

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ СМЕСИ ЛАКТОФЕРРИНА, АРТЕМИЗИНИНА И АЗИТРОМИЦИНА В ОТНОШЕНИИ SARS-COV-2 *IN VITRO*

А. А. Рябченкова¹✉, В. В. Копать¹, Е. Р. Чирак¹, Е. Л. Чирак¹, И. А. Ленева², Е. А. Глубокова², Н. П. Карташова², Н. Н. Колмаков³, И. В. Духовлинов¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова Минобрнауки России, Москва, Россия

³ Институт экспериментальной медицины Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия

Лактоферрин, артемизинин и азитромицин обладают широким спектром противовирусного, иммуномодулирующего и противовоспалительного действия. Экспериментально показанное частичное ингибирование ими инфекции, вызванной SARS-CoV-2 *in vitro*, позволяет заключить, что влияния на проникновение вирионов в клетки, опосредованное каждым из этих веществ в отдельности, недостаточно для полного ингибирования инфекции SARS-CoV-2. Целью работы было оценить *in vitro* цитотоксичность и противовирусную активность смеси активных действующих веществ лактоферрина, артемизинина и азитромицина в отношении лабораторного штамма SARS-CoV-2. Использовали перевиваемую культуру клеток Vero CCL81 (ATCC) и лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2 «Дубровка» (идентификационный № GenBank: MW161041.1), выделенный на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19. Определение цитотоксического действия смеси препаратов и изучение противовирусной активности в отношении вируса SARS-CoV-2 оценивали по эффекту цитопатического действия с использованием МТТ (метилтиазолилдифенилтетразолия бромид). В качестве препарата сравнения использовали гидроксихлорохин. Показано, что при высокой множественности заражения (100 MOI) и низкой (20 MOI) в культуре клеток Vero CCL81 смеси артемизинина, лактоферрина и азитромицина оказывает значимый эффект на вирусную репродукцию SARS-CoV-2, ИК50 (полумаксимальная ингибирующая концентрация) оценивается в обоих случаях как разведение 1 : 2. Полученные результаты позволяют сделать вывод о низкой цитотоксичности изучаемой смеси и о наличии значимого противовирусного действия *in vitro*.

Ключевые слова: артемизинин, азитромицин, лактоферрин, цитотоксичность, противовирусная активность, SARS-CoV-2, COVID-19, перепрофилирование препарата

Благодарности: Евгению Бахтиеровичу Файзулову (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова) за предоставленный вирус. Исследование выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И. И. Мечникова.

Вклад авторов: А. А. Рябченкова — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; В. В. Копать — концепция, дизайн и организация проведения исследования, подготовка текста; Е. Р. Чирак, Е. Л. Чирак — дизайн исследования, подготовка образцов и материалов; И. А. Ленева — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных; Н. П. Карташова, Е. А. Глубокова — проведение экспериментов; Н. Н. Колмаков — концепция исследования, корректировка текста; И. В. Духовлинов — инициация, руководство проектом, подготовка концепции состава препарата, организация финансирования проекта.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Андреевна Рябченкова
пр-кт Малый В. О., д. 57, к. 4, литера Ж, помещение 5-Н, г. Санкт-Петербург, 199178, Россия; riabchenkova@service-gene.ru

Статья получена: 23.09.2022 **Статья принята к печати:** 14.11.2022 **Опубликована онлайн:** 25.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.043

ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY AND ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST SARS-COV-2 OF THE MIXTURE OF LACTOFERRIN, ARTEMISININ, AND AZITHROMYCIN *IN VITRO*

Ryabchenkova AA¹✉, Kopat VV¹, Chirak ER¹, Chirak EL¹, Leneva IA², Glubokova EA², Kartashova NP², Kolmakov NN³, Dukhovlinov IV¹

¹ ATG Service Gen LLC, St. Petersburg, Russia

² Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

³ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

Lactoferrin, artemisinin, and azithromycin exhibit a broad spectrum of antiviral, immunomodulatory, and anti-inflammatory effects. The experiments show that these drugs partially inhibit the infection caused by SARS-CoV-2 *in vitro*. This allows us to conclude that the effects on the entry of virions into cells mediated by each of these substances taken separately are insufficient for complete inhibition of the SARS-CoV-2 infection. The study was aimed to perform *in vitro* assessment of cytotoxicity and antiviral activity against the laboratory SARS-CoV-2 strain of the mixture of active ingredients: lactoferrin, artemisinin, and azithromycin. We used the Vero CCL81 (ATCC) cell line and the Dubrovka laboratory strain of SARS-CoV-2 (GenBank ID: MW161041.1), isolated in the Vero CCL81 cell culture from the nasopharyngeal swab of patient with COVID-19. Cytotoxic effects and antiviral activity against SARS-CoV-2 of the drug mixture were assessed based on the cytopathic effects using the MTT (methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide) assay. Hydroxychloroquine was used as a reference drug. It has been shown that at high (MOI 100) and low (MOI 20) multiplicity of infection used in the Vero CCL 81 cell culture, the mixture of artemisinin, lactoferrin and azithromycin has a significant effect on the SARS-CoV-2 reproduction, and IC50 (half maximal inhibitory concentration) is estimated as the 1 : 2 dilution in both cases. The findings make it possible to conclude that the studied mixture is low toxic and shows significant antiviral effects *in vitro*.

Keywords: artemisinin, azithromycin, lactoferrin, cytotoxicity, antiviral activity, SARS-CoV-2, COVID-19, drug repurposing

Acknowledgements: we would like to express our gratitude to Evgeny B. Faizulov (Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera) for the provided virus. The study was performed using the equipment provided by the Center for Collective Use of the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.

Author contribution: Ryabchenkova AA — study concept and design, data analysis and interpretation, manuscript writing; Kopat VV — concept, design, and organization of research, manuscript writing; Chirak ER, Chirak EL — study design, preparation of samples and materials; Leneva IA — experimental procedures, data acquisition, analysis, and interpretation; Kartashova NP, Glubokova EA — experimental procedures; Kolmakov NN — study concept, manuscript editing; Dukhovlinov IV — initiation, project management, developing the concept of drug composition, organization of research funding.

