

ՎԻՐՈՒՍԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

ՀՏԴ 27.88:578

DOI: 10.54503/0321-1339-2022.122.1-49

Է. Ա. Արաբյան

Ապիզենինի և գենիստեինի սինթեզի հակավիրուսային ազդեցությունը խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի *in vitro* վարակի վրա

(Ներկայացված է ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ Ռ. Մ. Հարությունյանի կողմից 28/II 2022)

Բանալի բառեր. *խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուս, ապիզենին, գենիստեին, հակավիրուսային ակտիվություն, սինթեզի զրկում:*

Ներածություն: Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսը (ԽԱԺՎ) ընտանի և վայրի խոզերին վարակող սուր հեմոռագիկ հիվանդության հարուցիչ է, որն ունի բարձր հիվանդացություն և մահացություն: ԽԱԺՎ-ն երկշղթա ԴՆԹ պարունակող թաղանթավոր վիրուս է, որը պատկանում է *Asfarviridae* ընտանիքին [1]: ԽԱԺՎ-ն առաջացնում է մինչև 100 % մահացություն: Տվյալ հարուցչի դեմ առկա չէ որևէ պատվաստանյութ, այդ իսկ պատճառով հիմնավորված է բնական և արհեստական միացությունների հակավիրուսային իրականացումը ԽԱԺՎ-ի նկատմամբ [2, 3]: Ավելին, վերջին շրջանում, ներառյալ Հայաստանում, ընդգծվում են հակավիրուսային միացությունների մշակման կարևորությունն ու հրատապությունը:

Հակավիրուսային դեղամիջոցների հայտնաբերման լաբորատորիայում հայտնաբերվել է բուսական ծագման ապիզենինի և գենիստեինի (ֆլավոնոիդներ) հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը, որն արտահայտված է, համապատասխանաբար, վարակի վաղ և միջանկյալ փուլերում [4, 5]: Բուսական ծագման միացությունները՝ ֆլավոնոիդները, սապոնինները, անտոցիանները, երկրորդային մետաբոլիտներ են, որոնք ճնշում են վիրուսային վարակը վիրուսի կենսական ցիկլի տարբեր փուլերում [6]: Նկարագրված է մի շարք բուսական մզվածքների հակավիրուսային

ակտիվությունը, որտեղ առկա ակտիվ բաղադրիչները ցուցաբերում են համապատասխան ազդեցություն: Մզվածքի հակավիրուսային ակտիվության որոշումից հետո քրոմատոգրաֆիայի մեթոդներով անջատվում են տարբեր ֆրակցիաներ կամ առանձին բաղադրիչներ, որոնց հակավիրուսային ակտիվությունը որոշվում է առանձին: Արդյունքում հայտնաբերվում է էքստրակտի ակտիվ ֆրակցիան, որն ունի հակավիրուսային էֆեկտ:

Առկա են բազմաթիվ աշխատանքներ, որոնք ապացուցում են նյութերի համադրության առավել բարձր ակտիվությունը համեմատած նրանց անկախ ազդեցության: Որպես օրինակ հարկ է նշել յոկովանոլը և սվերտիսինը՝ *Ohwia caudata* բույսի մզվածքից, ցուցաբերում են սիներգիզմ գրիպի վիրուսի դեմ: Ֆլավոնների և ֆլավոնոնների զուգակցությունները ցուցաբերում են արտահայտված հակավիրուսային ազդեցություն հերպես վիրուսի (HSV-1) դեմ: Կան նաև տվյալներ այն մասին, որ պոլիֆենոլներով հարուստ մզվածքները ցուցաբերում են հակավիրուսային ակտիվություն կարմրախտի վիրուսի դեմ [7-9]: Այսպիսով, բազմաթիվ համոզիչ տվյալներ վկայում են բուսական ծագման նյութերի համատեղ մշակման արդյունավետությունը: Քանի որ մեր նախորդ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ապիգենինն ու գենիստեինն ունեն հակավիրուսային բարձր ազդեցություն ԽԱԺՎ վարակի տարբեր փուլերի վրա, մենք ենթադրել ենք, որ վարակված բջիջների համատեղ մշակումը ապիգենինի և գենիստեինի տարբեր կոնցենտրացիաներով պետք է ունենա հակավիրուսային սիներգիստիկ ազդեցություն: Հետևաբար՝ այս աշխատանքի նպատակն էր հետազոտել ապիգենինի և գենիստեինի համատեղ ազդեցությունը ԽԱԺՎ-ով վարակված բջիջների վրա:

Մեթոդներ: *Բջջային գծեր, վիրուսային շտամներ, աճեցման պայմաններ:* Հետազոտությունների համար օգտագործվել է ԽԱԺՎ BA71V լաբորատոր մոդելը: Որպես պերմիսիվ բջջային համակարգ օգտագործվել է կանաչ կապիկի երիկամի Vero վերահյուսվող բջջային գիծը: Բջիջներն աճեցվել են EMEM սննդային միջավայրի (Eagle's modified essential medium-Lonza), L-glutamine հավելմամբ (Lonza) 2 mM, բենզիլպենիցիլին 100 միավոր/մլ (Sigma-Aldrich, Germany) և ստրեպտոմիցին 100 մկգ/մլ (Sigma-Aldrich, Germany) և ցլի սաղմնային շիճուկի (Fetal bovine serum-EuroClone) օգտագործմամբ: Բջիջներն աճեցվել են բջջային ինկուբատորում 37°C և 5% CO₂ 85% խոնավության պայմաններում:

Ապիգենինի և գենիստեինի թունաբանական հետազոտություն: Նախքան ապիգենինի, գենիստեինի և նրանց կոմբինացիաների հակավիրուսային ակտիվության հետազոտումը, որոշվել է նրանց թունաբանությունը Vero բջջային գծի վրա: Հետազոտվող կոնցենտրացիաները

բերված են աղյուսակ 1-ում: Նյութերը լուծվել են DMSO-ում: Բջջային կուլտուրայում DMSO-ի կոնցենտրացիան ցածր է 1%-ից:

Vero բջիջները կուլտիվացվել են 96-ակոսանի ավսետում (20.000 բջիջ/ակոս): Ապիգենինի և զենիստեինի զուգակցվող կոնցենտրացիաներն ավելացվել են Vero բջջային զծի մոնոշերտին և ինկուբացվել 24 ժամվա ընթացքում, որից հետո բջիջները ներկվել են MTT մեթոդով: Այնուհետև ընտրվել են նյութերի այն զուգակցվող կոնցենտրացիաները, որոնց ազդեցությամբ բջիջների կենսունակությունը կազմում է 70% և բարձր: Սիներգիստիկ միավորը հաշվարկվել է Synergy finder ծրագրի օգնությամբ՝ LL4, ZIP պարամետրերի և Bliss ալգորիթմի կիրառմամբ՝ <https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/20220309103143305671/>: Այսպես, սիներգիստիկ միավորի -10-ից ցածր միավորը մասնանշում է անտագոնիստիկ ազդեցությունը -10-ից +10 արժեքը ցույց է տալիս համակցության ադդիտիվ ազդեցությունը, +10-ից բարձր միավորը վկայում է սիներգիզմի մասին:

Բջջատոքսիկության փորձարկումները կատարվել են MTT գունաչափական մեթոդով:

Նյութերի կոմբինատիվ ազդեցության հակավիրուսային հետազոտություն: Թունաբանական հետազոտության արդյունքում ստացված տվյալների հիման վրա ընտրվել են ոչ տոքսիկ կոմբինացիաներ հակավիրուսային հետազոտության համար: Vero բջիջները կուլտիվացվել են 24-ակոսանի ավսետներում (100.000 բջիջ/ակոս), 24 ժամ անց վարակվել են ԽԱԺՎ BA71V շտամով 0.2 TCID₅₀/մլ և մշակվել ապիգենինի և զենիստեինի համապատասխան զուգակցվող կոնցենտրացիաներով, որից 24 ժամ անց վերնստվածքը հավաքվել և տիտրվել է Ռիդ-Մյունխի նոսրացումների մեթոդով:

Հակավիրուսային սիներգիստիկ միավորը հաշվարկվել է Synergy finder <https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/20220309103143305671/> ծրագրի օգնությամբ՝ LL4, ZIP պարամետրերի և Bliss ալգորիթմի կիրառմամբ:

Ռիդ-Մյունխի նոսրացումների մեթոդ: Վիրուսի քանակական որոշման մեթոդներից մեկը Ռիդ-Մյունխի նոսրացումների մեթոդն է: Նմուշը հաջորդաբար նոսրացվում է 10 անգամ՝ ստանալով լոգարիթմային -1; -2; -3; -4 lg տարբերակները: Այնուհետև 120 ժամ անց լուսային մանրադիտակի օգնությամբ որոշվում է վիրուսի ցիտոպաթիկ ազդեցության չափը բջջային զծի վրա, որի հիման վրա որոշվում է նյութի հակավիրուսային ակտիվությունը:

Վիրուցիդալ մեթոդ: Հետազոտված միացություններից ընտրվել է առավել արտահայտված սիներգիստիկ հակավիրուսային ազդեցու-

թյուն ցուցաբերած կոմբինացիա (ապիզենին, գենիստեին), որը փորձարկվել է վիրուցիդալ հետազոտության մեջ:

Նյութերի համակցության ազդեցությունն արտաբջջային ԽԱԺՎ վիրուսային մասնիկի վրա հետազոտելու նպատակով 50 մկՄ գենիստեինը, 50 մկՄ ապիզենինը, 3.15 մկՄ ապիզենինի և 3.15 մկՄ գենիստեինի զուգակցությունը սենյակային ջերմաստիճանում ինկուբացվել է արտաբջջային վիրուսային մասնիկների սուսպենզիայի հետ: Այնուհետև հեղուկը նստացվել է 96-ակոսանի ափսեում Vero բջջային գծի վրա ԽԱԺՎ BA71V շտամով 0.2 TCID₅₀/մլ, արդյունքում նյութը նստացվել է 20 անգամ, որպեսզի ունենա նվազագույն վիրուսատիկ ազդեցություն: Այնուհետև 24 ժամ անց վերնստվածքը հավաքվել և տիտրվել է Ռիդ-Մյունխի մեթոդով:

Արդյունքներ: *Ապիզենինի և գենիստեինի համատեղ մշակման ազդեցությունը Vero բջիջների կենսունակության վրա:* Բջջատոքսիկության հետազոտության արդյունքում ապիզենինի և գենիստեինի 5 կոմբինացիաներ նվազեցրին բջիջների կենսունակությունը՝ հանգեցնելով 70%-ից ցածր արժեքի: Մյուս կոնցենտրացիաներն էապես չազդեցին բջիջների կենսունակության վրա՝ ընդունելով 70%-ից բարձր արժեք (տվյալները ցուցադրված չեն:

Ինչպես ցույց տվեց սիներգիզմի հաշվարկային բանաձևը, ապիզենինի և գենիստեինի որոշ համակցություններ ցուցաբերեցին սիներգիստիկ, որոշ մասը՝ անտագոնիստիկ, մյուսները՝ ադդիտիվ ազդեցություն բջիջների կենսունակության տեսանկյունից (աղ. 1): Աղյուսակում ցույց են տրված ապիզենինի և գենիստեինի սիներգիստիկ միավորները: Բջիջների կենսունակության տեսանկյունից լավագույն սիներգիստիկ ազդեցությունը ցուցաբերեց ապիզենինի 25 մկՄ և գենիստեինի 50 մկՄ կոմբինացիան՝ ընդունելով սիներգիստիկ միավորի 10.9 արժեքը: Արտահայտված անտագոնիստիկ ազդեցություն ունեցավ ապիզենին 12.5 մկՄ, գենիստեին 12.5 մկՄ կոնցենտրացիան՝ ընդունելով սիներգիստիկ միավորի -17.6 արժեքը:

Ինչպես նշված է նկ. 1-ում, ապիզենինի (Ա) և գենիստեինի (Բ) հետազոտված բոլոր կոնցենտրացիաները չեն նվազեցնում բջիջների կենսունակությունը՝ պահպանելով կենսունակության բարձր արժեքներ:

Ապիզենինի և գենիստեինի համատեղ մշակման հակամԽԱԺՎ ազդեցությունը: Կենսունակության հետազոտության շրջանակներում հայտնաբերված թունավոր կոնցենտրացիաները դուրս մղվեցին հետագա հետազոտությունից, իսկ մյուսները հետազոտվեցին հակավիրուսային ազդեցության տեսանկյունից:

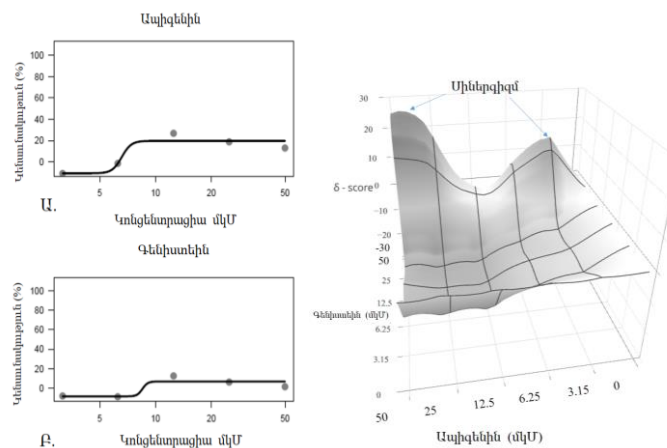
Նկ. 2-ից երևում է, որ ապիզենինը (Ա) և գենիստեինը (Բ) ցուցաբերում են կոնցենտրացիայից կախված հակավիրուսային ակտիվու-

թյուն՝ նվազեցնելով վիրուսային վարակը մինչև 94 և 91.65%, համապատասխանաբար:

Աղյուսակ 1

Ապիգենինի և գենիստեինի կոմբինատիվ ազդեցության սիներգիստիկ միավորների աղյուսակը

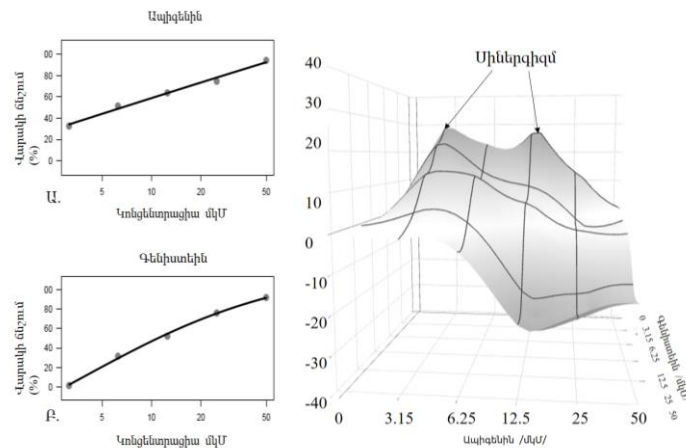
Ապիգենին							
Գենիստեին	Կոնցեն. մկՄ	0	50	25	12.5	6.25	3.15
	0	-	-	-	-	-	-
	50	-	7.66	10.9	-17.2	-10.7	0.61
	25	-	10.3	8.5	-4.6	-4.2	4.4
	12.5	-	-17.2	-17.2	-17.6	-10.6	-7.83
	6.25	-	-4.45	-4.45	-4.45	-2.54	-0.9
	3.15	-	-1.9	-8.7	-10.6	-2.08	1.6



