

# ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ РЕЧОВИН АКТИВНОГО ФАРМАКОЛОГІЧНОГО ІНГРЕДІЄНТУ В ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ ПРОТЕФЛАЗІД®

<sup>1</sup>Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського»

<sup>2</sup>Інститут епідеміології та інфекційних хвороб НАМНУ ім. Л. В. Громашевського

<sup>3</sup>ТОВ «НВК «Екофарм», м. Київ, Україна

У роботі представлено аналіз наукової літератури стосовно результатів досліджень антивірусної дії активних фармакологічних інгредієнтів лікарського засобу Протефлазид®. Такими речовинами є флавоноїди – гідроксильовані поліфеноли, дуже поширені в рослинному світі нашої планети: трицин, лютеолін, апігенін. Розглянуто сучасні методи дослідження активного фармакологічного інгредієнту та конструювання антивірусних препаратів – метод вивчення кількісної взаємозалежності поміж структурою та активністю речовини (QSAR), метод молекулярного комп'ютерного сайт-специфічного докінгу, що називається методом *in silico*. Велику увагу приділено також вибору структур – мішеней для тих чи інших збудників, відповідальних за їх патогенез.

Послідовно розглянуті відомі на сьогодні результати біологічної активності дієвих фармакологічних інгредієнтів, наявних у складі препарату Протефлазид®, та їхнє можливе застосування проти вірусних хвороб людини.

З викладеного матеріалу цілком однозначно випливає, що наявним у складі активного фармакологічного інгредієнту препарату Протефлазид® флавоноїдним сполукам – трициновим, лютеоліновим, апігеніновим – властива гальмівна дія проти різних вірусів, що зумовлює доцільність застосування препарату Протефлазид® для попередження та лікування актуальних вірусних захворювань.

**Ключові слова:** активний фармакологічний інгредієнт (АФІ), флавоноїди, апігенін, трицин, лютеолін, вірусна інфекція, *in vitro*, докінг, *in silico*.

М. А. Arkhytova<sup>1,2</sup>, Е. М. Zherebtsova<sup>3</sup>, V. P. Atamanyuk<sup>3</sup>

# FEATURES OF THE ACTION OF SUBSTANCES OF THE ACTIVE PHARMACOLOGICAL INGREDIENT IN THE DRUG PROTEFLAZID®

<sup>1</sup>National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"

<sup>2</sup>SI "L. V. Hromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases National Academy of Sciences of Ukraine"

<sup>3</sup>LLC "RPC "Ecofarm", Kyiv, Ukraine

Author for correspondence: [aniramovna@gmail.com](mailto:aniramovna@gmail.com)

The paper presents an analysis of the scientific literature on the results of research into the antiviral action of the active pharmacological ingredients of the drug Proteflazid®. These substances are flavonoids – hydroxylated polyphenols, very common in the plant world of our planet: tricin, luteolin, apigenin. The modern methods of research of the active pharmacological ingredient and the construction of antiviral drugs are considered – the method of studying the quantitative interdependence between the structure and activity of the substance (QSAR), the method of molecular computer site-specific docking, which is called the *in silico* method. Much attention is also paid to the selection of target structures for certain pathogens responsible for their pathogenesis.

The currently known results of the biological activity of the active pharmacological ingredients contained in the Proteflazid® preparation and their possible use against human viral diseases have been consistently reviewed.

It clearly follows from the presented material that the flavonoid compounds present in the active pharmacological ingredient of the drug Proteflazid® – tricin, luteolin, apigenin – have an inhibitory effect against various viruses, which determines the feasibility of using the drug Proteflazid® for the prevention and treatment of current viral diseases.

**Key words:** active pharmacological ingredient (API), flavonoids, apigenin, tricin, luteolin, viral infection, *in vitro*, docking, *in silico*.

У клінічній практиці України широко застосовується оригінальний лікарський терапевтичний засіб прямої антивірусної дії Протефлазид®<sup>®</sup>, виготований із рослинної сировини і призначений для лікування та профілактики різних інфекцій, зокрема гострих респіраторних вірусних інфекцій, включно з грипом та з COVID-19 [1, 2], що набув пандемічного характеру в 2019–2022 роках. Паралельно з численними практичними набутками, отриманими при лікувальному застосуванні препарату в клінічних і в амбулаторних умовах, у літературі з'явилися також результати вивчення окремих речовин активного фармакологічного інгредієнта (АФІ). У даному випадку такими речовинами виявились флавоноїди – гідроксильовані поліфеноли, дуже поширені в рослинному світі нашої планети. Багато з рослин, що містять флавоноїди успішно використовуються в практиці народної медицини всіх країн світу. Флавоноїди – це клас численних вторинних продуктів обміну рослин; ці сполуки мають три бензольних кільця, з яких два – А та В – сполучені між собою трикарбоним гетероциклічним пірановим кільцем (С-кільцем), утворюючи основний вуглецевий скелет С6–С3–С6. На сьогодні ідентифіковано вже понад 9 тис. таких продуктів різних підкласів; до них невпинно додається все більше нових сполук у міру повнішого фармакологічного вивчення різних рослин з різних континентів [3, 4]. З 1970-х рр. цілеспрямоване дослідження флавоноїдів значно розширилося завдяки опрацюванню нових методів та підходів [3].