Compliance with ethical standards: the study was performed in accordance with the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasia A. Ryabchenkova
Prospect Maly V.O., 57, k. 4, litera Zh, k. 5-H, St. Petersburg, 199178, Russia; riabchenkova@service-gene.ru

Received: 23.09.2022 **Accepted:** 14.11.2022 **Published online:** 25.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.043

В настоящее время не теряет актуальности проблема распространения коронавирусной инфекции COVID-19, вызываемой SARS-CoV-2. Несмотря на то что своевременная вакцинация способна снизить риски тяжелого протекания инфекции, разработка дополнительных средств, способных облегчить тяжелое течение или предотвратить заражение COVID-19, по-прежнему имеет высокий приоритет, в том числе потому, что антитела на вакцинные антигены могут не распознавать новые варианты вируса.

На сегодняшний день профилактика и лечение COVID-19 преимущественно заключались в применении и разработке вакцинных препаратов для формирования нейтрализующих антител к спайковому белку, препаратов иммунных сывороток и моноклональных антител, противовирусных препаратов [1] и препаратов, направленных против гиперактивации иммунного ответа [2] при симптоматической поддерживающей терапии и респираторной поддержке инфицированных. Во время борьбы с пандемией COVID-19 особое внимание было уделено перепрофилированию лекарственных препаратов, поскольку их известные профили безопасности и фармакокинетики позволили своевременно внедрить их в применение в отличие от новых лекарственных средств, требующих полного спектра испытаний и регистрации. В настоящее время в последнюю 16-ю версию Временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» в качестве химиопрепаратов прямого противовирусного действия включены фавипиравир, молнупиравир, нирматрелвир + ритонавир, ремдесивир, умифеновир. Рекомендованы также биотехнологические препараты: интерферон-альфа, синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (двухцепочечная) [3]. Однако для каждого из этих препаратов в отношении COVID-19 клинические исследования ограничены, часто противоречивы, нет бесспорной доказательной базы и опыта применения. Наличие многочисленных мутаций в S-белке указывает на его возможность приобретать новые свойства лигандной специфичности [4].

Механизм проникновения SARS-CoV-2 в клетки, связанный с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2), представляет собой сложный многофакторный процесс, требующий вовлечения многих вспомогательных молекул — протеиназ, корецепторов и активаторов их экспрессии. Наличие корецепторов позволяет SARS-CoV-2 инфицировать клетки с низкой экспрессией АПФ2 на мембранах.

Так, S-белок как гликопротеин может взаимодействовать с рецепторами не только белковой частью, но и путем связывания с лектиновыми рецепторами своей углеводной составляющей (N-гликаны S1-субъединицы, содержащие олигоманнозу и сложные сахара, защищающие вирус от антител) [5, 6]. Связывание лектиноподобных S1-сайтов с гликокаликсом клетки-мишени через O-ацетилированные сиаловые кислоты [7] и гепарансульфат [8] может способствовать инфицированию клетки. Было показано, что гепарансульфат усиливает проникновение многих типов вирусов в клетки [9], в том числе и SARS-CoV-2 [10]. Полисахаридные цепи гепарансульфатпротеогликанов в большинстве случаев имеют большой отрицательный заряд, что позволяет рекрутировать вирусные частицы SARS-CoV-2 на поверхность клетки вследствие взаимодействия с S-белком, что увеличивает его локальную концентрацию для последующего связывания с АПФ2. Есть основания

полагать, что положительно заряженная связывающая бороздка, расположенная на RBD-домене S-белка, может служить сайтом связывания для отрицательно заряженных полисахаридных цепей гепарансульфатпротеогликанов [8, 11], при этом специфичность связывания в значительной степени зависит от комплементарного пространственного расположения основных групп белка и сульфатных и карбоксильных групп полисахарида [12–14].

В качестве мощных ингибиторов проникновения SARS-CoV-2 в клетки скрининг перепрофилирования имеющихся лекарств позволил выявить несколько соединений, нацеленных на гепарансульфатпротеогликаны и зависимые от них пути эндоцитоза. Одним из таких соединений является лактоферрин (ЛФ) — встречающийся в природе нетоксичный гликопротеин, который доступен в качестве пищевой добавки [15].

Оценка противовирусной активности ЛФ на модели инфицирования коронавирусом иммортализованной линии клеток колоректальной аденокарциномы человека Caco-2 и клеток почечного эпителия африканской зеленой мартышки Vero 6 показала, что ЛФ частично ингибирует заражение и репликацию SARS-CoV-2 [16]. В ряде исследований эффектов связывания ЛФ с рецептором показано его влияние на различные сигнальные системы и пути, включающие NF-κB и различные регуляторные факторы интерферона, что приводит к модуляции противовирусного иммунного ответа [17]. Показано влияние ЛФ и на регуляцию TLR, особенно TLR3 и TLR7, участвующих в распознавании РНК-вирусов [18, 19], и ингибирование катепсина L [20], что приводит к блокировке проникновения SARS-CoV-2 в клетки эмбриональной почки человека 293/hАПФ2 [21]. В экспериментальных условиях [16] показано, что ЛФ может ингибировать экспрессию иммуносупрессивного цитокина TGFB1, подавлять экспрессию тимического стромального лимфопоэтина, высокие уровни которого были обнаружены на слизистой оболочке бронхов у пациентов с астмой и хронической обструктивной болезнью легких, и снижать экспрессию провоспалительных цитокинов IL1B и IL6. Эти иммуномодулирующие эффекты ЛФ могут противодействовать активации цитокинового шторма.

