Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Національна академія медичних наук України
ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського»

Міністерство освіти і науки України
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

**Архипова Марина Андріївна**

УДК [615.281.8:615.322].015:577.2](043.3)

# ДИСЕРТАЦІЯ

# ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ФЛАВОНОЇДІВ

09 – Біологія
091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ М.А. Архипова

Наукові керівники: Галкін Олександр Юрійович, д.б.н., проф.
Рибалко Світлана Леонтіївна, д.м.н., проф.

Київ – 2024

# АНОТАЦІЯ

*Архипова М.А.* Вивчення молекулярних механізмів противірусної активності флавоноїдів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2024.

У дисертаційній роботі представлені результати дослідження противірусних властивостей комплексного фітопрепарату та його активних фармакологічних інгредієнтів, встановлення механізмів його антивірусної дії.

Однією з основних задач сучасної фармації є пошук нових лікарських препаратів на основі рослинних компонентів. Серед таких рослинних речовин флавоноїди є перспективним джерелом біологічно активних сполук з широким спектром дії, зокрема з противірусними властивостями. Молекулярні механізми їхньої противірусної дії, головним чином, полягають у блокуванні ферментів, що беруть участь у реплікації вірусів, таких як нейрамінідаза, протеаза і ДНК/РНК-полімераза, а також у модифікації вірусних білків. Комбінування різних флавоноїдів або їх поєднання з синтетичними противірусними препаратами може збільшити їхню ефективність в боротьбі з вірусами. Стратегії доставки ліків, що базуються на флавоноїдах, значно покращують їхню біодоступність. Поява нових вірусних інфекцій з високою вірулентністю та пандемічним поширенням підкреслює необхідність розробки нових противірусних засобів, серед яких флавоноїдні речовини виявляються перспективними. Оцінка противірусної активності коктейлю флавоноїдів може бути корисною для профілактики вірусних інфекцій та покращення сучасної противірусної терапії.

Одним з таких комплексних лікарських препаратів рослинного походження є фітопрепарат на основі лікарських рослин *Filipendula vulgaris, Petroselinum crispum, Apium graveolens, Galium verum, Linaria vulgaris, Calendula officinalis*. Слід зазначити, що лікарські рослини, що складають основу фітопрепарату, містять низку біологічно активних речовин флавоноїдної

природи. Тому актуальним є проведення дослідження антивірусної активності та молекулярних механізмів противірусної активності фітопрепарату та його активних фармацевтичних інгредієнтів.

Перший розділ дисертаційної роботи «Огляд літератури» включає аналіз ролі флавоноїдів в інгібуванні репродукції вірусів, механізмів дії активних флавоноїдних інгредієнтів та їх клінічного значення, а також розгляд потенційних мішеней антивірусної дії рецептору епідермального фактору росту HER-2 та транскрипційного фактору Nrf2.

У другому розділі «Матеріали та методи» описані використані матеріали, середовища, реактиви, культури клітин, віруси та тест-системи. Подано методи, використані у дослідженні, такі як визначення концентрації білку, культивування клітин, визначення цитотоксичної та ефективної концентрації препаратів, аналіз впливу на репродукцію вірусу, інтерфероногенну активність та експресію генів фактору транскрипції Nrf2 та епідермального фактору росту HER-2.

У третьому розділі розглядається дослідження антивірусної активності фітопрепарату та його флавоноїдних компонентів на моделях герпетичної, коронавірусної інфекції, а також вірусу папіломи людини.

Спиртовий розчин фітопрепарату є активним інгібітором реплікації вірусів простого герпесу 1 та 2 типів з індексом селективності 178 для ВПГ-1, 89 для ВПГ-2; 110 для та коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней, 320 для моделі вірусу гепатиту С та 31 для вірусу папіломи людини. Ефективні концентрації фітопрепарату у формі спиртового розчину ($EC_{50}$) за концентрацією поліфенольних сполук становили: 0,31 мкг/мл для ВПГ-1 та вірусу гепатиту С; 0,63 мкг/мл для ВПГ-2 та коронавірусу ТГС; 62,5 мкг/мл для вірусу папіломи людини, що характеризує фітопрепарат у формі спиртового розчину як перспективний антивірусний препарат.

Для фітопрепарату у формі екстракту та капсул значення індексу селективності дорівнювало 500 для вірусу простого герпесу 1 та 2 типів, при ефективній концентрації 0,125 мкг/мл, що характеризує його як активний

антигерпетичний препарат. А на моделі коронавірусу ТГС індекс селективності становив 125 для екстракту, 250 для капсульної маси, при ефективній концентрації 0,63 мкг/мл. При дослідженні фітопрепарату у формі екстракту та капсул на моделі продукуючої вірус папіломи людини культурі клітин HeLa значення ефективної концентрації були 2 мкг/мл, індексу селективності – 31. Отримані результати вказують на більш активну антивірусну дію фітопрепарату у формі екстракту і капсул, ніж фітопрепарату у формі спиртового розчину.

В результаті експериментальних досліджень доведено ефективність фітопрепарату в лікуванні генітального герпесу. На моделі генітального герпесу морських свинок показано, що фітопрепарат при комбінованому режимі (*per os* + аплікація) відстрочує появу перших симптомів і скорочує час перебігу захворювання. Індекс ефективності лікувальної дії фітопрепарату на рівні протигерпетичного препарату ацикловіру.

У четвертому розділі «Механізми противірусної дії фітопрепарату та його активних флавоноїдних компонентів» доведено, що антивірусна активність препарату реалізується за рахунок молекулярних механізмів, таких як інгібування РНК- та ДНК-синтезу, індукції інтерферону, апоптозмоделюючої активності, інгібіції генів ВПГ-1 та коронавірусу ТГС, а також моделювання експресії генів Nrf2 та HER-2.

Було встановлено інгібуючий вплив фітопрепарату на синтез РНК та ДНК. Для дослідження впливу на синтез РНК використовувалася модельна система транскрипції на основі ДНК-залежної РНК-полімерази фагу Т7 (РНКП Т7), яка є ефективною та зручною у використанні. В результаті експерименту було показано, що фітопрепарат блокує синтез РНК *in vitro*. За допомогою обраної для дослідження впливу фітопрепарату на синтез ДНК ПЛР-РЧ системи визначення експресії гена GAPDH з клітинної лінії К562, було встановлено, що фітопрепарат має інгібуючий вплив на експресію гена GAPDH, що свідчить про його здатність впливати на синтез ДНК.

Доведено, що перспективний лікувальний противірусний потенціал досліджуваних форм фітопрепарату реалізується також через імуномодулюючий

вплив шляхом індукції α-інтерферону. Встановлено, що інтерферон, індукований досліджуваним фітопрепаратом, можна класифікувати як α-інтерферон. Рівень індукції ендогенного α-інтерферону досліджуваним фітопрепаратом подібний до ефекту, який спричиняє референтний препарат поліінозинової-поліцитидилової кислоти.

Показано, що у клітинах Jurkat, які були інфіковані вірусом простого герпесу 1 типу (ВПГ-1), спостерігалося значне збільшення апоптозу – на понад 30% у порівнянні з інтактною культурою клітин. Також відзначалося зниження вмісту клітин у фазі S та збільшення вмісту клітин у фазі G2/M. Використання фітопрепарату помітно знижувало вміст апоптотичних клітин, а також нормалізувало розподіл клітин за фазами клітинного циклу.

У дослідженні впливу фітопрепарату на гени вірусу простого герпесу UL10, UL23, UL30, UL1, UL48 методом ПЛР, вперше було встановлено, що фітопрепарат, а також синтетичний флавоноїд апігенін, інгібували експресію гена UL10, який кодує глікопротеїн M, необхідний для реплікації вірусу в культурі клітин.

Методом молекулярного докінгу показано, що флавоноїдні компоненти фітопрепарату, такі як кверцетин, лютеолін та апігенін, виявили здатність ефективно взаємодіяти з важливими компонентами вірусу SARS-CoV-2. Вони успішно утворювали комплекси з білково-нуклеїновим комплексом NSP16-NSP10-РНК, метилтрансферазою, основною протеазою та РНК-залежною РНК-полімеразою. Аналіз взаємодії показав, що ці інгібітори блокують активність ферментів вірусу, завдяки розміщенню у важливих регуляторних кишенях або блокуванню каталітичної діади, що вказує на потенційну антивірусну активність досліджуваних інгібіторів проти SARS-CoV-2.

За результатами дослідження вплив фітопрепарату у формі спиртового розчину та його активних флавоноїдних компонентів на експресію генів коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) встановлено, що фітопрепарат та його активні компоненти – апігенін і тетраметоксикверцетин інгібують експресію генів ORF1a та ORF3b коронавірусу ТГС. Отримані

результати свідчать про те, що механізм антивірусної дії фітопрепарату, як можливого антикоронавірусного агента, відбувається за рахунок інгібування генів і відкривають перспективи подальших досліджень у напрямку створення антикоронавірусного препарату.

Результати молекулярного докінгу флавоноїдних компонентів фітопрепарату до сайтів зв'язування гелікази папіломавірусу людини вказують на потенційну можливість цих сполук впливати на репродукцію вірусу. Зокрема, тетраметоксикверцетин продемонстрував змінений зразок зв'язування до гелікази папіломавірусу, відмінний від кверцетину та інших аналогів. Це свідчить про те, що тетраметоксикверцетин може мати унікальну взаємодію з геліказою папіломавірусу, що може вплинути на його активність та можливості репродукції.

У дослідженні впливу фітопрепарату на експресію гену транскрипційного фактору Nrf2 *in vitro* в клітинах Jurkat методом ПЛР було встановлено, що інфікування коронавірусом ТГС та ВПГ-1 призвело до незначного зменшення експресії гену транскрипційного фактору Nrf2, але у клітинах, оброблених фітопрепаратом та інфікованих вірусами ТГС та ВПГ-1 рівень експресії гену транскрипційного фактору Nrf2 збільшувався.

Вплив фітопрепарату та синтетичних флавоноїдів на експресію гена рецептора епідермального фактора росту HER-2 у клітинах Jurkat, інфікованих клітин вірусом простого герпесу 1 типу призводив до збільшення рівня експресії ДНК рецептора епідермального фактора росту HER-2 та до зменшення рівня експресії мРНК рецептора епідермального фактора росту HER-2. Однак обробка клітин фітопрепаратом спричинила зменшення цього показника. Транскрипційний аналіз експресії гена рецептора епідермального фактора росту HER-2 після обробки клітин фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами показав, що інфікування клітин цим вірусом не суттєво впливає на рівень мРНК рецептора епідермального фактора росту HER-2. Обробка клітин фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами призвела до зменшення рівня

мРНК рецептора епідермального фактора росту HER-2, особливо вираженого у випадку фітопрепарату.

У п'ятому розділі було проведено аналіз та узагальнення результатів.

Отримані та проаналізовані результати вказують на перспективність подальших досліджень фітопрепарату в якості протигерпетичного, протикоронавірусного та протипапіломавірусного препарату з полімішеневим механізмом антивірусної дії.

