащего 0,5 мкл из 50 × NTP и 0,5 мкл из 50 × матрицы (одноцепочечного полирибонуклеотида). Реакционную смесь (25 мкл) инкубировали в течение 2 ч при температуре 34 °C, затем реакцию останавливали добавлением 65 мкл 10 × флуоресцентного красителя и через 10 мин регистрировали сигнал флуоресценции при длинах волн возбуждения/испускания 488/535 нм с использованием флуоресцентного спектрометра (Tecan, Group Ltd., Меннедорф, Швейцария). Положительный контроль содержал 100 мкг/мл ремдесивира. Результаты выражены в % от контроля без добавления смеси V (среднее ± стандартное отклонение (SD), n = 5).

Анализ активности фурина

Влияние смеси V на ферментативную активность фурина оценивали с использованием набора для анализа активности фурина SensoLyte Rh110 (AnaSpec, Фремонт, штат Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, смесь V в концентрациях 5 и 10 мкг/мл смешивали с рекомбинантным белком фурином в течение 15 минут с последующим добавлением флуорогенного субстрата фурина Rh110. Образцы инкубировали в течение 1 ч при температуре 22 °C и регистрировали флуоресценцию при длинах волн возбуждения/испускания 490/520 нм с помощью флуоресцентного спектрометра (PerSeptive Biosystems Cytofluor 4000, Фрамингем, штат Массачусетс, США). Положительный контроль в виде пептидилхорметилкетона (деканойл-Арг-Вал-Лиз-Арг-ХМК) содержал 0,1 мкМ. Данные представлены в виде % от контроля без добавления смеси V (среднее ± стандартное отклонение (SD), n = 5).

Анализ активности катепсина L

Влияние смеси V на активность рекомбинантного катепсина L оценивали с использованием набора для анализа активности катепсина L (BPS Bioscience, Сан-Диего, штат Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, смесь V в концентрациях 5 и 10 мкг/мл добавляли к катепсину L (0,2 мЕд/мкл) на 15 минут при температуре 22 °C перед добавлением флуорогенного субстрата (Ac-FR-AFC) (10 мкМ) и дополнительно инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Положительный контроль содержал только катепсин L, а

отрицательный контроль содержал катепсин L и ингибитор катепсина L E-64 (25 мкМ). Флуоресценцию регистрировали при длинах волн возбуждения/испускания 360/480 нм с помощью флуоресцентного спектрометра (Tecan Group Ltd., Меннедорф, Швейцария). Данные представлены в виде % от контроля без добавления смеси V (среднее ± стандартное отклонение (SD), n = 5).

Жизнеспособность

Анализ жизнеспособности клеток проводили с использованием субстрата МТТ. Вкратце, 40 × 103 клеток A549 на лунку обрабатывали различными концентрациями смеси V отдельно или в комбинации с витамином D и цинком в течение до 48 часов. Затем лунки промывали 1 × ФСБ и добавляли полную питательную среду с 5 мг/мл МТТ с последующей инкубацией в течение 4 часов при температуре 37 °C. Затем культуральную среду отсасывали и добавляли 100 мкг метанола. Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм с помощью флуоресцентного спектрометра (Molecular Devices, Сан-Хосе, штат Калифорния, США). Данные представлены в виде % от контроля без добавления смеси V (среднее ± стандартное отклонение (SD), n = 8).

Статистический анализ

Данные для всех экспериментов представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения не менее чем для трех независимых экспериментов. Сравнение между различными выборками проводилось с использованием двустороннего Т-критерия в программе Microsoft Office Excel. Различия между образцами считались значимыми при Р-значениях менее 0,05.

Этические аспекты

Исследование проводилось без участия испытуемых людей. Поэтому этическое одобрение ЭСО и информированное согласие не применимы.