**Відомо, що АФІ Протефлазиду®<sup>®</sup> являють собою флавоноїди, які поєднані в комплекси [трицин, трицин-7-О або 8-С глікозид]:[лютеолін-7-О або 8-С-глікозид]:[апігенін, апігенін-7-О або 8-С-глікозид] та знаходяться в матриці допоміжних речовин [2].** Детальне вивчення кожного з таких АФІ дає змогу зрозуміти точну направленість їхньої дії та правильно й доцільно застосовувати кожен із названих інгредієнтів у конкретних випадках проти конкретних збудників. Деякі з цих збудників, зокрема збудники пандемічного значення особливо тяжких хвороб, наразі вже досить широко досліджені при застосуванні найсучасніших методів. У даному огляді йдеться саме про особливості лікувальної дії АФІ, виявлених у Протефлазиді®<sup>®</sup>, при певних хворобах вірусного походження. Перш ніж розглядати особливості терапевтичної дії кожного з названих АФІ, ми коротко розглянемо методи дослідження АФІ, зокрема найсучасніші з них, які сприяють прискореному і вдосконаленому вивченню та модифікації хімічних сполук.

**Конструювання та дизайн потрібних лікувальних препаратів – довготривалий процес, що потребує багато часу та великих грошових витрат.** Впродовж останнього десятиріччя набуло популярності застосування, серед інших методів, різних комп'ютерних та інших підходів, наприклад, методу структурної біології (structure-based biology), методу вивчення кількісної взаємозалежності між структурою та активністю речовин (quantitative structure-activity relationship, QSAR) і різних модифікацій методу так званого молекулярного комп'ю-

терного сайт-специфічного докінгу (computer-assisted site-specific molecular docking), що називається також методом *in silico*. Метод QSAR дає змогу відкривати взаємозв'язки між структурними особливостями сполук та їхніми біологічними властивостями. Завдяки цьому підходові можна попередньо відібрати велику кількість речовин із різними бажаними біологічними активностями. Застосовуючи метод докінгу, можна передбачити моделі зв'язування інгібітора та досліджуваної мішені. З'являється можливість всеохопно вивчати взаємодії між білком та лігандом і такі характеристики цієї взаємодії, як гідрофобність, енергія зв'язування, водневий донорно-акцепторний зв'язок (hydrogen bond donor-acceptor), геометрична компліментарність (geometry complementarity) та розподіл електронів (electron distribution). Знання взаємодій між лігандами та рецепторами допомагає опрацювати як нові ліки, так і нові методи лікування. Отримані величини відхилення середнього значення квадратного кореня (root mean square deviation values, RMSD values) використовуються для оцінки результатів докінгу лігандів з рецепторними білками. Ці значення RMSD виводяться з координат між атомами та їхніми конформаційними змінами. Енергія зв'язування (kcal/mol) дає змогу дослідити та порівняти афінність зв'язування різних лігандів/компонентів з їхніми відповідними рецепторами/мішенями. Енергія зв'язування являє собою суму загальної внутрішньої енергії мінус енергії, що стосується незв'язаної системи. Нижча енергія зв'язування вказує на більш високу спорідненість (афінність) між лігандом та рецептором, тобто про вдаліші результати докінгу. Ліганд з найвищою афінністю обирають згодом для подальшої роботи, спрямованої на створення нових лікувальних препаратів [5]. До названих підходів застосовують також і метод молекулярно-динамічної симуляції (molecular dynamics simulation, MD-simulation), додаткового оцінювання стабільності комплексу між білком та лігандом.

Істотне питання при проведенні пошуків лікувальних речовин сучасними методами – це питання про вибір структур-мішеней тих чи інших збудників, що відповідають за патогенез. Коли нам відома одна тільки мішень, ми стикаємося з проблемою «шийок пляшки» ("bottlenecks problem"); коли витрачаються великі кошти, а результати бувають скромнішими. Тому створення лігандів, спрямованих проти багатьох мішеней (multitarget-directed ligands), стають усе популярнішими підходами при створенні та дослідженні лікувальних препаратів.

Коли йдеться про мішені для флавоноїдів з метою терапії вірусних хвороб, доводиться розглядати питання про особливості структури вірусних часточок та тих вірусоспецифічних сполук, які виникають у клітині хазяїна після їхнього проникнення та репродукції. На сьогодні це здебільшого відомо. **Зазвичай при вірусних та й інших численних інфекціях й інвазіях в організмі виникає запалення. Це процес, що виникає в організмі у відповідь на потрапляння туди чужорідної субстанції. Імунні клітини розпізнають, наприклад, бактерії, віруси, паразитів, хімічні/антигенні речовини за допомо-**

гою так званих рецепторів. Розпізнавши чужорідні субстанції, організм активує прозапальні провідні шляхи, що призводить до синтезу цитокінів та активації клітин імунної системи, включаючи макрофаги та фагоцити, які видаляють чужорідні структури. Якщо організм не може цього зробити на ранньому етапі, запалення посилюється; хронічна фаза запалення супроводжується надмірною продукцією цитокінів, хемокінів та ферментів, які сприяють запаленню. Запалення регулюється численними провідними шляхами, включаючи Toll-подібні рецептори (Toll-like receptors), провідний шлях міоген-активованої протеїнкінази (mitogen-activated protein kinase, MAPK), енхансер легкого ланцюга ядерного фактора  $\kappa$  (NF- $\kappa$ B) в активованих В-клітинах, що здатен активувати понад 50 генів, причетних до процесу запалення. Як відомо, NF- $\kappa$ B регулює експресію ферменту циклооксигенази 2 (cyclooxygenase 2, COX2) та багатьох цитокінів, що далі активують клітини ендотеліальної системи. Здійснюється наступний каскад сигналізації, що призводить до залучення нейтрофілів, які вивільнюють простагландин E2 (PGE2), використовуючи COX1 чи 2, цитокіни, високореактивні форми кисню (reactive oxygen species, ROS) та гістаміни, викликаючи біль та запалення. Порушення регуляції таких процесів призводить до численних розладів, пов'язаних із запаленням (судинної проліферації, руйнування тканин, фіброзу) та до таких вторинних хвороб, як артрит, атеросклероз, хвороби серця та судин, хвороба Альцгеймера, астма та рак [6].

