DOI: https://doi.org/10.17816/CI695474 EDN: PMGMOC

Оценка противовирусной активности ряда азосоединений в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в эксперименте *in vitro*

Е.В. Литасова, В.А. Матюшенко, А.В. Соколов, Д.А. Меженская, Л.В. Мызников, Н.Б. Соколова, Н.П. Горбунов, Ю.М. Берсон, А.Я. Рак, И.Н. Исакова-Сивак

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Трансферриновый рецептор 1 (TfR1, CD71) является мультифункциональным белком, играющим важную роль в поддержании клеточного гомеостаза железа за счёт связывания с основным переносчиком железа — трансферрином (Tf). Помимо Tf, он способен связывать и переносить в клетку различные белки, вирусы, химиотерапевтические препараты и другие биомолекулы. Ранее был продемонстрирован эффект ингибирования инфекции SARS-CoV-2 при обработке клеток Vero ферристатином II — индуктором деградации TfR1; однако данный препарат не может быть использован как лекарственное средство ввиду образования канцерогенных производных бензидина при его метаболизме.

Цель исследования. Оценить противовирусную активность ряда азосоединений — структурных аналогов ферристатина II — с целью выявления общих структурных закономерностей соединений, демонстрирующих наибольшую эффективность против SARS-CoV-2. Полученные результаты будут использованы для разработки более безопасных аналогов ферристатина II, обладающих противовирусными свойствами.

Методы. В работе изучена противовирусная активность 15 соединений, 5 из которых были получены *de novo* методами органического синтеза. Противовирусную оценку препаратов проводили по их способности ингибировать репродукцию коронавируса SARS-CoV-2 линии Delta на культуре клеток Vero. Цитотоксичность соединений для данной клеточной линии определяли в МТТ тесте. Дополнительно для наиболее эффективных соединений была проведена оценка способности ингибировать захват железа клетками Vero с использованием хемосенсора HMRhoNox-M.

Результаты. Среди изученных красителей — аналогов ферристатина II — вирус-ингибирующей активностью обладали соединения прямой чёрный (среднеингибиторная концентрация IC_{50}=53,7 мкМ), прямой зелёный (IC_{50}=53,6 мкМ), прямой диазочёрный С (IC_{50}=28,2 мкМ) и прямой чёрный 2К (IC_{50}=45,3 мкМ). При этом соединение прямой зелёный проявляло выраженную токсичность для клеток Vero (CC_{50}=29,1 мкМ), тогда как ни один из чёрных красителей не демонстрировал цитотоксичности при максимальной концентрации 200 мкМ. Данные о снижении репродукции вируса в присутствии препаратов коррелировали со снижением способности клеток Vero захватывать железо, что указывает на вовлечённость TfR1 в противовирусную активность прямых азокрасителей.

Заключение. Определены общие закономерности прямых азокрасителей, наиболее активных в отношении SARS-CoV-2: присутствие на концах молекулы порядка четырёх кислотных групп (сульфогруппы) и небольшого жёсткого плоского линкера (бензидина), соединяющего их. Полученные данные открывают перспективы для разработки безопасных аналогов ферристатина II; в частности, для минимизации канцерогенных свойств бензидин может быть заменён на менее токсичные тетраметилбензидин и диаминоантрахинон, а для оптимизации структуры предлагается заменить сульфогруппы на карбоксильные.

Ключевые слова: трансферриновый рецептор 1; воспаление; противовирусный препарат; органический синтез; SARS-CoV-2; транспорт железа.

Как цитировать:
Литасова Е.В., Матюшенко В.А., Соколов А.В., Меженская Д.А., Мызников Л.В., Соколова Н.Б., Горбунов Н.П., Берсон Ю.М., Рак А.Я., Исакова-Сивак И.Н. Оценка противовирусной активности ряда азосоединений в отношении коронавируса SARS-CoV-2 в эксперименте *in vitro* // Цитокины и воспаление. 2025. Т. 22, № 3. С. 128–137. DOI: 10.17816/CI695474 EDN: PMGMOC

Рукопись получена: 29.10.2025 **Рукопись одобрена:** 30.11.2025 **Опубликована online:** 16.12.2025

DOI: https://doi.org/10.17816/CI695474 EDN: PMGMOC

Antiviral Activity Assessment of Specific Azo Compounds Against SARS-CoV-2 in *In Vitro* Experiment

Elena V. Litasova, Victoria A. Matyushenko, Alexey V. Sokolov, Daria A. Mezhenskaia, Leonid V. Myznikov, Natalia B. Sokolova, Nikolay P. Gorbunov, Yulia M. Berson, Alexandra Ya. Rak, Irina N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Transferrin receptor 1 (TfR1, CD71) is a multifunctional protein important for maintaining cellular iron homeostasis by binding to the main iron transporter transferrin (Tf). In addition to Tf, it can bind and transfer proteins, viruses, chemotherapeutic agents, and other biomolecules to the cell. Ferristatin II, a TfR1 degradation inducer, has previously been shown to inhibit SARS-CoV-2 infection in Vero cells; however, this agent cannot be used as a medicinal product, because its metabolism produces carcinogenic benzidine derivatives.

AIM: To assess the antiviral activity of specific azo compounds (structural analogs of ferristatin II) to identify common structural patterns of compounds that are the most effective against SARS-CoV-2. The findings will be used to develop safer antiviral analogs of ferristatin II.

METHODS: The paper investigates the antiviral activity of 15 compounds, including 5 *de novo* compounds generated by organic synthesis. The antiviral activity of the drugs was evaluated by their ability to inhibit the replication of SARS-CoV-2 Delta in Vero cell culture. Cytotoxicity of the compounds for this cell line was determined by the MTS assay. Additionally, the ability of the most effective compounds to inhibit iron uptake by Vero cells was assessed using the HMRhoNox-M chemosensor.