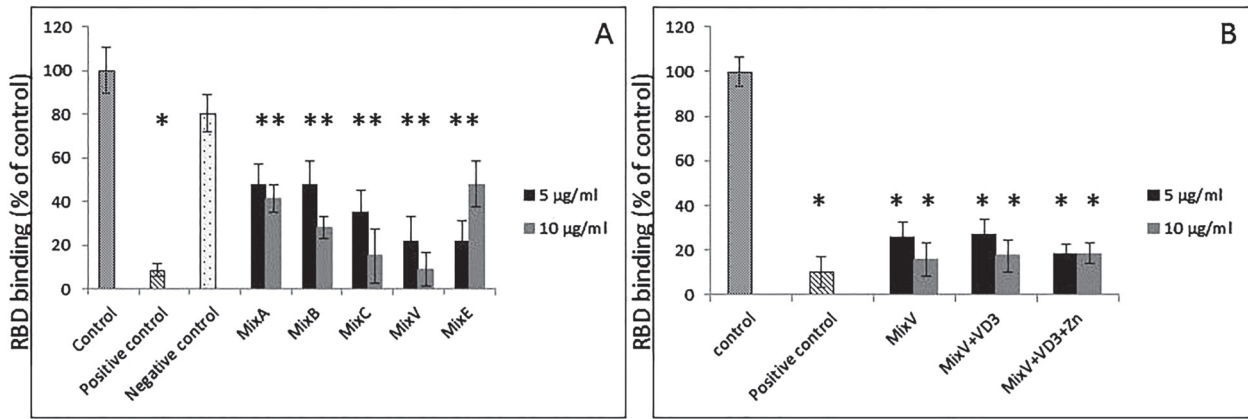
РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбор наиболее эффективной композиции природных соединений по степени ингибирования связывания RBD вируса с рецептором hACE2

Результаты на [рис. 1](#) демонстрируют эффективность ингибирования связывания RBD SARS-CoV-2 с эпителиальными клетками легких, избыточно экспрессирующими рецептор ACE2 человека, различными комбинациями растительных экстрактов и микроэлементов. Все пять композиций оказывали ингибирующее действие на связывание RBD с уровнем 50 % и выше. Наиболее выраженное ингибирование, т. е. на 90 % по сравнению с контролем, было достигнуто при применении смеси V в концентрации 10 мкг/мл ([рис. 1А](#)). Добавление витамина D или цинка к смеси V не усиливало ингибирование связывания RBD с человеческим рецептором ACE2, как показано на [рис. 1В](#).

Влияние смеси V на прикрепление SARS-CoV-2 и его псевдотипизированных вариантов к клеткам и проникновение в них

Влияние различных схем применения смеси V на прикрепление и проникновение в клетку псевдотипизированных вариантов с инкапсулированным S-белком и eGFP-люциферазой тестировали с использованием клеток A549/hACE2. Результаты, представленные на [рис. 2А](#), показывают, что обработка смесью V псевдовирионов до инфицирования ими клеток легких человека эффективно снижала проник-



ис. 1. Влияние тестируемых композиций на прикрепление RBD S-белка SARS-CoV-2 к эпителиальным клеткам легких. Ингибирующее действие смесей А, В, С, V и Е на связывание RBD вируса SARS-CoV-2 с рецептором ACE2 человека (А). Ингибирующее действие смеси V в присутствии витамина D и цинка на связывание RBD вируса SARS-CoV-2 с рецептором ACE2 человека (В); контроль — 0,25 % ДМСО, положительный и отрицательный контроли предоставлены производителем набора; данные представлены в % от контроля ± стандартное отклонение; * $P < 0,001$; VD3 — 25-гидроксивитамин D3 в концентрации 25 мкг/мл, Zn — цинк аспартат в концентрации 2,5 мкг/мл

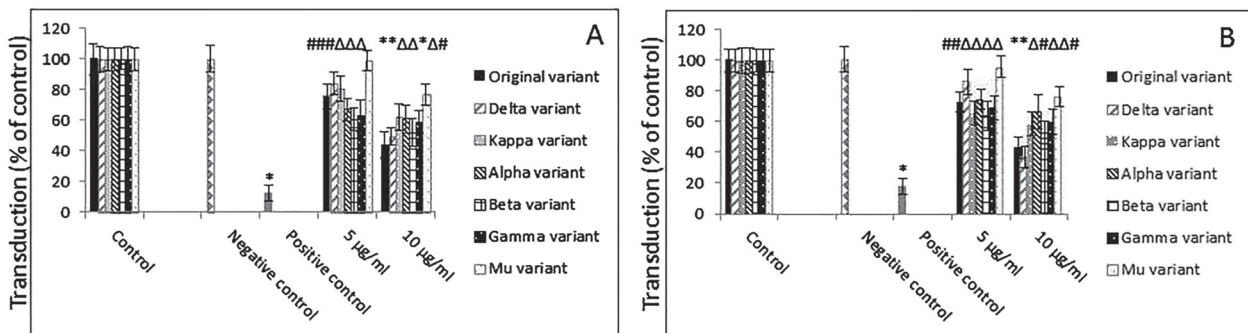


Рис. 2. Влияние смеси V на проникновение псевдотипированных вариантов SARS-CoV-2 с eGFP-люциферазой. Клетки hACE2/A549 инокулировали шестью различными вариантами псевдовироионов SARS-CoV-2 с инкапсулированным S-белками и обрабатывали смесью V в указанных концентрациях либо предварительно (А), либо одновременно (В). Контроль — 0,05 % ДМСО, отрицательный контроль — псевдотипированная ΔG-люцифераза (G*ΔG-люцифераза) rVSV,