**При деяких вірусних інфекціях, особливо в гострих випадках ГРВІ, грипу та COVID-19, виникає так званий цитокіновий шторм (cytokine storm), або синдром вивільнення цитокінів (cytokine release syndrome) – це загрозливий для життя синдром запалення, що характеризується підвищенням рівнем цитокінів у руслі крові та посиленою активністю клітин імунної системи.**

Дизайн та опрацювання лікувальних препаратів проти коронавірусів, особливо проти COVID-19, припадає на період, коли вже значною мірою для такої мети було випробувано найпередовіші підходи, зокрема методи аналізів амінокислотних послідовностей вірусних білків та моделювання гомології білків, а також комп'ютерного докінгу у поєднанні з різноманітними біопробами. У деяких роботах [7, 8] досліджено мутації вірусу SARS-CoV-2 та/або його антигенні зміни, щоб знайти консервативні мішені. В результаті молекулярних та модельних досліджень підтвердилась генетична стабільність SARS-CoV-2 у певних послідовностях його білків, незважаючи на величезну його мінливість та виникнення в період пандемії численних варіантів, від зараження якими деяких осіб не рятували ні щеплення частково опрацьованими вакцинами, ні наявність антитіл проти попередніх штамів, отриманих після клінічної чи латентної хвороби. Те саме стосується й інших збудників, особливо збудників вірусної природи, мінливість яких давно вже стала великою проблемою. Наголос на встановленні генетично стабільних послідовностей викликає сьогодні надію на отримання антивірусних препаратів-«довгожителів» та довготривалі успіхи терапії при клінічному застосуванні таких сполук.

Тепер послідовно будуть розглянуті відомі на сьогодні різноманітні активності АФІ, наявних у складі Протефлазиду®, та їхнє можливе застосування проти хвороб людини, звертаючи особливу увагу саме на їхню противірусну дію. Перша складова АФІ Протефлазиду® – це **трицин**. Трицин являє собою флавоноїд із групи флавонів, а саме: 4',5,7-тригідрокси-3',5'-диметоксифлавонон. Цікаві відомості стосовно противірусної дії трицину отримували, використовуючи не очищені речовини, а витяжки з відомих лікарських рослин, які містять цей флавоноїд. Одна з таких рослин – це родіола рожева (*Rhodiola rosea*), давно відомий адаптоген, використовуваний для посилення опору організму людини проти стресів (при неврозах, неспокої та безсонні). Нещодавно показано дію спиртових екстрактів цієї рослини (10 мг/мл) *in vitro* проти вірусу грипу А/НК/1/68 порівняно з відомим та широко застосовуваним противірусним засобом Занамівіром. Крім трицину, в досліджуваному екстракті наявні ще й два інших флавоноїди – трицин-5-О- $\beta$ -D-глюкопіранозид (tricin-5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside), родіозин (rhodiosin) і танін [9]. Вплив препаратів вивчали, використовуючи клітини MDCK (Madin-Darby canine kidney cells), де показали загальмування екстрактом родіоли цитопатогенної дії (ЦПД) вірусу та адитивну дію двох флавоноїдів. При цьому має значення час внесення флавоноїдів до використовуваних культур. Внесення препаратів у культуру перед інфікуванням не справляє впливу на хід інфекції. Але обробка флавоноїдами вірусних препаратів перед внесенням їх в культуру заважає утворенню бляшок. Особливо важливим результатом досліджень антивірусної дії екстракту *Rh. rosea* проти вірусу грипу (A/BLN/7/2019) вважають той факт [9], що після численних пасажів вірусу в культурі в присутності екстракту не відбулося відбору вірусних часток, які втратили чутливість до противірусних речовин, присутніх в цьому екстракті (значення IC<sub>50</sub> становили 0,19–0,26 мкг/мл).

Японські дослідники [10] першими вивчали противірусну дію трицину *in vivo* та *in vitro* на моделях декількох штамів вірусів грипу А {A/Solomon islands/3/2006(H1N1), A/Hiroshima/52/2005 (H3N2), A/California/07/2009/ H1N1pdm), A/Narita/2009 (H1N1pdm)} та вірусу грипу В штаму B/Malaysia/2506/2004. У даному дослідженні джерелом трицину була відома в Японії лікарська та харчова рослина *Sasa albo-marginata*, застосовувана також і як матеріал для упаковки харчових продуктів. Для визначення протигрипозної активності *S. albo-marginata in vitro* використали лінію клітин MDCK. За умов *in vivo* для досліджень брали адаптований до організму мишей вірус грипу А/PR/8/34/(H1N1) та мишей-самок лінії DBA2-Cr у віці 6 тижнів та вагою 17–19 грамів. Трицин не токсичний для культивованих клітин та по-різному загальмовує розвиток вірусної інфекції залежно від внесеної дози трицину (3–30 мкг/мл) та від випробовуваного вірусного штаму. Значення EC<sub>50</sub> для різних штамів вірусу грипу А варіює