**Ключові слова:** флавоноїди, фітопрепарат, вірус простого герпесу 1 типу, вірус простого герпесу 2 типу, коронавірус ТГС, модель вірусу гепатиту С, папіломавірус людини, антивірусна активність *in vitro*, інтерфероногенна дія, апоптозмодулюючий вплив, дослідження *in vivo,* молекулярний докінг *in silico,* транскрипційний фактор Nrf2, рецептор епідермального фактора росту HER-2.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

***Статті:***

1) Galkin A, **Arkhypova M**, Starosyla D, Deriabin O, Vasylchenko O, Rybalko S, Golembiovska, O. Antiviral activity of original flavonoids-containing phytopreparation against human alphaherpesvirus 2, hepatitis C surrogate virus and transmissible gastroenteritis coronavirus. *Farmacia*. 2023 Oct 26;71(5):991–1000. (Scopus, Q2). Доступно на: https://doi.org/10.31925/farmacia.2023.5.14 (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку*)

2) Golembiovska OI, **Arkhypova MA**, Lutsenko TM, Galkin OY. Analysis of the current state of development of antiviral herbal remedies in Ukraine and the world. *Fitoterapia*. 2021;(4):25-30. (Фахове видання категорії Б; 091 Біологія). Доступно на: https://doi.org/10.33617/2522-9680-2021-4-25 (*Особистий внесок здобувача — участь в зборі та аналізі літературних даних наукових джерел, підготовці статті до друку*)

3) **Arkhypova, M.,** Deriabin, O., Trokhymchuk, T., Starosyla, D., Atamaniuk, V., Zavelevich, M., Vialykh, Z., Rybalko, S., & Galkin, A. (2023). The Influence of Flavonoid Compositions on Nrf2 Transcription Factor Expression in Case of Infections Triggered by Influenza A Virus and Transmissible Gastroenteritis Coronavirus. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, *7*(4), 48–56. (Scopus, Q3). Доступно на: https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.4.290103 (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку*)

4) **Архипова М.** Фармакотерапевтичний дизайн комплексного рослинного препарату з поліфункціональною дією (огляд літератури). *Fitoterapia*. 2023;(3):83-94. (Фахове видання категорії Б; 091 Біологія). Доступно на: https://doi.org/10.32782/2522-9680-2023-3-83

5) **Arkhypova, M.,** Palchykovska, L., Platonov, M., Zavelevich, M., Deriabin, O., Atamaniuk, V., Starosyla, D., & Rybalko, S. (2024). Inhibition of Influenza Virus Reproduction by Active Components of «Proteflazidum» Flavonoid Composition: Putative Molecular Targets of Interaction. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 86(1), 26-38. (Scopus, Q4). Доступно на: https://doi.org/10.15407/microbiolj86.01.026 (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку*)

***Тези доповідей:***

6) **Arkhypova M**, Rybalko S, Zavelevych M, Trokhymchuk T, Porva Y. Expression of epidermal growth factor receptor in virus-infected cells *in vitro*. у: Development, education, culture: integration trends in the modern world; 11-14 квіт. 2023; Oslo, Norway. International Science Group; 2023. с. 38-42. Доступно на: https://doi.org/10.46299/ISG.2023.1.14 (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовка тез до друку*)

7) Дерябін О, Рибалко С, Деревянко С, **Архипова М**, Головко А. Розробка засобів молекулярно-генетичної індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней. у: Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування; 27 квіт.-28 квіт. 2023; Харків, Україна. Харків: ДБТУ; 2023. с. 82-5. (*Особистий внесок здобувача — участь у плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці тексту тез*)

8) Дерябін ОМ, **Архипова МА**, Рибалко СЛ, Трохимчук ТЮ, Атаманюк ВП, Галкін ОЮ. Вплив флавоноїдовмісних препаратів на генетичний профіль вірусу герпесу: аналіз експресії генів полімерази, глікопротеїну М та тимідинкінази вірусу простого герпесу 1 типу. У: «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біобезпека»; 12-13 жовт. 2023; Київ, Україна. Київ: Превентивна медицина.

Теорія і практика. №4 (4); 2023. с. 47. (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку*)

9) Лагута ІВ, Ставинська ОМ, Кузема ПО, Аніщенко ВМ, Іванніков РВ, Salmeron AL, Рибалко СЛ, **Архипова МА**, Старосила ДБ, Дерябін ОМ. Склад, антиоксидантна та противірусна активність рослинного екстракту *Anoectochilus Roxburghii* (Wall.) Lindl. У: Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи; 19 квіт. 2023; Житомір, Україна. Житомір: ПП «Євро-Волинь»; 2023. с. 173-5. (*Особистий внесок здобувача — участь у плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів*)

10) Дерябін О, **Архипова М**, Трохимчук Т, Атаманюк В, Завелевич М, Рибалко С, Пальчиковська Л, Порва Ю, Галкін О. Моделювання папіломавірусної інфекції *in vitro* та дослідження впливу флавоноїдних препаратів на репродукцію вірусу папіломи людини. У: Біотехнологія та її роль в забезпеченні здоров'я людей та тварин; 20 груд. 2023; Київ, Україна. Ніжин: ФОП Лисенко М.М.; 2023. с. 54-5. (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці тез до друку*)

11) Завелевич М, Фільченков О, Старосила Д, **Архипова М**, Рибалко С. Моделювання вірусної інфекції на клітинах Jurkat лімфобластного лейкозу людини. У: Біотехнологія і її роль в забезпеченні здоров`я людей та тварин; 20 груд. 2023; Київ, Україна. Ніжин: ФОП Лисенко М.М.; 2023. с. 125-6. (*Особистий внесок здобувача — участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці тез до друку*)

12) **Архипова МА**, Дерябін ОМ, Трохимчук ТЮ, Старосила ДБ, Атаманюк ВП, Завелевич МП, Рибалко СЛ. Вплив флавоноїдних препаратів Протефлазід і Протойл на експресію гена транскрипційного фактора Nrf2 при вірусних інфекціях. У: Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека; 12 жовт. 2022; Київ, Україна. Київ: Заславський О.Ю.; 2022. с. 65. Доступно на:

https://doi.org/10.22141/2224-0586.18.6.2022.1523 (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці тез до друку*)

13) **Архипова МА**, Старосила ДБ, Атаманюк ВП, Луценко ТМ, Пальчиковська ЛІ, Платонов МО, Завелевич МП, Рибалко СЛ. Вивчення молекулярно-біологічних механизмів антивірусної дії препарату Протефлазид та його складових: екстрактів щучника дернистого та війника наземного. У: Хімія природних сполук; 27-28 жовт. 2022; Тернопіль, Україна. Тернопіль: ТНМУ; 2022. с. 180. (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці тез до друку*)

14) **Arkhypova M**, Atamaniuk V, Deryabin O, Starosyla D, Zavelevich M, Loring Salmeron A, Trokhymchuk T, Masyk M, Rybalko S. Effects of flavonoid composition Proteflazid on expression of Nrf2 transcription factor in setting of viral infection. У: Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century; 22-23 верес. 2022; Kyiv, Ukraine. Kyiv; 2022. с. 26. (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці тез до друку*)

15) Kordium V, Rybalko S, Dibrova V, Starosyla D, Shuvalova N, Toporova O, Pokholenko I, Dibrova Y, **Arkhypova M**, Khominska M. Administration of human umbilical cord MSCs changes the course of virus-induced pneumonia in mice. У: Tissue engineering and regenerative medicine international society conference (TERMIS); 28 черв.-1 лип. 2022; Krakow, Poland. Krakow: TERMIS; 2022. (*Особистий внесок здобувача — участь у проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів*)

16) **Arkhypova MA**, Starosyla DB, Rybalko SL, Zadorozhna VI, Motronenko VV, Zavelevych MP, Lutsenko TM, Deryabin OM. Mechanisms of anti-virus action of bacillary biopolymers. У: Механізми розвитку патологічних

процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція; 18 листоп. 2021; Харків, Україна. Харків: НФаУ; 2021. с. 14-5. (*Особистий внесок здобувача — участь у проведенні експериментальних досліджень, підготовці тез до друку*)

17) **Архипова М**, Галкін О, Луценко Т, Старосила Д, Рибалко С, Дерябін О, Васильченко О. Антивірусна активність та механізми антивірусної дії препарату Тазалок. У: Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека; 12-13 жовт. 2021; Київ, Україна. Київ: Заславський О.Ю.; 2021. с. 49. (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці отриманих результатів, підготовці тез до друку*)

18) **Arkhypova MA**, Starosyla DB, Rybalko SL, Lutsenko TM, Motronenko VV. *In vitro* antiviral activity of flavonoid-containing medicinal plants. У: Актуальні питання: «Здоров'я і довголіття – фундаментальні і клінічні дослідження, впровадження. Комплементарні методи як здоровий спосіб життя»; 22-23 жовт. 2021; Київ, Україна. Київ: Наукове видання; 2021. с. 59-60. (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, підготовці тез до друку*)

19) Lutsenko TM, **Arkhypova MA**, Starosyla DB, Rybalko SL, Motronenko VV. Antiviral and antibacterial activity of phytochemicals. У: Актуальні питання: «Здоров'я і довголіття – фундаментальні і клінічні дослідження, впровадження. Комплементарні методи як здоровий спосіб життя»; 22-23 жовт. 2021; Київ, Україна. Київ: Наукове видання; 2021. (*Особистий внесок здобувача — участь у аналізі літературних джерел, підготовці тез до друку*)

***Праці, які додатково відображають результати дисертації:***

20) **Arkhypova MA**, Zherebtsova EM, Atamanyuk VP. Features of the action of substances of the active pharmacological ingredient in the drug Proteflazid®. Prev Med Theory Pract. 2023;4(4):34-40. Доступно на: https://doi.org/10.61948/prevmed-2023-4-34 (*Особистий внесок здобувача — участь в зборі та аналізі літературних даних наукових джерел, підготовка статті до друку*)

21) Golembiovska O., **Arkhypova M.,** Galkin A. Current state of the antiviral herbal preparations development // Efficiency and safety issues of modern multi-component herbal medicines: Monograph / A. Galkin, N. Gorchakova, G.Zaychenko et al.; Editors: A. Galkin, N. Gorchakova. - Kyiv: Igor Sikorsky Kyiv polytechnic institute, Publ. house “Polytechnica”; 2024. - P. 127-133. (*Особистий внесок здобувача — участь в зборі та аналізі літературних даних, написанні розділу 6*)

# ABSTRACT

*Arkhypova M.A.* Study of molecular mechanisms of antiviral activity of flavonoids. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Philosophy Doctor in specialty 091 – Biology. – National Technical University of Ukraine "Ihor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, 2024.

The dissertation presents the results of the study of the antiviral properties of the complex phytopreparation and its active pharmacological ingredients, establishing the mechanisms of its antiviral action.

One of the main tasks of modern pharmacy is the search for new medicines based on plant components. Among such plant substances, flavonoids are a promising source of biologically active compounds with a wide spectrum of action, in particular with antiviral properties. The primary molecular mechanisms behind their antiviral effects primarily involve hindering enzymes crucial for virus replication, such as proteases, neuraminidase, RNA/DNA polymerases. Additionally, they contribute to altering various viral proteins. Combining different flavonoids or combining them with synthetic antiviral drugs can increase their effectiveness in fighting viruses. Drug delivery strategies based on flavonoids significantly improve their bioavailability. The emergence of new viral infections with high virulence and pandemic distribution emphasizes the need to develop new antiviral agents, among which flavonoid substances are promising. Evaluation of the antiviral activity of a cocktail of flavonoids may be useful for the prevention of viral infections and the improvement of current antiviral therapy.

One of such complex medicinal preparations of plant origin is a phytopreparation based on medicinal plants *Filipendula vulgaris*, *Petroselinum crispum*, *Apium graveolens*, *Galium verum*, *Linaria vulgaris*, *Calendula officinalis*. It should be noted that the medicinal plants that make up the basis of the phytopreparation contain a number of biologically active substances of flavonoid nature. Therefore, it is relevant to conduct a study of the antiviral activity and molecular mechanisms of the antiviral activity of the phytopreparation and its active pharmaceutical ingredients.

The first section of the dissertation, "Literature Review", includes an analysis of the role of flavonoids in inhibiting virus reproduction, the mechanisms of action of active flavonoid ingredients and their clinical significance, as well as consideration of the potential targets of antiviral activity of HER-2 and Nrf2.

The second section, "Materials and Methods", describes the materials, media, reagents, cell cultures, viruses, and test systems used. The methods used in the study are presented, such as determination of protein concentration, cell cultivation, determination of cytotoxic and effective concentration of drugs, analysis of the effect on virus reproduction, interferonogenic activity and expression of transcription factor Nrf2 and epidermal growth factor receptor HER-2 genes.

The third chapter examines the study of the antiviral activity of the phytopreparation and its flavonoid components on models of herpes, coronavirus infection, and human papilloma virus.