Еще одним перспективным перепрофилированным соединением является азитромицин, оказывающий влияние на множество процессов. Прежде всего, азитромицин, влияющий на снижение экспрессии матриксных металлопротеиназ, связанных с CD147, привлек внимание исследователей, сформировавших гипотезу о том, что азитромицин может ингибировать CD147 и, в итоге, блокировать проникновение вируса в клетки-хозяева [22]. Было продемонстрировано, что CD147 индуцирует активацию сигнального пути PI3K/AKT, способствуя индукции NF-κB и продукции провоспалительных цитокинов [23, 24]. Сигнальный путь PI3K/AKT увеличивает экспрессию сериновой протеазы TMPRSS2, что способствует большему проникновению вируса в клетки.

Имуномодулирующие свойства азитромицина [25] могут играть важную роль при лечении гипертрофического состояния, вызванного цитокиновым штормом, при тяжелых стадиях протекания COVID-19. *In vitro* азитромицин показал снижение секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов [26, 27]. Кроме того, азитромицин уменьшает накопление инфильтрирующих воспалительных клеток в бронхоальвеолярном лаваже [28]. В фибробластах азитромицин ингибирует пролиферацию и выработку коллагена за счет снижения

концентрации трансформирующего фактора роста (TGFB) и демонстрации легочной антифибротической активности [29, 30]. Азитромицин оказывает мукорегуляторное действие, снижая гиперсекрецию слизи и улучшая мукоцилиарный клиренс [31].

Исследования показали, что азитромицин может изменять гликозилирование АПФ2 и тем самым предотвращать проникновение вируса SARS-CoV-2 внутрь клетки. Другой предполагаемый механизм противовирусного действия — молекулярная мимикрия азитромицина и клеточного ганглиозида GM1 (липидный ганглиозид, действующий как кофактор прикрепления вируса к клетке-хозяину для респираторных вирусов). Азитромицин способен связываться с ганглиозидсвязывающим доменом S-белка, таким образом блокируя взаимодействие S-белок-GM1 на плазматической мембране хозяина [32].

Еще один механизм действия азитромицина — непрямо блокирование фуриновой системы, способствующей проникновению вируса в клетку после связывания S1-ACE2. Фуриновая система активируется в кислой среде трансотдела аппарата Гольджи и отделяет S1-субъединицу S-белка. Предполагается, что азитромицин снижает активность фуринов путем повышения внутриорганельного pH [33]. Кроме того, азитромицин может подщелачивать везикулы, содержащие вирионы SARS-CoV-2, что предотвращает pH-зависимое слияние мембран.

Третье кандидатное средство против SARS-CoV-2 — противомаларийный иммуномодулирующий препарат артемизинин, который наряду с хлорохином и хинином имеет долгую историю клинического применения и обладает противовирусным потенциалом широкого спектра действия. Показано, что противомаларийный препарат с иммуномодулирующей активностью хлорохин, которому уже несколько десятилетий, и его производное гидроксихлорохин могут эффективно ингибировать SARS-CoV-2 *in vitro* [34, 35].

Помимо роли в борьбе с малярией, артемизинин изучали на предмет его потенциального влияния на иммунные реакции при физиологических и патологических состояниях [36–38]. Многие бактерии и вирусы, в том числе SARS-CoV-2, активируют сигнальный путь NF-κB в клетках человека. Активация передачи сигналов NF-κB приводит к последующей активации факторов транскрипции p50/p65. Артемизинин и артезунат могут действовать как ингибиторы сигнального пути NF-κB, блокируя функцию p50/p65. Исследования показывают, что артемизинин может воздействовать на клеточную поверхность путем ингибирования связывания S-белка SARS-CoV-2 с рецепторами клеточной поверхности, что потенциально предотвращает как эндоцитоз вируса, так и активацию передачи сигналов NF-κB. Таким образом, артемизинин может предотвращать цитокиновый шторм путем ингибирования IκB-киназы [39–41]. Однако исследования молекулярной стыковки показывают, что артемизинины могут также связываться с белками коронавируса, такими как E-белок, белок геликазы, N-белок, белок 3CL PRO, S-белок, неструктурный белок 3 (nsp3), nsp10, nsp14, nsp15, катепсин-L, и GRP78 [42, 43]. Соответственно, часть биологической активности артемизинина может быть частично основана на ингибировании функции этих вирусных белков.

Частичное ингибирование инфекции, вызванной SARS-CoV-2 *in vitro*, лактоферрином, артемизинином и азитромицином, позволяет предположить, что потенциальной блокировки проникновения вирионов в клетки,

опосредованной каждым из этих веществ в отдельности, недостаточно для полного ингибирования инфекции SARS-CoV-2. Комбинированный же прием данных препаратов может оказаться более перспективным в клинической практике. Поэтому поиск и создание новых препаратов, эффективных в отношении новой коронавирусной инфекции продолжается, и актуальность этих исследований не вызывает сомнений. Первым этапом такого поиска является изучение их противовирусной активности в культуре клеток.

Целью настоящей работы было исследование цитотоксичности и противовирусной активности смеси активных действующих веществ — лактоферрина, артемизинина и азитромицина — в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в сравнении с гидроксихлорохином, поскольку ограничением многих проведенных исследований *in vitro* было отсутствие использования препаратов сравнения для оценки противовирусной эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы и клетки

В опытах использовали перевиваемую культуру клеток эпителия почки африканской зеленой марышки Vero CCL81 (ATCC) из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова и лабораторный штамм коронавируса SARS-CoV-2 «Дубровка» (идентификационный № GenBank: MW161041.1), выделенный на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеального мазка больного COVID-19. Культивирование вируса проводили при 37 °C в питательной среде ДМЕМ с глутамином и глюкозой 4,5 г/л и 5% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ), L-глутамином (300 мкг/мл), гентамицином (40 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂ (культуральная среда, КС). Штамм прошел 20 последовательных пассажей и вызывал выраженное цитопатическое действие вируса (ЦПД). Образцы вирусного материала для проведения работы хранили при температуре –80 °C в виде аликвот. Во всех экспериментах были использованы аликвоты из одного стока.