від 3,3 до 10,2 мкМ. Трицин загальмовує розмноження вірусів грипу при додаванні його в культури як до, так і після адсорбції вірусу клітиною. З цього випливає, що трицин діє на стадії репродукції вірусу, блокуючи продукцію вірусного білка, опосередковану молекулами клітини-хазяїна. У випадку грипозної інфекції трицин може виступати і як імуномодулятор. При пероральному введенні самкам мишей [10] трицин знижує втрату ваги мишами, зараженими вірусом грипу, та подовжує час виживання заражених мишей. Ефективною виявилась доза трицину 20 мг/кг маси тіла миші, а токсичність 2 000 мг/кг маси миші. Зокрема, це проявляється у випадку дії трицину проти цитомегаловірусу людини. Трицин у випадку цитомегаловірусної інфекції загальмовує накопичення простагландину E2 та синтез циклооксигенази-2 (cyclooxygenase-2, COX-2), виступаючи як інгібітор синтезу цього ферменту. Те саме показано у випадку вірусу грипу. **Отже, трицин стримує процес запалення та імунні відповіді, пов'язані з запаленням, індукованим грипозною інфекцією. Те саме стосується й вірусів простого герпесу.** Доведено, що інгібітори COX-2 пригнічують реактивацію вірусу простого герпесу на мишачій моделі латентності, а також проявляють активність проти вірусної інфекції у мишей.

**Інша складова АФІ Протефлазиду®**, природний флавоновий флавоноїд лютеолін, за хімічною структурою являє собою біфлавоноїд (дифенілпропан, С6-С3-С6) та містить чотири гідроксильних групи; це 3,4,5,7-тетрагідрофлавонон. У похідних лютеоліну його гідроксильна група заміщується іншими групами у положеннях 3', 4', 5' чи 7'. Лютеолін та його похідні можуть існувати у вигляді агліконів, а також сполучатися з одним чи кількома цукрами, утворюючи глікозиди. У результаті подальшого метаболізму лютеолін може утворювати й інші похідні – глюкуроніди, моноглюкозиди, моноглюкориди, сульфати тощо. **Як сам лютеолін, так і його численні похідні показали при вивченні *in vivo* та *in vitro* різноманітні біологічні активності, включаючи регуляцію імунних процесів, протизапальну, протиракову, антигіперглікемічну, гепатопротекторну, протиалергічну та антиоксидантну дії;** сприяють профілактиці серцевих хвороб, старінню та хворобі Альцгеймера, лікуванню виразок, а також спрямовані проти мікроорганізмів та вірусів [3, 11]. Лютеолін здатен регулювати поляризацію макрофагів. Він може уповільнювати синтез реактивних видів кисню в клітинах мишачих макрофагів RAW264.7, простимульованих ліпополісахаридами, знижувати активацію інфламсомного комплексу NLRP3.

**Стосовно антивірусної дії лютеоліну достеменно доведено, зокрема, його антинейрамінідазну активність *in vitro* [12].** Показано, наприклад, що лютеолін заважає розмноженню вірусу грипу А на ранніх стадіях вірусної інфекції, помірно блокує адсорбцію та інтерналізацію цього вірусу. Така активність частково зумовлена націленістю лютеоліну на хазяїнський білок COPI (coat protein I complex). Комплекс COPI містить дев'ять різних субодиниць. Одна з них,  $\beta$ -COPI, становить основний компонент ко-атомного комплексу (co-atomer complex). Комп-

лекс COPI бере участь у перенесенні певних структур поміж апаратом Гольджі та ендоплазматичним ретикулумом, опосередковуючи проникнення в клітину вірусу грипу та його просування в ендоплазмі. При uszkodженні цих комплексів страждає функція сортування в ендосомах, утворення везикулярних пухирців (vesicular bodies formation) та рух мембрани (membrane trafficking). Перенесення vRNP в ядро може затримуватися через виключення експресії на ранніх стадіях інфекції. При відсутності активності COPI чи при виснаженні його запасів у інфікованих клітинах на ранніх стадіях інфекції загальмовується пересування вірусних часточок, які потрапили в клітину. Коли чутлива клітина інфікується вірусом грипу, комплекс РНК з РНК-полімеразою переноситься в клітину та відіграє важливу роль у реплікації та транскрипції РНК.

Встановлено інтерференцію флавоноїдів з деякими провідними шляхами розмноження вірусів. Це: (1) MAP-кінази, які контролюють перенесення вірусних РНП-комплексів з ядра в цитоплазму; (2) редокс-чутливі провідні шляхи, причетні до визрівання білкового компонента вірусного гемаглютиніну [13].

**Показово, що лютеолін здатен загальмовувати запалення у клітинах, інфікованих вірусом псевдоскажу свиней (хвороби Ауескі, porcine pseudorabies virus, PPV), представником групи вірусів герпесу.** Дослідження показують, що цей флавоноїд загальмовує активацію STAT1/3-залежного ядерного фактору NF- $\kappa$ B, викликаючи експресію опосередкованого Nrf2 ферменту HO-1. Лютеолін уповільнює також синтез медіатора запалення – окису азоту (NO, nitric oxide) та запальних цитокінів і вираження їхніх регуляторних генів – генів синтази азотистої кислоти (nitric acid synthase, iNOS) та циклооксигенази 2 (cyclooxygenase-2, COX-2).

