ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԷՐԻԿ ԱՐՄԵՆԻ ԱՐԱԲՅԱՆ

ԲՈՒՍԱԿԱՆ ԾԱԳՄԱՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՀԱԿԱՎԻՐՈՒՍԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՈՌԵՐԻ ԱՖՐԻԿՅԱՆ ԺԱՆՏԱԽՏԻ ՎԻՐՈՒՍԻ ԴԵՄ *IN VITRO*

Գ.00.03. – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2022

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY

ERIK ARMEN ARABYAN

ANTIVIRAL ACTIVITY OF PLANT-DERIVED COMPOUNDS AGAINST AFRICAN SWINE VIRUS *IN VITRO*

Synopsis

of Dissertation Submitted for the Degree
of Candidate of Biological Sciences (Ph.D.) in the Field of
03.00.03. “Molecular and Cellular Biology”

YEREVAN – 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝	կ.գ.թ. Հովակիմ Սարգսի Զաքարյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	կ.գ.դ., պրոֆ. Տիգրան Կամոյի Դավթյան կ.գ.թ. Անահիտ Միքայելի Սեդրակյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022 թ. հուլիսի 19-ին, ժամը 14:00-ին, ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ 0014, ք. Երևան, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և http://molbiol.sci.am/ կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2022 թ. հունիսի 7-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու Զ.Ա. Խաչատրյան

Dissertation topic approved at the Scientific Council of the Institute of Molecular Biology NAS RA.

Scientific supervisor:	Ph.D. Hovakim Sargis Zakaryan
Official opponents:	D.Sc., Prof. Tigran Kamo Davtyan PhD., Anahit Sedrakyan
Leading organization:	Yerevan State University

The defense of the dissertation will be held on 19 July 2022, at 14:00 at the session of the specialized council 042 acting in the Institute of Molecular Biology NAS RA (Hasratyan 7, 0014, Yerevan, RA).

The dissertation is available at the library of the Institute of Molecular Biology NAS RA and at the website http://www.molbiol.sci.am.

Synopsis was sent out on 7 June 2022.

Scientific secretary of the specialized council 042
PhD Z.A. Khachatryan

ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Աշխատանքի արդիականությունը

Խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսը (ԽԱԺՎ) երկշղթա ԴՆԹ պարունակող, թաղանթավոր վիրուս է, որը պատկանում է *Asfarviridae* ընտանիքին և վարակում է ընտանի և վայրի խոզերին՝ առաջացնելով սուր հեմոռագիկ հիվանդություն: Սույն հարուցիչը ի հայտ է բերում բարձր հիվանդացության և մահացության ցուցանիշ վարակված կենդանիների շրջանում և մեծ վտանգ է հանդիսանում գյուղատնտեսության համար (Galindo et al., 2019):

ԽԱԺ-ի համաճարակները տնտեսական մեծ հետևանք են թողնում այն երկրների վրա, որտեղ վարակը տարածվում կամ համարվում է էնդեմիկ: ՀակաԽԱԺՎ միացությունների հետազոտությունը ունի շատ կարևոր նշանակություն Հայաստանի համար: Համաձայն Հայաստանի վիճակագրական տարեգրքի տվյալների (2014 թվական)՝ մեր երկրում ԽԱԺ համաճարակի առաջին տարվա ընթացքում (2007/2008 թվական) խոզերի ընդհանուր գլխաքանակը կրճատվել է շուրջ 56%-ով: Կորուստների զգալի մասը բաժին է հասել անհատ կամ գյուղացիական տնտեսություններին: Գլխաքանակի անկումն իր ազդեցությունն է թողել մսամթերքի արտադրության վրա, որը նույն ժամանակահատվածում նվազել է 13300 տոննայից մինչև 7500-ի:

ԽԱԺՎ-ը, վարակելով ընտանի և վայրի խոզերին, նվազեցնում է խոզերի գլխաքանակը գյուղատնտեսական ֆերմաներում: Այս պահին առկա չէ ոչ պատվաստանյութ, ոչ հաստատված հակավիրուսային դեղամիջոց, որը հնարավոր է օգտագործել հիվանդության դեմ պայքար մղելու նպատակով: Հրապարակված են մի շարք աշխատանքներ՝ նվիրված պատվաստանյութերի և հակավիրուսային դեղերի մշակմանը, սակայն մինչ այժմ միջազգային գիտական հանրությունը համապարփակ լուծում չի գտել: Հետևաբար ԽԱԺՎ-ի դեմ պայքարի միակ միջոցը շարունակում է մնալ վարակված կենդանիների ոչնչացումը՝ վարակի հետագա տարածումը կանխելու նպատակադրմամբ:

Ատենախոսության մեջ հետազոտվել է 101 ֆլավոնոիդի հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը, որոնցից առանձնացվել են 4 բուսական ծագման միացություններ, որոնք ցուցաբերել են նշանակալի հակավիրուսային ազդեցություն ԽԱԺՎ-ի նկատմամբ in vitro: Դրանք են ապիգենինը, գենիստեինը, գենկվանինը և կեմպֆերոլը: Ընտրված նյութերը փորձարկվել են վիրուսաբանական տարբեր հետազոտություններում: Նշված 4 նյութերից՝ երեքի համար պարզաբանվել է դրանց ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմը մեխանիզմը (Hakobyan et al., 2016, Arabyan et al., 2018, Hakobyan et al., 2019, Arabyan et al., 2021):

ԽԱԺՎ-ի դեմ պայքարում բուսական ծագման միացությունների ընտրությունը և օգտագործման տեսլականը և առավելությունը սինթետիկ միացությունների նկատմամբ խարսխված է այն մտայնության վրա, որ ֆլավոնոիդներն ունեն ցածր ինքնարժեք, ունեն ցածր թունաբանանական ազդեցություն, կարող են օգտագործվել խոզերի կերի մեջ որպես կենսահավելում (Arabyan et al., 2019):

Նպատակը և խնդիրները

Հաշվի առնելով վերը շարադրվածը՝ սույն ատենախոսության նպատակն է բացահայտել հակախՍԱԺՎ ակտիվություն ունեցող նոր միացություններ, որոնք պատկանում են ֆլավոնոիդների ընտանիքին:

Նշված նպատակի իրականացման համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- Հետազոտել ֆլավոնոիդների գրադարանների հակավիրուսային ակտիվությունը ԽՍԱԺՎ-ի դեմ *in vitro*:
- Ուսումնասիրել բացահայտված հակախՍԱԺՎ միացությունների ազդեցության մեխանիզմները ավիրուլենտ շտամի վրա *in vitro*:
- Ուսումնասիրել ավիրուլենտ շտամի վրա բացահայտված հակախՍԱԺՎ միացությունների ազդեցությունը վիրուլենտ շտամի վրա *in vitro*:
- Ուսումնասիրել առավելագույն հակախՍԱԺՎ ազդեցություն ցուցաբերած միացությունների սիներգիստիկ փոխազդեցության հնարավորությունը:

Գիտական նորույթը և կիրառական նշանակությունը

Աշխատանքի նորարարությունը կայանում է նրանում, որ հայտնաբերված նյութերի հակախՍԱԺՎ ակտիվությունը նախկինում չի նկարագրվել, իսկ գենկվանինի համար առաջին անգամ նկարագրվել է հակավիրուսային ակտիվություն որևէ վիրուսի դեմ: Մեր հետազոտություններում հակախՍԱԺՎ ակտիվություն ցուցաբերած բուսական միացություններն ունեն ցածր թունաբանական ազդեցություն *in vitro*, միևնույն ժամանակ ցուցաբերում են հակավիրուսային ակտիվություն վիրուսային վարակի տարբեր փուլերում: Բուսական ծագման միացությունները հասանելի են և ունեն խոզի ինքնարժեքից ավելի ցածր գին, այդ իսկ պատճառով հիմնավորված է դրանց հետազոտումը հետագա առևտրայնացման տեսանկյունից:

Հետազոտությունն ունի մեծ կիրառական նշանակություն խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի բուժման տեսանկյունից: Անհրաժեշտ է ուսումնասիրել հայտնաբերված միացությունների կոմբինատիվ հակավիրուսային ակտիվությունը *in vitro* պայմաններում: *In vitro* հայտնաբերված միացությունները կարող են օպտիմիզացվել համակարգչային մոդելավորման և կառուցվածքի քիմիական մոդիֆիկացման ճանապարհով՝ թերապևտիկ ազդեցության ուժեղացման նպատակով: Վերջնարդյունքում in vitro հետազոտված և արտահայտված հակախՍԱԺՎ միացությունները և դրանց համակցությունները պետք է փորձարկվեն խոզերի վրա՝ որոշելով տվյալ միացությունների տոքսիկությունը, ֆարմակոդինամիկ ցուցիչները՝ յուրացումը, բաշխումը, մետաբոլիզմը, արտազատումը և հակախՍԱԺՎ ազդեցությունը:

Բարեհաջող անցած միացությունների *in vivo* փորձարկումները կարող են հաստատվել որպես դեղամիջոց:

Աշխատանքի փորձաքննությունը

Աշխատանքի դրույթները ներկայացվել և զեկուցվել են՝ «Երկրորդ համահայկական գիտական ֆորումին», 2017 թ., FEBS Advanced Lecture Course

“Current Advances in Pathogen Research” գիտաժողովին, 2019 թ., ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի սեմինարներում և գիտական խորհրդի նիստերում, 2019-2022 թթ.:

Հրապարակված գիտական աշխատանքները

Հետազոտության հիմնական արդյունքները հրատարակվել են 8 գիտական հոդվածների տեսքով, և 3 զեկույց միջազգային գիտաժողովների նյութերում:

Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը

Ատենախոսությունը շարադրված է համակարգչային տեքստի 101 էջի վրա, պարունակում է 32 նկար և 4 աղյուսակ, բաղկացած է «Ներածություն», «Գրական ակնարկ», «Նյութեր և մեթոդներ», «Արդյունքներ», «Արդյունքների քննարկում», «Ամփոփում», «Եզրակացություններ» և «Օգտագործված գրականություն» բաժիններից: Գրականության ցանկը ներառում է հայերեն և անգլերեն լեզուներով 159 աղբյուր:

ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Բոլոր հետազոտությունների համար օգտագործվել է 2 մոդել՝ Ա. լաբորատոր և Բ. բնական:

Ա. Բոլոր հետազոտությունները իրականացվել են *in vitro*: Որպես պերմիսիվ բջջային համակարգ՝ օգտագործվել է Vero վերահյուսվող բջջային գիծը՝ տրանսֆորմացված SV40 վիրուսով: Օգտագործվել է ԽԱԺՎ BA71V ավիրուլենտ լաբորատոր ադապտացված շտամը, որը բնական պայմաններում չի վարակում խոզերին: Բ. Որպես վարակի բնական մոդել՝ օգտագործվել է խոզերի ալվեոլար մակրոֆագերի առաջնային բջջային կուլտուրան PAM և ԽԱԺՎ Georgia 2007 և Armenia/07 վայրի շտամները: Բջիջները աճեցվել են DMEM սննդային միջավայրում:

Նախքան նյութերի հակավիրուսային ակտիվության հետազոտումը որոշվել է դրանց տոքսիկությունը Vero բջջային գծի վրա: Այս հետազոտությունը խիստ անհրաժեշտ է, քանի որ հակավիրուսային նյութը պետք է ճնշի վիրուսի ռեպլիկատիվ ցիկլի փուլերը՝ թողնելով բջիջները անվնաս:

Բջջատոքսիկության փորձարկումները կատարվել են 2 հիմնական կոլորիմետրիկ մեթոդներով՝ կրիստալ վիոլետով ներկում և MTT ներկում:

Վիրուսի քանակական որոշման համար կիրառվել է Ռիդ-Մյունխի նոսրացումների մեթոդը: Փորձից ստացված նմուշը հաջորդաբար նոսրացվել է 10 անգամ՝ ստանալով լոգարիթմային -1,-2,-3,-4 log նոսրացումներ: Այնուհետև 96 ժամ անց լուսային մանրադիտակի օգնությամբ կատարվել է վիրուսի բջջախտաբանական ազդեցության գնահատում բջջային գծի վրա, որի հիման վրա որոշվում է նյութի հակավիրուսային ակտիվությունը (Carrascosa et al, 2011):

Բոլոր նյութերի համար կատարվել է առաջնային հակավիրուսային հետազոտություն, ընտրվել են առավել ակտիվ հակաԽԱԺՎ միացությունները, որոնք օգտագործվել են կոնցենտրացիայից կախյալ, ժամ-կախյալ խարսխման և

ներթափանցման, վիրուցիդալ, վիրուսային գործարանների, հետազոտությունների համար:

Իմունոբլոտինգի հետազոտության շրջանակներում Vero բջիջները և ալվեոլար մակրոֆագերը աճեցվել են և վարակվել են վիրուսով, այնուհետև մշակվել են ուսումնասիրվող նյութերի տարբեր կոնցենտրացիաներով: Լիզատը հավաքվել է 16 ժամ անց և ենթարկվել SDS-PAGE գել էլեկտրոֆորեզի՝ օգտագործելով 8-16% պոլիակրիլամիդային գել (Bio-Rad) և էլեկտրոբլոտինգի միջոցով տեղափոխվել նիտրոցելյուլոզային ֆիլտրի (Whatman Schleider & Schuell) վրա: Իրականացվել է ինկուբացիա պերօքսիդազով կոնյուգացված երկրորդային հակամարմինների հետ:

ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը գնահատվել է կոմետ հետազոտության օգնությամբ (Tice et al., 2000, Freitas et al., 2016): Vero բջիջները վարակվել են Ba71V շտամով 5 TCID50/մլ և մշակվել 50 մկՄ գենիստեինով 1-14 ժամ, 8-14 ժամ և 13-14 ժամ ժամանակահատվածում: Որպես ստուգիչ՝ օգտագործվել են ինտակտ բջիջները, վիրուսով վարակված բջիջները, վիրուսով չվարակված, բայց գենիստեինով մշակված բջիջները: Նմուշների վիզուալիզացիան իրականացվել է ֆլուորեսցենտային մանրադիտակով (ZEISS, Germany), Comet Assay IV software (Perceptive Instruments, UK) ծրագրով: Կատարվել է 150 բջջի հաշվարկ յուրաքանչյուր նմուշում, որից հետո վերլուծվել է վնասված ԴՆԹ-ի մոլեկուլների 5%-ը:

Կատարվել է վիրուսային տոպոիզոմերազ II ֆերմենտի և գենիստեինի փոխազդեցության համակարգչային մոդելավորում: Ըստ կառուցվածքային հոմոլոգիայի՝ կառուցվել է ԽԱԺՎ-Տոպո II ֆերմենտի եռաչափ համակարգչային մոդելը ICM-PRO 3.8-7 ծրագրի օգնությամբ: Հետազոտության համար կառուցվել է ԽԱԺՎ-Տոպո II ֆերմենտի մոդելը *Saccharomyces cerevisiae* օրգանիզմի տոպոիզոմերազ II-ի բյուրեղային կառուցվածքի (PDB: 4GFH) հոմոլոգիայի օգնությամբ՝ ԽԱԺՎ-Տոպո II ֆերմենտի ամինաթթվային հաջորդականության համադրմամբ UniProtKB (ID: Q00942): Օգտագործվել են ամինաթթվային և ռենտգեն-կառուցվածքային տվյալների բազաները:

Վիրուսային գործարաններում ԴՆԹ-ի հետազոտության համար Vero բջիջները (300.000 բջիջ/ակոս) և մակրոֆագերը (200.000 բջիջ/ակոս) աճեցվել են ծածկապակիների վրա և վարակվել են Ba71V 0.5 TCID50/մլ և Arm/07 0.5 HADU50/մլ, վարակից 1 ժամ անց ավելացվել է 20 մկգ/մլ կեմպֆերոլ, այնուհետև 14 ժամ անց բջիջները ֆիքսվել են 96% էթանոլով և ներկվել են Շիֆֆի ռեագենտով և Ֆյոլգենի ներկանյութով: ԴՆԹ-ի քանակը չափվել է ցիտոմետրիկ եղանակով SMP 05 (Carl Zeiss, Germany) սարքով 575 նմ ալիքի երկարությամբ և ներկայացվել է օպտիկական խտության արժեքով:

Ուսումնասիրվել է կեմպֆերոլի ազդեցությունը աուտոֆագիայի խթանման վրա: Կեմպֆերոլի ազդեցությամբ աուտոֆագային վակուոլները հաշվարկվել են աուտոֆագիայի դետեկցիայի կիտով (ab139484, Abcam, United Kingdom):

Բոլոր փորձերը կատարվել են 3 անգամ, միմյանցից անկախ, վիճակագրական արժանահավատությունը գնահատվել է Student թեստով: $p<0.05$ գնահատվել է որպես արժանահավատ արդյունք:

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ

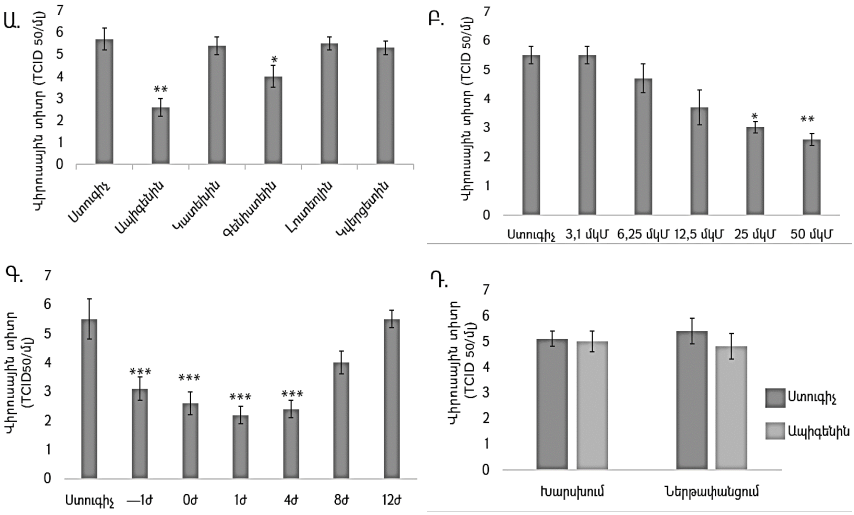
Ապիգենին

Ֆլավոնոիդների բջջատոքսիկություն

Հետազոտված ֆլավոնոիդների տարբեր կոնցենտրացիաները ցուցաբերել են ցիտոտոքսիկ ակտիվություն Vero բջիջների վրա, ընտրվել են նյութերի աշխատանքային կոնցենտրացիաները:

Միացությունների հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը BA71V շտամի վրա

Ֆլավոնոիդների առաջնային սկրինինգի արդյունքում առավելագույն հակավիրուսային ակտիվություն ցուցաբերել են ապիգենինը և գենիստեինը 50 մկՄ կոնցենտրացիաներով (նկ. 1Ա): Ապիգենինը նվազեցնում է ԽԱԺՎ տիտրը 5,5 log TCID50/մլ մինչև 2.6 log TCID50/մլ (P<0.01)՝ ճնշելով վարակը 99,99%:



Նկար 1. Ապիգենինի հակավիրուսային ակտիվությունը ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամի դեմ:

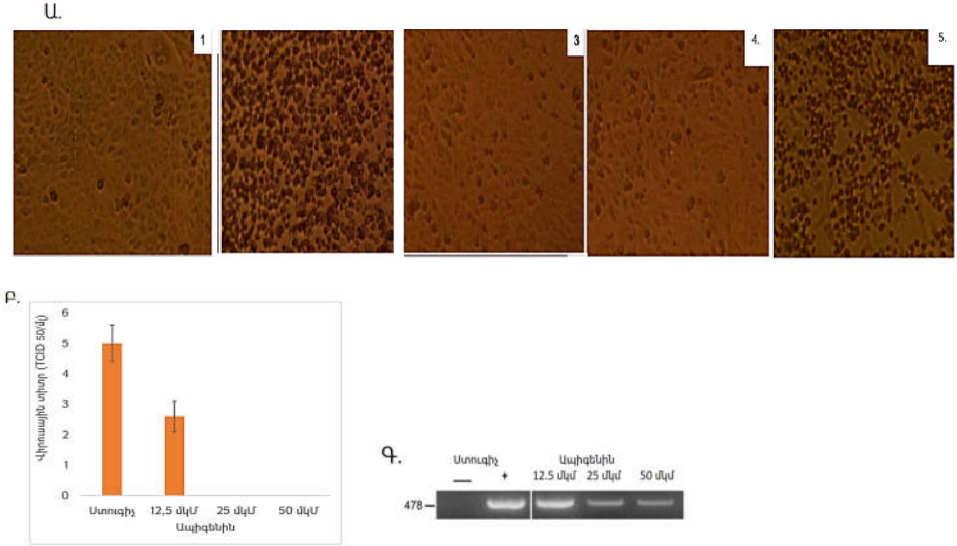
Ա. Ֆլավոնոիդների առաջնային հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը, Բ. Ապիգենինի կոնցենտրացիայից կախյալ ակտիվությունը, Գ. Ապիգենինի ժամ-կախյալ ակտիվությունը, Դ. Ապիգենինի ազդեցությունը ԽԱԺՎ վիրուսային մասնիկի խարսխման և ներթափանցման վրա: Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ *(P<0.05), **(P<0.02), ***(P<0.01):