новение всех протестированных вариантов SARS-CoV-2 в клетки. Таким образом, применение смеси V в концентрации 10 мкг/мл к исходному штамму SARS-CoV-2 и его вариантам альфа, бета, гамма, дельта, каппа и мю в течение 1 ч до их добавления к клеткам A549/hACE2 приводило к снижению проникновения вируса в клетки на 39 %, 48 % и 42 %, 57 %, 51 %, 39 % и 24 % соответственно. На рис. 2В показано влияние смеси V на ингибирование проникновения в клетки тестируемых вариантов при одновременном применении к псевдотипированным вирионам и клеткам A549/hACE2. В присутствии смеси V в концентрации 10 мкг/мл проникновение в клетку вирионов варианта альфа ингибировалось на 38 %, бета — на 48 % и гамма — на 41 %. Ингибирующий эффект смеси V на проникновение вирионов исходного SARS-CoV-2 составил 57 %, а вариантов дельта, каппа и мю — 64 %, 42 % и 24 % соответственно. Результаты, представленные на рис. 3А, показывают, что смесь V, применяемая в концентрациях 5 и 10 мкг/мл, не влияла на жизнеспособность клеток A549/hACE2, а введение витамина D3 отдельно или с цинком не оказывало дополнительного влияния на их выживаемость (рис. 3В).

Влияние смеси V на вирусную полимеразу RdRp

В нашем исследовании также изучалось, действует ли смесь V после этапов связывания в процессе инфицирования SARS-CoV-2, путем оценки ее влияния на другие

важные клеточные механизмы при вирусной инфекции, такие как активность RdRp, которая играет ключевую роль в репликации вируса. Как показано на рис. 4А, ферментативная активность рекомбинантного RdRp SARS-CoV-2 в значительной степени ингибировалась на 53 % в присутствии смеси V в концентрации 10 мкг/мл. Ни витамин D3, ни цинк не усиливали этот ингибирующий эффект. Аналогичный ингибирующий эффект смеси V на активность RdRp наблюдался и при использовании лизата клеток с гиперэкспрессией белка RdRp (рис. 4Б).

Влияние смеси V на протеазы клеток-хозяев

Документально подтверждено, что для облегчения проникновения SARS-CoV-2 в клетки необходимы различные специфические протеазы клеток-хозяев, включая фурина и катепсин L, которые облегчают выход вируса за счет ферментативного «примирования» S-белков. В нашем исследовании применялись бесклеточные анализы для изучения прямого воздействия смеси V на активность этих ферментов. Как показано на рис. 5А, при применении смеси V в концентрациях 5 и 10 мкг/мл наблюдалось ингибирование активности фурина на 12 % и 34 % соответственно. Этот ингибирующий эффект смеси V дополнительно усиливался в присутствии витамина D, приводя к 54-процентному ингибированию. Комбинация смеси V с витамином D и цинком дополнительно снижала активность фурина на