RESULTS: In the studied stains similar to ferristatin II, direct black (average inhibitory concentration IC_{50} = 53.7 μM), direct green (IC_{50} = 53.6 μM), direct diazo black C (IC_{50} = 28.2 μM), and direct black 2K (IC_{50} = 45.3 μM) inhibited the viral activity. In addition, direct green showed pronounced toxicity to Vero cells (CC_{50} = 29.1 μM); whereas none of the black dyes showed cytotoxicity at a highest concentration of 200 μM. The recorded decrease in viral replication in the presence of the drugs correlated with the reduced ability of Vero cells to capture iron, indicating the involvement of TfR1 in the antiviral activity of direct azo stains.

CONCLUSION: The study identified general patterns of direct azo dyes that are most active against SARS-CoV-2, i.e. approximately four acidic groups (sulfo groups) at the ends of the molecule and a small rigid flat linker (benzidine) connecting them. The findings open up prospects for the development of safe analogs of ferristatin II. In particular, benzidine may be replaced with less toxic tetramethylbenzidine and diaminoanthraquinone to reduce carcinogenic activity; to improve the structure, we propose to replace the sulfo groups with carboxyl groups.

Keywords: transferrin receptor 1; inflammation; antiviral drug; organic synthesis; SARS-CoV-2; iron transport.

To cite this article:
Litasova EV, Matyushenko VA, Sokolov AV, Mezhenskaia DA, Myznikov LV, Sokolova NB, Gorbunov NP, Berson YuM, Rak AYa, Isakova-Sivak IN. Antiviral Activity Assessment of Specific Azo Compounds Against SARS-CoV-2 in *In Vitro* Experiment. *Cytokines and Inflammation.* 2025;22(3):128–137. DOI: 10.17816/CI695474 EDN: PMGMOC

Submitted: 29.10.2025 **Accepted:** 30.11.2025 **Published online:** 16.12.2025

ОБОСНОВАНИЕ

Хроническое воспаление лежит в основе патогенеза широкого спектра заболеваний, включая аутоиммунные расстройства, нейродегенеративные процессы, метаболический синдром и онкологические заболевания [1, 2]. Несмотря на значительные успехи в понимании молекулярных механизмов воспалительного ответа, поиск новых, высокоселективных мишеней для фармакологического вмешательства остаётся актуальной задачей современной биомедицины. В последние годы всё больше данных свидетельствует о том, что белки, традиционно ассоциированные с фундаментальными клеточными процессами, могут выполнять нетрадиционные функции в регуляции иммунного ответа. Одним из таких многофункциональных белков является трансферриновый рецептор 1 (TfR1, CD71) [3]. TfR1, известный прежде всего своей ключевой ролью в клеточном захвате железа посредством связывания с трансферрином [4], в настоящее время признан важным модулятором иммунных процессов. Экспрессия TfR1 значительно повышается на активированных иммунокомпетентных клетках, таких как Т- и В-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки, что указывает на его возможную роль не только в удовлетворении их возросших метаболических потребностей, но и в прямом участии в сигнальных путях воспаления [5–7]. В экспериментальных исследованиях показано, что ограничение доступности железа путём блокирования опосредованного CD71 эндоцитоза железа нарушает дифференцировку и патогенность Т-хелперов 17-го типа и замедляет развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [8]. Кроме того, TfR1 рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень при остеоартрите, поскольку ингибирование TfR1 с помощью малых интерферирующих РНК снижает содержание железа в хондроцитах, препятствует окислительному стрессу и подавляет воспаление, опосредованное c-GAS/STING-белком, при котором разрушаются митохондрии и высвобождается мтДНК [9]. В данном исследовании W. Wang и соавт. также продемонстрировали, что ферристатин II, новый селективный ингибитор TfR1, может существенно подавлять активность TfR1 как *in vivo*, так и *in vitro*, а также замедлять дегенерацию хрящевой ткани.

Известно, что TfR1 играет важную роль в размножении ряда вирусов человека и животных, включая альфавирусы, вирусы гепатита С, аденовирусы, вирус гриппа и др. [10, 11]. В более поздних исследованиях было показано, что блокирование TfR1 моноклональными антителами практически полностью подавило инфекцию, вызванную новым коронавирусом SARS-CoV-2 [12]. В наших экспериментах мы подтвердили, что обработка клеток с помощью ферристатина II, низкомолекулярного индуктора деградации TfR1, эффективно препятствовала развитию продуктивной инфекции тремя эволюционно неродственными вариантами SARS-CoV-2 [13]. Краситель ферристатин II (прямой чёрный 38) не может быть использован как лекарственное средство, поскольку при его метаболизме образуются канцерогенные производные бензидина. В этой связи поиск структурных аналогов ферристатина II, вызывающих деградацию TfR1 с минимальной вероятностью метаболизма до канцерогенов, представляет собой актуальную задачу биомедицины. В работе Y. Xiao и соавт. продемонстрировано, что другое азосоединение — прямой синий 53 — также обладает выраженной активностью в отношении различных геновариантов SARS-CoV-2 [14]. Соответственно, для структурной оптимизации и дальнейшего поиска безопасных противовирусных соединений целесообразно провести скрининг других красителей из ряда азосоединений с целью выявления общих закономерностей, ассоциированных с их противовирусной активностью.

ЦЕЛЬ

Оценить противовирусную активность ряда азосоединений — структурных аналогов ферристатина II — с целью выявления общих структурных закономерностей соединений, демонстрирующих наибольшую эффективность против SARS-CoV-2. Полученные результаты будут использованы для разработки более безопасных аналогов ферристатина II, обладающих противовирусными свойствами.

МЕТОДЫ

Прямые азокрасители чаще всего представляют собой азо- или полиазосоединения. Десять соединений были получены из коллекции кафедры красителей СПб ГТИ(ТУ) (Санкт-Петербург, Россия) (Приложение 1). Органический синтез пяти азосоединений проводили в лаборатории синтеза и нанотехнологии лекарственных веществ ФГБНУ «ИЭМ». Кроме того, в работе использован контрольный препарат ферристатин II производства Sigma (Германия).

Исследование проведено в период с 15.05.2025 по 15.10.2025.