Կոնցենտրացիայից կախյալ հակավիրուսային հետազոտությունը ցույց է տվել, որ BA71V շտամի վրա առավել արտահայտված հակավիրուսային ակտիվություն ունի ապիգենինի 50 մկՄ կոնցենտրացիան (P<0.02) (նկ. 1Բ): Ժամ-կախյալ հետազոտության արդյունքում պարզվել է, որ ապիգենինը առավելագույն

ակտիվություն դրսևորում է BA71V ԽԱԺՎ վարակի վաղ փուլերում վարակից 1 ժամ անց՝ նվազեցնելով վիրուսի տիտրը 5.5 log TCID50/մլ (control) արժեքից մինչև 2.2 log TCID50/մլ (P<0.01)՝ հանգեցնելով վարակի 99.99% ճնշման: Նմանատիպ արդյունքներ դիտվել են, երբ ապիգենինը ավելացվում էր վիրուսային վարակից -1, 0, 4 ժամ անց (P<0.01) (նկ. 1Գ): Ապիգենինը չի ազդում վիրուսային մասնիկի խարսխման և ներթափանցման վրա (նկ. 1Դ):

Երկարատև մշակում ապիգենինով

Մանրադիտակային զննումը թույլ է տվել նկատել, որ ապիգենինը զգալիորեն արգելակում է վիրուսի ցիտոպաթիկ ազդեցությունը բջիջների վրա (նկ. 2Ա):



Նկար 2. Ապիգենինի երկարատև մշակման հակավիրուսային ակտիվությունը ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամի դեմ:
Ա. Մանրադիտակային զննում՝ 1. Ստուգիչ, չվարակված Vero բջիջներ, 2. Վիրուսային ստուգիչ, ԽԱԺՎ վարակված բջիջներ, 3. ԽԱԺՎ վարակված բջիջներ, մշակված 50 մկՄ ապիգենինով, 4. ԽԱԺՎ վարակված բջիջներ, մշակված 25 մկՄ ապիգենինով, 5. ԽԱԺՎ վարակված բջիջներ, մշակված 12.5 մկՄ ապիգենինով, Բ. Ապիգենինով երկարատև մշակումից հետո վարակված բջիջների վերնստվածքի տիտրում, Գ. Անջատված ԴՆԹ-ից ՊՇՌ ռեակցիայի արդյունքներ:

Տիտրման և իմունոֆերմենտային մեթոդներով հեղուկում վիրուսային հարուցիչ չի հայտնաբերվել: Սակայն p72 վիրուսային գենի ՊՇՌ հետազոտությունը ցույց է տվել վիրուսային նուկլեինաթթվի քանակի զգալի նվազում (նկ. 2Բ): Ըստ իմունոբլոտինգի հետազոտության՝ ԽԱԺՎ վարակի վաղ (p32) և ուշ (p72) փուլի

սպիտակուցների քանակությունը նվազում է ապիգենինի 50 մկՄ կոնցենտրացիայի ազդեցությամբ (նկ. 2Գ):

Ապիգենինի 12.5 մկՄ, 25 մկՄ, 50 մկՄ կոնցենտրացիաները նվազեցրել են վիրուսային գործարանների թիվը 44%, 60% և 74% համապատասխանաբար (P<0.05):

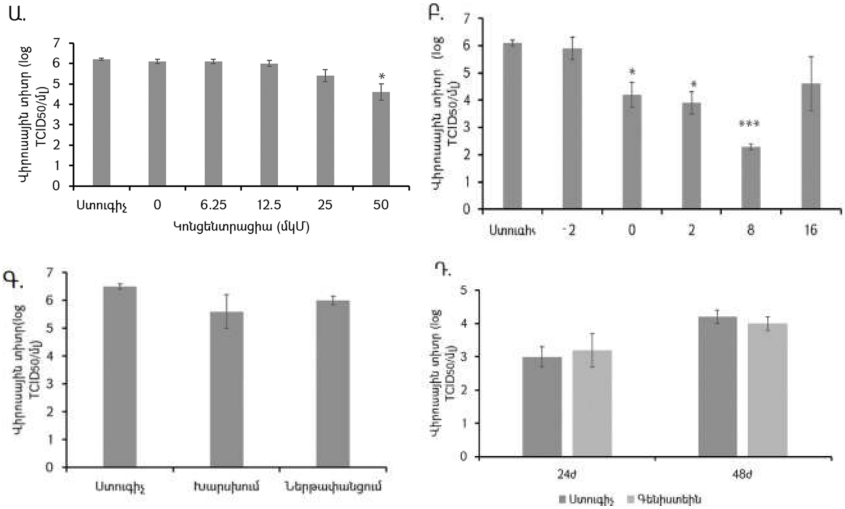
Գենիստեին

Գենիստեինի բջջատոքսիկության որոշում

Գենիստեինի բջջատոքսիկությունը որոշվել է MTT մեթոդով: Գենիստեինը ցուցաբերում է թունաբանական ազդեցություն 50 մկՄ կոնցենտրացիայից բարձր դոզաներում:

Գենիստեինի հակախՍԱԺՎ ազդեցությունը Vero բջիջների վրա

Գենիստեինի հակավիրուսային ակտիվությունը Vero բջջային գծի վրա կազմել է IC50 = 13 մկՄ, SI = 23: Վիրուսային տիտրը նվազել է 6.2 ± 0.05 log TCID50/մլ արժեքից մինչև 4.6 ± 0.4 TCID50/մլ 50 մկՄ կոնցենտրացիայով (P<0.05), այն չի ցուցաբերել արտահայտված հակավիրուսային ակտիվություն 25 մկՄ կոնցենտրացիայով (նկ. 3Ա):



Նկար 3. Գենիստեինի հակախՍԱԺՎ ակտիվությունը:
Ա. Կոնցենտրացիայից կախյալ ազդեցությունը ԽՍԱԺՎ-ի վրա, Բ. Գենիստեինի ժամ-կախյալ ազդեցությունը ԽՍԱԺՎ-ի վրա, Գ. Գենիստեինի ազդեցությունը ԽՍԱԺՎ-ի խարսխման և ներթափանցման վրա, Դ. Գենիստեինի վիրուցիդալ ազդեցությունը ԽՍԱԺՎ-ի վրա վարակից 24ժ, 48ժ, 96 ժ հետո: Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ *(P<0.05), ***(P<0.001):

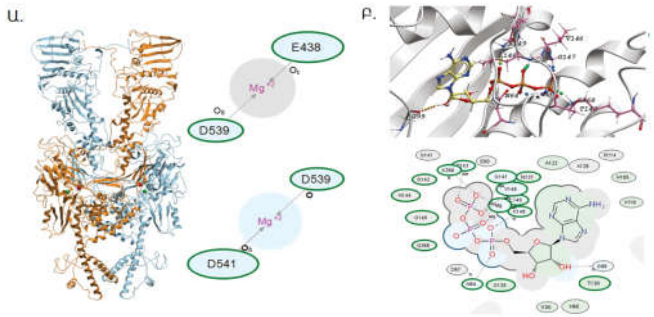
Հաջորդիվ կատարվել է ժամ-կախյալ հետազոտությունը: Գենիստեինի առավելագույն հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը ցուցաբերվել է վարակից 8 ժամ անց՝ նվազելով 3.8 log-ով (> 99%, P<0.001) (նկ. 3Բ): Հակավիրուսային ազդեցություն նկատվել է նաև այն ժամանակ երբ գենիստեինը ավելացվել է վարակից 0, 2 ժամ անց (P<0.05). Այս տվյալները մատնանշում են գենիստեինի նկատմամբ ԽԱԺՎ-ի ռեպլիկատիվ ցիկլի վաղ և միջին փուլերի զգայունության վրա: Գենիստեինը չի ցուցաբերում ակտիվություն վիրուսի խարսխման և ներթափանցման վրա (նկ. 3Գ), ինչպես նաև չունի վիրուցիդալ ակտիվություն (նկ. 3Դ):

Գենիստեինի ազդեցությունը ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամի վիրուսային ԴՆԹ-ի և սպիտակուցի սինթեզի վրա

Գենիստեինի ազդեցությամբ դիտվել է ԴՆԹ-ի քանակության զգալի նվազում վիրուսային գործարաններում 34% (P<0.05) վարակի 0 ժամային կետում, ԴՆԹ-ի քանակը գործարաններում նվազում է 54% (P<0.02), երբ գենիստեինը ավելացվում է վարակից 8 ժամ անց: Հետևաբար գենիստեինը նվազեցնում է վիրուսային ԴՆԹ-ի քանակը վարակված բջջում: Իմունոբլոտինգի արդյունքների համաձայն՝ գենիստեինի 50 մկՄ կոնցենտրացիայի ազդեցությամբ ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամի վաղ (p32) և ուշ (p72) փուլի սպիտակուցների քանակությունը նվազում է:

Գենիստեինի և ԽԱԺՎ տոպո II ֆերմենտի փոխազդեցության ուսումնասիրում in silico

Գենիստեինի և ԽԱԺՎ տոպո II ֆերմենտի փոխազդեցությունը գնահատելու համար իրականացվել է համակարգչային դոքինգ հետազոտություն:

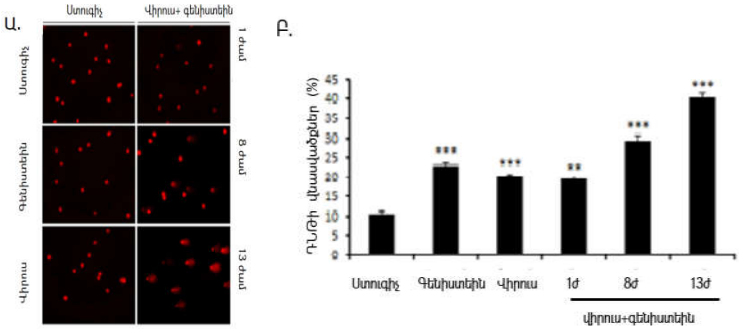


Նկար 4. Գենիստեինի փոխազդեցությունը ԽԱԺՎ Տոպո II ֆերմենտի հետ *in silico*: Ա. ԽԱԺՎ Տոպո II համակարգչային մոդել, Բ. ԽԱԺՎ Տոպո II ֆերմենտի և գենիստեինի փոխազդեցության համակարգչային մոդել:

Դոքինգ անալիզի համար ընտրվել է ԴՆԹ-տոպոիզոմերազ ֆերմենտի ԱԵՖ-կապող հատվածը (16 ամինաթթու): Գենիստեինը փոխազդում է նշված հատվածի հետ՝ առաջացնելով ջրածնային կապեր հետևյալ դիրքերում Asn-144, Val-146, Gly-147 և Leu-148:ԱԵՖ-ի կապման սայթում գենիստեինի փոխազդեցության էներգիան

կազմում է -4.62 կկալ/մոլ՝ ի տարբերություն ԱԵՖ-ի մոլեկուլի, որը նշված տեղամասի հետ կապվում է ավելի մեծ խնամակցությամբ (-3.02 կկալ/մոլ)՝ մրցակցելով ԱԵՖ-ի հետ կապման համար (նկ. 4):

ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամով վարակված բջիջներում ԴՆԹ-ի վնասվածքների կոմետ հետազոտությունը ցույց է տվել, որ միայն գենիստեինով մշակված, գենիստեինով մշակված վարակված բջիջներում ԴՆԹ-ի ֆրագմենտացիայի մակարդակը 3 անգամ ավելի բարձր է՝ համեմատած ստուգիչի հետ (P<0.001 կամ P<0.02): ԴՆԹ-ի վնասվածքների մակարդակը 4-5 անգամ բարձր է, երբ բջիջները մշակվում են գենիստեինով վարակից 8 ժամ անց (P<0.001), ինչը համընկնում է վիրուսային նուկլեինաթթվի ակտիվ ռեպլիկացիայի հետ (նկ. 5Ա, Բ):



Նկար 5. Գենիստեինի ազդեցությունը ԴՆԹ-ի վնասվածքների վրա ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամի վարակված բջիջներում:
Ա. Կոմետ հետազոտություն, Բ. ԴՆԹ-ի վնասվածքների աստիճանի քանակական գնահատում (%): Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ **(P<0.02), ***(P<0.001):

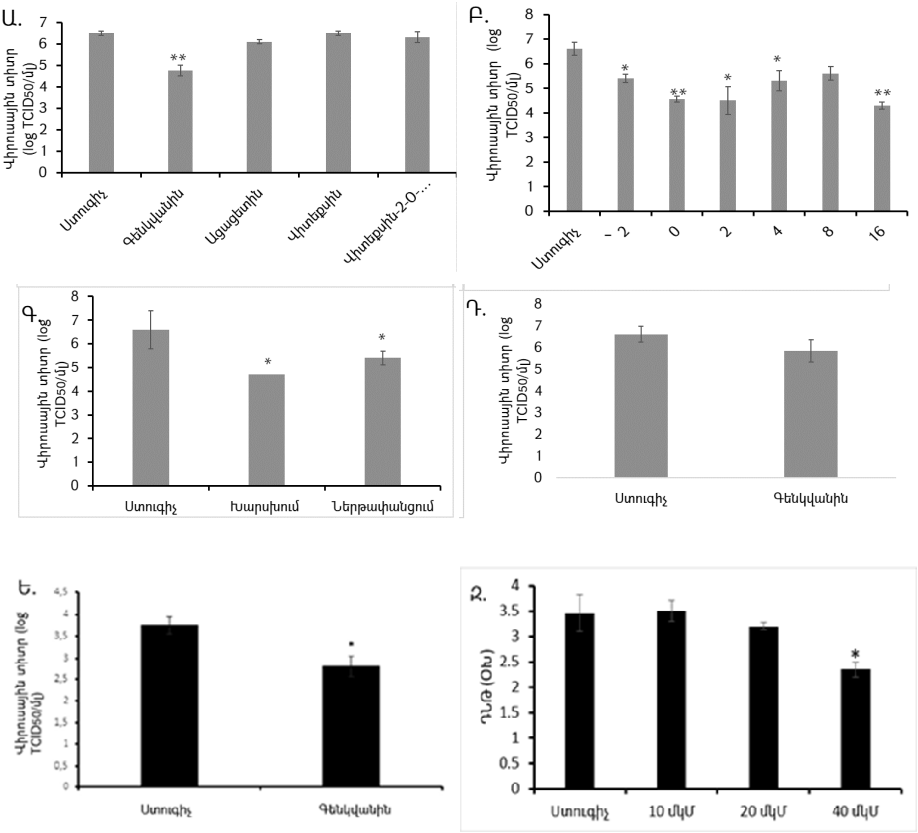
Մակրոֆագերում գենիստեինի հակաԽԱԺՎ ակտիվության գնահատումը ԽԱԺՎ վիրուլենտ շտամի վրա

Ավիրուլենտ շտամի վրա գենիստեինի ազդեցության տվյալները վերարտադրվել են նաև վիրուլենտ շտամի վրա: Գենիստեինի առավելագույն ակտիվությունը արտահայտվել է վիրուլենտ շտամի վարակից 8 ժամ անց:

Գենկվանին

Բջջատոքսիկության տվյալների հիման վրա ընտրվել և փորձարկվել են ապիգենինի ածանցյալ միացությունների հետևյալ կոնցենտրացիաները՝ 20 մկՄ ացացետինի և վիտեքսինի համար, 40 մկՄ գենկվանին և վիտեքսին-2-O ռամնոզիդի համար (նկ. 6Ա): Առավելագույն հակավիրուսային ակտիվությունը ցուցաբերել է գենկվանինը՝ նվազեցնելով վիրուսային ինֆեկցիայի տիտրը 6.5 ± 0.1 log-ից մինչև 4.75 ± 0.25 log TCID50/մլ՝ ընդունելով IC50 =2.9 մկՄ SI =205.2 (p<0.02):

Ժամ-կախյալ հետազոտության մեջ գենկվանինը 40 մկՄ կոնցենտրացիայով արգելակում է ԽԱԺՎ վարակը, երբ ավելացվում է վիրուսային վարակի վաղ և ուշ փուլերում՝ չազդելով միջանկյալ փուլերի վրա (նկ. 6Բ):



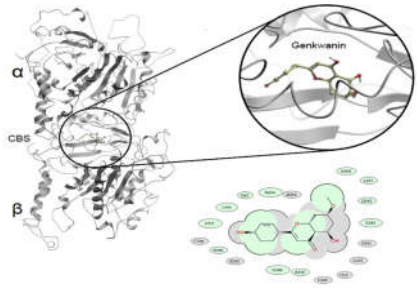
Նկար 6. Գենկվանինի հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը:
Ա. Ապիգենինի ածանցյալների հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը, Բ. Գենկվանինի ժամ-կախյալ հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը, Գ. Գենկվանինի ակտիվությունը վիրուսային մասնիկի խարսխման և ներթափանցման վրա, Դ. Գենկվանինի վիրուցիդալ ակտիվությունը, Ե. Գենկվանինի ազդեցությունը վիրուսային մասնիկի ելքի վրա, Զ. Գենկվանինի ազդեցությունը վիրուսային գործարանների ձևավորման վրա: Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ *($P<0.05$), **($P<0.02$):

Ժամ-կախյալ հետազոտությունը ցույց է տվել, որ գենկվանինը առավելագույն հակաԽԱԺՎ ազդեցությունը ցուցաբերել է վարակի վաղ և ուշ փուլերում, հետևաբար այն ազդում է վիրուսի ներթափանցման և ելքի վրա: Գենկվանինը ազդում է ԽԱԺՎ-ի ներթափանցման գործընթացի վրա՝ նվազեցնելով վիրուսային տիտրը 6.6 ± 0.8

log TCID50/մլ մինչև 4.7 ± 0.4 log TCID50/մլ ($p<0.02$): Ներթափանցման հետազոտությունների շրջանակներում գենկվանինը նվազեցնում է վիրուսային վարակը 1,2 log ($p<0.05$): Այս արդյունքները վերահաստատել են գենկվանինի ազդեցությունը վիրուսային մասնիկի խարսխման և ներթափանցման արգելակման մեխանիզմով (նկ. 6Գ, Դ):

Վիրուսային մասնիկի ելքի հետազոտություններում գենկվանինը ազդել է ԽԱԺՎ ելքի վրա՝ նվազեցնելով վիրուսային տիտրը 1 log ($p<0.05$) (նկ. 6Ե): Այսպիսով, 40 մկՄ կոնցենտրացիայով գենկվանինը նվազեցնում էր վիրուսային ԴՆԹ-ի քանակը գործարաններում (նկ. 6Զ):

ԽԱԺՎ վարակի վաղ և ուշ փուլերում առանցքային նշանակություն ունեն միկրոխողովակները, որոնք պատասխանատու են վիրուսի ներբջջային փոխադրման համար: Ապիգենինը, որի ածանցյալն է գենկվանինը, միևնույն ժամանակ հայտնի է որպես տուբուլինային միկրոխողովակների պոլիմերացման ինհիբիտոր: Այդ իսկ պատճառով կատարվել է գենկվանինի և տուբուլինի դոքինգ հետազոտություն, որը ցույց է տվել գենկվանինի փոխազդեցությունը բետա-տուբուլինի, կոլխիցին կապող տեղամասի հետ: Կատարվել է նաև մոլեկուլային դինամիկայի հետազոտություն, կապման MM-GBSA ալգորիթմով կազմել է –31.5 կկալ/մոլ (նկ. 7):



Նկար 7. Գենկվանինի փոխազդեցությունը միկրոխողովակների բետա-տուբուլին սպիտակուցի հետ *in silico*:

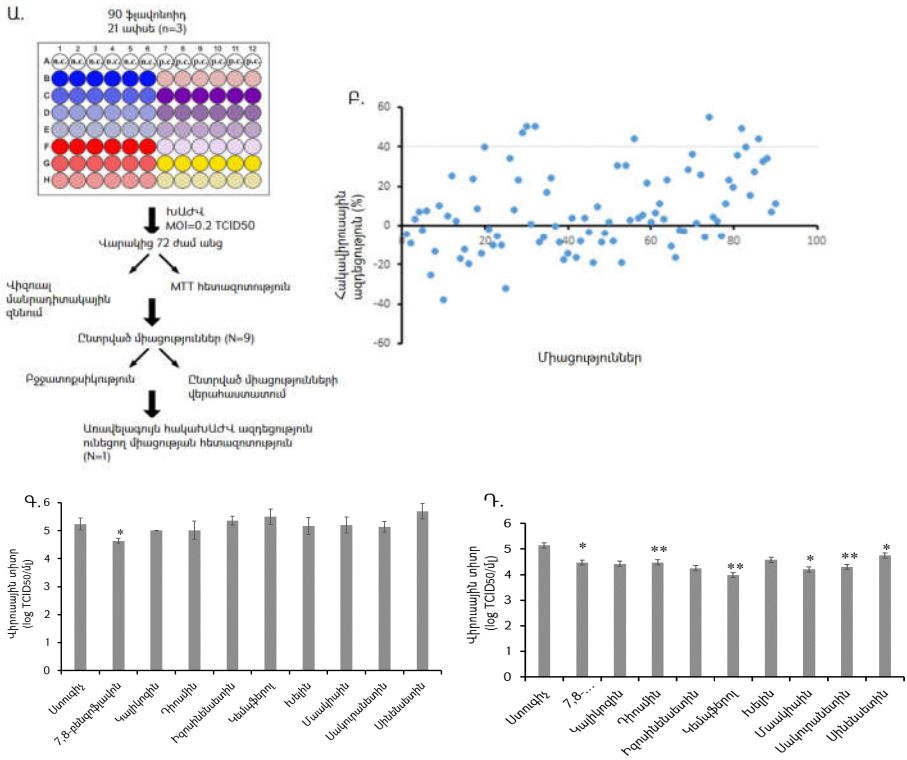
Գենկվանինի հակավիրուսային ակտիվությունը հաստատելու համար չափվել է ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիան վիրուսային գործարաններում:

Գենկվանինի ազդեցությունը ուսումնասիրվել է նաև խոզերի ալվեոլար մակրոֆագերի վրա, տվյալները վերարտադրվել են: Գենկվանինը ճնշում է վիրուսային մասնիկների խարսխումը և ներթափանցումը, ազդում է վիրուսային վարակի վաղ և ուշ փուլերում:

Կեմպֆերոլ

Ֆլավոնոիդների գրադարանի սկրինինգի (նկ. 8Ա, Բ), արդյունքում առավելագույն հակաԽԱԺՎ ակտիվություն ցուցաբերած 9 ֆլավոնոիդներից վիրուցիդալ ակտիվություն ցուցաբերել է 7,8-բենզոֆլավոնը, կեմպֆերոլը ցուցաբերել է առավելագույն հակաԽԱԺՎ ակտիվություն՝ նվազեցնելով վիրուսային տիտրը 5.14

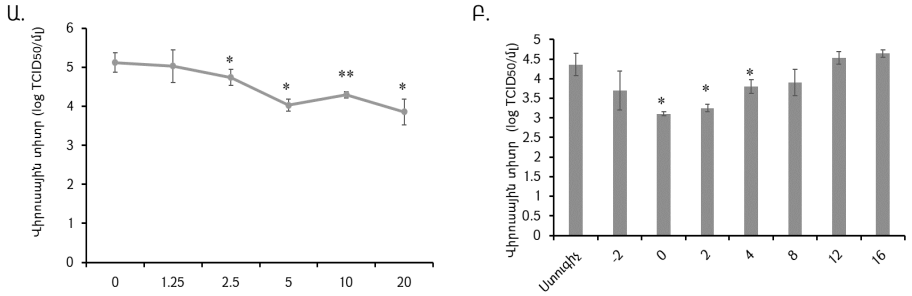
± 0.19 log TCID50/մլ մինչև 3.98 ± 0.19 log TCID50/մլ (p<0.01)՝ ապահովելով 92% հակավիրուսային վիրոստատիկ ակտիվություն (նկ. 8Գ, Դ):



Նկար 8. Սկրինինգի արդյունքում ընտրված միացությունների հակավիրուսային ազդեցությունը ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամի նկատմամբ:
Ա. Սկրինինգի հետազոտության սխեմա, Բ. Հետազոտված միացությունների հակավիրուսային ակտիվություն, Գ. Նյութերի վիրուցիդալ ազդեցություն, Դ. Նյութերի վիրոստատիկ ազդեցություն: Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ *(P<0.05), **(P<0.02):

Կեմպֆերոլի 20 մկգ/մլ կոնցենտրացիան (70 մկՄ) ցուցաբերել է առավելագույն հակավիրուսային ակտիվություն՝ նվազեցնելով վիրուսային վարակը 1,26 log (p<0.05):

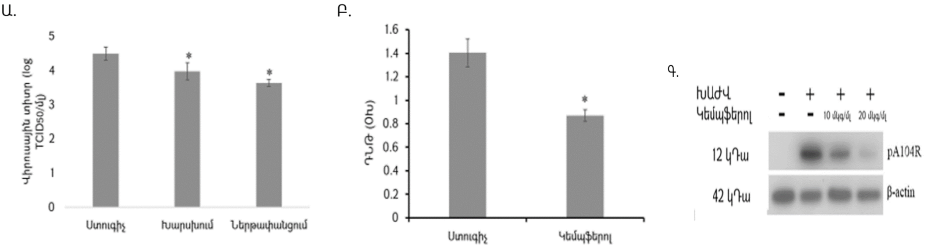
Այս հակախԱԺՎ ազդեցությունը կոնցենտրացիայից կախյալ է (նկ. 9Ա): Կեմպֆերոլի համար IC50 կազմել է 2.2 մկգ/մլ (7.7 մկՄ): Կեմպֆերոլի 20 մկգ/մլ կոնցենտրացիան ցուցաբերել է հակախԱԺՎ ազդեցություն նաև կախված ԽԱԺՎ-ի տիտրից: Այն նվազեցնում է վիրուսային տիտրը 1,21 log, երբ վիրուսի MOI = 1:



Նկար 9. Կեմպֆերոլի կոնցենտրացիայից կախյալ և ժամ-կախյալ ազդեցությունը ԽԱԺՎ-ի նկատմամբ:
Ա. Կոնցենտրացիայից կախյալ կեմպֆերոլի հակավիրուսային ազդեցությունը, Բ. Կեմպֆերոլի ժամ-կախյալ հետազոտությունը: Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ *(P<0.05):

Ժամ-կախյալ հետազոտության շրջանակներում վիրուսային տիտրի ամենակտրուկ անկումը նկատվել է վիրուսային վարակի ամենավաղ փուլերում: Առավելագույն հակավիրուսային ակտիվությունը նկատվել է 0 և 2 ժամային կետերում՝ նվազեցնելով վիրուսային տիտրը 1.25 log (p<0.05) և 1.1 log (p<0.05), համապատասխանաբար: Կեմպֆերոլը չի ցուցաբերել հակավիրուսային ակտիվություն վիրուսային վարակի ուշ փուլերում (նկ. 9Բ):

Խարսխման հետազոտությունների շրջանակներում վիրուսային տիտրը իջել է 4.48 ± 0.19 log TCID50/մլ մինչև 3.97 ± 0.25 log TCID50/մլ (p<0.05)՝ ապահովելով 60% նվազում: Ներթափանցման հետազոտությունը ցույց է տվել ԽԱԺՎ տիտրի նվազում 4.48 ± 0.19 log TCID50/մլ մինչև 3.63 ± 0.11 log TCID50/մլ (p<0.05) (նկ. 10Ա):

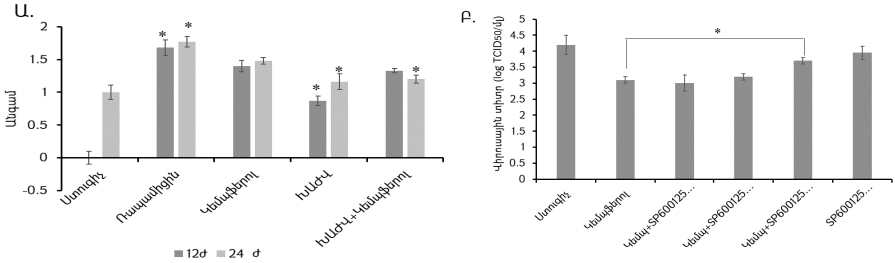


Նկար 10. ԽԱԺՎ ավիրուլենտ շտամի վրա կեմպֆերոլի ազդեցությունը:
Ա. Ներթափանցման հետազոտություն, Բ. Վիրուսային գործարաններում ԴՆԹ-ի քանակաչափական հետազոտություն, Գ. ԽԱԺՎ pA104R սպիտակուցի մակարդակի որոշում կեմպֆերոլի ազդեցությամբ: Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ *(P<0.05):

Կեմպֆերոլը նվազեցնում է վիրուսային գործարաններում ԴՆԹ-ի պարունակությունը (նկ. 10Բ), ինչպես նաև նվազեցնում է pA104R սպիտակուցի քանակը (նկ. 10Գ):

Կեմպֆերոլը նվազեցնում է վիրուլենտ շտամի տիտրը վարակի վաղ փուլերում, արգելակում է խարսխման և ներթափանցման գործընթացները և նվազեցնում է վիրուսային ԴՆԹ-ի քանակը գործարաններում:

ԽԱԺՎ մակրոֆագերը մշակվել են կեմպֆերոլով և աուտոֆագիայի արգելակիչով միաժամանակ, ինչի արդյունքում հակավիրուսային ակտիվությունը չեզոքացվել է: Դա նշանակում է, որ կեմպֆերոլի հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը պայմանավորված է աուտոֆագիայի գործընթացի խթանման հետ, որն էլ հանգեցնում է հակաԽԱԺՎ ազդեցության (նկ. 11Ա, Բ):



Նկար 11. Կեմպֆերոլի հակաԽԱԺՎ ազդեցությունը աուտոֆագիայի եղանակով:
Ա. ԽԱԺՎ-ով վարակված և կեմպֆերոլով մշակված բջիջներում աուտոֆագիայի խթանում, Բ. Կեմպֆերոլի հակավիրուսային ազդեցության հակադարձում աուտոֆագիայի արգելակման եղանակով: Ստուգիչի համեմատ արժանահավատությունը գնահատվել է՝ *(P<0.05), **(P<0.02), ***(P<0.001):