The alcoholic solution of the phytopreparation is an active inhibitor of the replication of herpes simplex virus types 1 and 2 and TGS coronavirus with a selectivity index of 178 for HSV-1, 89 for HSV-2, 110 for TGS coronavirus, 320 for hepatitis C and 31 for human papillomavirus. The effective concentrations of the phytopreparation in the form of an alcoholic solution ($EC_{50}$) according to the concentration of polyphenolic compounds were: 0.31 μg/ml for HSV-1 and HCV; 0.63 μg/ml for HSV-2 and TGS coronavirus, 62.5 μg/ml for HPV, which characterizes the phytopreparation in the form of an alcoholic solution as promising an antiviral drug.

For the phytopreparation in the form of extract and capsules, the value of the selectivity index was equal to 500 for herpes simplex virus types 1 and 2, at an effective concentration of 0.125 μg/ml, which characterizes it as an active antiherpetic drug. And on the TGS coronavirus model, the selectivity index was 125 for the extract, 250 for the capsule mass, at an effective concentration of 0.63 μg/ml. When studying the phytopreparation in the form of extract and capsules on the model of the human papilloma virus-producing HeLa cell culture, the values of the effective concentration were 2 μg/ml, the selectivity index was 31. The obtained results indicate a more active antiviral effect of the phytopreparation in the form of extract and capsules than the phytopreparation in the form of alcohol solution.

As a result of experimental studies, the effectiveness of the phytopreparation in the treatment of genital herpes has been proven. On the model of genital herpes of guinea pigs, it is shown that the phytopreparation in the combined mode (*per os* + application) delays the appearance of the first symptoms and shortens the course of the disease. The index of effectiveness of the medicinal effect of the phytopreparation is at the level of the antiherpetic drug acyclovir.

In the fourth chapter "Mechanisms of the antiviral action of the phytopreparation and its active flavonoid components" it is proven that the antiviral activity of the drug is realized due to molecular mechanisms, such as inhibition of RNA and DNA synthesis, induction of interferon, apoptosis-modulating activity, inhibition of HSV-1 and TGE coronavirus genes, as well as modeling of Nrf2 and HER-2 gene expression.

The inhibitory effect of the phytopreparation on the synthesis of RNA and DNA was established. To study the effect on RNA synthesis, a model transcription system based on phage DNA-dependent RNA polymerase T7 (T7 RNAP), which is efficient and convenient to use, was used. As a result of the experiment, it was shown that the phytopreparation blocks the synthesis of RNA *in vitro*. Using the PCR-RT system for determining the expression of the GAPDH gene from the K562 cell line, chosen for the study of the effect of the phytopreparation on DNA synthesis, it was established that the phytopreparation has an inhibitory effect on the expression of the GAPDH gene, which indicates its ability to influence DNA synthesis.

It has been proven that the promising therapeutic antiviral potential of the investigated forms of the phytopreparation is realized also through the immunomodulatory effect by induction of α-interferon. It was established that the interferon induced by the investigated phytopreparation can be classified as α-interferon. The level of induction of endogenous α-interferon by the investigated phytopreparation is similar to the effect caused by the reference drug Poly(I)•Poly(C).

It was shown that in Jurkat cells that were infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), a significant increase in apoptosis was observed - by more than 30% compared to intact cell culture. A decrease in the content of cells in the S phase and an increase in the content of cells in the G2/M phase were also noted. The use of

phytopreparation markedly reduced the content of apoptotic cells, and also normalized the distribution of cells according to the phases of the cell cycle.

In the study of the effect of the phytopreparation on the genes of the herpes simplex virus UL10, UL23, UL30, UL1, UL48, it was established for the first time by the PCR method that the phytopreparation, as well as the synthetic flavonoid apigenin, inhibited the expression of the UL10 gene, which encodes glycoprotein M, which is necessary for virus replication in culture cells

The method of molecular docking showed that the flavonoid components of the phytopreparation, such as quercetin, luteolin and apigenin, showed the ability to effectively interact with important components of the SARS-CoV-2 virus. They successfully formed complexes with the NSP16-NSP10-RNA protein-nucleic complex, methyltransferase, basic protease and RNA-dependent RNA polymerase. Interaction analysis showed that these inhibitors block the activity of viral enzymes, due to placement in important regulatory pockets or blocking the catalytic dyad, indicating the potential antiviral activity of the investigated inhibitors against SARS-CoV-2.

According to the results of the study of the effect of the phytopreparation in the form of an alcohol solution and its active flavonoid components on the expression of the genes of the swine transmissible gastroenteritis (TGE) coronavirus, it was established that the phytopreparation and its active components - apigenin and tetramethoxyquercetin inhibit the expression of the ORF1a and ORF3b genes of the swine TGE coronavirus. The obtained results indicate that the mechanism of antiviral action of the phytopreparation, as a possible anti-coronavirus agent, occurs due to gene inhibition and open the prospects for further research in the direction of creating an anti-coronavirus drug.

The results of molecular docking of the flavonoid components of the phytopreparation to the human papillomavirus helicase binding sites indicate the potential of these compounds to influence virus reproduction. In particular, tetramethoxyquercetin demonstrated an altered binding pattern to papillomavirus helicase, different from quercetin and other analogues. This suggests that

tetramethoxyquercetin may have a unique interaction with the papillomavirus helicase that may affect its activity and reproductive capabilities.

In the study of the effect of the phytopreparation on the expression of the Nrf2 transcription factor gene *in vitro* in Jurkat cells by PCR, it was established that infection with the TGE coronavirus and HSV-1 led to a slight decrease in the expression of the Nrf2 transcription factor gene, but in cells treated with the phytopreparation and infected with the TGE and HSV-1 viruses gene expression level of transcription factor Nrf2 increased.

The effect of the phytopreparation and synthetic flavonoids on the expression of the epidermal growth factor receptor HER-2 gene in Jurkat cells infected with herpes simplex virus type 1 led to an increase in the expression level of HER-2 epidermal growth factor receptor DNA and a decrease in the expression level of mRNA HER-2 epidermal growth factor receptor. However, treatment of cells with a phytopreparation caused a decrease in this indicator. Transcriptional analysis of the expression of the epidermal growth factor receptor HER-2 gene after treatment of cells with a phytopreparation and synthetic flavonoids showed that infection of cells with this virus does not significantly affect the mRNA level of the epidermal growth factor receptor HER-2. Treatment of cells with a phytopreparation and synthetic flavonoids led to a decrease in the mRNA level of the epidermal growth factor receptor HER-2, which was especially pronounced in the case of the phytopreparation.

In the fifth chapter, the analysis and generalization of the results is carried out.

The obtained and analyzed results indicate the prospects of further research of the phytopreparation as an anti-herpetic, anti-coronavirus and anti-papilloma virus drug with a multi-target mechanism of antiviral action.

**Key words:** flavonoids, phytopreparation, herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, TGE coronavirus, hepatitis C virus model, human papillomavirus, antiviral activity *in vitro*, interferonogenic effect, apoptosis-modulating effect, *in vivo* research, molecular docking *in silico*, transcription factor Nrf2, epidermal growth factor receptor HER-2.

**ЗМІСТ**

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ..... 23

ВСТУП ..... 24

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ..... 31

1.1. Флавоноїди в системі антивірусної дії ..... 31

1.2. Деякі особливості дії активних флавоноїдних інгредієнтів ..... 36

1.3. Потенційні мішені антивірусної дії флавоноїдних препаратів на рівні клітинного метаболізму ..... 53

1.3.1. Роль рецептору епідермального фактора росту в процесі репродукції вірусів ..... 53

1.3.2. Роль фактору транскрипції Nrf2 при вірусних інфекціях ..... 58

1.3.3. Апоптоз індукованих вірусом клітин та його регуляція флавоноїдами 60

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ..... 63

2.1. Матеріали, використані в роботі ..... 63

2.1.1. Препарати ..... 63

2.1.2. Середовища, реактиви ..... 64

2.1.3. Культури клітин ..... 65

2.1.4. Віруси ..... 66

2.1.5. Тест-системи ..... 67

2.1.6. Тварини ..... 67

2.1.7. Зразки ДНК ..... 67

2.2. Методи, використані в роботі ..... 68

2.2.1. Визначення концентрації білку ..... 68

2.2.2. Культивування культур клітин ..... 68

2.2.3. Визначення цитотоксичної концентрації препаратів ($CC_{50}$) ..... 69

2.2.4. Визначення цитотоксичності препаратів МТТ-методом ..... 70

2.2.5. Визначення ефективної концентрації ($EC_{50}$) ..... 70

2.2.6. Визначення індексу селективності препаратів ..... 71

2.2.7. Дослідження антигерпетичної активності фітопрепарату на моделі вірусу простого герпесу 2 типу *in vivo* ..... 71

2.2.8. Визначення вмісту апоптотичних клітин та розподіл за фазами клітинного циклу ..... 72

2.2.9. Визначення здатності препаратів до індукції інтерферону *in vivo* ..... 73

2.2.10. Визначення вірусного навантаження папіломавірусу людини ..... 74

2.2.11. Метод інгібування РНК-синтезу в системі транскрипції *in vitro* (РНКП Т7) ..... 75

2.2.12. Визначення впливу фітопрепарату на синтез ДНК ..... 76

2.2.13. Дослідження впливу фітопрепарату на експресію генів вірусу простого герпесу 1 типу ..... 76

2.2.15. Дослідження впливу фітопрепарату на експресію генів коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) ..... 80

2.2.16. Аналіз продуктів ампліфікації методом електрофорезу ..... 82

2.2.17. Дослідження впливу фітопрепарату на експресію Nrf2 за допомогою ПЛР аналізу ..... 82

2.2.18. Аналіз експресії гена рецептора епідермального фактора росту HER-2 ..... 83

2.2.19. Молекулярий докінг ..... 84

2.3. Статистична обробка результатів досліджень ..... 85

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ФІТОПРЕПАРАТУ ТА ЙОГО АКТИВНИХ ФЛАВОНОЇДНИХ КОМПОНЕНТІВ ..... 86

3.1. Визначення цитотоксичності фітопрепарату на культурах клітин ..... 86

3.1.1. Визначення цитотоксичності ($CC_{50}$) фітопрепарату за ступенем цитопатичної дії..... 86

3.1.2. Визначення цитотоксичності фітопрепарату МТТ-методом..... 87

3.1.3. Результати визначення цитотоксичності препаратів синтетичних флавоноїдів МТТ-методом..... 88

3.2. Дослідження антигерпетичної активності фітопрепарату на моделі вірусу простого герпесу 1 та 2 типів..... 91

3.2.1. Дослідження антигерпетичної активності на моделі вірусу простого герпесу 1 та 2 типів *in vitro* ..... 91

3.2.2. Дослідження антигерпетичної активності фітопрепарату на моделі вірусу простого герпесу 2 типу *in vivo*..... 98

3.3. Дослідження антикоронавірусної активності фітопрепарату на моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней *in vitro* ..... 100

3.4. Дослідження анти-ВГС активності на моделі вірусу бичачої вірусної діареї *in vitro* ..... 105

3.5. Дослідження впливу фітопрепарату на репродукцію вірусу папіломи людини *in vitro*..... 106

РОЗДІЛ 4. МЕХАНІЗМИ ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ ФІТОПРЕПАРАТУ ТА ЙОГО АКТИВНИХ ФЛАВОНОЇДНИХ КОМПОНЕНТІВ ..... 110

4.1. Дослідження впливу фітопрепарату на синтез РНК в системі транскрипції РНКП Т7 *in vitro* ..... 110

4.2. Дослідження впливу фітопрепарату на синтез ДНК..... 111

4.3. Дослідження індукції інтерферону фітопрепаратом ..... 112

4.4 Визначення вмісту апоптотичних клітин та розподіл за фазами клітинного циклу..... 113

4.5. Аналіз впливу фітопрепарату на гени вірусу простого герпесу 1 типу ... 117

4.6. Дослідження мішеней антикоронавірусної дії фітопрепарату ..... 123
4.6.1 Молекулярний докінг флавоноїдних компонентів фітопрепарату у мішені SARS-CoV-2 ..... 123
4.6.2. Розробка методу молекулярно-генетичної індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) ..... 127
4.6.3. Дослідження впливу фітопрепарату на гени коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней ..... 132
4.7. Молекулярний докінг флавоноїдних компонентів фітопрепарату до сайтів зв'язування гелікази папіломавірусу людини ..... 134
4.8. Вплив фітопрепарату на експресію гену транскрипційного фактору Nrf2 при вірусних інфекціях ..... 137
4.9. Вплив фітопрепарату на експресію гена рецептора епідермального фактора росту HER-2 ..... 139
4.9.1. Аналіз кількості копій гену HER-2 у клітинах після обробки фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами ..... 140
4.9.2. Транскрипційний аналіз експресії гена HER-2 після обробки клітин фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами ..... 141
РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ..... 142
ВИСНОВКИ ..... 151
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ..... 153
ДОДАТОК А ..... 173
ДОДАТОК Б ..... 174

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

$CC_{50}$ – цитотоксична концентрація;

$EC_{50}$ – ефективна концентрація;

GAPDH – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа;

SAM – S-аденозилметіонін;

SI – індекс селективності;

$ID_{50}$ – інфекційна доза вірусу

ВГС – вірус гепатиту С;

ВНК – Baby Hamster Kidney;

ВОФ/RFU – відносна одиниця флуоресценції/relative fluorescence unit

ВПГ – вірус простого герпесу;

ВПЛ – вірус папіломи людини;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ІЛД – індекс лікувальної дії;

ІФН – інтерферон;

КВ – контроль вірусу;

КК – культура клітин;

МО – міжнародні одиниці;

ОГ – оптична густина;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

СНЕВ – свиняча нирка ембріональна версенізована;

ТГС – трансмісивний гастроентерит свиней;

$ТЦД_{50}$ – тканинна цитопатогенна доза;

ФП – фітопрепарат;

$ЦПД_{50}$ – цитопатогенна доза.