Приготовление смеси препаратов

К 45 мг азитромицина добавили 10 мл ДМСО для получения раствора с концентрацией 6 мкмоль/мл. К 10 мг лактоферрина добавили 0,5 мл фосфатного буфера для получения раствора с концентрацией 20 мг/мл. К 21 мг артемизинина добавили 5 мл ДМСО для получения раствора с концентрацией 15 мкмоль/мл. Для приготовления рабочего раствора смешали 5 мкл раствора азитромицина, 125 мкл раствора лактоферрина и 50 мкл раствора артемизинина, объем довели культуральной средой до 5 мл.

Концентрированный раствор контрольного препарата гидроксихлорохина готовили из лекарственной формы (таблетка), растворяя ее в стерильной дистиллированной воде отдельно для каждого опыта непосредственно в день использования в эквивалентных количествах, соответствующих количеству чистого вещества в препарате. Все соединения, а также гидроксихлорохин взвешивали с точностью до 0,1 мг на аналитических весах.

Определение цитотоксического действия препаратов в культуре клеток

Клетки рассаживали в 96-луночных планшетах фирмы «Corning» со средней плотностью 20 000 клеток на лунку

и выращивали в питательной среде DMEM с глутамином и глюкозой 4,5 г/л и 5% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ), L-глутамином (300 мкг/мл), гентамицином (40 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂ (КС) в течение трех суток до полного монослоя. Затем среду удаляли и в планшеты вносили по 100 мкл испытуемых препаратов в соответствующей среде без сыворотки (рабочая среда, РС) в указанных концентрациях (по восемь концентраций). Затем в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл РС. Каждая точка эксперимента была поставлена в четырех повторностях ($n = 4$). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, содержащие 200 мкл питательной среды РС. Для определения цитотоксической дозы 50 (ЦТД₅₀) планшеты инкубировали 72 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Поскольку при определении противовирусной активности инкубация клеток с препаратами проводится в течение пяти дней, для исключения эффекта токсического влияния изучаемых образцов в течение этого времени в другой серии экспериментов определение цитотоксичности проводили при таком же времени инкубации, как и при определении противовирусной активности (пять суток). Оценку цитотоксического действия препаратов учитывали визуально по состоянию клеточного монослоя и в количественном тесте МТТ. Для этого в каждую лунку добавляли по 160 мкл среды DMEM без фенолового красного, а также 40 мкл раствора тетразолиевого красителя МТТ с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Далее культуральную жидкость удаляли и в лунки вносили по 100 мкл ДМСО с последующей инкубацией в течение 20 мин при комнатной температуре и постоянном покачивании на шейкере. С помощью планшетного спектрофотометра определяли оптическую плотность каждой лунки при 530 нм с учетом фоновых значений при 620 нм. Максимальную концентрацию препарата, не изменяющую значение ОП более чем на 10–15% по сравнению с контролем клеток, принимали за максимально переносимую концентрацию (МПК). Концентрацию субстанций, уменьшающую значение ОП на 50% по сравнению с контролем клеток, принимали за ЦТД₅₀.

Изучение противовирусной активности препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 по эффекту ЦПД с использованием МТТ

Для изучения противовирусной активности образцов культуру клеток Vero CCL81 рассаживали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток с плоским дном (20 000 клеток/лунка) и выращивали в соответствующей КС. На третьи сутки после достижения полного монослоя из лунок планшета удаляли РС с последующим внесением 100 мкл исследуемых препаратов неразведенных или в указанных разведениях на РС (семь концентраций). Часть лунок использовали для контроля вируса и клеток. Каждая точка эксперимента была поставлена в четырех повторностях ($n = 4$). Параллельно для исключения цитотоксического эффекта препаратов в опытах по противовирусной активности к незараженным лункам были добавлены препараты в таких же условиях и при тех же концентрациях. После инкубации в течение 2 ч во все лунки, за исключением лунок клеточного контроля, вносили вирус в дозе 20 или 100 MOI (в 100 мкл) и клетки инкубировали в течение 5 суток при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ до появления четкого ЦПД в клетках вирусного контроля. Учет результата проявления ЦПД в клетках

проводили с использованием количественного теста МТТ, как описано ранее. Вычисление ИК₅₀ учитывали в программе Excel по формуле:

$$\text{Ингибирование} = \frac{100 - (\text{ОП}_{\text{кл. контроль}} - \text{ОП}_{\text{опыт}})}{(\text{ОП}_{\text{кл. контроль}} - \text{ОП}_{\text{вир. контроль}})} \times 100 (\%)$$

Значимым для проявления противовирусной активности считали ингибирование вирусной репродукции 30% и более. Концентрацию препарата, уменьшающую значение величины ОП на 50% принимали за ИК₅₀.

В качестве препарата сравнения использовали лекарственную форму гидроксихлорохина, для исследования была выбрана концентрация 10 мкг/мл, соответствующая его ИК₅₀ [34, 44].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение цитотоксического действия образцов в культуре клеток Vero CCL81

В первой серии опытов была изучена цитотоксичность различных разведений тестируемых препаратов. Использовали линию клеток Vero CCL81, в которой в дальнейшем определяли противовирусную активность. После инкубации в течение 72 ч визуальная оценка при помощи инвертированного микроскопа показала, что в клеточных контролях не было отмечено цитотоксических и морфологических изменений, а также нарушений клеточного монослоя. В экспериментальных лунках при части концентраций соединений было отмечено частичное разрушение монослоя, клетки были более округлые и морфологически отличались от клеточного контроля, в части лунок наблюдалось полное разрушение клеточного монослоя. Проведенные исследования с использованием более точного количественного метода с окрашиванием клеток МТТ подтвердили данные, полученные при визуальном изучении состояния клеток. На основании полученных данных определения цитотоксического действия смеси в культуре клеток с использованием метода окрашивания красителем МТТ построены кривые доза-ответ (рис. 1), из которых выведены значения МПК и ЦТД₅₀, составляющие 1 : 500 и менее 1 : 2 для трехдневной инкубации и 1 : 50 и менее 1 : 2 для пятидневной инкубации соответственно. Поскольку метод с использованием МТТ применяют и для определения противовирусной активности, при инкубации в течение пяти суток для исключения эффекта цитотоксичности смеси для контроля к клеткам были добавлены такие же разведения образцов в таком же объеме и при таком же времени инкубации, как и в методе определения противовирусной активности при отсутствии инфицирования клеток.