Общую схему синтеза можно описать следующим образом: диазотирование диамина (бензидина или дианизина), а затем азосочетание. При синтезе симметричных диазокрасителей вводят в реакцию азосочетания 2 моль азосостовляющих. При синтезе несимметричных последовательно вводят по 1 моль каждого азосоставляющего, причём сначала проводят азосочетание с менее активной азосоставляющей. При этом особое внимание при проведении реакции диазотирования и азосочетания уделяли корректировке pH. Схема синтеза диазосоединений приведена на рис. 1.

К раствору 0,0005 моль бензидина в абсолютном этаноле, охлаждённому на ледяной бане, по каплям добавляли концентрированную HCl. Затем по каплям вносили 0,0015 моль $NaNO_2$ при поддержании температуры ниже 5 °C и перемешивали в течение 30 мин, после чего продолжали перемешивание ещё 3 ч при той же температуре. Избыток нитрита удаляли добавлением сульфаминовой кислоты.

DOI: https://doi.org/10.17816/CI695474

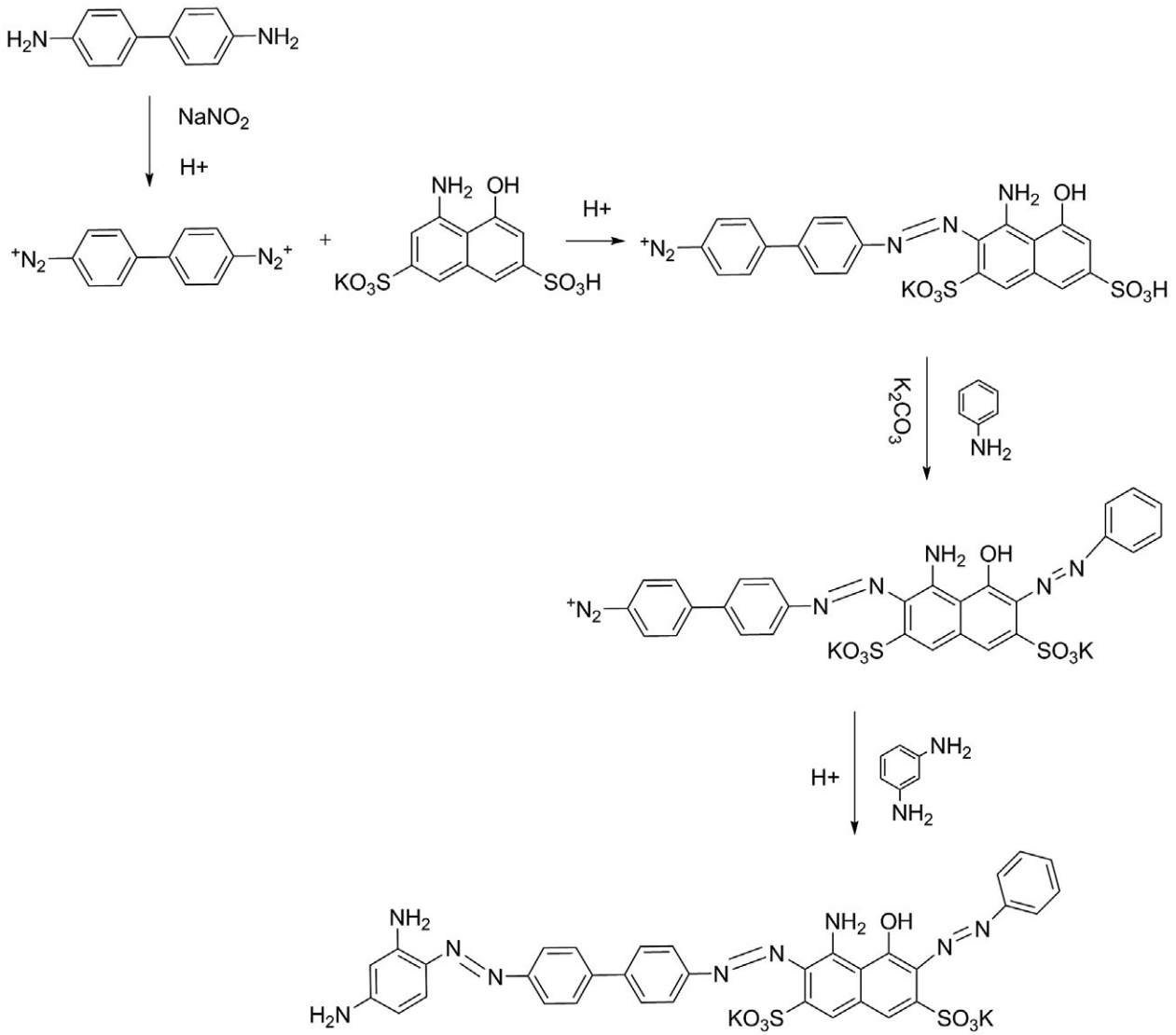


Рис. 1. Схема синтеза триазосоединения (прямой чёрный).
Fig. 1. Triazo compound (direct black) synthesis diagram.

К полученному раствору в течение 30 мин добавляли по каплям 20% водный раствор карбоната калия, доводя pH реакционной смеси до 3,0. После этого вносили раствор соли Н-кислоты в воде, затем добавляли 20% водный раствор гидроксида калия до pH 9,5. Смесь перемешивали в течение 1-го часа при температуре 0–6 °С, затем выдерживали ещё 1 ч при перемешивании при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр.

Затем вводили анилин, реакцию проводили с добавлением карбоната калия для поддержания pH; смесь выдерживали при перемешивании на магнитной мешалке 1 ч при температуре 5–7 °С. После этого вводили 9% водный раствор м-фенилендиамина (растворяли при нагревании до 40 °С), затем охлаждали до 20 °С. Реакционную смесь охлаждали льдом до 5 °С и добавляли 20% водный раствор гидроксида калия, доводя pH до 8,5–9,5 и выдерживали при перемешивании 8 ч при комнатной температуре.

Затем реакционную смесь подкисляли разбавленной H_2SO_4 до кислого pH, нагревали до 60 °С и проводили горячее фильтрование. Осадок промывали на фильтре водой. Полученный продукт перекристаллизовывали с активированным углём при pH=10. После фильтрации угля смесь концентрировали упариванием и выдерживали в холодильнике ночь. Выпавший осадок фильтровали. Индивидуальные вещества выделяли хроматографически на системе BioRad DuoLogic. Остальные соединения синтезировали по аналогичной методике. Все полученные соединения были охарактеризованы методом масс-спектрометрии и CHN-анализом.