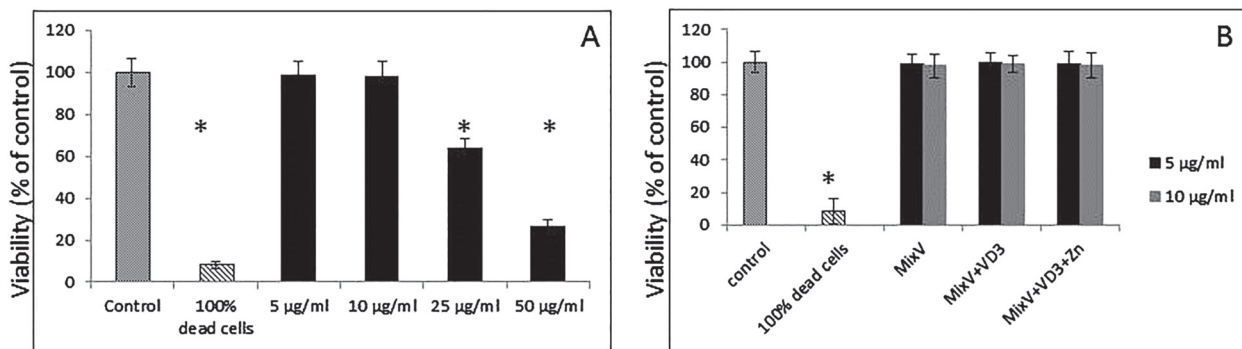


Рис. 3. Жизнеспособность эпителиальных клеток легких человека. Влияние смеси V на выживаемость клеток A549/hACE2 (A). Влияние смеси V в комбинации с витамином D3 и цинком на выживаемость клеток A549/hACE2 (A). Жизнеспособность клеток A549/hACE2 оценивали с использованием метода МТТ, как описано в разделе «Экспериментальная часть»; контроль — 0,05 % ДМСО; * P < 0,001 VD3 — 25-гидрокси-витамин D3 в концентрации 25 мкг/мл, Zn — аспарат цинка в концентрации 2,5 мкг/мл

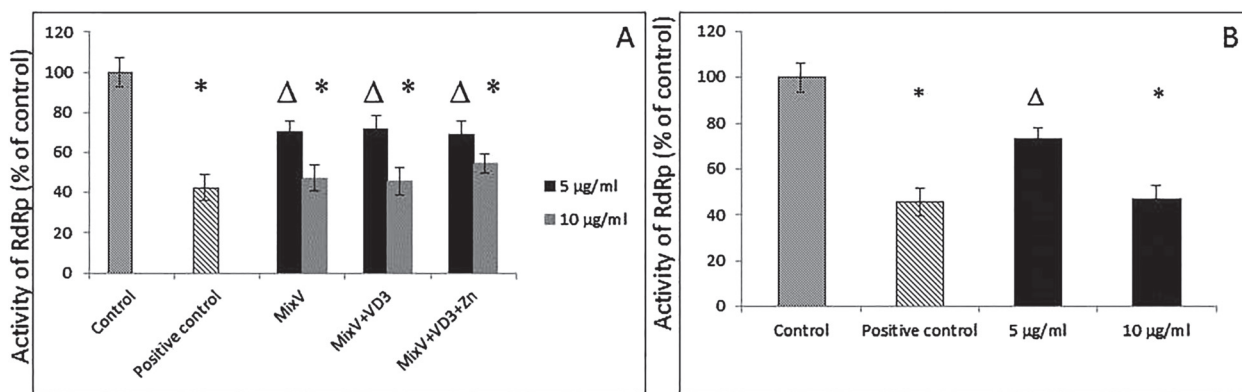


Рис. 4. Влияние смеси V на вирусную RdRp. Влияние смеси V отдельно (A) и в сочетании с витамином D3 и цинком (B) на активность RdRp SARS-CoV-2. Очищенный рекомбинантный фермент RdRp в клетках VeroE6 инкубировали со смесью V в указанных концентрациях в течение 15 минут при комнатной температуре. После нанесения реакционной смеси, состоящей из NTP и матрицы РНК, проводили инкубацию в течение 2 ч при температуре 34 °С. Сигнал измеряли в течение 10 мин при длинах волн возбуждения/испускания 488/535 нм спектрофлуориметром. Контроль — 0,05 % ДМСО, положительный контроль — ремдесивир 100 мкг/мл; Δ P < 0,01, * P < 0,001; VD3 — 25-гидрокси-витамин D3 в концентрации 25 мкг/мл, Zn — аспарат цинка в концентрации 2,5 мкг/мл