Лютеолін не проявляє токсичності при внесенні його в культивовані клітини MDCK та Vero (значення IC<sub>50</sub> лютеоліну становить 6,89 та 7,15 мМ, відповідно) та не погіршує життєдіяльності клітин. Він активно загальмовує ЦПД, спричинену штамми вірусу грипу A/Jiagxi/312/2006 (H3N2) та A/FortMonmouth/1/1947 (H1N1). **При обробці лютеоліном інфікованих клітин спостерігається залежне від дози зниження інфекційних титрів вірусу.** Флавоноїд загальмовує розмноження цього вірусу на ранніх стадіях його життєвого циклу, помірно блокує адсорбцію та інтерналізацію віріонів. Методом ПЛР встановлено, що лютеолін знижує рівень внутрішньоклітинного синтезу мРНК, яка кодує вірусний білок М2. Дозозалежно загальмовується, відповідно, експресія білка М2. Вірусне потомство з'являється вперше через 8 год. після зараження. **Антивірусна дія лютеоліну проявляється після його додавання в систему через 2–4 год. після інфікування, тобто на ранній стадії вірусного циклу.**

Досліджували також дію лютеоліну проти вірусу Коксакі А16 (CA16) в культурі клітин RDS (EC<sub>50</sub>=10,52 мкМ). Дія лютеоліну на вірус відбувалася через загальмовування реплікації вірусної РНК на стадії після прикріплення вірусу до поверхні клітини.

Лютеолін загальмовує розмноження вірусу гепатиту В через зниження експресії гепатоцитного ядерного фактора 4а.

Третій компонент АФІ Протефлазиду® – це апігенін (apigenin, 4',5,7-тригідрофлавоноїд), найрозповсюдженіший представник флавонових флавоноїдів. Його знайдено у багатьох цінних харчових та лікарських рослинах; він типово містить одну гідроксильну групу в В-кільці та гідроксильні групи у С-кільці. **Рослини, до складу яких входить апігенін, використовуються для лікування численних інфекційних та неінфекційних хвороб, включаючи діабет (антигіперглікемічна дія), дизентерію, гепатит, бленорагію (blennorrhagia), злоякісний артрит (cancer arthritis), запалення, геморої та виразки, які виникають при лейшманіозі (leishmanial ulcers)** тощо. Наразі про клінічні дослідження апігеніну не повідомляли, хоча при високих дозах очищеного апігеніну не виявили його токсичності.

Що стосується біодоступності (bioavailability) апігеніну, то за сучасною біофармацевтичною класифікацією (Biopharmaceutics classification) апігенін відносять до сполук класу II як речовину з низькою розчинністю у воді, але з високою здатністю проникати в організм через кишківник (high intestinal permeability). Часто їх екстрагують [14] органічними розчинниками (етанол, гексан, етилацетат). На сьогодні запропоновано різні методи для посилення біодоступності та доставки апігеніну до місця його дії [15]; йдеться про застосування мікрочасточок, наночасточок, систему доставки з само-наноемульсифікацією (self-nanoemulsifying drug delivery system), ліпосомні пухирці (везикули), тверді дисперсні часточки та міцели [6]. Зазначимо, крім того, що доступність флавоноїдів до організму людини й тварин залежить від адсорбції та біодоступності рослинних продуктів, що містять ці флавоноїди, від присутності в споживаній рослинній їжі інших флавоноїдних та нефлавоноїдних компонентів тощо.

Відомо також, що у багатьох випадках глікозидним формам флавоноїдів притаманна більш висока розчинність, а тому й вища противірусна дія порівняно з неглікозидними формами. Якщо в рослинній сировині глікозидних форм апігеніну мало, можна вдатися до хімічного синтезу необхідних компонентів. Отже, питання про те, як досягти вищої біодоступності флавоноїдів та доставки їх до потрібного органу/тканини ще залишається вирішувати.

Метод молекулярного докінгу доводить, що апігенін взаємодіє з вірусною РНК-полімеразою (RdRp) через три водневих зв'язки у сайтах Lys545, Arg-A:543 та Arg-A:555. Зв'язування апігеніну з цими амінокислотними залишками у місці каналу входження нуклеозидтрифосфатів робить зв'язок міцнішим і може модулювати взаємозв'язок. Біоінформатичні комп'ютерні програми (bioinformatic tools) ProtParam та SOPMA дають змогу встановити найкращі місця приєднання апігеніну до вірусоспецифічних структур – RBD (receptor-binding domains) для RdRp і порівняти результати докінгу (docking scores) із результатами, отримуваними для поширених хіміотерапевтичних препаратів уміфеновіра (umifenovir) та ремдесевіра (remdesivir). **Отже, за клінічних умов апігенін може сприяти лікуванню хвороб, викликаних РНК-вмісними вірусами, де**

**має велике значення активність RdRp, з грипом та SARS-CoV-2 включно [16].**

На клітинах Vero в тесті МТТ спостерігали залежний від дози вплив апігеніну на проліферацію клітин. Значення IC<sub>50</sub> для апігеніну становить 87,55 мкг/мл.

Показаний також вплив апігеніну на вірус віспи буйволів (buffalo pox virus, BPXV) з роду Orthopoxvirus родини Poxviridae; сьогодні віспа буйволів стала емерджентним зоонозом.

Досліди *in vitro* [17] доводять, що на входження BPXV в клітини апігенін не впливає; наявність його в культуральній рідині не заважає вірусним часточкам прикріплюватись і входити в клітину. Як відомо, синтез вірусних білків у випадку BPXV проходить залежно від кепінгу (cap-dependent, IRES-dependent manner), коли центральну роль відіграє ініціація трансляції. Провідна ж роль у ініціації трансляції належить eIF4E/eIF4G. Активований eIF4E приєднується до 5'-кепа мРНК та розпочинає трансляцію. Апігенін зменшує вихід вірусу, вірусного геномного матеріалу та вірусних білків. Флавоноїд зменшує фосфорилування клітинного eIF4E й доводить, що eIF4E опосередковує противірусну дію апігеніну. Встановлено, що апігенін здатен також безпосередньо пошкоджувати роботу вірусної полімерази.