В работе использовали вирус hCoV-19/Russia/SPE-RII-32759V/2021 (линия Delta), который получили из ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» (Санкт-Петербург, Россия). Всю работу с инфекционным вирусом проводили в лаборатории 3-го уровня биобезопасности (BSL-3).

Оценку вирус-ингибирующего действия исследуемых соединений в отношении SARS-CoV-2 проводили в реакции микронейтрализации по методике, описанной ранее [13]. Клетки Vero-CCL81 культивировали

в 96-луночных планшетах в среде DMEM, содержащей 1× антибиотик-антимикотик и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). На следующий день клетки заражали вирусом в дозе 100 ТЦД50 в течение 2 ч при 37 °C и 5% CO_2. Лунки без вируса служили отрицательным контролем. После удаления инокулята клетки обрабатывали 2-кратными разведениями исследуемых субстанций (в DMEM/2% FBS), начиная с дозы 100 мкМ. Планшеты инкубировали 72 ч при 37 °C, после чего отбирали супернатанты, а клетки фиксировали 10% формальдегидом в течение 24 ч при +4 °C. Наличие вирусного антигена в лунках планшета определяли методом иммуноферментного анализа с использованием поликлональных антител к RBD-белку и вторичных видоспецифических антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Результаты измеряли при 450 нм. Среднеингибиторную концентрацию соединений (IC_{50}) рассчитывали методом четырёхпараметрической нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Цитотоксичность субстанций для клеток Vero оценивали методом MTT [15]. Препараты разводили на среде DMEM (2% FBS) в концентрациях от 200 до 6,3 мкМ и добавляли в 96-луночный планшет с клетками на 48 ч. По завершении инкубационного периода клетки промывали и в каждую лунку добавляли реагент MTT (0,5 мг/мл) на 2 ч при стандартных условиях культивирования. После удаления реагента клетки промывали тёплым раствором PBS и добавляли по 100 мкл 96% этанола для растворения формазана. Оптическую плотность образовавшегося раствора измеряли при длине волны 535 нм. Значения 50% токсической дозы (CC_{50}) рассчитывали методом четырёхпараметрической нелинейной регрессии в программе GraphPad Prism.

Анализ влияния красителей на содержание в клетках Vero ионов железа проводили, используя в качестве хемосенсора соединение HMRhoNox-M (Lumiprobe, артикул 3317), которое образует флуоресцирующий продукт (возбуждение при 555 нм, испускание при 575 нм) после взаимодействия с железом, поглощённым путём опосредованного рецептором трансферрина эндоцитоза [16]. Клетки Vero рассевали, используя плотность 400 тыс. клеток в мл и культивировали при 37 °C в CO_2-инкубаторе в 96-луночных планшетах в среде DMEM, содержащей 2% FBS. Для оценки влияния красителей на содержание ионов железа их добавляли в клеточную среду в конечной концентрации 100 мкМ (разбавляя стоковый раствор 2 мМ красителя в диметилсульфоксиде) на 24 ч. Для каждого красителя использовали 10–12 лунок; дополнительно в 10 лунок вносили только диметилсульфоксид без красителя. Все растворы перед использованием термостатировали при 37 °C.

Клетки трижды отмывали от среды и красителей раствором Хенкса и инкубировали 30 мин с раствором Хенкса, содержащим 1 мкМ HMRhoNox-M (разбавляя стоковый 1 мМ раствор HMRhoNox-M в диметилформамиде). Затем клетки снова трижды отмывали раствором Хенска без хемосенсора. В каждом опыте оставляли 10 лунок, которые инкубировали 30 мин с раствором Хенкса без добавления хемосенсора. С помощью прибора AID vSpot Spectrum Reader (Advanced Imaging Devices, Германия) регистрировали число спотов на изображениях лунок, используя настойки для красителя Cy3.

В качестве показателя подавления поглощения железа использовали выражение:

$$\frac{N_{\mathrm{DMSO}} - N_{\mathrm{Dye}}}{N_{\mathrm{Ch}} - N_0} \times 100\%,$$

где N_{DMSO} — среднее число спотов в лунках с добавлением 1 мкМ хемосенсора и 5% диметилсульфоксида (растворитель для красителей), N_{Dye} — среднее число спотов в лунках с добавлением 100 мкМ красителя и 1 мкМ хемосенсора, N_{Ch} — среднее число спотов в лунках с 1 мкМ хемосенсора без красителя и N_0 — среднее число спотов в лунках без хемосенсора и без красителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящем исследовании была изучена противовирусная активность 15 азосоединений, а также контрольного препарата ферристатина II (Sigma, Германия) в отношении коронавируса SARS-CoV-2 геноварианта Delta (см. Приложение 1).

По результатам исследований наиболее выраженной вирус-ингибирующей активностью, наряду с референсным препаратом ферристатином II (IC_{50}=51,2 мкМ), обладали соединения прямой чёрный (IC_{50}=53,7 мкМ), прямой зелёный (IC_{50}=53,6 мкМ), прямой диазочёрный С (IC_{50}=28,2 мкМ) и прямой чёрный 2К (IC_{50}=45,3 мкМ) (рис. 2). Однако оценка цитотоксичности данных препаратов показала, что краситель прямой зелёный обладает выраженной токсичностью для клеток Vero, в результате чего индекс селективности препарата был ниже 1 (табл. 1). Интересно, что среди всех исследованных азосоединений только чёрные красители обладали способностью подавлять репликацию SARS-CoV-2 и при этом не были токсичными для клеток при максимальной исследованной дозе 200 мкМ (см. табл. 1).