Противовирусная активность смеси активных действующих веществ в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero CCL81

Изучение противовирусного действия препаратов в культуре клеток Vero CCL81 в отношении коронавируса SARS-CoV-2 было проведено с использованием метода ингибирования ЦПД вируса, выявляемого окрашиванием МТТ. Для заражения клеток использовали две множественности заражения — 100 MOI и 20 MOI. Ингибирование наблюдали при разведении не более чем в 15 раз для обоих вариантов заражения. Полученные

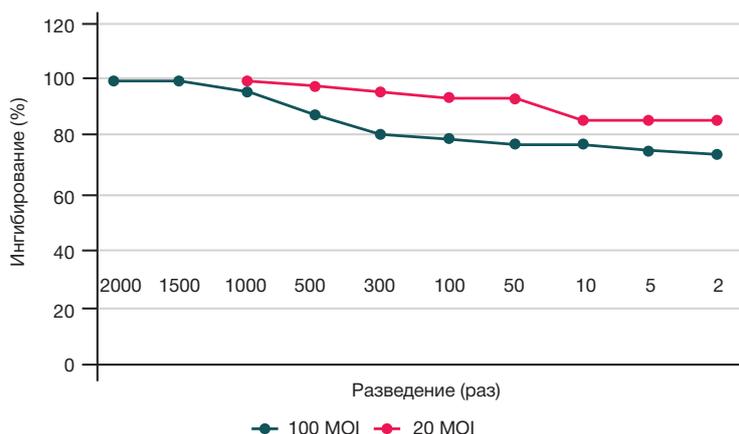


Рис. 1. Цитотоксичность различных разведений смеси активных действующих веществ в культуре клеток Vero CCL81 при инкубации в течение трех и пяти суток

данные представлены на рис. 2. Добавление смеси к клеткам значительно (более 30% ингибирования вирусной репродукции) подавляло размножение коронавируса SARS-CoV-2. При этом взятый в качестве препарата сравнения гидроксихлорохин в концентрации 10 мкг/мл ингибировал размножение коронавируса SARS-CoV-2 на 65% (данные не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ряд исследований показал, что в дополнение к АПФ2 для инфекции SARS-CoV-2 необходимы другие корецепторы или клеточные молекулы [45]. На данный момент полный их перечень неизвестен. Первичный этап проникновения вируса в клетку часто инициирован низкоаффинным связыванием с сайтами прикрепления, что способствует концентрации вирионов на поверхности клетки. Последующее связывание с высокоаффинным рецептором запускает проникновение в клетку [46, 47]. Исследование задействованных SARS-CoV-2 молекулярных механизмов при инфицировании клеток выявило ряд препаратов, с помощью которых можно ингибировать инфекцию.

Исследуемая смесь на основе артемизинина, азитромицина и лактоферрина малотоксична и значимо ингибирует заражение и репликацию SARS-CoV-2 *in vitro*. Предполагается, что механизмы его действия опосредованы

входящими в состав активными действующими веществами. Связывание с рецепторами проникновения SARS-CoV-2 и ингибирование функций вирусных белков могут лежать в основе профилактики инфицирования клеток SARS-CoV-2, так как влияют на ассоциированные с ними сигнальные системы и пути, включающие NF-κB, PI3K/AKT, различные регуляторные факторы интерферона и продукцию провоспалительных цитокинов [23, 24]. Кроме того, снижение активности фурина азитромицином значительно снижает клеточное инфицирование, при этом азитромицин может подщелачивать везикулы, содержащие вирионы SARS-CoV-2, и предотвращать pH-зависимое слияние мембран.

ВЫВОДЫ

Нами было показано, что смесь активных действующих веществ на основе азитромицина, лактоферрина и артемизинина при инкубации в культуре клеток Vero CCL 81 в течение трех и пяти суток малотоксична. Жизнеспособность клеток при всех разведениях была не нарушена более чем на 10–30%, значения ЦТД₅₀ оценивались ниже, чем минимально возможное для изучения разведение 1 : 2. При высокой (100 MOI) и низкой (20 MOI) множественностях заражения в культуре клеток Vero CCL 81 исследованная смесь оказывала значимый эффект на вирусную репродукцию SARS-CoV-2, ИК50 оценивалась в обоих случаях как разведение 1 : 2.

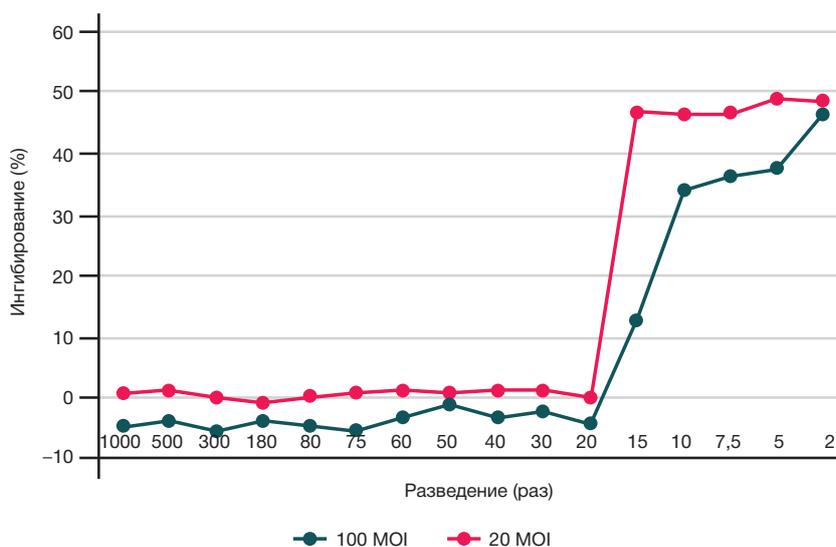


Рис. 2. Противовирусная активность смеси активных действующих веществ в культуре клеток Vero CCL81, инфицированных 20 MOI и 100 MOI коронавируса SARS-CoV-2

Таким образом, ИК₅₀ смеси достигается при следующей концентрации действующих веществ: азитромицин — 3 ммоль/л, лактоферрин — 5 мг/л и артемизинин — 7,5 ммоль/л.