Показано, що апігенін та його О-метилпохідна сполука генкванін (genkwainin) мають вплив на розмноження *in vitro* вірусу африканської чуми свиней (African swine fever virus, ASFV, представника родини Asfarviridae), збудника високо контагіозної хвороби домашніх та диких свиней, від якої гине практично 100% інфікованого поголів'я. Апігенін дозозалежно впливає на розмноження ASFV, особливо на ранніх стадіях інфекції, крім стадії входження вірусу в клітину. При додаванні в культуру в дозі 50 мкМ через 1 год. після зараження флавоноїд знижує вихід вірусу більш як на 99,99%. Генкванін активно загальмовує інфекцію ASFV на рівні синтезу ранніх та пізніх вірусних білків та синтезу вірусної ДНК. Він здатен, крім того, пригнічувати полімеризацію тубуліну, заважаючи тим самим транспорту ASFV вздовж мікротрубочок. З цих результатів випливає, що генкванін загальмовує і входження вірусу в клітину, і його вивільнення з клітини. Крім того, апігенін може індукувати продукцію ROS, зупиняти клітинний цикл на стадії G2/M, та викликати аутофагічну («самоперетравлювану») смерть клітини (autophagic cell death).

Усім вірусним збудникам неодмінно притаманна стратегія уникнення імунного нагляду з боку організму хазяїна. **Ключовий уроджений РНК-сенсор, який розпізнає чужорідні РНК в організмі, активує каскад реакцій, спрямованих на боротьбу з вірусною інфекцією.** Відомо, наприклад, що рівні мРНК та рівні білка RIG-I істотно підвищуються в клітинах A549 та THT-1 після зараження вірусом грипу A/PR/8/34(H1N1). Вплив апігеніну на ці процеси залежить від його дози. Рівні новосинтезованих після грипозної інфекції IFN типу I (IFN-β) та типу III (IFN-λ1), так само як і цитокінів запалення IL-6 та TNF-α понижуються після обробки апігеніном. **Виходить, що апігенін пригнічує експресію RIG-I та понижує**

**синтез IFNs** при грипозній інфекції. Хоча і вважають, що апоптоз являє собою стратегію захисту клітин проти вірусної інфекції, але надмірна продукція IFNs та цитокінів при запаленні може спричинити імунопатологічне ушкодження легень внаслідок гострої вірусної інфекції. Показано, що такий апоптоз клітин може бути припинений апігеніном при обробці заражених клітин. **Отже, апігенін – інгібітор викликаного вірусом активації RIG-I, що загальмовує загибель клітин.** Встановлено, що внесення в культури апігеніну забезпечує запобігання смерті клітини, ураженої вірусом.

Щоб встановити стадії грипозної інфекції, на які впливає апігенін, клітини A549 обробляли цим флавоноїдом або за 9 год. до зараження, або ж через 9 год. після нього. Результати [18] доводять, що при попередній обробці клітин апігенін ніяк не впливає на хід інфекції, але проявляє свою противірусну дію саме після зараження клітин. В інших дослідках показали, що апігенін знижує рівні NP PНК в клітинах A549 при внесенні його в культуру через 8 год. після зараження. Повний цикл розмноження вірусу грипу складає приблизно 8–10 годин. Отже, апігенін не заважає входженню вірусу в чутливі клітини та пізнішій реплікації вірусного генома під час одиночного інфекційного циклу (8 год.). Однак ця сполука заважає збиранню вірусних часточок (virus assembly).

Вивчали також дію апігеніну на РНК-вмісні віруси EV-A71 з родини Picornaviridae. Його невеликий геном (754 кб) кодує чотири вірусних білки (VP1–VP4) та сім неструктурних білків (NSPs). Даний вірус відомий як збудник енцефаліту та основна причина HFMD (hand, foot, and mouth disease) у дітей.

Показано також деякий вплив апігеніну на ентеровірусні штами BrCr та Fuyang EV-A71, вирощувані в клітинах Vero та RD. Було показано, що апігенін при концентрації  $EC_{50}=10,3$  мкМ здатен загальмовувати репродукцію вірусів, знижуючи титри вірусу завдяки пригніченню внутрішнього сайту входження в рибосому (internal ribosome entry site, IRES). Апігенін у концентрації 30 мкМ знижує цитопатогенний вплив ентеровірусу.

При вивченні противірусного впливу апігеніну *in vivo* на новонароджених мишей лінії BALB/c було показано, що тварини виявлялися захищеними від смертельного впливу вірусу при інтракраніальному його введенні. При дозі препарату 50 мг/кг вижило 88,89% заражених мишей.

У дослідках *in vitro* та *in vivo* апігенін проявляє антивірусну дію проти ентеровірусу-71 (EV71), вірусу гепатиту С (HCV), ВІЛ (HIV) та аденовірусів. Розмноження вірусу ящура (foot-and-mouth disease virus, FMDV) на різних стадіях інфекції уповільнюється завдяки пригніченню IRES-направленої трансляційної активності та синтезу білків. Апігенін заважає також продукції віріонів у клітинах NPC, латентно інфікованих вірусом Епштейна-Барр (Epstein-Barr virus, EBV), перешкоджаючи переходові латентної інфекції в літичну інфекцію.