Նկ. 1: Ապիգենինի և գենիստեինի ազդեցությունը բջիջների կենսունակության վրա: Ա) Ապիգենինի կոնցենտրացիայից կախված ազդեցությունը Vero բջջային զծի վրա: Բ) Գենիստեինի կոնցենտրացիայից կախված ազդեցությունը Vero բջջային զծի վրա: Գ) Ապիգենինի և գենիստեինի համակցված ազդեցությունը բջիջների կենսունակության վրա սիներգիստիկ դիագրամի տեսքով:

Սիներգիստիկ դիագրամից (նկ. 2, Գ) երևում է, որ ապիգենինի և գենիստեինի համակցությունները ցուցաբերում են անտագոնիստիկ, ադդիտիվ և սիներգիստիկ ազդեցություն:

Աղյուսակ 2-ում նշված են ապիզենինի և գենիստեինի համատեղ մշակման արդյունքում ստացված սիներգիստիկ միավորները: Միացությունների 8 համակցություն ցուցաբերեցին սիներգիստիկ ազդեցություն՝ ընդունելով սիներգիստիկ միավորի +10-ից բարձր արժեք: Ամենաբարձր սիներգիստիկ միավորը՝ 30.03, ընդունեց ապիզենին 3.15 մկՄ և գենիստեին 3.15 մկՄ համակցությունը:



Նկ. 2: Ապիզենինի և գենիստեինի հակաֆԱԺՎ ազդեցությունը: Ա) Ապիզենինի կոնցենտրացիայից կախված հակաֆԱԺՎ ազդեցությունը: Բ) Գենիստեինի կոնցենտրացիայից կախված հակաֆԱԺՎ ազդեցությունը: Գ) Ապիզենինի և գենիստեինի համակցված հակաֆԱԺՎ ազդեցությունը սիներգիստիկ դիագրամի տեսքով:

Հակավիրուսային հետազոտությունների արդյունքներից ելնելով՝ ընտրվեց 1 սիներգիստիկ կոմբինացիա՝ ապիզենին 3.15 մկՄ, գենիստեին 3.15 մկՄ, որն ուսումնասիրվեց վիրուցիդալ հետազոտության մեջ: Նյութերի զուգակցությունը վիրուցիդալ ազդեցություն չունեցավ:

Արդյունքների քննարկում: Տվյալ հետազոտությունը ցույց տվեց, որ ապիզենինի և գենիստեինի զուգակցությունները բջջային գծի կենսականության տեսանկյունից հիմնականում ադդիտիվ են (զումարային) կամ անտագոնիստիկ: Մինչդեռ այս նյութերի զուգակցություններից ութը ունեն սիներգիստիկ ազդեցություն ֆԱԺՎ-ի վրա: Այստեղից կարելի է եզրակացնել, որ նյութերի կոմբինատիվ մշակումն ուժեղացնում է տվյալ միացությունների հակաֆԱԺՎ ակտիվությունը: Հասկանալի

կան է, որ առավելագույն սիներգիստիկ ազդեցությունն ունենում է նյութերի ամենացածր կոնցենտրացիայով համակցությունը:

Աղյուսակ 2

Գենիստեինի և ապիգենինի կոմբինատիվ մշակման արդյունքում ստացված սիներգիստիկ միավորներ: Աստղանիշով նշված են սիներգիստիկ կոմբինացիաները

Ապիգենին							
Գենիստեին	Կոնցենտ. մկՄ	0	50	25	12.5	6.25	3.15
	0	-	-	-	-	-	-
	50	-	-8.4	-15.2	-22.2	-3.55	-1.53
	25	-	-16.4	-19.9	-23.5	-1.5	2.65
	12.5	-	-2.98	-2.8	4.93	12.8*	14.1*
	6.25	-	0.06	-3.91	7.76	12.1*	22.5*
	3.15	-	1.21	12.2*	28.8*	22.4*	30.03*