Для подтверждения вовлечённости трансферринового рецептора в процесс ингибирования вирусной репликации в присутствии чёрных красителей нами проведено исследование поглощения культурой клеток Vero ионов железа с использованием хемосенсора HMRhoNox-M. Следует отметить, что диметилсульфоксид, использованный как растворитель для приготовления стоковых растворов красителей, в дозе 5% практически не влиял на поглощение клетками железа. Репрезентативные изображения пар лунок представлены на рис. 3. Видно, что в лунках без добавления хемосенсора (0) практически не выявляются споты, окрашенные оранжевым. Изучено ингибирование поглощения железа для 100 мкМ красителей

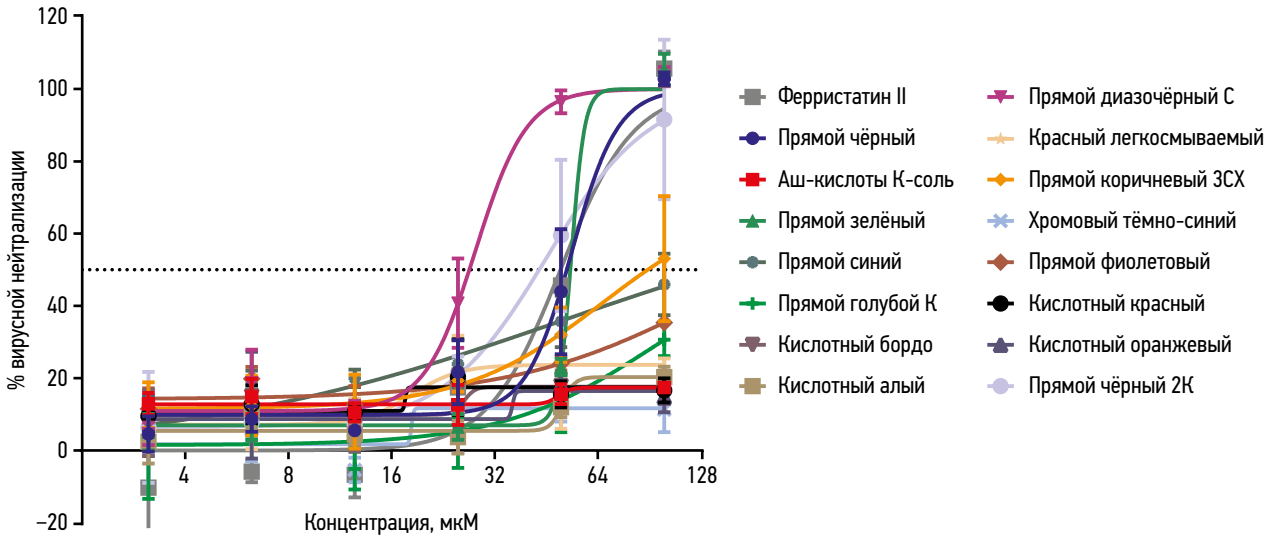
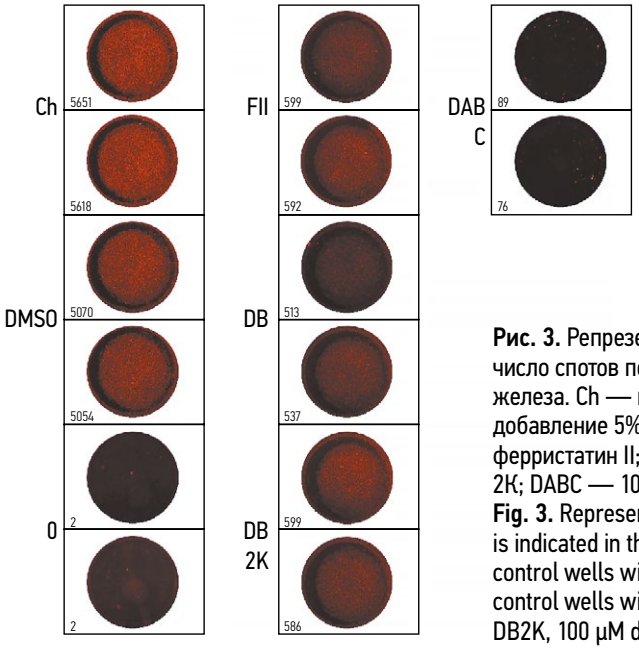


Рис. 2. Ингибирование репликации SARS-CoV-2 в клетках Vero с использованием исследуемых соединений. Указан % подавления вирусной инфекции при соответствующих концентрациях субстанций путём выявления антигена RBD в клетках с помощью клеточного иммуноферментного анализа.
Fig. 2. Inhibition of SARS-CoV-2 replication in Vero cells by the study compounds. The indicated virus suppression (in %) at the corresponding concentrations of substances is determined by detecting the RBD antigen in cells using cellular enzyme immunoassay.

Таблица 1. Характеристика наиболее эффективных соединений по их противовирусной, цитотоксической активности и способности к ингибированию захвата железа клетками
Table 1. Antiviral and cytotoxic activity and ability of the most effective compounds to inhibit iron uptake by cells

Название	IC_{50}, мкМ (нейтрализация)	CC_{50}, мкМ (цитотоксичность)	SI (индекс селективности)	% ингибирования захвата железа
Ферристатин II	51,2	>200	>3,9	86±3
Прямой чёрный	53,7	>200	>3,7	87±3
Прямой зелёный	53,6	29,1	<1	н/д
Прямой диазочёрный С	28,2	>200	>7,1	94±3
Прямой чёрный 2К	45,3	>200	>4,4	85±3

Примечание. н/д — нет данных.



[ферристатина II (86±3%), прямого чёрного (87±3%), прямого чёрного 2К (85±3%) и прямого диазочёрного С (94±3%)], которые нетоксичны для клеток (см. табл. 1). Поскольку именно последнее соединение обладало наиболее выраженным вирус-ингибирующим эффектом, вполне резонно предположить, что подавление вирусной репродукции связано с нарушением функционирования TfR1.