Досить повно вивчено вплив апігеніну в складі настоїв з різних рослин {наприклад, *Achyrocline satureioides* (Asteraceae), *Elscholtzia rugulosa* (Lamiaceae), *Cynodon dactylon* (Poaceae)}

на віруси грипу А та грипу В {influenza virus A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1), A/PR/8/34(H1N1), A/jinan/15/90/(H3N2), B/Jiangsu10/2003}. Йдеться про блокування адсорбції вірусу на поверхні клітин MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) чи про заваду до приєднання вірусних часточок до рецепторного сайту зв'язування; в такий спосіб пригнічується експресія СОPI.

Часто вплив апігеніну (як і інших флавоноїдів) на різних збудників вивчали, маючи справу не тільки з очищеними речовинами, але й з лікарськими рослинами чи сумішами таких рослин, до складу яких ця сполука входить. В одній з нових публікацій [19] досліджували вплив суміші екстракту (APRG64) з двох рослин, *Agrimonia pilosa* Ledeb. (родини Rosaceae) та *Galla rhois* (родини Anacardiaceae), на вірус грипу А. Апігенін був ідентифікований як основний компонент, відповідальний за антивірусну активність екстракту. APRG64 захищає клітини MDCK від ЦПД, який викликає вірус грипу А; захист залежить від дози вірусу та дози APRG64. **Показано, що апігенін заважає прикріпленню вірусу до клітини, входженню його в клітину, активності RdRp, а також індукованій вірусом активації сигнального шляху MAPK.** Інтраназальне введення APRG64 мишам пригнічує розмноження вірусу в легенях та сприяє виживанню інфікованих тварин.

Як відомо, вірусна інфекція сприяє підвищеному синтезові IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  та IL-6, призводячи до патологічного ураження легень. Введення APRG64 призводить до регуляторного пониження синтезу названих цитокінів.

**Найважливіша роль флавоноїдів у згадуваній літературі – це загальмування активності ядерного фактора NF- $\kappa$ B, видалення вільних радикалів,** участь в ензим-рецепторних системах стосовно таких ферментів, як циклооксигеназа (cyclooxygenase), ліпоксигеназа (lipoxygenase), ксантиноксидаза (xanthine oxydase), альдозоредуктаза (aldose reductase), NDM-1, активатор інсулінового рецептора (insulin receptor activator). BACE-1, AChE, BChE, зниження ушкоджень при ішемії, попередження атеросклерозу, антимікробна, антиканцерогенна, протитромбозна, протизапальна, антиоксидантна та протимутагенна дія.

**Антивірусна спрямованість флавоноїдів має дуже велике значення з погляду сучасної терапії вірусних хвороб. Це пояснюється значною токсичністю хімічних антивірусних препаратів для організму, швидкими темпами мінливості вірусів та селекції вірусних штамів, резистентних проти застосовуваних хімічних препаратів; через деякі особливості вірусного генома та його реплікації; що особливо стосується саме РНК-вмісних вірусів.**

З викладеного тут матеріалу цілком однозначно й беззаперечно випливає, що присутнім у складі Протефлазиду® флавоноїдним сполукам, а саме: його АФІ – трицинові, лютеолінові та апігенінові – властива гальмівна дія проти вірусів різних систематичних груп. Отже, щодо АФІ Протефлазиду® повністю доведено їхню терапевтичну активність, а тому й цілковиту доцільність застосування препарату для попередження та лікування різноманітних та актуальних інфекційних захворювань.