# ВСТУП

**Актуальність теми.** Зростання загрози вірусних інфекцій, включаючи нові віруси та зміни в резистентності існуючих, підкреслює актуальність дослідження антивірусних препаратів. Розробка ефективних антивірусних засобів надзвичайно важлива для лікування та профілактики різних вірусних інфекцій [1]. Хімічні препарати, які застосовуються в антивірусній терапії, часто є вузькоспецифічними, тобто вони спрямовані на певні мішені або етапи вірусного життєвого циклу, що обмежує їх ефективність у боротьбі з різними видами вірусів [2]. Тому пошук більш широкоспрямованих та ефективних антивірусних засобів залишається актуальною науковою та медичною проблемою.

Пошук терапевтичних агентів, які мають здатність неспецифічно впливати на діяльність імунної системи, є ключовим для корекції порушень, спричинених різними інфекційними агентами. Вони стимулюють необхідні реакції, спрямовані на запобігання негативних наслідків інфекції для організму-хазяїна. Отже, пошук противірусних засобів не обмежується лише препаратами, що мають безпосередню противірусну активність [3]. Навіть за домінуючої концепції створення фармацевтичних препаратів, яка полягає у їхній здатності селективно впливати на конкретні мішені, наразі зростає інтерес до здатності препаратів або їхніх комбінацій впливати одночасно на кілька мішеней. Флавоноїди є одними з таких препаратів, які відомі своєю здатністю впливати на репродукцію вірусів за рахунок полімішеневої дії [4, 5].

Флавоноїдами називають групу природних біологічно активних сполук – похідних бензопірону, в основі яких лежить фенілпропановий скелет, що складається з С6-С3-С6 вуглецевих одиниць. Це гетероциклічна сполука з атомом кисню в кільці. В залежності від ступеню окислення та гідроксилірування пропанового скелету та розташування фенільного радикалу флавоноїди поділяються на декілька груп: флавони (хризин, апігенін);

ізофлавони; флавоноли; флавонони; флавононоли; флавоноїди. Флавоноїдам властиві виражені антибактеріальна та антиоксидантна дія [6].

В останні роки виявилося, що деякі з флавоноїдів мають антивірусну активність [7, 8]. Особливо важливим є той факт, що такі противірусні ефекти встановлені по відношенню до тих вірусних інфекцій, які мають найбільше значення в сучасній медицині.

Дослідження молекулярних механізмів противірусної активності флавоноїдів має актуальність у зв'язку з розширенням загрози вірусних інфекцій та появою нових вірусів, таких як коронавіруси SARS, MERS, SARS-CoV-2 (COVID-19), віруси пташиного (H5N1), свиного (H1N1, 2009 р.) грипу, віруси Ебола, Зіка та інші. Проблематика полягає в тому, що існуючі методи лікування вірусних захворювань можуть мати обмежену ефективність або призводити до розвитку резистентності вірусів до ліків [9]. Таким чином, пошук нових антивірусних засобів і стратегій стає нагальною потребою.

Флавоноїди, як природні речовини, мають потенційний противірусний ефект через їхню здатність взаємодіяти з різноманітними ферментами вірусів та гальмувати їхню реплікацію [10]. Дослідження механізмів цих взаємодій може розкрити нові можливості для розробки ефективних противірусних препаратів на основі природних сполук та для вже існуючих фітопрепаратів. Такі дослідження можуть сприяти розумінню молекулярних процесів, які відбуваються в клітинах під час інфекції вірусами та можуть вказати на нові точки інгібування репродукції вірусів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась у 2020-2024 рр. в рамках наступних науково-дослідних робіт лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАМН України та кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського: «Клініко-епідеміологічна характеристика, лікування і профілактика COVID-19» (державний реєстраційний номер 0120U101911), «Визначення ролі рецепторів епідермального фактору росту при деяких вірусних інфекціях (COVID-19,

гепатит С, герпетична інфекція)» (державний реєстраційний номер 0121U000202), «Експериментальне дослідження ефективності та безпечності застосування нових фітохімічних та бактерійних препаратів для лікування коронавірусної та інших найпоширеніших інфекцій» (державний реєстраційний номер 0120U105184), «Розробка інноваційних біомедичних технологій та продуктів для діагностики та лікування патологій людини» (державний реєстраційний номер 0119U103789).

**Мета і завдання дослідження.**

***Метою*** дисертаційної роботи є виявлення та вивчення спектру противірусної дії флавоноїдвмісної фітокомпозиції, а також дослідження молекулярних механізмів противірусної активності.

Для реалізації вказаної мети у роботі вирішувались такі ***завдання***:

1. Провести аналіз сучасного стану розробки противірусних фітопрепаратів та визначити фармакологічні та молекулярно-біологічні особливості дії флавоноїдвмісних субстанцій.

2. Дослідити цитотоксичність флавоноїдвмісної фітокомпозиції на основі лікарських рослин *Filipendula vulgaris, Petroselinum crispum, Apium graveolens, Galium verum, Linaria vulgaris, Calendula officinalis* (далі – фітопрепарат).

3. Дослідити противірусну активність фітопрепарату по відношенню до вірусів простого герпесу I та II типів, вірусу трансмісивного гастроентериту свиней, вірусу гепатиту С та вірусу папіломи людини (на моделях *in vitro* та/або *in vivo*).

4. Визначити молекулярні механізми неспецифічної противірусної активності фітопрепарату (вплив на синтез РНК та ДНК, індукція інтерферонів та апоптозу).

5. Визначити молекулярні механізми специфічної противірусної активності фітопрепарату на моделях найбільш перспективних вірусних інфекцій, включаючи молекулярний докінг взаємодії флавоноїдних компонентів та рецепторів зв'язування вірусів.

6. Дослідити вплив фітопрепарату на вірусспецифічні механізми патогенезу – експресію генів транскрипційного фактору Nrf2 та рецептора епідермального фактора росту HER-2 за різних вірусних інфекцій *in vitro*.

**Об'єкт дослідження:** фітопрепарат, флавоноїди, віруси простого герпесу I та II типів, вірус трансмісивного гастроентериту свиней, вірус гепатиту С та вірус папіломи людини.

**Предмет дослідження:** цитотоксичність і антивірусна активність фітопрепарату та флавоноїдів, молекулярні механізми противірусної дії фітопрепарату та флавоноїдів.

**Методи дослідження:** вірусологічні (культивування клітин та вірусу, визначення цитотоксичної та антивірусної дії фітопрепарату, моделювання генітального герпесу *in vivo*), мікроскопічні, молекулярно-біологічні (полімеразна ланцюгова реакція для визначення експресії генів та вірусного навантаження, виявлення апоптотичних клітин з використанням пропідію йодиду за допомогою проточної цитофлуориметрії), методи *in silico* моделювання (прогнозування біологічної активності та молекулярний докінг потенційних мішеней), а також статистичні методи.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показано противірусну активність флавоноїдвмісної фітокомпозиції на основі лікарських рослин *Filipendula vulgaris, Petroselinum crispum, Apium graveolens, Galium verum, Linaria vulgaris, Calendula officinalis* по відношенню до вірусів простого герпесу I та II типів, вірусу трансмісивного гастроентериту свиней, вірусу гепатиту С та вірусу папіломи людини. Вперше показано, що реалізація противірусної активності фітопрепарату відбувається за рахунок низки механізмів, включаючи індукцію інтерферону, спроможність пригнічувати експресію вірусних генів, задіяних в процесах реплікації, інгібуванні синтезу РНК та ДНК, вплив на експресію генів рецепторів Nrf2 та HER-2, апоптозмоделюючу активність.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані наукові дані щодо спектру та характеру противірусної активності флавоноїдвмісної фітокомпозиції на основі лікарських рослин *Filipendula vulgaris, Petroselinum crispum, Apium graveolens, Galium verum, Linaria vulgaris, Calendula officinalis* відкривають додаткові можливості щодо розроблення нових та вдосконалення існуючих лікарських засобів у контексті їх фармакотерапевтичного профілю.

За результатами виконання роботи було впроваджено новий метод молекулярно-генетичної індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (Акт впровадження науково-методичної розробки, наданий ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України" від 29.02.2024 р.). Результати роботи доповнюють науково-методичні основи доклінічного вивчення специфічної активності комплексних рослинних препаратів, в першу чергу, за рахунок комплексного використання методів *in vitro, in vivo* та *in silico*.

Результати роботи враховано при розробленні навчальних програм (силабусів) та впроваджено з 2023/24 н.р. у викладання дисциплін «Основи медичної хімії та біофармації» (бакалаврський рівень вищої освіти) та «Біомолекулярна інженерія» (магістерський рівень вищої освіти) для здобувачів спеціальності 163 Біомедична інженерія на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського (Довідка про використання результатів дисертаційної роботи від 05.03.2024р.).

**Особистий вклад здобувача.** Результати роботи, що викладені в дисертації, одержані автором або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи та узагальнення отриманих результатів проводилося спільно з науковими керівниками д.б.н., проф. Галкіним О.Ю. та д.м.н., проф. Рибалко С.Л.

Інформаційний пошук, опрацювання літературних даних, розробка схем експериментів, планування та розробка методичних підходів виконання комплексу лабораторних досліджень, отримання експериментальних даних, їх узагальнення та інтерпретація автором дисертації виконано особисто.

Визначення цитотоксичного впливу та антивірусної активності досліджуваних препаратів *in vitro* та *in vivo*, визначення індукції інтерферону досліджуваними препаратами проведені спільно з к.б.н. Старосилою Д.Б. та к.б.н. Трохимчук Т.Ю. Дослідження вмісту апоптотичних клітин та розподілу за фазами клітинного циклу були проведені спільно з к.б.н. Завелевичем М.П. Дослідження експресії генів вірусів герпесу 1 типу та коронавірусу ТГС, а також клітинних факторів HER-2 та Nrf2 були проведені спільно з Дерябіним О.М. Спільно із к.б.н. Пальчиковською Л.Г., к.х.н. Васильченко О.В., к.х.н. Платоновим М.О. були проведені дослідження впливу фітопрепарату на РНК- та ДНК-синтез, а також молекулярний докінг потенційних мішеней фітопрепарату.