Рис. 3. Репрезентативные изображения пар лунок (в левом нижнем углу указано число спотов по каналу для Cy3) после визуализации захвата клетками Vero железа. Ch — контрольные лунки с хемосенсором 1 мкМ HMRhoNox-M; DMSO — добавление 5% DMSO; 0 — контрольные лунки без хемосенсора; FII — 100 мкМ ферристатин II; DB — 100 мкМ прямой чёрный; DB2K — 100 мкМ прямой чёрный 2К; DABC — 100 мкМ прямой диазочёрный С.
Fig. 3. Representative images of well pairs (the number of spots per Cy3 channel is indicated in the lower left corner) after visualization of iron uptake by Vero cells. Ch, control wells with chemosensor 1 μM HMRhoNox-M; DMSO, with added 5% DMSO; 0, control wells without chemosensor; FII, 100 μM ferristatin II; DB, 100 μM direct black; DB2K, 100 μM direct black 2K; DABC, 100 μM direct diazo black C.

ОБСУЖДЕНИЕ

TfR1 играет ключевую роль в гомеостазе B- и T-клеток, поскольку он способствует усвоению железа, необходимого для пролиферации, дифференцировки и функционирования этих иммунных клеток [17]. Правильная работа TfR1 обеспечивает иммунокомпетентные клетки достаточным количеством железа для их метаболических потребностей, в то время как его дисфункция может привести к иммунодефициту, например, к нарушению выработки антител и другим иммунологическим проблемам. Кроме того, известно, что опухолевые клетки характеризуются гиперэкспрессией TfR1, и его ингибирование с помощью различных воздействий является перспективной терапевтической стратегией при лечении рака [18–20].

В настоящей работе рассматривались низкомолекулярные ингибиторы TfR1 в контексте их противовирусной активности, поскольку широкий спектр человеческих и зоонозных вирусов могут проникать в клетки посредством взаимодействия с TfR1 и другими факторами переноса железа. За последние 15 лет опубликован ряд статей, посвящённых результатам исследований TfR1 в качестве мишени воздействия на различные вирусы, включая вирус иммунодефицита человека [21], вирус бешенства [22], вирус Эпштейна–Барр [23], вирус гепатита C [24, 25] и другие [10]. Соответственно, поиск путей блокировки проникновения вируса через TfR1 представляет собой многообещающую стратегию для терапии респираторных вирусных инфекций, включая грипп, COVID-19 и другие острые респираторные вирусные инфекции.

Ранние скрининговые исследования выявили два соединения небольшого размера (NCI11079 и NCI306711), оказывающие значительное ингибирующее действие на Tf-опосредованное поглощение железа клетками HeLa. Соединение NCI306711 нацелено на TfR1, индуцируя его интернализацию и деградацию, и было названо «ферристатином» из-за его необычных свойств ингибировать транспорт железа через холестерин-зависимый путь [26]. Другая небольшая молекула, ферристатин II (NSC8679), действует сходным образом и разрушает TfR1 через нистатин-чувствительный путь липидного рафта [27]. В наших исследованиях было доказано, что ферристатин II ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero-CCL81 за счёт того, что вирус, в отсутствие TfR1, остаётся прикреплённым к мембране клетки за счёт связывания с рецептором ACE2, но при этом не может проникнуть в клетку и вызвать продуктивную инфекцию [13]. Однако использование самого ферристатина II в медицинской практике невозможно, поскольку, во-первых, в результате его метаболизма образуется бензидин, который является канцерогеном, повышающим вероятность развития различных форм раковых опухолей, а во-вторых, имеет чёрную окраску, что малоприемлемо для лекарственного препарата.

Проведённый в настоящем исследовании анализ противовирусной активности ряда азосоединений, структурно схожих с ферристатином II, показал, что только чёрные красители обладали селективным действием в отношении SARS-CoV-2, при этом не проявляя цитотоксических свойств. Сопоставление структур этих азосоединений выявило общие закономерности: присутствие в молекуле порядка четырёх кислотных группировок (сульфогруппы) на концах молекулы и небольшой жёсткий плоский линкер (бензидин), который их соединяет. Для минимизации канцерогенных свойств данных соединений может быть предложен ряд новых соединений, у которых бензидин будет заменён на менее токсичные тетраметилбензидин и диаминоантрахинон. Кроме того, для дальнейшей модификации молекул и поиска наиболее оптимальной структуры предлагается заменить сульфогруппы на карбоксильные. На следующем этапе будут разрабатываться методы синтеза, выделения и очистки требуемых веществ, с последующей оценкой их токсических и вирус-ингибирующих свойств как в отношении SARS-CoV-2, так и в отношении вирусов гриппа A и аденовирусов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование позволило выявить ключевые структурные закономерности, определяющие противовирусную активность прямых азокрасителей — аналогов ферристатина II — в отношении SARS-CoV-2. Установлено, что наиболее эффективные соединения характеризуются наличием плоского бензидинового линкера и нескольких сульфогрупп. Важным результатом является демонстрация того, что противовирусный эффект данных соединений коррелирует с ингибированием захвата железа клетками, что подтверждает гипотезу о вовлечении TfR1 в механизм их действия. При этом некоторые красители (прямой диазочёрный C, прямой чёрный) проявили высокую вирус-ингибирующую активность без выраженной цитотоксичности. Полученные данные формируют фундамент для целенаправленного дизайна новых, более безопасных производных. Для минимизации рисков, связанных с канцерогенностью бензидина, предложена его замена на тетраметилбензидин или диаминоантрахинон, а также модификация кислотных групп. Таким образом, работа открывает перспективы создания на основе выявленных фармакофоров новых ингибиторов TfR1, которые могут стать основой для разработки противовирусных препаратов с новым механизмом действия, направленным на нарушение взаимодействия вирусных белков с трансферриновым рецептором.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Приложение 1. Перечень азосоединений, использованных в настоящем исследовании. doi: 10.17816/CI695474-4389425

Вклад авторов. Е.В. Литасова — определение концепции, разработка методологии, написание черновика рукописи; В.А. Матюшенко — администрирование проекта, проведение исследования, пересмотр и редактирование рукописи; А.В. Соколов — определение концепции, разработка методологии, проведение исследования, визуализация, написание черновика рукописи; Д.А. Меженская — проведение исследования, анализ данных, визуализация; Л.В. Мызников — проведение исследования, обеспечение исследования, анализ данных; Н.Б. Соколова — разработка методологии, обеспечение исследования, анализ данных; Н.П. Горбунов – проведение исследования, обеспечение исследования, анализ данных; Ю.М. Берсон — проведение исследования, обеспечение исследования, анализ данных; А.Я. Рак — разработка методологии, проведение исследования, анализ данных; И.Н. Исакова-Сивак — определение концепции, написание черновика рукописи, руководство исследованием, привлечение финансирования. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Не применимо

Источники финансирования. Исследование проведено с использованием денежных средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FGWG-2025-0026). Министерство науки и высшего образования Российской Федерации не участвовало в организации, планировании и проведении исследования, сборе, хранении, анализе и интерпретации данных, подготовке рукописи и принятии решения о её публикации, а также в осуществлении надзора за исследованием. Финансирующая организация не устанавливала ограничений на использование данных и распространение результатов исследования.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. В настоящей работе использованы впервые собранные сведения.