Ուսումնասիրվել է նաև ապիգենինի և գենիստեինի համատեղ մշակման ազդեցությունը Vero բջիջների կենսունակության վրա: Բջջատոքսիկության հետազոտության արդյունքում ապիգենինի և գենիստեինի 5 կոմբինացիաներ նվազեցրել են բջիջների կենսունակությունը՝ հանգեցնելով 70%-ից ցածր արժեքի: Մյուս կոնցենտրացիաները էապես չեն ազդել բջիջների կենսունակության վրա՝ ընդունելով 70%-ից բարձր արժեք:

Ինչպես ցույց է տվել սիներգիստիկ ակտիվության հետազոտությունը, ապիգենինի և գենիստեինի համատեղ մշակումը հանգեցրել է արտահայտված սիներգիստիկ հակաԽԱԺՎ ակտիվության: Առավելագույն հակաԽԱԺՎ սիներգիստիկ համակցությունն է գենիստեին 12,5 մկՄ և ապիգենին 6,25 մկՄ, որը ցուցաբերել է 93,02% հակաԽԱԺՎ ազդեցություն:

Սիներգիստիկ ակտիվությունը հաշվարկվել է 3 ալգորիթմներով: Միացությունների 8 համակցություն ցուցաբերել են սիներգիստիկ ազդեցություն՝ ընդունելով սիներգիստիկ միավորի +10-ից բարձր արժեք: Ամենաբարձր սիներգիստիկ միավոր և հակաԽԱԺՎ ակտիվություն ցուցաբերած միացությունների համակցությունը՝ ապիգենին 6,25 մկՄ, գենիստեին 12,5 մկՄ է:

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԻ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

Մի շարք հակաԽԱԺՎ միացություններ նախկինում նկարագրվել են: Օրինակ, սուլֆատային բազմաշաքարները արգելակում են ԽԱԺՎ-ի խարսխումը տեր բջջին, *Pophyridium cruentum* և *Ellipsoidon* sp. ջրիմուռներից անջատված միացությունները կոնցենտրացիայից կախյալ հակավիրուսային ազդեցություն են ցուցաբերում ԽԱԺՎ վարակի վրա *in vitro* (García-Villalón et al., 1991): Պոլիֆենոլային ֆիտոալլեքսինները, ինչպես օրինակ, ռեսվերատրոլը և օքսիռեսվերատրոլը, նվազեցնում են ԽԱԺՎ տիտրը՝ ազդելով ԴՆԹ-ի ռեպլիկացիայի, ուշ փուլի սպիտակուցների սինթեզի և վիրուսային գործարանների ձևավորման վրա (Galindo et al., 2019): Մի շարք ֆլավոնոիդների համար նկարագրված է հակավիրուսային ակտիվություն: Օրինակ, կատեխինը և նարինգենինը արգելակում են հեպատիտ C-ի վիրուսային մասնիկի կազմավորումը (Kato et al., 2001):

Ապիգենին. Ատենախոսության շրջանակներում հետազոտված ֆլավոնոիդներից ամենաարտահայտված հակավիրուսային ակտիվությունը ցուցաբերել է ապիգենինը: Այս ֆլավոնոիդը չի ցուցաբերել որևէ ակտիվություն ԽԱԺՎ խարսխման և ներթափանցման վրա: Հակավիրուսային ակտիվություն գրանցվել է ժամ-կախյալ հետազոտության շրջանակներում, ըստ այդմ՝ ապիգենինի առավելագույն ակտիվությունը նկատվել է վարակի վաղ փուլերում: Առավել ցածր հակավիրուսային ակտիվություն գրանցվել է վարակից 8 և 12 ժամ անց: Իմունոբլոտինգի տվյալները ցույց են տվել ԽԱԺՎ վաղ և ուշ փուլի սպիտակուցների քանակության նվազում ապիգենինի 50 մկՄ կոնցենտրացիայի ազդեցությամբ: Վիրուսային գործարանների քանակական ուսումնասիրությունները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ ապիգենինը նվազեցնում է վերջիններիս քանակը բոլոր ուսումնասիրված կոնցենտրացիաների ազդեցությամբ: Վարակված բջիջները ապիգենինով բազմակի մշակումը թույլ է տվել կանխել վիրուսային բջջաախտաբանական ազդեցությունը: Նկատվել է նաև վիրուսային հակածնի կոնցենտրացիայի կտրուկ նվազում: Անհրաժեշտ են հավելյալ հետազոտություններ, որոնցում կուսումնասիրվի ապիգենինի ազդեցությունը խոզերի վրա *in vivo* (Hakobyan et al., 2016):

Գենիստեին. Գրականությունից հայտնի է, որ գենիստեինը ճնշում է մարդու ցիտոմեգալովիրուսը վարակի վաղ փուլերում՝ ազդելով վիրուսի ներթափանցման գործընթացի վրա (Evers et al., 2005): Գենիստեինը արգելակում է նաև ՄԻԱՎ-ի Ս սպիտակուցը, որը հանդես է գալիս որպես իոնային անցուղի (Sauter et al., 2014):

Համաձայն մեր ստացած արդյունքների՝ գենիստեինը 50 մկՄ կոնցենտրացիայով ցուցաբերում է հակավիրուսային ակտիվություն ԽԱԺՎ-ի դեմ Vero բջիջներում, ինչպես նաև խոզերի ալվեոլար մակրոֆագերում: Այս փորձերում գենիստեինը չի ցուցաբերել վիրուցիդալ ակտիվություն, այն չի ազդել նաև վիրուսային մասնիկի ներթափանցման գործընթացի վրա: Նշված միացությունը չի ցուցաբերում նաև կանխարգելիչ (նախավարակային) ազդեցություն: Գենիստեինի առավելագույն հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը ցուցաբերվել է, երբ այն ավելացվել է վիրուսային վարակի միջանկյալ փուլում՝ 8 ժամ հետո, ինչը համընկնում է ԽԱԺՎ-ի ակտիվ ռեպլիկացիայի փուլի հետ: Հիմնվելով այս փաստի վրա՝ եզրակացնում ենք,

որ գենիստեինը ճնշում է ԽԱԺՎ-ի ռեպլիկացիայի գործընթացը: Այս եզրակացությունը հիմնավորվում է նաև այն փաստով, որ գենիստեինը նվազեցնում է ԴՆԹ-ի քանակը վիրուսային գործարաններում, ինչպես նաև այն դիտարկմամբ, համաձայն որի՝ նվազում է ԽԱԺՎ-ի p72 սպիտակուցի քանակությունը գենիստեինի ազդեցությամբ, ինչը ցույց է տրվել իմունոբլոտինգի մեթոդով (Arabyan et al., 2018): Հայտնի է, որ ԴՆԹ-ի ռեպլիկացիայի ինհիբիտորները հանգեցնում են վիրուսային գեների էքսպրեսիայի նվազման: Գենիստեինի մետաբոլիկ փոխարկման բարձր արագությունը կարող է բացատրել վերջինիս թույլ ազդեցությունը վիրուսային վարակի վաղ փուլերում (Chang et al., 2000):

Վաղ աշխատանքներում ակնարկվում է գենիստեինի փոխազդեցությունը տոպոիզոմերազ II -ԴՆԹ կոմպլեքսի հետ, որը հանգեցնում է տոպո II-կախյալ ԴՆԹ-ի երկշղթա վնասվածքների առաջացմանը (Constantinou et al., 1990): Վերջերս (Coelho et al., 2016) ցույց է տրվել, որ գենիստեինը, 32 մկՄ կոնցենտրացիայով, թիրախավորում է ԽԱԺՎ-ի տոպո II ֆերմենտը (Coelho et al., 2016): Հիմնվելով այս տվյալների վրա՝ ենթադրել ենք, որ գենիստեինը արգելակում է ԽԱԺՎ ԴՆԹ-ի ռեպլիկացիան՝ ազդելով վիրուսային տոպո II ֆերմենտի վրա: Ելնելով վերը շարադրվածից՝ սպասվում էր ԴՆԹ-ի երկշղթա վնասվածքների գեներացում գենիստեինով մշակված բջիջներում: Կոմետ հետազոտությունը ցույց տվեց, որ գենիստեինով հարուցված ԴՆԹ-ի վնասվածքները առավել արտահայտված էին վարակի ուշ փուլում՝ 13 ժամ անց: Այս փուլում տեղի է ունենում վիրուսային ԴՆԹ-ի ուժգին ռեպլիկացիա Vero բջիջներում (Frouco G. et al., 2017): Այսպես, տոպո II ֆերմենտի արգելակումը գենիստեինով հարուցում է ԴՆԹ-ի երկշղթա վնասվածքներ: Վարկածը վերահաստատվել է համակարգչային մեթոդների կիրառմամբ: Կառուցվել է ԽԱԺՎ տոպո II ֆերմենտի համակարգչային մոդելը 2 Mg2+ իոններով: Մոդելավորումը ցույց տվեց, որ գենիստեինը փոխազդում է 4 ամինաթթուների հետ տոպո II-ի ԱԵՖ-կապող սայթում: Գենիստեինի կապումը տոպո II-ի հետ տեղի է ունենում ավելի մեծ կապման էներգիայով, քան ԱԵՖ-ի կապումը: Բոլոր տոպոիզոմերազ II ֆերմենտները կատալիզում են ԴՆԹ-ի տոպոլոգիական փոխարկումները ԱԵՖ-ի մասնակցությամբ՝ օգտագործելով այն որպես կոֆերմենտ: ԱԵՖ-ի մրցակցային ինհիբիտորները, ինչպես և գենիստեինը բարձրացնում են ԴՆԹ-ի մոլեկուլի երկշղթա վնասվածքների հաճախականությունը (Gadelle and Forterre, 2009): Այս աշխատանքում ցույց է տրվել նաև, որ գենիստեինն ունի հակաԽԱԺՎ ակտիվություն ոչ միայն ավիրուլենտ ASFV Ba71V լաբորատոր շտամի, այլ նաև ԽԱԺՎ վիրուլենտ Armenia/07 շտամի նկատմամբ *in vitro* (Arabyan et al., 2018):

Գենկվանին. Ապիգենինի ածանցյալների հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ առավել արտահայտված հակավիրուսային ակտիվությամբ օժտված է գենկվանինը, ուստի այն օգտագործվել է մյուս հակավիրուսային հետազոտություններում: Արդյունքում պարզ դարձավ, որ գենկվանինը նվազեցնում է ԽԱԺՎ տիտրը վարակի վաղ և ուշ փուլերում, ինչը կապված է գենկվանինի ազդեցությամբ վիրուսի խարսխման և ներթափանցման, ինչպես նաև ձևավորված վիրուսային մասնիկների ելքի վրա:

Մի քանի այլ ֆլավոնոիդների համար ցույց է տրված հակավիրուսային ակտիվություն, որն իրականացվում է վիրուսային մասնիկի խարսխման և ներթափանցման արգելակման միջոցով: Գենկվանինի զգալի հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը ի հայտ է գալիս վիրուսային վարակի ուշ փուլերում՝ 16 ժամ անց: Այդ ժամային կետը համընկնում է ԽԱԺՎ-ի մասնիկների փոխադրման հետ վիրուսային գործարաններից դեպի բջջի պլազմային թաղանթ: Քանի որ ԽԱԺՎ-ի փոխադրումը դեպի բջջի տարբեր կոմպարտմենտներ տեղի է ունենում տուբուլինային միկրոխողովակների օգնությամբ (Jouvenet et al., 2004): Միևնույն ժամանակ գենկվանինը ապիգենինի ածանցյալն է, որի համար ցույց է տրված միկրոխողովակների դեպոլիմերացման հատկություն (Choudhury et al., 2013): Գենկվանինը կարող է դիտարկվել որպես տուբուլինային միկրոխողովակների դեստաբիլիզատոր, որի օգնությամբ արտահայտվում է հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը (Choudhury et al., 2013): Այս ենթադրությունը հաստատվում է մեր կողմից իրականացված *in silico* համակարգչային հետազոտությամբ, որը ցույց է տալիս գենկվանինի կապումը բետա-տուբուլինի հետ: Մեր տվյալները փաստում են այն մասին, որ գենկվանինը ազդում է ԽԱԺՎ խարսխման, ներթափանցման և բջջից ելքի վրա, ինչը հնարավոր է միկրոխողովակների թիրախավորման ճանապարհով (Hakobyan et al., 2019):

Լաբորատոր շտամի վրա ստացված տվյալները վերարտադրվում են նաև վայրի շտամի վրա, որը շրջանառվում է Եվրոպայում և Չինաստանում, ինչը մեծացնում է գենկվանինի արժեքը՝ որպես հնարավոր հակաԽԱԺՎ դեղամիջոց: Մեր կողմից առաջին անգամ նկարագրվել է գենկվանինի հակավիրուսային ակտիվությունը (Hakobyan et al., 2019): Գրականության մեջ այլ վիրուսների հանդեպ գենկվանինի հակավիրուսային ակտիվության վերաբերյալ հիշատակում առկա չէ:

Կեմպֆերոլ. Ատենախոսության շրջանակներում ուսումնասիրվել է 90 ֆլավոնոիդներից բաղկացած բնական ծագման միացությունների գրադարանի հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը: Սկրինինգի արդյունքում ընտրվել է 9 ֆլավոնոիդ՝ 7,8-բենզոֆլավոնը, կալիկոզինը, դիոսմինը, իզոսինենսետինը, կեմպֆերոլը, խելինը, մաակիաինը, սակուրանետինը, և սինենսետինը, որոնք նվազեցրել են ԽԱԺՎ-ով պայմանավորված բջջաախտաբանական ազդեցությունը (≥40%): Ընտրված ֆլավոնոիդները փորձարկվել են վիրոստատիկ, վիրուցիդալ և ցիտոտոքսիկության հետազոտություններում: Միացություններից առավելագույն ակտիվությունը ցուցաբերել է կեմպֆերոլ (3,5,7-տրիհիդրոքսի-2-4հիդրոքսիպենտենիլ-4H-քրոմեն-4-ոն) ֆլավոնոիդը և ուսումնասիրվել է առավել մանրամասն:

Նախկինում ցույց է տրվել կեմպֆերոլի հակավիրուսային ակտիվությունը՝ հերպեսվիրուսի, ճապոնական էնցեֆալիտի վիրուսի, Գրիպի B վիրուսի նկատմամբ (Zhang et al., 2012):

Մեր հետազոտությունները ցույց տվեցին կեմպֆերոլի հակաԽԱԺՎ ակտիվությունը Vero բջջային կուլտուրայի և մակրոֆագերի վրա: Կեմպֆերոլը ճնշում է ԽԱԺՎ վարակը՝ ճնշելով վիրուսային մասնիկի ներթափանցումը ավելի քան 60 տոկոսով:

Կեմպֆերոլը չի ցուցաբերում վիրուցիդալ ակտիվություն ԽԱԺՎ-ի դեմ, հետևաբար ներթափանցման արգելակումը կապված չէ նյութի՝ վիրուսի վրա ուղիղ ազդեցության հետ: Առաջին անգամ ցույց է տրվել կեմպֆերոլի հակավիրուսային ակտիվությունը ներթափանցման փուլում (Arabyan et al., 2021): Հայտնի է, որ կեմպֆերոլը խթանում է աուտոֆագիայի գործընթացը վարակված բջիջներում՝ բաձրացնելով ԱՄՖ կինազ ֆերմենտի էքսպրեսիայի մակարդակը: Աուտոֆագիան ինքնամարսման ունիվերսալ և կոնսերվատիվ գործընթաց է, որը բնորոշ է էուկարիոտ բջիջներին: Այն կարող է ակտիվանալ տարբեր ազդակների դրդմամբ՝ քաղցի, սպիտակուցների բնափոխման և ախտածին միկրոօրգանիզմների ներթափանցման ազդեցությամբ (Huang et al., 2013):

Հայտնի է որ ԽԱԺՎ վարակը արգելակվում է աուտոֆագիայի խթանման ազդեցությամբ (Lin et al, 2020): Ենթադրվեց, որ կեմպֆերոլի ակտիվությունը վիրուսային վարակի վաղ փուլերում կապված է աուտոֆագիայի խթանման հետ: Այս վարկածի ստուգման համար ԽԱԺՎ վարակված բջիջները կեմպֆերոլի առկայությամբ մշակվեցին աուտոֆագիայի ինհիբիտորով՝ SP600125: Արդյունքում վիրուսային տիտրը վերականգնվեց, ինչը ապացուցում է, որ կեմպֆերոլի հակավիրուսային ակտիվությունը վարակի վաղ փուլերում՝ վիրուսային մասնիկի ներթափանցումից հետո, կապված է աուտոֆագիայի խթանման հետ (Arabyan et al., 2021):

Սիներգիստիկ ազդեցություն. Հաշվի առնելով բազմաթիվ բուսական ծագման միացությունների կոմբինատիվ հակավիրուսային ազդեցությունները, ինչպես նաև այն փաստը, որ ապիգենինը և գենիստեինն ազդում են ԽԱԺՎ վարակի տարբեր փուլերի վրա, կատարվել է վարակված բջիջների մշակում ապիգենինի և գենիստեինի համակցային կոնցենտրացիաներով (Արաբյան, 2022):

Հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ապիգենինի և գենիստեինի կոմբինատիվ մշակումը բջջային գծի կենսունակության վրա հիմնականում ադիտիվ է (գումարային) կամ անտագոնիստիկ (Արաբյան, 2022): Սակայն այս նյութերի ութ կոմբինացիաներ ունեն սիներգիստիկ ակտիվություն ԽԱԺՎ-ի վարակի վրա: Հետևաբար կարելի է եզրակացնել, որ նյութերի համակցային մշակումը ուժեղացնում է միացությունների հակաԽԱԺՎ ազդեցությունը (Արաբյան, 2022): Հայտնաբերված հակավիրուսային համակցության ազդեցությունը կարող է կապված լինել աուտոֆագիայի խթանման և վիրուսային տոպոիզոմերազ ֆերմենտի միաժամանակ արգելակման հետ:

Հետագա աշխատանքներում անհրաժեշտ է դիտարկել լավագույն հակաԽԱԺՎ սիներգիստիկ համակցության (ապիգենին 25 մկՄ, գենիստեին 3.15 մկՄ) ազդեցությունը վիրուսային վարակի տարբեր փուլերում: Այս համակցությունը ունի պոտենցիալ ԽԱԺՎ բուժման համար *in vivo* (Արաբյան, 2022):

ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Ատենախոսական աշխատանքի ընթացքում ստացված արդյունքների հիման վրա կարելի է անել հետևյալ եզրակացությունները.

1. Հետազոտված 102 ֆլավոնոիդից առնվազն 4-ը՝ ապիգենինը, գենիստեինը, գենկվանինը և կեմպֆերոլն օժտված են արտահայտված հակավիրուսային ակտիվությամբ ԽԱԺՎ-ի նկատմամբ:
2. Նկարագրվել է հետազոտված նյութերի ազդեցությունը՝ կախված ԽԱԺՎ վարակի փուլից. ապիգենինը և կեմպֆերոլը դրսևորում են առավելագույն ակտիվություն վարակի վաղ փուլում, գենիստեինը՝ միջանկյալ փուլում, իսկ գենկվանինի առավելագույն ակտիվությունը դիտվել է վարակի վաղ և ուշ փուլերում:
3. Հայտնաբերվել են հակավիրուսային միացությունների ազդեցության մեխանիզմները, ըստ որոնց՝ գենկվանինը և կեմպֆերոլը ունեն բջջային թիրախներ և ազդում են, համապատասխանաբար, միկրոխողովակների և աուտոֆագիայի վրա: Գենիստեինը ունի վիրուսային թիրախ և արգելակում է ԽԱԺՎ տոպո II ֆերմենտի ակտիվությունը: Ապիգենինի թիրախը բացահայտված չէ:
4. Առավելագույն հակավիրուսային ազդեցություն ունեցող միացություններ ապիգենինը և գենիստեինը համակցված ձևով դրսևորում են սիներգիստիկ ակտիվություն ԽԱԺՎ-ի նկատմամբ:
5. Հայտնաբերված միացությունները խոստումնալից թեկնածուներ են *in vivo* փորձարկման համար:

ՀՐԱՊԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ

Հոդվածներ

1. Hakobyan A, Arabyan E, Avetisyan A, Abroyan L, Hakobyan L, Zakaryan H. Apigenin inhibits African swine fever virus infection *in vitro*. // **Arch Virol**. 2016; 161(12):3445-3453. doi: 10.1007/s00705-016-3061-y
2. Zakaryan H, Arabyan E, Oo A, Zandi K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections.// **Arch Virol**. 2017; 162(9):2539-2551. doi: 10.1007/s00705-017-3417-y
3. Arabyan E, Hakobyan A, Kotsinyan A, Karalyan Z, Arakelov V, Arakelov G, Nazaryan K, Simonyan A, Aroutiounian R, Ferreira F, Zakaryan H. Genistein inhibits African swine fever virus replication *in vitro* by disrupting viral DNA synthesis. // **Antiviral Res**. 2018; 156:128-137. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.06.014
4. Hakobyan A, Arabyan E, Kotsinyan A, Karalyan Z, Sahakyan H, Arakelov V, Nazaryan K, Ferreira F, Zakaryan H. Inhibition of African swine fever virus

infection by genkwanin. // **Antiviral Res**. 2019; 167:78-82. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.008
5. Arabyan E, Kotsynyan A, Hakobyan A, Zakaryan H. Antiviral agents against African swine fever virus. // **Virus Res**. 2019; 270:197669. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197669
6. Arabyan E, Kotsinyan A, Hakobyan A, Zakaryan H. Porcine Viruses: From Pathogenesis to Strategies for Control (Edited by: Hovakim Zakaryan). // Caister Academic Press, U.K. (2019) Pages: 1-20. doi: 10.21775/9781910190913.01
7. Arabyan E, Hakobyan A, Hakobyan T, Grigoryan R, Izmailyan R, Avetisyan A, Karalyan Z, Jackman JA, Ferreira F, Elrod CC, Zakaryan H. Flavonoid Library Screening Reveals Kaempferol as a Potential Antiviral Agent Against African Swine Fever Virus. // **Front Microbiol**. 2021; 12:736780. doi: 10.3389/fmicb.2021.736780
8. Արաբյան Է. Ա., Ապիգենինի և գենիստեինի սիներգիստիկ հակավիրուսային ազդեցությունը խոզերի աֆրիկյան ժանտախտի վիրուսի *in vitro* վարակի վրա. // ՀՀ ԳԱԱ Զեկույցներ, 2022; 122(1):49-56: doi: 10.54503/0321-1339-2022.122.1-49

Թեզիսներ

1. Hakobyan A, Arabyan E, Zakaryan H. *In vitro* antiviral activity of flavonoids against African swine fever virus. Current FEBS Advance Lecture Course "Current Advances in Pathogen Research", Yerevan, Armenia, March 21-26, 2016, p. 16-17.
2. Arabyan E, Hakobyan A, Sahakyan H, Arakelov V, Nazaryan K, Zakaryan H. Genkwanin inhibits African swine fever virus infection *in vitro*. FEBS Advance Lecture Course "Current Advances in Pathogen Research", Yerevan, Armenia, March 25-30, 2019, p. 49.
3. Arakelov V, Arabyan E, Zakaryan H, Arakelov G, Nazaryan K. *In silico* study of the molecular mechanisms of African swine fever virus inhibition by flavonoids. FEBS Advance Lecture Course "Current Advances in Pathogen Research", Yerevan, Armenia, March 25-30, 2019, p. 39.

АРАБЯН ЭРИК АРМЕНОВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРОТИВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ *IN VITRO*

РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: Вирус африканской чумы свиней, антивирусные соединения, флавоноиды, апигенин, генистеин, генкванин, кемпферол, синергизм

Вирус африканской чумы свиней (ВАЧС) вызывает высокую заболеваемость и смертность диких и домашних свиней. В настоящий момент нет эффективных вакцин и противовирусных соединений для ведения борьбы против данного заболевания. Животные обычно погибают в течение двух недель со смертностью до 100%. В последние годы было описано более 8000 эпидемических вспышек в 25 азиатских и европейских странах. Несмотря на попытки создания эффективных вакцин, они завершились неудачей. Эти проблемы еще больше подчеркивают необходимость разработки противовирусных препаратов для лечения и профилактики инфекции ВАЧС.

В настоящей работе изучена антивирусная активность растительных соединений флавоноидов против вируса африканской чумы свиней. В частности, изучена антивирусная активность 101 флавоноида из коих 4 оказали выраженную активность против ВАЧС. Все исследования проводились *in vitro*, исследовался авирулентный и вирулентный штамм. Антивирусная активность определялась методом титрования, для соединений проводилось молекулярное моделирование к определенным мишеням.

Так, апигенин подавлял инфекцию ВАЧС на ранних этапах инфекции, действие соединения было дозо-зависимым. Апигенин не оказал вируцидального действия и не подавлял связывание и проникновение вирусной частицы в клетку, Апигенин снизил концентрацию нуклеиновой кислоты вируса в вирусных фабриках.

Генистеин подавлял вирусную инфекцию в дозо-зависимом порядке на промежуточном этапе вирусной инфекции. В то же самое время соедиение не имело влияния на связывание и проникновение вирусной частицы и не имело вируцидального эффекта. Генистеин подавлял концентрацию вирусной нуклеиновой кислоты в вирусных фабриках при добавлении через 8 часов после инфекции. Промежуточный этап вирусного цикла является стадией усиленного синтеза вирусной нуклеиновой кислоты, одновременно известно, что генистеин явялется ингибитором ДНК-топо II, более того

ВАЧС кодирует ДНК-топо II в геноме. Исходя из этого компьютерными методами было определено, что генистеин связывается с АТФ-связывающим сайтом ДНК-топоизомеразы II ВАЧС. Маркером ингибирования ДНК-топо II являются повреждения ДНК, которые можно измерить с помощью метода комет. В течение вирусой инфекции под действием генистеина наблюдалось динамичное повышение уровня повреждений ДНК на разных этапах вирусной инфекции, что указало на антивирусную активность генистеина против ВАЧС по механизму ингибирования ДНК-топо II. Антивирусная активность генистеина воспроизвелась также на вирулентном штамме.

Далее были исследованы производные апигенина против ВАЧС. Генкванин проявил максимальную антивирусную активность в дозо-зависимой манере на ранних и поздних этапах вирусной инфекции. Генкванин оказал влияние на связывание и проникновение вирусной частицы в клетку, а также тормозил процесс выхода вирусной частицы из клетки. На ранних и поздних этапах вирусной инфекции активно функционируют микротрубочки цитоскелета. Компьютерное моделирование показало связывание генкванина с колхицин-связывающим сайтом бета–тубулина. Антивирусная активность генкванина воспроизвелась также на вирулентном штамме.

С целью обнаружения новых препаратов с антиВАЧС активностью была исследована библиотека флавоноидов, состоящая из 90 флавоноидов. Были избраны 9 из них в процессе скрининга. Избранные соединения были протестированы в вируцидальном исследовании. 7, 8-бензофлавон оказал вируцидальное действие. В виростатическом исследовании максимальную активность проявил кемпферол, который оказал антиВАЧС активность на ранних этапах инфекции и как стало известно эта активность была обусловлена индукцией аутофагии. Антивирусная активность кемпферола воспроизвелась также на вирулентном штамме.

Была исследована синергистическая активность апигенина и генистеина, максимальный синергизм проявила комбинация апигенин 6,25 мкМ, генистеин 12,5 мкМ. Следовательно, обнаруженные соединения, оказавшие антивирусную активность против ВАЧС, представляются многообещающими для дальнейшего исследования в *in vivo* исследованиях.

ERIK ARMEN ARABYAN

STUDY OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF PLANT-DERIVED ANTIVIRAL COMPOUNDS AGAINST AFRICAN SWINE FEVER VIRUS

SUMMARY

Key words: African swine fever virus, antiviral compounds, flavonoids, apigenin, genistein, genkwanin, kempferol, synergy.

African swine fever virus (ASFV) causes high morbidity and mortality of pigs and has huge economic impact. Currently, no effective vaccine or antiviral drug is available. Animals usually die in 2 weeks with mortality reaching about 100%. Over the last years, more than 8000 ASF outbreaks have been reported in 25 countries, mostly in Europe and Asia. While there have been some trials on the ASFV vaccine development, they finished unsuccessfully. These challenges further underscore the need to develop antiviral drugs for the treatment and prevention of ASFV infection.

In the present work, the antiviral activity of plant compounds of flavonoids against the African swine fever virus was studied. In particular, the antiviral activity of 101 flavonoids has been tested, 4 of them displayed significant antiviral actvivity against ASFV. All experiments have been performed *in vitro*. Both avirulent and virulent strains were involved in the testing. Antiviral activity has been tested by titration method. For succesfull compounds, molecular modeling with appropriate targets has been performed.

Thus, apigenin demonstrated antiASFV activity at early stages of infection in the dose-dependent manner. Apigenin did not have a virucidal effect and did not suppress the binding and penetration of a viral particle into a cell. The long-term treatment with apigenin reduced the viral DNA concentration in viral factories.

Genistein exerted antiASFV activity in dose-sependent manner. Significant reduction of viral titer was observed at the mid-stage of infection. At the same time, the compound had no effect on the binding and penetration of the viral particle and had no virucidal effect. Genistein dramatically reduces viral DNA concentration when it was added after 8 hours after infection. The mid-stage of infection corresponds to the phase of active viral DNA replication. Meanwhile, genistein was reported as a DNA Topoisomerase II inhibitor, moreover the ASFV genome encodes DNA Topo II gene. Based on this statement the docking analysis of DNA Topo II-genistein interaction has been performed. According to the results, genistein binds to the Topo II ATP-biding site with more affinity compared to the ATP. DNA damage is marker of Topo II

inhibition, which is possible to detect, using comet assay. The comet assay demonstrated dynamic growth of DNA damage in the ASFV-infected genistein treated cells in various time-points of infection. This data shows that the antiASFV activity of genistein is the result of viral DNA Topo II inhibition. The antiviral activity of genistein has been reproduced on the ASFV virulent strain.

Further, apigenin derivatives were also tested against ASFV. The most potent antiASFV activity has been demonstrated by genkwanin. This activity was dose-dependent at early and late stages of ASFV infection. Genkwanin influenced the binding and penetration of a viral particle into a cell, as well as inhibited the process of the viral particle exit from a cell. At early and late stages of infection ASFV exploits microtubule machinery. According to the docking analysis genkwanin interacts with colchicine-binding site of beta-tubulin. The antiviral activity of genkwanin has been reproduced on the ASFV virulent strain.

In order to discover new antiASFV molecules the screening of 90 flavonoid library has been performed. As a result 9 flavonoids were selected and tested on the virucidal and virostatic assays. 7,8-benzoflavone demonstrated virucidal activity and the most potent antiviral effect exerted kempferol. Kempferol demonstrated its activity at early time-points of infection in the dose-dependent manner. The antiviral activity of kempferol has been reproduced on the ASFV virulent strain.

The synergistic activity of apigenin and genistein was studied, the combination of apigenin 6.25 μM, genistein 12.5 μM showed maximum synergy. To sum up, we have investigated 4 potent antiASFV compounds which have a promising potential to be tested in *in vivo* research.