Аналіз літературних даних за деякими темами проводили спільно із к.фарм.н. Голембіовською О.І., к.т.н. Луценко Т.М., к.б.н. Жеребцовою Е.М., Атаманюком В.П.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основні положення дисертації представлені на науково-практичних конференціях та з'їздах: на V Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів», м. Харків, 2021; на науково-практичному симпозіумі «Актуальні питання: «Здоров'я і довголіття – фундаментальні і клінічні дослідження, впровадження. Комплементарні методи як здоровий спосіб життя», м. Київ, Україна, 2021; на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека», м. Київ, Україна, 2021; на науково-практичній конференції "Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI столітті", м. Київ, Україна, 2022; на VI Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук», м. Тернопіль, Україна, 2022; на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека», м. Київ, Україна, 2022; на конференції Європейського відділення Міжнародного товариства тканинної інженерії та регенеративної медицини (TERMIS),

м. Краків, Польща, 2022; на всеукраїнській науковій конференції «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи», м. Житомір, Україна, 2023; на XIV міжнародній науково-практичній конференції «Development, education, culture: integration trends in the modern world», м. Осло, Норвегія, 2023; на науково-практичній конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування», м. Харків, Україна, 2023; на науково-практичнії конференції з міжнародною участю «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біобезпека», м. Київ, Україна, 2023; на міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія і її роль в забезпеченні здоров`я людей та тварин», м. Київ, Україна2023.

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову працю, з яких: 1 монографія, 3 статті у періодичних виданнях, що індексуються Scopus (Q2, Q3, Q4), 2 статті у наукових фахових виданнях України категорії Б за спеціальністю 091 – Біологія, 1 стаття у іншому періодичному виданні України, 14 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних науково-практичних конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Зміст роботи викладено на 174 сторінках. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, двох розділів власних досліджень, аналізу отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел з 172 найменувань та 2 додатків. Робота містить 27 таблиць та 45 рисунків.

# РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

## 1.1. Флавоноїди в системі антивірусної дії

Вірусні інфекції щороку забирають мільйони життів. Найбільш агресивними вірусними захворюваннями є геморагічні лихоманки Ебола і Марбург, СНІД, грип, гострий респіраторний синдром MERS і SARS та багато інших. А в 2019 році цей список розширився за рахунок захворювань, викликаних нещодавно ідентифікованим коронавірусом SARS-CoV-2.

Основою противірусної терапії є інгібування репродукції вірусу або його компонентів на різних стадіях його репродукції [11]. Загалом, противірусні препарати можна розділити на кілька підгруп за механізмом дії. Це: 1) пригнічення проникнення та злиття вірусу з мембраною клітини; 2) пригнічення вивільнення геному вірусу в клітину-хазяїна; 3) пригнічення транскрипції або синтезу вірусної РНК чи ДНК; 4) пригнічення трансляції або збірки вірусних білків; 5) пригнічення збірки віріонів; 6) пригнічення вивільнення вірусних частинок з клітини.

Рослинні препарати становлять особливий інтерес для дослідників, оскільки природні сполуки можуть використовуватися як інгібітори на різних стадіях репродукції вірусних інфекцій. Особливо цінним є те, що такі рослинні препарати можуть застосовуватись тривалий час і вони не викликають резистентності.

Народна медицина досить часто використовувала різні рослини для лікування захворювань, що викликають віруси, ще до появи специфічних методів лікування. Досить великий діапазон терапевтичної дії рослин зумовлений наявністю в них найрізноманітніших хімічних сполук (алкалоїдів, флавоноїдів, глікозидів, сапонінів, вітамінів, дубильних речовин, ефірних олій тощо) з різною лікарською дією як на організм людини, так і на збудників інфекційних захворювань. Однією з найперспективніших груп біопродуктів ботанічного походження є поліфенольні сполуки, стероїди, алкалоїди, терпеноїди, лігніни та інші фітометаболіти, що належать до біологічно активних

речовин [12, 13]. Рослини, що виділяють ефірні олії, також відіграють важливу роль у профілактиці та лікуванні захворювань, спричинених вірусами [14].

Рослинна сировина є величезним ресурсом для розробки лікарських засобів будь-якої дії, в тому числі і противірусних препаратів. Численні наукові центри в Україні та світі проводять дослідження з метою розробки нових, більш ефективних препаратів, як синтетичних, так і з рослинної сировини [15].

Тритерпенові сапоніни мають структурні особливості, які забезпечують їх здатність змінювати просторову структуру клітинних мембран шляхом зв'язування з мембранними фосфоліпідами, тим самим пригнічуючи адсорбцію вірусів. Поліфенольні сполуки не тільки змінюють заряд клітинної поверхні, але й перешкоджають специфічній сорбції вірусів на рецепторах, тим самим пригнічуючи реплікацію вірусів. Ці дві групи біологічно активних речовин є найбільш перспективними для розробки противірусних фітопрепаратів.

Молекули, що пригнічують активність вірусної нейрамінідази, можуть бути використані для пригнічення останньої стадії репродукції вірусу – вивільнення вірусного потомства. Фенолкарбонові кислоти (наприклад, такі кислоти, як корична, кавова, розмаринова, ферулова та речовини групи кондитерських кислот) можуть імітувати структуру природного субстрату каталітичної ділянки нейрамінідази і таким чином нейтралізувати вірусну нейрамінідазу, що призводить до відсутності її біологічної активності – розщеплення оболонки і вивільнення окремих вірусних частинок [16]. Суміші різних флавоноїдів або комбінації флавоноїдів і синтетичних противірусних препаратів підвищують противірусну ефективність [17].

Нещодавні дослідницькі стратегії доставки ліків зробили значний внесок у подолання низької біодоступності флавоноїдів [18]. Противірусні механізми цих фітохімічних речовин спрямовані в різних напрямках, включаючи антиоксидантну активність, пригнічення синтезу ДНК і РНК, пригнічення проникнення вірусу і пригнічення репродукції вірусу. Однак механізми дії природних противірусних агентів вивчені недостітньо. Ряд фітомолекул, що проявляють противірусні властивості, потребують дослідження таких механізмів

дії [19]. На цьому тлі флавоноїдні коктейлі були протестовані на противірусну активність для профілактики вірусних інфекцій та вдосконалення існуючої противірусної терапії [20].

Останнім часом дослідники вивчали потенціал флавоноїдів, від відомих (наприклад, кверцетин, байкалін, лютеолін, гесперетин, галокатехін галат, епігаллокатехін галат) до менш відомих (наприклад, скутеллареїн, аментофлавон, папіліфлавонол А), на предмет їхньої здатності інгібувати ключові білки, які приймають участь у циклі пошкодження коронавірусу. Флавоноїди є вторинними метаболітами, широко присутніми в рослинних тканинах, мають антиоксидантні та антимікробні властивості та інгібують ключові білки, задіяні в циклі реплікації коронавірусу, включаючи протеази PLpro, 3CLpro та NTPase/геліказа.

Більшість опублікованих на сьогоднішній день робіт присвячено дослідженням *in silico* та *in vitro* флавоноїдів та інших природних структур з використанням функцій молекулярного докінгу [21, 22]. Конструювання та дизайн потрібних лікувальних препаратів є довготривалий процес, який потребує багато часу та великих витрат.

Впродовж останнього десятиріччя набуло популярності застосування, серед інших методів, різних комп'ютерних та інших підходів, зокрема методу структурної біології (structure-based biology), методу вивчення кількісної взаємозалежності поміж структурою та активністю речовин (quantitative structure-activity relationship, QSAR) і різних модифікацій методу так званого молекулярного комп'ютерного сайт-специфічного докінгу (computer-assisted site-specific molecular docking), що називається також методом *in-silico*. Метод QSAR дає змогу відкривати взаємозв'язки поміж структурними особливостями сполук та їхніми біологічними властивостями. Завдяки цьому підходові можна попередньо відібрати велику кількість речовин з різною бажаною біологічною активністю. Застосовуючи метод докінгу, можна передбачити моделі зв'язування інгібітора та досліджуваної мішені. Отримується змога всеосяжно вивчати взаємодії між білком та лігандом і характеристики цієї взаємодії, як

гідрофобність, енергія зв’язування, водневий донор-акцепторний зв'язок (hydrogen bond donor-acceptor), геометрична компліментарність (geometry complementariIy) та розподіл електронів (electron distribution). Знання взаємодій між лігандами та рецепторами допомагає опрацьовувати як нові ліки, так і нові методи лікування. Отримані величини відхилення середнього значення квадратного кореня (root mean square deviation values, RMSD values) використовуються для оцінки результатів докінгу лігандів з рецепторними білками. Ці значення RMSD виводяться з координат поміж атомами та їхніми конформаційними змінами. Енергія зв’язування (kcal/mol) дає змогу дослідити та порівняти афінність зв’язування різних лігандів/компонентів з їхніми відповідними рецепторами/мішенями. Енергія зв’язування являє собою суму загальної внутрішньої енергії мінус енергії, що стосується незв’язаної системи. Нижча енергія зв’язування вказує на більш високу спорідненість (афінність) поміж лігандом та рецептором, тобто про вдаліші результати докінгу. Ліганд з найвищою афінністю обирають потім для подальшої роботи, спрямованої на створення нових лікувальних препаратів [23]. На додачу до названих підходів застосовують також і метод молекулярно-динамічної симуляції (molecular dynamics simulation, MD-simulation), додатково оцінювання стабільності комплексу поміж білком та лігандом.

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

Коли йдеться про мішені для флавоноїдів з метою терапії вірусних хвороб, доводиться розглядати питання про особливості структури вірусних часточок та тих вірусоспецифічних сполук, які виникають у клітині хазяїна після їхнього

проникнення та репродукції. На сьогодні це в основному відомо. Як правило, при вірусних (та й інших численних інфекціях та інвазіях) в організмі виникає запалення. Це процес, що виникає в організмі у відповідь на потрапляння туди чужорідної субстанції. Імунні клітини розпізнають, наприклад, бактерії, віруси, паразитів, хімічні/антигенні речовини за допомогою так званих рецепторів. Розпізнавши чужорідні субстанції, організм активує прозапальні провідні шляхи, що призводить до синтезу цитокінів та активації клітин імунної системи, включаючи макрофаги та фагоцити, які видаляють чужорідні структури. Якщо організм не може цього зробити на ранньому етапі, запалення посилюється; хронічна фаза запалення супроводжується надмірною продукцією цитокінів, хемокінів та ферментів, які сприяють запаленню. Запалення регулюється численними провідними шляхами, включаючи Toll-подібні рецептори (Toll-like receptors), провідний шлях міоген-активованої протеїнкінази (mitogen-activated protein kinase, MAPK), енхенсер легкого ланцюга ядерного фактора к (NF-κB) в активованих В-клітинах, що здатен активувати понад 50 генів, причетних до процесу запалення. Як відомо, NF-κB регулює експресію ферменту циклоосигенази 2 (cyclooxygenase 2, COX2) та багатьох цитокінів, що далі активують клітини ендотеліальної системи. Здійснюється наступний каскад сигналізації, що призводить до залучення нейтрофілів, які вивільнюють простагландин Е2 (PGE2), використовуючи COX1 чи 2, цитокіни, високореактивні форми кисню (reactive oxygen species, ROS) та гістаміни, викликаючи біль та запалення. Порушення регуляції таких процесів призводить до численних розладів, пов’язаних із запаленням (судинної проліферації, руйнування тканин, фіброзу) та до вторинних хвороб, таких як артрит, атеросклероз, хвороби серця та судин, хвороба Альцгеймера, астма та рак [24].

Дизайн та опрацювання лікувальних препаратів проти коронавірусів, особливо проти COVID-19, припадає на період, коли вже значною мірою для такої мети було випробувано найпередовіші підходи, зокрема методи аналізів амінокислотних послідовностей вірусних білків та моделювання гомології білків, а також комп’ютерного докінгу у поєднанні з різноманітними біопробами.