Доступ к данным. Авторы предоставляют доступ к данным, полученным при подготовке настоящей статьи, по запросу.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Рукопись направлена в редакцию журнала в инициативном порядке. В рецензировании участвовали член редакционной коллеги и внешний рецензент.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplement 1: The list of azo compounds used in the present study. doi: 10.17816/CI695474-4389425

Author contributions: E.V. Litasova: conceptualization, methodology, writing—original draft; V.A. Matyushenko: project administration, investigation, writing—review & editing; A.V. Sokolov: conceptualization, methodology, investigation, visualization, writing—original draft; D.A. Mezhenskaia: investigation, formal analysis, visualization; L.V. Myznikov: investigation, resources, formal analysis; N.B. Sokolova: methodology, resources, formal analysis; N.P. Gorbunov: investigation, resources, formal analysis; Yu.M. Berson: investigation, resources, formal analysis; A.Ya. Rak: methodology, investigation, formal analysis; I.N. Isakova-Sivak: conceptualization, writing—original draft, supervision, funding acquisition. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: Not applicable.

Funding sources: The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FGWG-2025-0026). The Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation was not involved in the study organization, planning, execution, or supervision; data collection, storage, analysis, or interpretation; manuscript preparation, making the decision to submit it for publication, nor in the supervision of the study. The funding source imposed no restrictions on data usage or the dissemination of study findings.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: All the data are available upon reasonable request.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer-review: This article was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved a member of the editorial board and an external reviewer.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Pahwa R, Goyal A, Jialal I. Chronic inflammation. [Updated 2023 Aug 7]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/

2. Chavda VP, Feehan J, Apostolopoulos V. Inflammation: The Cause of All Diseases. *Cells*. 2024;13(22):1906. doi: 10.3390/cells13221906 EDN: DNKUYB

3. Guo Q, Qian C, Wang X, Qian ZM. Transferrin receptors. *Exp Mol Med*. 2025;57(4):724–732. doi: 10.1038/s12276-025-01436-x EDN: TZCTVI

4. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(11):2137–2143. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.007

5. Alim T, Yang B, Zhang Y, et al. Elevated transferrin receptor 1 promoting B-cell autoimmunity in systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol*. 2025;158:114804. doi: 10.1016/j.intimp.2025.114804

6. Wang Z, Yin W, Zhu L, et al. Iron drives T helper cell pathogenicity by promoting RNA-binding protein PCBP1-mediated proinflammatory cytokine Production. *Immunity*. 2018;49(1):80–92.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2018.05.008

7. Aba Ü, Maslak İC, İpşir C, et al. A novel homozygous germline mutation in transferrin receptor 1 (TfR1) leads to combined immunodeficiency and provides new insights into iron-immunity axis. *J Clin Immunol*. 2024;44(2):55. doi: 10.1007/s10875-024-01658-0 EDN: AQLFUF

8. Li L, Xia Y, Yuan S, et al. Iron deprivation restrains the differentiation and pathogenicity of T helper 17 cell. *J Leukoc Biol*. 2021;110(6):1057–1067. doi: 10.1002/JLB.3MA0821-015R EDN: MWKMPZ

9. Wang W, Ma Z, Feng X, et al. TfR1 mediated iron metabolism dysfunction as a potential therapeutic target for osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2024;26(1):71. doi: 10.1186/s13075-024-03304-x EDN: LYSIKK

10. Wessling-Resnick M. Crossing the iron gate: why and how transferrin Receptors Mediate Viral Entry. *Annu Rev Nutr*. 2018;38:431–458. doi: 10.1146/annurev-nutr-082117-051749

11. Mazel-Sanchez B, Niu C, Williams N, et al. Influenza A virus exploits transferrin receptor recycling to enter host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(21):e2214936120. doi: 10.1073/pnas.2214936120 EDN: FVLWVW

12. Liao Z, Wang C, Tang X, et al. Human transferrin receptor can mediate SARS-CoV-2 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024;121(10):e2317026121. doi: 10.1073/pnas.2317026121 EDN: CQDNGM

13. Sokolov A, Isakova-Sivak I, Grudinina N, et al. Ferristatin II efficiently inhibits SARS-CoV-2 replication in Vero cells. *Viruses*. 2022;14(2):317. doi: 10.3390/v14020317 EDN: ODCJTD