Քանի որ գրականությունից ապիգենինը հայտնի է որպես աուտոֆագիայի խթանիչ [10], իսկ գենիստեինը՝ ԽԱԺՎ տոպոիզոմերազի ինհիբիտոր, հայտնաբերված հակավիրուսային համակցության հակավիրուսային ակտիվությունը կարող է կապված լինել աուտոֆագիայի խթանման և վիրուսային տոպոիզոմերազ ֆերմենտի միաժամանակ արգելակման հետ: Լավագույն համակցությունը ցուցաբերում է վիրոսատիկ և ոչ վիրուցիդալ ակտիվություն, հետևաբար՝ այս միացությունների համակցությունը չի ազդում ԽԱԺՎ վիրուսային մասնիկի կառուցվածքի վրա:

Երախտագիտություն: Աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳՊԿ ասպիրանտների և երիտասարդ հայցորդների հետազոտությունների աջակցության ծրագրի ֆինանսական աջակցությամբ:

ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտ
e-mail: erik.arabyan@isec.am

Է. Ա. Արաբյան

Ապիգենինի և գենիստեինի սիներգիստիկ հակավիրուսային ազդեցությունը խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի *in vitro* վարակի վրա

Ներկայացված է ապիգենինի և գենիստեինի սիներգիստիկ ակտիվությունը խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի դեմ *in vitro*: Առավելագույն սիներգիստիկ

ակտիվությունը ցուցաբերում է ապիգենին 3.15 մկՄ, գենիստեին 3.15 մկՄ կոնցենտրացիոն համակցությունը, որը ցուցաբերում է վիրոսաստիկ և ոչ վիրուցիդալ ազդեցություն: Այս համակցությունը խոստումնալից է հետագա հետազոտությունների համար:

Յ. Ա. Արաբյան

Синергистическое антивирусное воздействие апигенина и генистеина на вирус африканской чумы свиней *in vitro*

Рассматривается синергистическое взаимодействие апигенина и генистеина против вируса африканской чумы свиней *in vitro*. Максимальный синергистический эффект достигается при комбинации апигенина 3.15 мкмоль и генистеина 3.15 мкмоль, которая оказывает виростатический, но не вируцидальный эффект и представляет интерес для дальнейших исследований.

E. A. Arabyan

Synergistic Action of Apigenin and Genistein on the African Swine Fever Virus Infection *in vitro*

In this study synergistic activity of apigenin and genistein against african swine fever virus is addressed. The maximal synergistic interaction was observed for apigenin 3.15 uM, genistein 3.15 uM. This combination has demonstrated virostatic but not virucidal activity. This combination has a potential for further investigations.

Գրականություն

1. Dixon L. K., Sun H., Roberts H. – Antiviral Res. 2019. V. 165. P. 34-41. doi:10.1016/j.antiviral.2019.02.018.
2. Zakaryan H., Revilla Y. – Vet Microbiol. 2016. V. 185. P. 15-19. doi:10.1016/j.vetmic.2016.01.016.
3. Zakaryan H. Porcine Viruses: From Pathogenesis to Strategies for Control. Caister Academics. 2019. 201 p.
4. Hakobyan A., Arabyan E., Avetisyan A. et al. – Arch Virol. 2016. V.161(12). P. 3445-3453. doi:10.1007/s00705-016-3061-y.
5. Arabyan E., Hakobyan A., Kotsinyan A. et al. – Antiviral Res. 2018. V. 156. P. 128-137. doi:10.1016/j.antiviral.2018.06.014.
6. Arabyan E., Kotsinyan A., Hakobyan A. et al. – Virus Res. 2019. V. 270. P. 197669. doi:10.1016/j.virusres.2019.197669.
7. Kwon E. B., Yang H. J., Choi J. G. et al. – Molecules. 2020. Sep. V. 24;25(19). P. 4387. doi: 10.3390/molecules25194387.
8. Amoros M. et al. – Journal of Natural Products. 1992. T. 55. №. 12. C. 1732-1740.
9. Morán-Santibañez K. et al. – Viruses. 2018. T. 10. № 9. C. 465.
10. Kim T. W., Lee H. G. – Int J Mol Sci. 2021. Dec. 15;22(24). P.13455. doi: 10.3390/ijms222413455. PMID: 34948250; PMCID: PMC8706813.