У деяких роботах [25, 26] досліджено мутації вірусу SARS-CoV-2 та/або його антигенні зміни, щоб знайти консервативні мішені. В результаті молекулярних та модельних досліджень підтвердилася генетична стабільність SARS-CoV-2 у певних послідовностях його білків, незважаючи на величезну його мінливість та виникнення в період пандемії численних варіантів, від зараження якими деяких осіб не рятували ні щеплення частково опрацьованими вакцинами, ні наявність антитіл проти попередніх штамів, отриманих після клінічної чи латентної хвороби. Те саме стосується й інших збудників, особливо збудників вірусної природи, мінливість яких давно вже стала великою проблемою. Наголос на встановленні генетично стабільних послідовностей викликає сьогодні надію на отримання антивірусних препаратів-«довгожителів» та довготривалі успіхи терапії при клінічному застосуванні таких сполук.

### 1.2. Деякі особливості дії активних флавоноїдних інгредієнтів

Паралельно з численними практичними набутками, отриманими при лікувальному застосуванні препарату в клінічних і в амбулаторних умовах, у літературі з’явилися також результати вивчення окремих речовин активного фармакологічного інгредієнта. У даному випадку такими речовинами виявились флавоноїди – гідроксильовані поліфеноли, дуже поширені в рослинному світі нашої планети. Багато з рослин, що містять флавоноїди успішно використовуються в практиці народної медицини всіх країн світу. З 1970-х рр. цілеспрямоване дослідження флавоноїдів значно розширилося завдяки опрацюванню нових методів та підходів [27].

Флавоноїди – це клас численних вторинних продуктів обміну рослин; ці сполуки мають три бензольних кільця, з яких два – А та В – сполучені поміж собою трикарбоновим гетероциклічним пірановим кільцем (С-кільцем), утворюючи основний вуглецевий скелет С6-С3-С6. На сьогодні ідентифіковано вже понад 9 тис. таких продуктів різних підкласів; до них невпинно додаються все нові й нові сполуки по мірі все повнішого фармакологічного вивчення різних

рослин з різних континентів [28].

Детальне вивчення кожного з активних фармакологічних інгредієнтів дає змогу зрозуміти точну направленість їхньої дії та правильно й доцільно застосовувати кожен з названих інгредієнтів у конкретних випадках проти конкретних збудників. Деякі з цих збудників, особливо збудники пандемічного значення особливо тяжких хвороб, наразі вже досить широко досліджені при застосуванні найсучасніших методів.

Трицин являє собою флавоноїд з групи флавонів, а саме 4’,5,7-тригідрокси-3’,5’-диметоксифлавон. Цікаві відомості стосовно противірусної дії трицину отримували, використовуючи не очищені речовини, а витяжки з відомих лікарських рослин, які містять цей флавоноїд. Одна з таких рослин – це родіола рожева (*Rhodiola rosea*), давно відомий адаптоген, використовуваний для посилення опору організму людини проти стресів (при неврозах, неспокої та безсонні). Нещодавно показано дію спиртових екстрактів цієї рослини (10 мг/мл) *in vitro* проти вірусу грипу A/HK/I/68 порівняно з відомим та широко застосовуваним противірусним засобом Занамівіром. Вплив екстракту родіоли вивчали, використовуючи клітини MDCK (Madin-Darby canine kidney cells), де показали гальмування цитопатогенної дії (ЦПД) вірусу та адитивну дію двох флавоноїдів. При цьому має значення час внесення флавоноїдів до використовуваних культур. Внесення препаратів у культуру перед інфікуванням не впливає на хід інфекції. Але обробка флавоноїдами вірусних препаратів перед внесенням їх в культуру заважає утворенню бляшок. Особливо важливим результатом досліджень антивірусної дії екстракту *Rh. rosea* проти вірусу грипу (A/BLN/7/2019) вважають той факт [29], що після численних пасажів вірусу в культурі в присутності екстракту не відбулося відбору вірусних часток, які втратили чутливість до противірусних речовин, присутніх в цьому екстракті (значення $IC_{50}$ становили 0,19-0,26 мкг/мл).

Японські дослідники [30] першими вивчали противірусну дію трицину *in vivo* та *in vitro* на моделях декількох штамів вірусів грипу A (A/Solomon islands/3/2006(H1N1), A/Hiroshima/52/2005 (H3N2), A/California/07/2009/

H1N1pdm), A/Narita/2009 (H1N1pdm)) та вірусу грипу В штаму B/Malaysia/2506/2004. У даному дослідженні джерелом трицину була відома в Японії лікарська та харчова рослина *Sasa albo-marginata*, застосовувана також і як матеріал для упаковки харчових продуктів. Для визначення протигрипозної активності *S. albo-marginata in vitro* використали лінію клітин MDCK. За умов *in vivo* для досліджень брали адаптований до організму мишей вірус грипу A/PR/8/34/(H1N1) та мишей-самок лінії DBA2-Cr у віці 6 тижнів та вагою 17-19 г. Трицин не токсичний для культивованих клітин та по-різному загальмовує розвиток вірусної інфекції в залежності від внесеної дози трицину (3-30 мкМ/мл) та від випробовуваного вірусного штаму. Значення $EC_{50}$ для різних штамів вірусу грипу А варіює від 3,3 до 10,2 мкМ. Трицин загальмовує розмноження вірусів грипу при додаванні його в культури як до, так і після адсорбції вірусу клітиною. З цього випливає, що трицин діє на стадії репродукції вірусу, блокуючи продукцію вірусного білка, опосередковувану молекулами клітини-хазяїна. У випадку грипозної інфекції трицин може виступати і як імуномодулятор. При пероральному введенні самкам мишей [30] трицин знижує втрату ваги мишами, зараженими вірусом грипу, та подовжує час виживання заражених мишей. Ефективною виявилась доза трицину 20 мкг/кг маси тіла миші, а токсичність 2000 мг/кг маси миші. Трицин у випадку цитомегаловірусної інфекції загальмовує накопичення простагландину Е2 та синтез циклооксигенази-2 (cyclooxygenase-2, COX-2), виступаючи як інгібітор синтезу цього ферменту. Те саме показано у випадку вірусу грипу. Отже, трицин стримує процес запалення та імунні відповіді, пов’язані з запаленням, індукованим грипозною інфекцією. Те саме стосується й вірусів простого герпесу. Доведено, що інгібітори COX-2 пригнічують реактивацію вірусу простого герпесу на мишачій моделі латентності, а також проявляють активність проти вірусної інфекції у мишей.

Флавоноїд лютеолін за хімічною структурою являє собою біфлавоноїд (дифенілпропан, C6-C3-C6) та містить чотири гідроксильних групи; це 3,4,5,7-тетрагідрофлавон. У похідних лютеоліну його гідроксильна група заміщується іншими групами у положеннях 3’, 4’, 5’ чи 7’. Лютеолін та його похідні можуть

існувати у вигляді агліконів, а також сполучатися з одним чи кількома цукрами, утворюючи глікозиди. У результаті подальшого метаболізму лютеолін може утворювати й інші похідні – глюкуроніди, моноглюкозиди, моноглюкориди, сульфати тощо. Як сам лютеолін, так і його численні похідні показали при вивченні *in vivo* та *in vitro* різноманітні біологічні активності, включаючи регуляцію імунних процесів, протизапальну, протиракову, антигіперглікемічну, гепатопротекторну, протиалергійну та антиоксидантну дію; сприяють профілактиці серцевих хвороб, старінню та хворобі Альцгеймера, лікуванню виразок, а також спрямовані проти мікроорганізмів та вірусів [27, 31]. Лютеолін здатен регулювати поляризацію макрофагів. Він може уповільнювати синтез реактивних видів кисню в клітинах мишачих макрофагів RAW264.7, простимульованих ліпополісахаридами, понижувати активацію інфламосомного комплексу NLRP3.

Стосовно антивірусної дії лютеоліну доведено його антинейрамінідазну активність *in vitro* [32]. Показано, що лютеолін заважає розмноженню вірусу грипу А на ранніх стадіях вірусної інфекції та помірно блокує адсорбцію та інтерналізацію цього вірусу. Така активність частково обумовлена націленістю лютеоліну на хазяйський білок COPI (coat protein I complex). Комплекс COPI містить дев’ять різних субодиниць. Одна з них, β-COP, становить основний компонент ко-атомного комплексу (co-atomer complex). Комплекс COPI бере учать у перенесенні певних структур поміж апаратом Гольджі та ендоплазматичним ретикулюмом, опосередковуючи проникнення в клітину вірусу грипу та його просування в ендоплазмі. При ушкодженні цих комплексів страждає функція сортування в ендосомах, утворення везикулярних пухирців (vesicular bodies formation) та рух мембрани (membrane trafficking). Перенесення vRNP в ядро може затримуватися через виключення експресії на ранніх стадіях інфекції. При відсутності активності COPI чи при виснаженні його запасів у інфікованих клітинах на ранніх стадіях інфекції загальмовується пересування вірусних часточок, які потрапили в клітину. Коли чутлива клітина інфікується вірусом грипу, комплекс РНК з РНК-полімеразою переноситься в клітину та

відіграє важливу роль у реплікації та транскрипції РНК.

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

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

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

Кверцетин – це природний флавоноїд, який зустрічається в різних продуктах, таких як фрукти, овочі, чай та червоне вино. У найновіших дослідах виявлено, що кверцетин має потенційні антиоксидантні, протизапальні та

антивірусні властивості [33, 34].

Клінічне значення кверцетину вивчається у зв'язку з його можливістю зменшення запалення, підвищення імунітету та боротьби зі стресом оксидативного типу. Деякі дослідження показують його потенційну ефективність у підтримці здоров'я серцево-судинної системи, зниженні ризику розвитку захворювань, пов'язаних з запаленням, і підтримці імунітету [35].

Кверцетин, як було встановлено, пригнічує широкий спектр штамів вірусів грипу, включаючи A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/FM-1/47/1 (H1N1) і A/Aichi/2/68 (H3N2) з $IC_{50}$ – 7,756 ± 1,097, 6,225 ± 0,467 і 2,738 ± 1,931 мкг/мл відповідно [36]. Дослідження механізму його противірусної активності виявили, що кверцетин взаємодіє з субодиницею HA2 [36].

Дигідромірицетин [37] в експериментах *in vitro* на культурі клітин MDCK, інфікованих вірусом грипу H1N1, виявив чіткий антивірусний ефект: $IC_{50}$ = 2,8 мкг/мл (8,7 мкМ). Інший флавоноїд - 5,7,3’,4’-тетра-О-метил-кверцетин продемонстрував більш виражений антивірусний ефект із $IC_{50}$ = 0,13 мкг/мл (0,36 мкМ) проти вірусу грипу H1N1, тобто його ефективність була майже такою ж, як у Озельтамівіру, синтетичного протигрипозного препарату. Дослідження механізмів дії даних флавоноїдів показало, що вони зв’язуються з поверхнею віруса H1N1 і запобігають його прикріпленню до клітини-господаря [37].

У іншій серії експериментів було проведено дослідження противірусної активності кверцетину стосовно вірусу псевдосказу *in vitro* та *in vivo* [38]. Кверцетин *in vitro* суттєво інгибував вірулентний штам вірусу псевдосказу HNX при напівмаксимальній інгібуючій концентрації $IC_{50}$=2,618 мкМ та індексі селективності 229. Ця противірусна активність кверцетину була дозозалежною. Крім того, кверцетин також пригнічував широкий спектр штамів вірусу псевдосказу, таких як Ea, Bartha і Fa. Дослідження механізму антивірусного ефекту свідчить, що кверцетин відповідає за інгібування адсорбції вірусу псевдосказу. Аналіз можливих взаємодій кверцетину із вірусом псевдосказу *in silico* дозволяє припустити, що кверцетин може взаємодіяти з gD-білком на поверхні вірусу псевдосказу, що є важливим для запуску вірусної інфекції. Крім

того, *in vivo* ін'єкція кверцетину захистила мишей від летального зараження, знизивши вірусне навантаження на мозок інфікованих вірусом псевдосказу мишей і їх смертність [38].