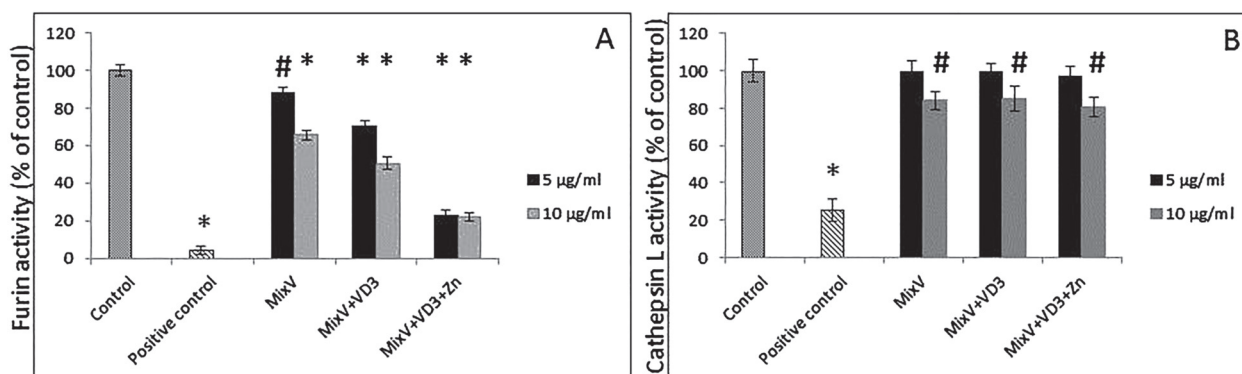


Рис. 5. Влияние смеси V на протеазы клеток. Влияние смеси V на активность фурина (A). Фурин как рекомбинантный белок инкубировали со смесью V отдельно или в комбинации с витамином D и цинком в указанных концентрациях в течение 15 минут с последующим добавлением флуорогенного субстрата фурина Rh110 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 22 °С. Влияние смеси V на активность катепсина L (B и C). Катепсин L как рекомбинантный белок инкубировали со смесью V отдельно или в комбинации с витамином D и цинком в указанных концентрациях в течение 1 ч при температуре 22 °С с последующим нанесением 10 мкМ флуорогенного субстрата на 30 мин. Контроль — 0,05 % ДМСО, положительный контроль — 25 мкг/мл E-64; # P < 0,05, * P < 0,001 VD3 — 25-гидрокси-витамин D3 в концентрации 25 мкг/мл, Zn — аспарат цинка в концентрации 2,5 мкг/мл

78 %. Как показано на рис. 5B, смесь V также оказалась эффективной, хотя и в умеренной степени, в снижении активности катепсина L, участвующего в эндосомальном выходе SARS-CoV-2. В присутствии 10 мкг/мл смеси V ферментативная активность катепсина L снижалась на 14 %, а добавление витамина D3 не оказывало значимого влияния на ингибирование катепсина L.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование представляет новый комплексный подход к COVID-19, направленный на контроль не одного, а сразу нескольких клеточных механизмов, связанных с инфицирующей способностью SARS-CoV-2. Полученные результаты показывают, что определенная комбинация активных растительных компонентов и отдельных микроэлементов (смесь V) может в значительной степени повлиять на критические этапы, необходимые для инфицирования клеток исходным штаммом SARS-CoV-2 и его мутантными формами альфа, бета, гамма, дельта, каппа и ю, путем ингибирования прикрепления вируса к клеточным рецепторам ACE2, снижения доступности этих рецепторов на клетках легких человека и снижения активности вирусной полимеразы RdRp, необходимой для репликации вируса. Кроме того, эти природные соединения препятствовали проникновению вирионов в клетки за счет снижения активности важных ферментов, таких как фурин и катепсин L (см. рис. 6).

Эти результаты дополняют проведенное нами ранее исследование с использованием вирионов SARS-CoV-2, в котором были определены основные компоненты этой комбинации, которые эффективно ингибировали связывание вируса с рецептором hACE2 и снижали экспрессию рецепторов ACE2 на малых альвеолярных эпителиальных клетках человека [21]. Учитывая доступность и благоприятный профиль безопасности этих природных соединений, их потенциально можно применять в профилактических целях, например в качестве дополнения к вакцинам и методам лечения COVID.

В то время как все протестированные комбинации питательных веществ (A, B, C, D и E) эффективно ингибировали связывание RBD с ACE2 примерно на 50 %, самая высокая степень ингибирования связывания вируса наблюдалась при применении смеси V — 90 %. Это указывает на то, что в данном случае может иметь место синергетический или, по крайней мере, аддитивный эффект, но при этом не ис-

ключаются другие взаимодействия, например аллотропные, между соединениями смеси V и RBD/ACE2.

В исследовании изучалось ингибирующее действие смеси V на интернализацию в клетки как вирионов SARS-CoV-2, так и его мутантных форм с использованием различных схем обработки этих вирионов смесью V и введения в клетки легких человека. Соответственно, тестируемые вирионы инкубировали со смесью V в течение 1 ч до их воздействия на клетки и одновременно объединяли смесь V с вирионами и клетками. Результаты показывают, что максимальное ингибирование клеточной трансдукции этими вирионами может быть достигнуто при одновременном взаимодействии всех перечисленных элементов. Это означает, что данная смесь воздействует на метаболические аспекты взаимодействия клеток и вирионов, а не на сам вирус. Хотя эффективность смеси V в ингибировании интернализации вируса не была вирус-специфичной, ингибирующий эффект был наиболее выраженным для исходных вариантов SARS-CoV-2 и дельта по сравнению с другими мутантными формами.