Подробные молекулярные механизмы инфицирования клеток вирионами SARS-CoV-2 остаются до конца нераскрытыми, однако комбинированные смеси имеют преимущества за счет синергических эффектов входящих в состав компонентов. Полученные результаты для смеси на основе артемизинина, азитромицина и лактоферрина *in vitro* демонстрируют, что она представляет собой

перспективный действенный адьювантный терапевтический инструмент для лечения и профилактики COVID-19. Теоретические предпосылки и продемонстрированная в настоящем исследовании противовирусная активность смеси артемизинина, азитромицина и лактоферрина побуждают к планированию дальнейших доклинических и клинических исследований, направленных на изучение безопасности, реальной противовирусной активности *in vivo* против SARS-CoV-2, а также на определение режимов дозирования препарата и его комбинирование с другими противовирусными лекарственными средствами.

Литература

- Martinez MA. Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64 (5): e00399-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00399-20>.
- Convertino I, Tuccori M, Ferraro S, Valdiserra G, Cappello E, Focosi D, et al. Exploring pharmacological approaches for managing cytokine storm associated with pneumonia and acute respiratory distress syndrome in COVID-19 patients. *Crit Care.* 2020; 24 (1): 331. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03020-3>.
- Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 16 от 18.08.2022. 2022; 249 с.
- Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JC, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife.* 2020; 9: e61312. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>.
- Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6 (1): 233. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>.
- Lokhande KB, Apte GR, Shrivastava A, Singh A, Pal JK, K Venkateswara Swamy, et al. Sensing the interactions between carbohydrate-binding agents and N-linked glycans of SARS-CoV-2 spike glycoprotein using molecular docking and simulation studies. *J Biomol Struct Dyn.* 2022; 40 (9): 3880–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1851303>.
- Kim CH. SARS-CoV-2 Evolutionary Adaptation toward Host Entry and Recognition of Receptor O-Acetyl Sialylation in Virus-Host Interaction. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (12): 4549. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21124549>.
- Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, Pihl J, Perrett HR, Painter CD, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell.* 2020; 183 (4): 1043–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.033>.
- Cagno V, Tseligka ED, Jones ST, Tapparel C. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses.* 2019; 11 (7): 596. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11070596>.
- Tree JA, Turnbull JE, Buttigieg KR, Elmore MJ, Coombes N, Hogwood J, et al. Unfractionated heparin inhibits live wild type SARS-CoV-2 cell infectivity at therapeutically relevant concentrations. *Br J Pharmacol.* 2021; 178 (3): 626–35. <https://doi.org/10.1111/bph.15304>.
- Kim SY, Jin W, Sood A, Montgomery DW, Grant OC, Fuster MM, et al. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. *Antiviral Res.* 2020; 181: 104873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104873>.
- Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci.* 2008; 13: 4309–38. Available from: <https://doi.org/10.2741/3007>.
- Rudd TR, Preston MD, Yates EA. The nature of the conserved basic amino acid sequences found among 437 heparin binding proteins determined by network analysis. *Mol Biosyst.* 2017; 13 (5): 852–65. Available from: <https://doi.org/10.1039/c6mb00857g>.
- Meneghetti MC, Hughes AJ, Rudd TR, Nader HB, Powell AK, Yates EA, et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J R Soc Interface.* 2015; 12 (110): 0589. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0589>.
- Zhang Q, Chen CZ, Swaroop M, Xu M, Wang L, Lee J, et al. Heparan sulfate assists SARS-CoV-2 in cell entry and can be targeted by approved drugs in vitro. *Cell Discov.* 2020; 6 (1): 80. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00222-5>.
- Salaris C, Scarpa M, Elli M, Bertolini A, Guglielmetti S, Pregliasco F, et al. Protective Effects of Lactoferrin against SARS-CoV-2 Infection In Vitro. *Nutrients.* 2021; 13 (2): 328. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu13020328>.
- Kell DB, Heyden EL, Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol.* 2020; 11: 1221. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221>.
- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014; 5: 461. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
- Channappanavar R, Fehr AR, Zheng J, Wohlford-Lenane C, Abrahante JE, Mack M, et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J Clin Invest.* 2019; 129 (9): 3625–39. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI126363>.
- Sano E, Miyauchi R, Takakura N, Yamauchi K, Murata E, Trang Le Q, et al. Cysteine protease inhibitors in various milk preparations and its importance as a food. *Food Research International*, 2005: 38 (4): 427–33, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.011>.
- Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 1620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.
- Ulrich H, Pillat MM. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Rev Rep.* 2020; 16 (3): 434–40. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09976-7>.
- Chen Y, Zhang H, Gou X, Horikawa Y, Xing J, Chen Z. Upregulation of HAb18G/CD147 in activated human umbilical vein endothelial cells enhances the angiogenesis. *Cancer Lett.* 2009; 278 (1): 113–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.004>.
- Fang F, Wang L, Zhang S, Fang Q, Hao F, Sun Y. CD147 modulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncol Lett.* 2015; 9 (3): 1439–43. Available from: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2849>.
- Wilms EB, Touw DJ, Heijerman HG. Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit.* 2006; 28 (2): 219–25. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000195617.69721.a5>.
- Tsai WC, Rodriguez ML, Young KS. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170 (12): 1331–9. Available