1. Отчёт об изучении механизмов действия биологически активных веществ лечебной субстанции Протефлазид®. Ду «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України», 2010; с. 83.
2. Кузнецова Л. В. Протефлазид® – ефективний лікарський засіб у боротьбі з вірусними захворюваннями. Превентивна медицина 2023; 1(1): 46–49.
3. Wang L., Song J., Liu A., Xiao B., Li S., Wen Z., Lu Y. & Du G. Research Progress of the Antiviral Bioactivities of Natural Flavonoids. Natural products and bioprospecting, 2020 Oct; 10(5), 271–283. DOI: 10.1007/s13659-020-00257-x
4. Sahrajabian M. H., Sun W., Cheng Qi The importance of flavonoids and phytochemicals of medicinal plants with antiviral activities. Mini-Reviews in Organic Chemistry, 2021; 19(3): 293–318. DOI: 10.2174/1570178618666210707161025
5. Tuli H., Sood S., Pundir A., Choudhary D., Dhama K., Kaur G., Seth P., Vashishth A. & Kumar P. Molecular Docking studies of Apigenin, Kaempferol, and Quercetin as potential target against spike receptor protein of SARS COV. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 2022; 10(1): 144–149. [https://doi.org/10.18006/2022.10\(1\).144.149](https://doi.org/10.18006/2022.10(1).144.149).
6. Al-Khayri J. M., Sahana G. R., Nagella P., Joseph B. V., Alessa F. M. & Al-Mssalleem, M. Q. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. Molecules (Basel, Switzerland), 2022; 27(9): 2901. <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>.
7. Boufissiou A., Abdalla M., Sharaf M., Al-Resayes S. I., Imeddine K., Alam M., Yagi S., Azam M. & Yousfi M. (2022). In-silico investigation of phenolic compounds from leaves of Phillyrea angustifolia L. as a potential inhibitor against the SARS-CoV-2 main protease (Mpro PDB ID:5R83) using a virtual screening method. Journal of Saudi Chemical Society, 2022; 26(3): 101473. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101473>
8. Farhat A., Ben Hlima H., Khemakhem B., Ben Halima Y., Michaud P., Abdelkafi S. & Fendri I. Apigenin analogues as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: In-silico screening approach. Bioengineered, 2022; 13(2): 3350–3361. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2027181>.
9. Döring K., Langeder J., Duwe S., Tahir A., Grienke U., Rollinger J. M. & Schmidtke M. (2022). Insights into the direct anti-influenza virus mode of action of Rhodiola rosea. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, 2022; 96:153895. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153895>.
10. Yazawa K., Kurokawa M., Obuchi M., Li Y., Yamada R., Sadanari H., Matsubara K., Watanabe K., Koketsu M., Tsuchida Y. & Murayama, T. Anti-influenza virus activity of tricin, 4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone. Antiviral chemistry & chemotherapy, 2011; 22(1): 1–11. <https://doi.org/10.3851/IMP1782>.
11. Li Wei-Feng & Wang Xuan & Wang Tian-Han & Ding Ya-Li & Wang Meng-Xi & Jia-Lei Tao & Yuan Bin. (2023). Application Potential of Luteolin in the Treatment of Viral Pneumonia. Journal of Food Biochemistry. 2023; 4: 1–20. <https://doi.org/10.1155/2023/1810503>.
12. Yan H., Ma L., Wang H., Wu S., Huang H., Gu Z., Jiang J. & Li Y. (2019). Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression. Journal of natural medicines, 2019; 73(3): 487–496. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01287-7>.
13. Zima V., Radilová K., Kožíšek M., Albiňana C. B., Karlukova E., Brynda J., Fanflík J., Flieger M., Hodek J., Weber J., Majer P., Konvalinka J. & Machara A. (2020). Unraveling the anti-influenza effect of flavonoids: Experimental validation of luteolin and its congeners as potent influenza endonuclease inhibitors. European journal of medicinal chemistry, 2020; 208: 112754. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112754>.
14. Zhang X., Chen S., Li X., Zhang L. & Ren L. Flavonoids as Potential Antiviral Agents for Porcine Viruses. Pharmaceutics, 2022; 14(9): 1793. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091793>.
15. Ayissi Owona & Galani Borris & Fewou Moundipa. In Silico Identification of Apigenin and Narcissin (Food-Flavonoids) as Potential Targets Against SARS-CoV-2 Viral Proteins: Comparison with the Effect of Remdesivir. Journal of Clinical Anesthesia and Pain Management, 2021; 5(1): 214–2235 DOI: 10.36959/377/356
16. Murali M., Nair B., Vishnu V.R. et al. 2,4-Dihydroxycinnamic acid as spike ACE2 inhibitor and apigenin as RdRp inhibitor in Nimbamritadi Panchatikram Kashayam against COVID-19: an in silico and in vitro approach. Molecular Diversity. 2022; 10: 1–11 <https://doi.org/10.1007/s11030-022-10552-z>.
17. Khandelwal N., Chander Y., Kumar R., Riyesh T., Dedar R. K., Kumar M., Gulati B. R., Sharma S., Tripathi B. N., Barua S. & Kumar N. (). Antiviral activity of Apigenin against buffalopox: Novel mechanistic insights and drug-resistance considerations. Antiviral research, 2020; 181: 104870. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104870>.
18. Xu X., Miao J., Shao Q., Gao Y. & Hong L. Apigenin suppresses influenza A virus-induced RIG-I activation and viral replication. Journal of medical virology, 2020; 92(12): 3057–3066. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.26403>
19. Joo Y. H., Lee Y. G., Lim Y., Jeon H., Lee I. G., Cho Y. B., Hong S. H., Kim E. H., Choi S. H., Kim J. W., Kang S. C. & Seo Y. J. Anti-influenza A virus activity by Agrimonia pilosa and Galla rhois extract mixture. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2022; 155: 113773. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113773>.

**Відомості про авторів:**

**Архипова М. А.** – старший лаборант з вищою освітою Інституту епідеміології та інфекційних хвороб НАМНУ ім. Л. В. Громашевського, аспірант Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського».

**Участь у статті:** ідея, збір матеріалу для манускрипту, переклад.

*E-mail:* [aniramovna@gmail.com](mailto:aniramovna@gmail.com)

*ORCID:* 0000-0001-5860-2870

**Жеребцова Е. М.** – к. б. н., ТОВ «НБК «Екофарм», м. Київ, Україна.

**Участь у статті:** написання основного тексту манускрипту.

*ORCID:* 0009-0006-1445-2958

**Атаманюк В. П.** – директор департаменту наукових досліджень ТОВ «НБК «Екофарм», м. Київ, Україна.

**Участь у статті:** рецензування, куратор проекту.

*Конфлікт інтересів у авторів відсутній.*

*Роботу виконано за підтримки ТОВ «НБК «ЕКОФАРМ».*

**Information about the authors:**

**Arkhypova M. A.** – a senior laboratory assistant with a higher education L. V. Hromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMSU, graduate student of the National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute".

**Participation in the article:** idea, collection of material for the manuscript, translation.

*E-mail:* [aniramovna@gmail.com](mailto:aniramovna@gmail.com)

*ORCID:* 0000-0001-5860-2870

**Zherebtsova E. M.** – Candidate of Biological Science, LLC "RPC "Ecopharm", Kyiv, Ukraine.

**Participation in the article:** writing the main text of the manuscript.

*ORCID:* 0009-0006-1445-2958

**Atamanyuk V. P.** – director of the scientific research department of LLC "RPC "Ecopharm", Kyiv, Ukraine.

**Participation in the article:** review, project curator.

*The authors have no conflict of interest. The work was carried out with the support of LLC "RPC "Ecopharm".*