В експериментах на культурі Huh7-клітин, інфікованих вірусом гепатиту С, було досліджено противірусну активність флавоноїду кверцетину щодо вірусу гепатиту С, зосереджуючи основну увагу на протеазі NS3. Клітини Huh-7 трансфікували плазмідою EGFP-NS5A/B-DsRed-NLSX3, яка містить ген протеази NS3. Кверцетин не виявляв цитотоксичності щодо клітин Huh-7 у концентрації 10 мкг/мл. При обробці кверцетином у концентрації 10 мкг/мл даної культури рівні експресії протеази NS3 у клітині були знижені до 90%, що дає можливість припустити, що одним із механізмів реалізації противірусного ефекту кверцетину стосовно вірусу гепатиту С може бути інгібування данного ферменту. Крім того, за даної концентрації кверцетину (10 мкг/мл) цей флавоноїд здатен інгібувати химерний вірус гепатиту С HJ3–5. Кверцетин пригнічує вироблення такого вірусу гепатиту С на 95%. Кверцетин ефективно взаємодіє з РНК вірусу гепатиту С і знижує її рівень, що призводить до інгібування вірусу гепатиту С [39].

Чой та ін. вивчали противірусну активність 7-рамнозиду кверцетину щодо вірусу епідемічної діареї свиней (PEDV) в культурі клітин Vero [40]. Вірус епідемічної діареї свиней належить до класу альфа-коронавірусів і родини вірусів *Coronaviridae*. Це вірус має оболонку та геном, представлений одноланцюговою позитивною РНК розміром 30 kbp і викликає гостру діарею, блювоту, зневоднення та високу смертність у свиней [41]. Кверцетин 7-рамнозид інгібував процес реплікації вірусу епідемічної діареї свиней PEDV. Він пригнічував ранню фазу реплікації вірусу епідемічної діареї свиней. $IC_{50}$ 7-рамнозиду кверцетину становила 0,014 мкг/мл, тоді як його значення $CC_{50}$ клітин Vero було 100 мкг/мл [40]. Крім того, ефективність кверцетину 7-рамнозиду проти двох інших вірусів (вірусу трансмісивного гастроентериту TGEV, респіраторного корона вірусу свиней PRCV) була нижчою порівняно з вірусом епідемічної діареї свиней. Деякі структурні аналоги кверцетину 7-рамнозиду:

кверцетин, апігенін, лютеолін і катехін, також виявили помірну активність проти вірусу епідемічної діареї свиней.

Veckenstedt та ін. провели дослідження *in vivo* на різних лініях мишей (гібриди ABD2F1, AB/Jena X DBA 2/Jena) із різними штамами кардіовірусів (MengoM, штам вірусу енцефаломіокардиту (EMC), штам Col. SK і MM) [42]. Кверцетин у дозі 80–240 мг на кг маси тіла не спричиняв токсичного ефекта у мишей і захищав їх від летального зараження різними штамами кардіовірусів. Однак, цей захисний ефект був відмічений лише при профілактичному введені кверцетину за 3 дні до зараження штамами вірусів шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції. Під час досліджень *in vitro* на клітинах L-929, інфікованих кардіовірусом, було відмічено, що кверцетин не був ефективним [42].

На культурі клітин BEAS-2B (іммортализовані епітеліальні клітини бронхів людини), інфікованих вірусними штамами ріновірусу (RV1B та RV39) вивчали противірусну активність кверцетину у концентраціях 5, 10 і 25 мкМ, і показали, що кверцетин знижував репродукцію різних штамів ріновірусу на 75–85% [43]. Дослідження механізму противірусної дії показало, що кверцетин ефективно пригнічував реплікацію риновірусу на стадії транскрипції [43].

Група дослідників вивчала противірусну активність дигідрокверцетину в експериментах на мишах стосовно віруса Коксакі [44]. Лікування проводили за схемою внутрішньоочеревинного шляху введення дигідрокверцетину у дозах 75 та 150 мг/кг на добу протягом 5 днів після інфікування. Було відмічено, що лікування дигідрокверцетином викликало дозозалежне інгібування вірусної інфекції та знизило титр вірусу в тканині підшлункової залози мишей. Механізм дії дигідрокверцетину проти цього вірусу полягав у пригніченні процесу його реплікації [44].

Щоб встановити наявність противірусного ефекту кверцетину стосовно вірусу Денге Zandi та ін. використовували клітини Vero, інфіковані штамом віруса Денге DENV-2 New Guinea C (NGC) [45]. Значення $CC_{50}$ для кверцетину стосовно культури клітин Vero становило 252,6 ± 0,17 мкг/мл. Кверцетин

інгибував вірус Денге DENV-2 ($IC_{50}$ = 35,7 мкг/мл) дозозалежно. Продукція РНК-копій віруса Денге DENV-2 була знижена на 67% при застосуванні 50 мкг/мл кверцетину. Кверцетин не мав значного віруліцидного ефекту на вірус Денге DENV-2, але при профілактичному додаванні до клітинної культури від 5 годин до 4 днів перед зараженням вірусом у концентрації 28,9 мкг/мл кверцетин виявляв ефективну інгібуючу дію проти віруса Денге DENV-2. При збільшенні концентрації кверцетину за тією ж схемою введення, продукція РНК віруса Денге DENV-2 знизилася більш ніж на 75%. Позаклітинної інгібуючої активності кверцетину проти віруса Денге DENV-2 не спостерігалося. Ці результати показують, що кверцетин впливає на внутрішньоклітинну реплікацію віруса Денге, але не на вхід і приєднання віруса Денге до клітини-господаря [45].

Противірусна активність кверцетин-3ß-O-D-глюкозиду досліджувалась на культурі епітеліальних клітин Vero E6, інфікованих двома різними штамами вірусу Ебола - EBOV-Kikwit і EBOV-Makona [46]. При визначенні цитотоксичної концентрації кверцетин-3ß-O-D-глюкозиду для клітин Vero E6, ця сполука у дозах до 100 мкМ не виявляла токсичності для клітин даної лінії. Кверцетин-3 ß-O-D-глюкозид був здатний інгібувати вірус Ебола *in vitro* ($EC_{50}$=5,3 мкМ), пригнічуючи його розмноження. При тестуванні даного флавоноїда з іншими типами вірусів Ебола, таких як SUDV (штам вірусу Ебола з Судану) і вірусами Ебола дикого типу, він також продемонстрував потужний пригнічуючий ефект, спрямований на проникнення цих вірусів до клітини-хазяїна.

Противірусна активність кверцетин-3ß-O-D-глюкозиду була продемонстровані і *in vivo* у експериментах із адаптованим до мишей штамом вірусу Ебола (MA-EBOV): усі 10 мишей C57BL/6, яким вводили кверцетин-3ß-O-D-глюкозид у дозі 50 мг/кг протягом двох тижнів, а потім інфікували летальною дозою (1000x$LD_{50}$) адаптованого до мишей вірусу Ебола, вижили. Введення кверцетин-3ß-O-D-глюкозиду продовжували протягом ще 48 годин після зараження. У мишей спостерігалася лише мінімальна втрата ваги та легкі ознаки захворювання. Кверцетин-3ß-O-D-глюкозид у дозах 12,5 і 25 кг/мл також

забезпечував профілактичний захист: у відповідних експериментальних групах по 10 тварин летальність склала відповідно – 3 з 10 і 2 з 10 [46].

Апігенін (apigenin, 4’,5,7-тригідрофлавон), найрозповсюдженіший представник флавонових флавоноїдів. Його знайдено у багатьох цінних харчових та лікарських рослинах; він типово містить одну гідроксильну групу в В-кільці та гідроксильні групи у С-кільці. Рослини, до складу яких входить апігенін, використовуються для лікування численних інфекційних та неінфекційних хвороб, включаючи діабет (антигіперглікемічна дія), дизентерію, гепатит, бленорагію (blennorrhagia), злоякісний артрит (cancer arthritis), запалення, геморой та виразки, які виникають при лейшманіозі (leishmanial ulcers), тощо.

Що стосується біодоступності апігеніну, то за сучасною біофармацевтичною класифікацією (Biopharmaceutics classification) апігенін відносять до сполук класу II як речовину з низькою розчинністю у воді, але з високою здатністю проникати в організм через кишківник (high intestinal permeability). Часто їх екстрагують [47] органічними розчинниками (етанол, гексан, етилацетат). На сьогодні запропоновано різні методи для посилення біодоступності та доставки апігеніну до місця його дії [48]; йдеться про застосування мікрочасточок, наночасточок, систему доставки з само-наноемульсифікацією (self-nanoemulsifying drug delivery system), ліпосомні пухирці (везикули), тверді дисперсні часточки та міцели [24].

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

Метод молекулярного докінгу доводить, що при грипі та SARS-CoV-2 апігенін взаємодіє з вірусною РНК-полімеразою (RdRp) через три водневих зв’язки у сайтах Lys545, Arg-A:543 та Arg-A:555. Зв'язування апігеніну з цими

амінокислотними залишками у місці каналу входження нуклеозидтрифосфатів робить зв'язок міцнішим і може модулювати взаємозв’язок. Біоінформатичні комп’ютерні програми (bioinformatic tools) ProtParam та SOPMA дають змогу встановити найкращі місця приєднання апігеніну до вірусоспецифічних структур – RBD (receptor-binding domains) для RdRp і порівняти результати докінгу (docking scores) з результатами, отримуваними для поширених хіміотерапевтичних препаратів уміфеновіра (umifenovir) та ремдесевіра (remdesevir). Отже, за клінічних умов апігенін може сприяти лікуванню хвороб, викликаних РНК-вмісними вірусами, де має велике значення активність RdRp, з грипом та SARS-CoV-2 включно [49].

На клітинах Vero в тесті МТТ спостерігали залежний від дози вплив апігеніну на проліферацію клітин. Значення $IC_{50}$ для апігеніну становить 87,55 мкг/мл.

Показаний також вплив апігеніну на вірус віспи буйволів (buffalo pox virus, BPXV) з роду Orthopoxvirus родини Poxviridae; сьогодні віспа буйволів стала емерджентним зоонозом. Досліди *in vitro* [50] доводять, що на входження BPXV в клітини апігенін не впливає; наявність його в культуральній рідині не заважає вірусним часточкам прикріплюватись і входити в клітину. Як відомо, синтез вірусних білків у випадку BPXV проходить залежно від кепінгу (cap-dependent, IRES-dependent manner), коли центральну роль відіграє ініціація трансляції. Провідна ж роль у ініціації трансляції належить eIF4E/eIF4G. Активований eIF4E приєднується до 5’-кепа мРНК та розпочинає трансляцію. Апігенін зменшує вихід вірусу, вірусного геномного матеріалу та вірусних білків. Флавоноїд зменшує фосфорилювання клітинного eIF4E, це доводить, що eIF4E опосередковує противірусну дію апігеніну. Встановлено, що апігенін здатен також безпосередньо пошкоджувати роботу вірусної полімерази.

Показано, що апігенін та його О-метилпохідна сполука генкванін (genkwanin) мають вплив на розмноження *in vitro* вірусу африканської чуми свиней (African swine fever virus, ASFV, представника родини Asfarviridae), збудника високо контагіозної хвороби домашніх та диких свиней, від якої гине

практично 100 % інфікованого поголів'я. Апігенін дозозалежно впливає на розмноження ASFV, особливо на ранніх стадіях інфекції, крім стадії входження вірусу в клітину. При додаванні в культуру в дозі 50 мкМ через 1 год. після зараження флавоноїд знижує вихід вірусу більш як на 99,99 % [51]. Більш того – апігенін може індукувати продукцію ROS, зупиняти клітинний цикл на стадії G2/M, та викликати аутофагічну («самопереварну») смерть клітини (autophagic cell death).

Усім вірусним збудникам неодмінно притаманна стратегія уникнення імунного нагляду з боку організму хазяїна. Ключовий уроджений РНК-сенсор, який розпізнає чужорідні РНК в організмі, активує каскад реакцій, спрямованих на боротьбу з вірусною інфекцією. Відомо, наприклад, що рівні мРНК та рівні білка RIG-I істотно підвищуються в клітинах A549 та THT-1 після зараження вірусом грипу A/PR/8/34(H1N1) [52]. Вплив апігеніну на ці процеси залежить від його дози. Рівні новосинтезованих після грипозної інфекції IFN типу I (IFN-β) та типу III (IFN-λ1), так само як і цитокінів запалення IL-6 та TNF-α понижуються після обробки апігеніном. Виходить, що апігенін пригнічує експресію RIG-I та понижує синтез IFNs при грипозній інфекції. Хоча і вважають, що апоптоз являє собою стратегію захисту клітин проти вірусної інфекції, але надмірна продукція IFNs та цитокінів при запаленні може спричинити імунопатологічне ушкодження легень внаслідок гострої вірусної інфекції. Показано, що такий апоптоз клітин може бути припинений апігеніном при обробці заражених клітин.