14. Xiao Y, Wang L, Fang SS, et al. Direct blue 53, a biological dye, inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking ACE2 and spike interaction in vitro and in vivo. *Virology*. 2023;586:105–114. doi: 10.1016/j.virol.2023.07.006 EDN: FZFAPX
15. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro*. 1988;2(1):1–6. doi: 10.1016/0887-2333(88)90030-6
16. Niwa M, Hirayama T, Okuda K, Nagasawa H. A new class of high-contrast Fe(II) selective fluorescent probes based on spirocyclized scaffolds for visualization of intracellular labile iron delivered by transferrin. *Org Biomol Chem*. 2014;12(34):6590–6597. doi: 10.1039/c4ob00935e EDN: YEKPKB
17. Ni S, Yuan Y, Kuang Y, Li X. Iron Metabolism and immune regulation. *Front Immunol*. 2022;13:816282. doi: 10.3389/fimmu.2022.816282
18. Yan M, Chen X, Li X, et al. Transferrin receptor-targeted immunostimulant for photodynamic immunotherapy against metastatic tumors through *β*-catenin/CREB interruption. *Acta Pharm Sin B*. 2024;14(9):4118–4133. doi: 10.1016/j.apsb.2024.05.030 EDN: FOJORE
19. Neiveyans M, Melhem R, Arnoult C, et al. A recycling anti-transferrin receptor-1 monoclonal antibody as an efficient therapy for erythroleukemia through target up-regulation and antibody-dependent cytotoxic effector functions. *MAbs*. 2019;11(3):593–605. doi: 10.1080/19420862.2018.1564510
20. Pina A, Mastrantuono E, Silva M, et al. Transferrin receptor 1-targeted polymersomes therapy for colorectal cancer. *Mater Today Bio*. 2025;34:102263. doi: 10.1016/j.mtbio.2025.102263
21. Al-Muffti AS, Kiarie IW, Tőzsér J, Mahdi M. Modulation of transferrin receptor by HIV-2. *Virol J*. 2025;22(1):382. doi: 10.1186/s12985-025-02987-1
22. Wang X, Wen Z, Cao H, et al. Transferrin receptor protein 1 Is an Entry factor for rabies virus. *J Virol*. 2023;97(2):e0161222. doi: 10.1128/jvi.01612-22 EDN: XXJVHZ
23. Martínez LE, Daniels-Wells TR, Guo Y, et al. Targeting TfR1 with the ch128.1/IgG1 antibody Inhibits EBV-driven lymphomagenesis in immunosuppressed mice bearing EBV$^+$ human primary B-cells. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(9):1592–1602. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0074 EDN: RIMANS
24. Haberger V, Elgner F, Roos J, et al. Regulation of the transferrin receptor recycling in hepatitis C virus-replicating cells. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:44. doi: 10.3389/fcell.2020.00044 EDN: NZTFPL
25. Martin DN, Uprichard SL. Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10777–10782. doi: 10.1073/pnas.1301764110
26. Horonchik L, Wessling-Resnick M. The small-molecule iron transport inhibitor ferristatin/NSC306711 promotes degradation of the transferrin receptor. *Chem Biol*. 2008;15(7):647–653. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.05.011
27. Byrne SL, Buckett PD, Kim J, et al. Ferristatin II promotes degradation of transferrin receptor-1 in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013;8(7):e70199. doi: 10.1371/journal.pone.0070199

ОБ АВТОРАХ

*** Исакова-Сивак Ирина Николаевна,** д-р биол. наук, чл.-кор. РАН;
адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12;
ORCID: 0000-0002-2801-1508;
eLibrary SPIN: 3469-3600;
e-mail: isakova.sivak@iemspb.ru

Литасова Елена Викторовна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0002-0999-8212;
eLibrary SPIN: 5568-8939;
e-mail: llitasova@mail.ru

Матюшенко Виктория Аркадьевна;
ORCID: 0000-0002-4698-6085;
eLibrary SPIN: 1857-1769;
e-mail: matyshenko@iemspb.ru

Соколов Алексей Викторович, д-р биол. наук;
ORCID: 0000-0001-9033-0537;
eLibrary SPIN: 7427-7395;
e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Меженская Дарья Андреевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-6922-7682;
eLibrary SPIN: 5799-8802;
e-mail: dasmez@mail.ru

Мызников Леонид Витальевич, д-р хим. наук, доцент;
ORCID: 0000-0002-9231-5792;
e-mail: myznikov_lv@mail.ru

Соколова Наталья Борисовна, канд. хим. наук, доцент;
ORCID: 0000-0002-7355-5184;
eLibrary SPIN: 5155-2743;
e-mail: nsokolova@inbox.ru

Горбунов Николай Петрович;
ORCID: 0000-0003-4636-0565;
eLibrary SPIN: 6289-7281;
e-mail: niko_laygo@mail.ru

AUTHORS' INFO

*** Irina N. Isakova-Sivak,** Dr. Sci. (Biology), corresponding member of the Russian Academy of Sciences;
address: 12 Akademika Pavlova st, Saint Petersburg, Russia, 197022;
ORCID: 0000-0002-2801-1508;
eLibrary SPIN: 3469-3600;
e-mail: isakova.sivak@iemspb.ru

Elena V. Litasova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0002-0999-8212;
eLibrary SPIN: 5568-8939;
e-mail: llitasova@mail.ru

Victoria A. Matyushenko;
ORCID: 0000-0002-4698-6085;
eLibrary SPIN: 1857-1769;
e-mail: matyshenko@iemspb.ru

Alexey V. Sokolov, Dr. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-9033-0537;
eLibrary SPIN: 7427-7395;
e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Daria A. Mezhenskaia, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-6922-7682;
eLibrary SPIN: 5799-8802;
e-mail: dasmez@mail.ru

Leonid V. Myznikov, Dr. Sci. (Chemistry), Assistant Professor;
ORCID: 0000-0002-9231-5792;
e-mail: myznikov_lv@mail.ru

Natalia B. Sokolova, Cand. Sci. (Chemistry), Assistant Professor;
ORCID: 0000-0002-7355-5184;
eLibrary SPIN: 5155-2743;
e-mail: nsokolova@inbox.ru

Nikolay P. Gorbunov;
ORCID: 0000-0003-4636-0565;
eLibrary SPIN: 6289-7281;
e-mail: niko_laygo@mail.ru

Берсон Юлия Михайловна;
ORCID: 0000-0003-0548-3745;
eLibrary SPIN: 5562-1057;
e-mail: juletschka.ber@gmail.com
Рак Александра Яковлевна, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-5552-9874;
eLibrary SPIN: 9282-9259;
e-mail: alexandrak.bio@gmail.com

Yulia M. Berson;
ORCID: 0000-0003-0548-3745;
eLibrary SPIN: 5562-1057;
e-mail: juletschka.ber@gmail.com
Alexandra Ya. Rak, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-5552-9874;
eLibrary SPIN: 9282-9259;
e-mail: alexandrak.bio@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author