- from: <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-2000C>
27. Culic O, Erakovic V, Cepelak I. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol.* 2002; 450 (3): 277–89. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02042-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02042-3).
 28. Tsai WC, Standiford TJ. Immunomodulatory effects of macrolides in the lung: lessons from in-vitro and in-vivo models. *Curr Pharm des.* 2004; 10 (25): 3081–93. Available from: <https://doi.org/10.2174/1381612043383430>.
 29. Stamatou R, Paraskeva E, Boukas K, Gourgoulianis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* 2009; 34 (3): 721–30. Available from: <https://doi.org/10.1183/09031936.00089407>.
 30. Cigana C, Assael BM, Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51 (3): 975–81. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.01142-06>.
 31. Halldorsson S, Gudjonsson T, Gottfredsson M, Singh PK, Gudmundsson GH, Baldursson O. Azithromycin maintains airway epithelial integrity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42 (1): 62–8. Available from: <https://doi.org/10.1165/rncmb.2008-0357OC>
 32. Pani A, Lauriola M, Romandini A, Scaglione F. Macrolides and viral infections: focus on azithromycin in COVID-19 pathology. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 56 (2): 106053. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106053>
 33. Khoshnood S, Shirani M, Dalir A, Moradi M, Haddadi M, Sadeghifard N, et al. Antiviral effects of azithromycin: A narrative review. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2022; 147: 112682. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112682>.
 34. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020; 30 (3): 269–71. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
 35. Hedy SA, Safar MM, Bahgat AK. Hydroxychloroquine antiparkinsonian potential: Nurr1 modulation versus autophagy inhibition. *Behav Brain Res.* 2019; 365: 82–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.033>.
 36. Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I, Olbrich A, et al. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl).* 2002; 80 (4): 233–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0300-8>.
 37. Aldieri E, Atragne D, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia A, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 2003; 552: 141–4. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00905-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00905-0)
 38. Nunes JJ, Pandey SK, Yadav A, Goel S, Ateeq B. Targeting NF- κ B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. *Neoplasia.* 2017; 19 (4): 333–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.002>.
 39. Gendrot M, Duflot I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: In vitro inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. *Int J Infect Dis.* 2020; 99: 437–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.032>.
 40. Rolta R, Salaria D, Sharma P, Sharma B, Kumar V, Rathi B, et al. Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* Inhibit Spike Protein of SARS-CoV-2 Binding to ACE2 Receptor: In Silico Approach. *Curr Pharmacol Rep.* 2021; 7 (4): 135–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40495-021-00259-4>.
 41. Uckun FM, Saund S, Windlass H, Trieu V. Repurposing Anti-Malaria Phytomedicine Artemisinin as a COVID-19 Drug. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 649532. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.649532>.
 42. Fuzimoto AD. An overview of the anti-SARS-CoV-2 properties of *Artemisia annua*, its antiviral action, protein-associated mechanisms, and repurposing for COVID-19 treatment. *J Integr Med.* 2021; 19 (5): 375–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2021.07.003>.
 43. Ribaud G, Coghi P, Yang LJ, Ng JPL, Mastinu A, Memo M, et al. Computational and experimental insights on the interaction of artemisinin, dihydroartemisinin and chloroquine with SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD). *Nat Prod Res.* 2021; 12: 1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1925894>.
 44. Gendrot M, Andreani J, Boxberger M, Jardot P, Fonta I, Le Bideau M, et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An in vitro evaluation. *Trav Med Infect Dis.* 2020; 37: 101873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101873>.
 45. Chen J, Subbarao K. The Immunobiology of SARS*. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 443–72. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141706>.
 46. Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009; 276 (24): 7206–16. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x>.
 47. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2008; 10 (1): 122–33. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01023.x>.

References

1. Martinez MA. Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64 (5): e00399-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00399-20>.
2. Convertino I, Tuccori M, Ferraro S, Valdiserra G, Cappello E, Focosi D, et al. Exploring pharmacological approaches for managing cytokine storm associated with pneumonia and acute respiratory distress syndrome in COVID-19 patients. *Crit Care.* 2020; 24 (1): 331. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03020-3>.
3. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 16 от 18.08.2022. 2022; 249 с.
4. Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JC, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife.* 2020; 9: e61312. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>.
5. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6 (1): 233. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>.
6. Lokhande KB, Apte GR, Shrivastava A, Singh A, Pal JK, K Venkateswara Swamy, et al. Sensing the interactions between carbohydrate-binding agents and N-linked glycans of SARS-CoV-2 spike glycoprotein using molecular docking and simulation studies. *J Biomol Struct Dyn.* 2022; 40 (9): 3880–98. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1851303>.
7. Kim CH. SARS-CoV-2 Evolutionary Adaptation toward Host Entry and Recognition of Receptor O-Acetyl Sialylation in Virus-Host Interaction. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (12): 4549. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms21124549>.
8. Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, Pihl J, Perrett HR, Painter CD, et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. *Cell.* 2020; 183 (4): 1043–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.033>.
9. Cagno V, Tseligka ED, Jones ST, Tapparel C. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses.* 2019; 11 (7): 596. Available from: <https://doi.org/10.3390/v11070596>.
10. Tree JA, Turnbull JE, Buttigieg KR, Elmore MJ, Coombes N, Hogwood J, et al. Unfractionated heparin inhibits live wild type SARS-CoV-2 cell infectivity at therapeutically relevant