Помимо ингибирующего действия смеси V на прикрепление вирионов SARS-CoV-2 к клетке и проникновение в нее, также наблюдалось воздействие смеси V на клеточные механизмы эндосомального выхода и размножения вируса путем снижения активности ферментов, участвующих в процессинге вируса в клетке. Было показано, что наиболее важными для патогенности SARS-CoV-2 протеолитическими ферментами, задействованными в этих процессах, являются катепсин L и фурин [22, 23]. Также было показано, что для слияния вирионов с мембранами клетки-хозяина необходимо воздействие фурина на S-белок SARS-CoV-1 без непосредственного влияния на инфицирующую способность вируса [24]. Похоже, что для эффективного контроля и лечения инфекции SARS-CoV-2 может потребоваться одновременное ингибирование нескольких протеаз, чтобы эффективно препятствовать этим патологическим превращениям.

В данной работе показано, что помимо нарушения связывания вируса с эпителиальными клетками легких с гиперэкспрессией hACE2, смесь V снижала активность мембранной протеазы фурина и эндосомального катепсина L. Снижение активности этих ферментов наблюдалось при нетоксичных концентрациях смеси V. Этот эффект значим, поскольку отсутствие дополнительного сайта расщепления фурином на S-белке SARS-CoV-1 оказывает существенное влияние на его инфицирующую способность [25].

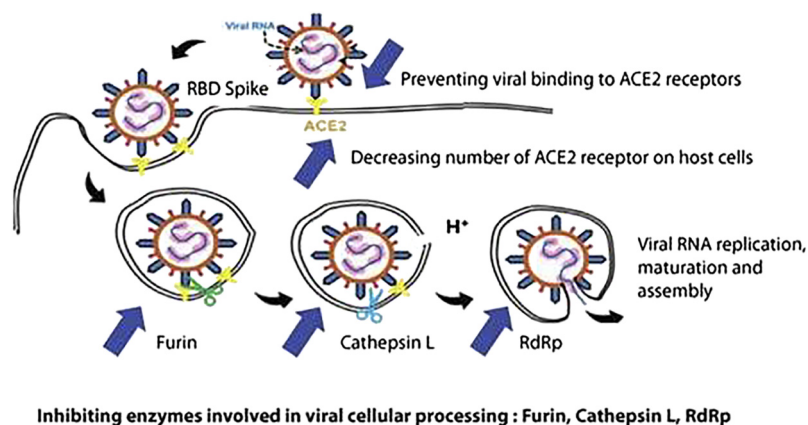


Рис. 6. Схематическое изображение эффектов смеси V на ключевые клеточные процессы, связанные с инфицирующей способностью SARS-CoV-2.

Предполагается, что в дополнение к самой инфекции SARS-CoV-2 существует потенциальная сигнальная связь между S-белком, фурином и ACE2 и развитием нежелательных сердечно-сосудистых явлений [26]. Поскольку эти ферменты также участвуют в различных биохимических процессах, может оказаться полезным отсутствие полного ингибирования при концентрациях смеси V, использованных в исследовании. В исследовании наблюдалось, что витамин D3 и цинк оказывали дополнительное влияние на снижение ферментативной активности фурина, но не катепсина L. Наконец, при этих концентрациях также было зафиксировано значимое ингибирование активности вирусной полимеразы RdRp, которое приводило к снижению скорости репликации вируса.

Из результатов этого исследования и полученных ранее данных [18, 19, 27] следует, что эта комбинация соединений растительного происхождения и микроэлементов может представлять новую стратегию борьбы с SARS-CoV-2, одновременно влияя на несколько аспектов жизненного цикла вируса, в том числе на проникновение в клетку и репликацию. Эта стратегия была реализована и в проведенных нами более ранних исследованиях, в том числе исследованиях гриппа H1N1 человека, птичьего гриппа H1N5 и др., основанных на отборе природных компонентов, одновременно влияющих на ключевые механизмы патогенеза у широкого спектра инфекционных агентов [28—31].