- concentrations. *Br J Pharmacol*. 2021; 178 (3): 626–35. <https://doi.org/10.1111/bph.15304>.
11. Kim SY, Jin W, Sood A, Montgomery DW, Grant OC, Fuster MM, et al. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. *Antiviral Res*. 2020; 181: 104873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104873>.
 12. Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci*. 2008; 13: 4309–38. Available from: <https://doi.org/10.2741/3007>.
 13. Rudd TR, Preston MD, Yates EA. The nature of the conserved basic amino acid sequences found among 437 heparin binding proteins determined by network analysis. *Mol Biosyst*. 2017; 13 (5): 852–65. Available from: <https://doi.org/10.1039/c6mb00857g>.
 14. Meneghetti MC, Hughes AJ, Rudd TR, Nader HB, Powell AK, Yates EA, et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J R Soc Interface*. 2015; 12 (110): 0589. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0589>.
 15. Zhang Q, Chen CZ, Swaroop M, Xu M, Wang L, Lee J, et al. Heparan sulfate assists SARS-CoV-2 in cell entry and can be targeted by approved drugs in vitro. *Cell Discov*. 2020; 6 (1): 80. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00222-5>.
 16. Salaris C, Scarpa M, Elli M, Bertolini A, Guglielmetti S, Pregliasco F, et al. Protective Effects of Lactoferrin against SARS-CoV-2 Infection *In Vitro*. *Nutrients*. 2021; 13 (2): 328. Available from: <https://doi.org/10.3390/nu13020328>.
 17. Kell DB, Heyden EL, Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Front Immunol*. 2020; 11: 1221. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221>.
 18. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014; 5: 461. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.
 19. Channappanavar R, Fehr AR, Zheng J, Wohlford-Lenane C, Abrahante JE, Mack M, et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J Clin Invest*. 2019; 129 (9): 3625–39. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI126363>.
 20. Sano E, Miyauchi R, Takakura N, Yamauchi K, Murata E, Trang Le Q, et al. Cysteine protease inhibitors in various milk preparations and its importance as a food. *Food Research International*, 2005; 38 (4): 427–33, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.011>.
 21. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 1620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.
 22. Ulrich H, Pillat MM. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Rev Rep*. 2020; 16 (3): 434–40. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09976-7>.
 23. Chen Y, Zhang H, Gou X, Horikawa Y, Xing J, Chen Z. Upregulation of HAB18G/CD147 in activated human umbilical vein endothelial cells enhances the angiogenesis. *Cancer Lett*. 2009; 278 (1): 113–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.004>.
 24. Fang F, Wang L, Zhang S, Fang Q, Hao F, Sun Y. CD147 modulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer PC-3 cells. *Oncol Lett*. 2015; 9 (3): 1439–43. Available from: <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2849>.
 25. Wilms EB, Touw DJ, Heijerman HG. Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis. *Ther Drug Monit*. 2006; 28 (2): 219–25. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000195617.69721.a5>.
 26. Tsai WC, Rodriguez ML, Young KS. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170 (12): 1331–9. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.200402-2000C>.
 27. Culic O, Erakovic V, Cepelak I. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol*. 2002; 450 (3): 277–89. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02042-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02042-3).
 28. Tsai WC, Standiford TJ. Immunomodulatory effects of macrolides in the lung: lessons from in-vitro and in-vivo models. *Curr Pharm des*. 2004; 10 (25): 3081–93. Available from: <https://doi.org/10.2174/1381612043383430>.
 29. Stamatou R, Paraskeva E, Boukas G, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA, Hatziefthimiou AA. Azithromycin has an antiproliferative and autophagic effect on airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*. 2009; 34 (3): 721–30. Available from: <https://doi.org/10.1183/09031936.00089407>.
 30. Cigana C, Assael BM, Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51 (3): 975–81. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.01142-06>.
 31. Halldorsson S, Gudjonsson T, Gottfredsson M, Singh PK, Gudmundsson GH, Baldursson O. Azithromycin maintains airway epithelial integrity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42 (1): 62–8. Available from: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0357OC>.
 32. Pani A, Lauriola M, Romandini A, Scaglione F. Macrolides and viral infections: focus on azithromycin in COVID-19 pathology. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 56 (2): 106053. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106053>.
 33. Khoshnood S, Shirani M, Dalir A, Moradi M, Haddadi M, Sadeghifard N, et al. Antiviral effects of azithromycin: A narrative review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 147: 112682. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112682>.
 34. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*. 2020; 30 (3): 269–71. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.
 35. Hedy SA, Safar MM, Bahgat AK. Hydroxychloroquine antiparkinsonian potential: Nurr1 modulation versus autophagy inhibition. *Behav Brain Res*. 2019; 365: 82–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.033>.
 36. Eferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I, Olbrich A, et al. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med (Berl)*. 2002; 80 (4): 233–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0300-8>.
 37. Aldieri E, Atrogene D, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia A, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- κ B activation. *FEBS Lett*. 2003; 552: 141–4. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00905-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00905-0).
 38. Nunes JJ, Pandey SK, Yadav A, Goel S, Ateeq B. Targeting NF- κ B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. *Neoplasia*. 2017; 19 (4): 333–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.002>.
 39. Gendrot M, Duflo I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: In vitro inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. *Int J Infect Dis*. 2020; 99: 437–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.032>.
 40. Roita R, Salaria D, Sharma P, Sharma B, Kumar V, Rathi B, et al. Phytocompounds of *Rheum emodi*, *Thymus serpyllum*, and *Artemisia annua* Inhibit Spike Protein of SARS-CoV-2 Binding to ACE2 Receptor: In Silico Approach. *Curr Pharmacol Rep*. 2021; 7 (4): 135–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40495-021-00259-4>.
 41. Uckun FM, Saund S, Windlass H, Trieu V. Repurposing Anti-Malaria Phytomedicine Artemisinin as a COVID-19 Drug. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 649532. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.649532>.
 42. Fuzimoto AD. An overview of the anti-SARS-CoV-2 properties of *Artemisia annua*, its antiviral action, protein-associated mechanisms, and repurposing for COVID-19 treatment. *J Integr Med*. 2021; 19 (5): 375–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2021.07.003>.
 43. Ribaudo G, Coghi P, Yang LJ, Ng JPL, Mastinu A, Memo M, et al. Computational and experimental insights on the interaction of artemisinin, dihydroartemisinin and chloroquine with SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD). *Nat Prod Res*. 2021; 12: 1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1925894>.

44. Gendrot M, Andreani J, Boxberger M, Jardot P, Fonta I, Le Bideau M, et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An in vitro evaluation. *Trav Med Infect Dis.* 2020; 37: 101873. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101873>.
45. Chen J, Subbarao K. The Immunobiology of SARS*. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 443–72. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141706>.
46. Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009; 276 (24): 7206–16. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x>.
47. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2008; 10 (1): 122–33. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01023.x>.