Настоящее исследование предполагает, что одновременный контроль ключевых этапов инфицирования SARS-CoV-2 с помощью определенной комбинации растительных и биологически активных соединений может оказаться эффективным при лечении сложных патологий, таких как при этой вирусной инфекции. В совокупности с недавно полученными клиническими данными о том, что инфузии витамина С могут успешно бороться с COVID-19 даже на поздних стадиях [32], фитосоединения благодаря их плейотропным биологическим эффектам могут представлять собой новый подход к борьбе с SARS-CoV-2 и его мутантными формами.

Источник финансирования: данное исследование было проведено при финансовой поддержке некоммерческого фонда Dr. Rath Health Foundation, принадлежащего Stichting Administratiekantoor Dr. Rath Holding, Нидерланды.

Вклад авторов: А. Г. запланировал, разработал дизайн и провел эксперименты, проанализировал данные, проверил статью и нес основную ответственность за окончательное содержание статьи; В. И. и С. И. разработали дизайн и провели эксперименты, проанализировали данные, проверили статью и несли основную ответственность за окончательное содержание статьи. А. Н. и М. Р. осуществляли контроль, валидировали, написали статью и несли основную ответственность за ее окончательное содержание. Все авторы имели полный доступ ко всем данным исследования, они прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи и несут ответственность за целостность данных и точность их анализа.

Конфликт интересов: д-р Рат (Rath) и д-р Недзвецкий (Niedzwiecki) являются членами некоммерческого фонда Dr. Rath Health Foundation, но не получают от него никаких финансовых доходов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов в отношении исследования, авторства и/или публикации этой статьи.

Заявление о доступности данных: все данные, полученные или проанализированные в ходе этого исследования, включены в эту опубликованную статью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят доктора Билву Бханап (Bilwa Bhanap), Вьому Бханапа (Vyoma Bhanap), Вальдемара Сумеру (Waldemar Sumera) и Кэти Флауэрс (Cathy Flowers) за их ценный вклад в эту рукопись.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chakraborty I, Maity P. COVID-19 outbreak: migration, effects on society, global environment and prevention. *Sci Total Environ* 2020;728:138882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138882>.
2. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-oncovid-19—31-august-2021>.
3. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
4. Andreano E, Piccini G, Licastro D, Casalino L, Johnson NV, Paciello I, et al. SARS-CoV-2 escape from a highly neutralizing COVID-19 convalescent plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021; 118(36):e2103154118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103154118>.
5. Zhang L, Cui Z, Li Q, Wang B, Yu Y, Wu J, et al. Ten emerging SARS-CoV-2 spike variants exhibit variable infectivity, animal tropism, and antibody neutralization. *Commun Biol* 2021;4(1):1196. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02728-4>.
6. Collier DA, Marco AD, Ferreira IATM, Meng B, Datt RP, Walls AC, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccineelicited antibodies. *Nature* 2021;593:136–41. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03412-7>.
7. Dyson L, Hill EM, Moore S, Curran-Sebastian J, Tildesley MJ, Lythgoe KA, et al. Possible future waves of SARS-CoV-2 infection generated by variants of concern with a range of characteristics. *Nat Commun* 2021;12(1):5730. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25915-7>.
8. Li, F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol* 2016;3:237–61. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>.
9. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng B J, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:226–36. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>.
10. Du L, Yang Y, Zhou Y, Lu L, Li F, Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. *Expert Opin Ther Targets* 2017; 21(2):131–43. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1271415>.
11. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 2015;1282:1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
12. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol* 2011; 85(9):4122–34.
13. Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(33):11876–81.

14. Zhang D, Hamdoun S, Chen R, Yang L, Ip CK, Qu Y, et al. Identification of natural compounds as SARS-CoV-2 entry inhibitors by molecular docking-based virtual screening with biolayer interferometry. *Pharmacol Res* 2021;172:105820. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105820>.
15. Muchtaridi M, Fauzi M, Khairul Ikram NK, Mohd Gazzali A, Wahab HA. Natural flavonoids as potential angiotensin-converting enzyme 2 inhibitors for anti-SARS-CoV-2. *Molecules* 2020;25(17):3980. <https://doi.org/10.3390/molecules25173980>.
16. Gopinath K, Jokinen EM, Kurkinen ST, Pentikäinen OT. Screening of natural products targeting SARS-CoV-2-ACE2 receptor interface-A MixMD based HTVS pipeline. *Front Chem* 2020;8:589769. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.589769>.
17. Yang LJ, Chen RH, Hamdoun S, Coghi P, Ng JPL, Zhang DW, et al. Corilagin prevents SARS-CoV-2 infection by targeting RBD-ACE2 binding. *Phytomedicine* 2021;87:153591. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153591>.
18. Goc A, Ivanov V, Ivanova S, Chatterjee M, Rath M, Niedzwiecki A. Simultaneous inhibition of SARS-CoV-2 infectivity by a specific combination of plant-derived compounds. *Eur J Bio Biotech* 2021;2(5):24–33. <https://doi.org/10.24018/ejbio.2021.2.5.258>.
19. Goc A, Sumera W, Rath M, Niedzwiecki A. Phenolic compounds disrupt spike-mediated receptor-binding and entry of SARS-CoV-2 pseudo-virions, *PLOS ONE* 2021;16(6):e0253489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253489>.
20. Goc A, Niedzwiecki A, Rath M. Polyunsaturated u-3 fatty acids inhibit ACE2-controlled SARS-CoV-2 binding and cellular entry. *Sci Rep* 2021;11:5207. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84850-1>.
21. Ivanov V, Goc A, Ivanova S, Niedzwiecki A, Rath M. Inhibition of ACE2 expression by Ascorbic acid alone and its combination with other natural compounds. *Infect Dis Res Trmt (Auckl)* 2021;14:1–7. <https://doi.org/10.1177/1178633721994605>.
22. Liu T, Luo S, Libby P, Shi GP. Cathepsin L-selective inhibitors: a potentially promising treatment for COVID-19 patients. *Pharmacol Ther* 2020;213:107587. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107587>.
23. Tian S, Huang Q, Fang Y, Wu J. Furin DB: A database of 20-residue furin cleavage site motifs, substrates and their associated drugs. *Int J Mol Sci* 2011;12(2):1060–5. <https://doi.org/10.3390/ijms12021060>.
24. Follis KE, York J, Nunberg JH. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology* 2006;350(2):358–69. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.02.003>.
25. Johnson BA, Xie X, Kumari BK, Lokugamage G, Muruato A, Zou J, et al. Furin cleavage site is key to SARS-CoV-2 pathogenesis. *bioRxiv* 2020:268854. <https://doi.org/10.1101/2020.08.26.268854> Preprint.
26. Ming Y, Qiang L. Involvement of spike protein, furin, and ACE2 in SARS-CoV-2-related cardiovascular complications. *SN Compr ClinMed* 2020;2:1103–8. <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00400-2>.
27. Ivanov V, Ivanova S, Niedzwiecki A, Rath M. Effective and safe global public health strategy to fight the COVID-19 pandemic: specific micronutrient combination inhibits Coronavirus cell-entry receptor (ACE2) expression. *J Cell Med Nat Health* 2020. <https://jcmnh.org/effective-and-safe-global-public-health-strategy-tofight-the-covid-19-pandemic-specific-micronutrient-compositioninhibits-coronavirus-cell-entry-receptor-ace2-expression/>.
28. Barbour EK, Rayya EG, Houssam, AS, El-Hakim RG, Niedzwiecki A, Nour AMA, et al. Alleviation of histopathologic effects of avian influenza virus by a specific nutrient synergy. *Int J Appl Res Vet Med* 2007;5(1):9–16.
29. Jariwalla RJ, Gangapurkar B, Pandit A, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Micronutrient cooperation in suppression of HIV production in chronically and latently infected cells. *Mol Med Rep* 2010;3(3):377–85. https://doi.org/10.3892/mmr_00000268.
30. Deryabin PG, Lvov DK, Botikov AG, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, et al. Effects of a nutrient mixture on infectious properties of the highly pathogenic strain of avian influenza virus A/H5N1. *Biofactors* 2008;33(2):85–97. <https://doi.org/10.1002/biof.5520330201>.
31. Jariwalla RJ, Roomi MW, Gangapurkar B, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Suppression of influenza A virus nuclear antigen production and neuraminidase activity by a nutrient mixture containing ascorbic acid, green tea extract and amino acids. *Biofactors* 2001;31(1):1–15. <https://doi.org/10.1002/biof.5520310101>.
32. Zhang J, Rao X, Li Y, Zhu Y, Liu F, Guo G, et al. High dose vitamin C infusion for the treatment of critically ill COVID-19. *Ann Intensive Care* 2021;11(1):5. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00792-3>.

Открытый доступ. Эта публикация распространяется в открытом доступе с условиями лицензии Creative Commons Attribution NonCommercial, версия 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), которая разрешает любое некоммерческое использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии надлежащего указания автора (авторов) оригинальной работы и источника, предоставления ссылки на лицензию и указания на любые внесенные изменения (если таковые имели место).