Щоб встановити стадії грипозної інфекції, на які впливає апігенін, клітини A549 обробляли цим флавоноїдом або за 9 год. до зараження, або ж через 9 год. після нього. Результати [52] доводять, що при попередній обробці клітин апігенін ніяк не впливає на хід інфекції, але проявляє свою противірусну дію саме після зараження клітин. В інших дослідах показали, що апігенін знижує рівні NP РНК в клітинах A549 при внесенні його в культуру через 8 год. після зараження. Повний цикл розмноження вірусу грипу складає приблизно 8-10 год. Отже, апігенін не заважає входженню вірусу в чутливі клітини та пізнішій реплікації вірусного генома під час одиничного інфекційного циклу (8 год.).

Однак ця сполука заважає збиранню вірусних часточок (virus assembly).

Показано також деякий вплив апігеніну на ентеровірусні штами BrCr та Fuyang EV-A71, вирощувані в клітинах Vero та RD. Було показано, що апігенін при концентрації $EC_{50}$=10,3 мкМ здатен загальмовувати репродукцію вірусів, знижуючи титри вірусу завдяки пригніченню внутрішнього сайту входження в рибосому (internal ribosome entry site, IRES). Апігенін у концентрації 30 мкМ знижує цитопатогенний вплив ентеровірусу. При вивченні противірусного впливу апігеніну *in vivo* на новонароджених мишей лінії BALB/c було показано, що тварини виявлялися захищеними від смертельного впливу вірусу при інтракранальному його введенні. При дозі препарату 50 мг/кг виживало 88,89% заражених мишей [53].

У дослідах *in vitro* та *in vivo* апігенін проявляє антивірусну дію проти ентеровірусу-71 (EV71), вірусу гепатиту С (HCV), ВІЛ (HIV) та аденовірусів. Розмноження вірусу ящуру (foot-and-mouth disease virus, FMDV) на різних стадіях інфекції уповільнюється завдяки пригніченню IRES-направленої трансляційної активності та синтезу білків [54]. Апігенін заважає також продукції віріонів у клітинах NPC, латентно інфікованих вірусом Епштейна-Барр (Epstein-Barr virus, EBV), перешкоджаючи переходові латентної інфекції в літичну інфекцію [55].

Лінарин, також відомий як акацетин-7-О-рутинозид, є активною речовиною, що міститься в квітах лікарського рослинного виду *Linaria vulgaris*, або льонок. Це флавоноїд, який належить до групи флавонолів. Його хімічна структура включає кілька фенольних груп і представляє собою складну молекулу зі специфічним ароматом і хімічними властивостями. Лінарин відзначається антиспазмодичною дією, яка може сприяти розслабленню м'язів, зокрема, корисною у зменшенні спазмів та поліпшенні функціонування органів, таких як кишечник. Також вивчається протизапальна активність лінарину, що може бути корисною для захворювань, пов'язаних із запаленням. Антимікробні властивості лінарину можуть виявлятися у боротьбі з інфекціями. Також слід зазначити його

антиоксидантні властивості, які допомагають захищати клітини від ушкоджень, спричинених вільними радикалами [56].

Враховуючи різноманітність механізмів противірусної дії різних флавоноїдів перспективним видається дослідження впливу на віруси не лише окремих флавоноїдів, але й їх комбінацій. Наприклад, було досліджено противірусну активність композиції флавоноїдів байкалін-лінарін-ікаріїн-нотогінзенозид R1 (BLIN) на вірусний гепатит качок, викликаний вірусом гепатиту А типу 1 (DHAV-1) [57]. Зокрема, вивчали вплив даної композиції флавоноїдів у дозах 20, 10, 5 і 2,5 мкг/мл на репродукцію вірусу гепатиту А типу 1 *in vitro*, а також вплив даної композиції флавоноїдів у дозах 20 мкг/мл на адсорбцію, реплікацію та вивільнення вірусу гепатиту А типу 1 з застосуванням методу qRT-PCR. Методом МТТ досліджували здатність композиції байкалін-лінарін-ікаріїн-нотогінзенозид стимулювати проліферацію Т- і В-лімфоцитів у дозах 20, 10, 5 і 2,5 мкг/мл. Рівні IL-2 та IFN-γ та загальну секрецію анти-DHAV-1 антитіл після обробки DHAV-1 протягом 4, 8 та 54 годин визначали методом ELISA.

Композиція флавоноїдів байкалін-лінарін-ікаріїн-нотогінзенозид R1 продемонструвала залежну від дози здатність до інгібування репродукції вірусу гепатиту качок А типу 1. Інгібуючий ефект був найвищим при дозі 20 мкг/мл. При цьому вже у дозі 5 мкг/мл дана композиція флавоноїдів значно посилювала проліферацію Т- і В-лімфоцитів. Композиція флавоноїдів байкалін-лінарін-ікаріїн-нотогінзенозид R1 у експериментах *in vivo* стимулювала загальну секрецію антитіл проти DHAV-1 у каченят у дозі 4 мг на каченя, але суттєво не впливала секрецію IL-2 та IFN-γ.

Отже композиція байкаліну з лінаріном, ікаріїном та нотогінзенозидом R1 виявилась здатною до ефективного пригнічення репродукцію вірусу гепатиту качок А типу 1, його адсорбції та вивільнення. Крім того, вона сприяла інтенсифікації противірусної реакції у каченят.

Катехін**.** У *in vitro* дослідженні оцінювали противірусну дію (+)-катехіну щодо вірусу трансмісивного гастроентериту (TGEV) із родини вірусів

*Coronaviridae* [58]. Вірус трансмісивного гастроентериту викликає трансмісивний гастроентерит, особливо у новонароджених поросят, що серйозно загрожує світовій свинарській галузі. Введення (+)-катехіну у культуру клітин ST, інфікованих вірусом трансмісивного гастроентериту, спричинило дозозалежний противірусний ефект: вихід вірусу в культурах, оброблених (+)-катехіном, зменшився майже на три одиниці log10. Кількісний ПЛР-аналіз генома вірусу трансмісивного гастроентериту у реальному часі виявив, що реплікація РНК вірусу була інгібована після обробки (+)-катехіном. Дослідження рівня внутрішньоклітинних активних форм кисню показало, що (+)-катехін зменшує оксидативний стрес, спричинений розвитком інфекції вірусу трансмісивного гастроентериту. Таким чином, (+)-катехін виявляв інгібуючу дію щодо проліферації TGEV *in vitro* та антиоксидантну активність.

Imanishi та ін. перевірили флавоноїди екстракту зеленого чаю щодо їх інгібуючого ефекту на штами вірусів грипу (грипу PR8 (підтип H1N1), штам Aichi H3N2, Sing) [59]. Залежно від дози флавоноїдного екстракту, ріст вірусу сповільнявся логарифмічно. Також він впливав на ранні стадії вірусної інфекції. Даний екстракт зеленого чаю містить багато різних флавоноїдів, однак епігалокатехін є основною його складовою. Противірусна активність проти вірусів грипу А і В епігалокатехіну була детально вивчена на наступному етапі досліджень, при цьому було показано, що в експериментах *in vitro* на культурі клітин, інфікованих вірусами, його $CC_{50}$ було 400 мкг/мл.

Іншими дослідниками згодом було виявлено, що і катехін, і галова кислота *in vitro* є потужними інгібіторами реплікації мРНК вірусу грипу [60]. Крім того, обидві сполуки інгібували нейрамінідазну активність і вірусний глікопротеїн. 50% ефективна концентрація інгібування ($EC_{50}$) катехіну та галової кислоти для вірусу грипу А (H1N1) становила 18,4 мкг/мл та 2,6 мкг/мл відповідно; тоді як 50% цитотоксичні концентрації ($CC_{50}$) катехіну та галової кислоти становили >100 мкг/мл і 22,1 мкг/мл відповідно. При цьому, індекси селективності катехіну та галової кислоти становили >5,6 та 22,1 відповідно [60].

Також було встановлено, що катехін ефективно пригнічував розмноження вірусу грипу H1N1, дозо-залежно знижував рівні вірулентного білку M2, вірусного нуклеопротеїну, аутофагічних маркерів (наприклад, білку LC3B), кількість аутофагічних вакуолей в клітинах, інфікованих вірусом грипу H1N1 [61].

Дослідження Ісаакс та ін. [62] на культурах клітин Vero та CV-1 з штамами різних клінічних ізолятів вірусу простого герпесу (як ВПГ-1, так і ВПГ-2) показали, що усі ці вірусні штами сильно пригнічуються флавоноїдом епігалокатехін галатом. Було виявлено, що дана сполука взаємодіє з білками оболонки gB і gD вірусу простого герпесу, які відіграють важливу роль у злитті плазматичною мембраною та у проникненні вірусу до клітини-господаря. Значення $IC_{50}$ епігалокатехінгалату для ВПГ-1 та його різних клінічно ізольованих штамів коливались в межах від 12 до 25 мкМ, тоді як $IC_{50}$ епігалокатехінгалату для ВПГ-2 та його різних клінічно ізольованих штамів - від 6 до 12,5 мкМ. Усі штами вірусу простого герпесу (як ВПГ-1, так і ВПГ-2) інгібувалися на 100% при концентрації 100 мкМ епігалокатехінгалату. Епігалокатехінгалат не виявляв цитотоксичності як щодо клітин Vero, так і для клітин CV-1 у даній концентрації [62].

Було виявлено, що похідні катехіну, включаючи (-)-епікатехін галат, (-)-епігаллокатехін галат, (-)-епігаллокатехін пригнічують активність ДНК-полімерази вірусу простого герпесу 1 (ВПГ-1 DNAP) [63]. В серії експериментів *in vitro* було показано, що епігаллокатехін галат та епікатехін галат є дуже потужними інгібіторами, при чому: відповідно до значень $IC_{50}$ ці сполуки можна впорядкувати у ряд таким чином:

(-)-епігаллокатехін галат > (-)-епікатехін галат > (-)-епігалокатехін.

Кінетичне дослідження показало, що епігаллокатехін галат здійснює змішане інгібування (конкурентне і неконкурентне) по відношенню до різних локусів ДНК-полімерази вірусу простого герпесу 1 [63].

В експериментах *in vitro* на культурі клітин HepG2.117, які реплікували вірус гепатиту В, вивчали противірусну активність епігалокатехіну галату [64].

Цитотоксичний вплив даного флавоноїду на клітини HepG2.117 був непомітним аж до його концентрації 100 мкмоль/л. Введення епігалокатехіну галату дозозалежно інгибувало експресію антигену вірусу гепатиту В (HBeAg) ($IC_{50}$ = 39,4 мкмоль/л). У той же час рівень експресії поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) залишався переважно незмінним. Тобто епігалокатехін галат специфічно пригнічує саме рівні HBeAg, тоді як рівні HBsAg залишаються незмінними в клітинах HepG2.117.

Утворення ковалентно замкнутої кільцевої ДНК (cccDNA) вірусу гепатиту В і RI-ДНК також дозозалежно інгібується епігалокатехіном галатом. Швидкість інгібування продукції cccDNA становила 36,3%, 63% і 72,4%, коли концентрація епігалокатехіну галату становила 25, 50 і 100 мкмоль/л відповідно [65].

Дослідження противірусної активності епігалокатехіну галату проти вірусу Зіка проводили на культурі клітин, отриманих від *Aedes albopictus*, клон C6/36, інфікованих штамом ZIKV [66]. Спочатку було оцінено, чи може епігалокатехін галат мати віруліцидну дію проти штамів вірусу Зіка - ZIKBVR. Більше 90% активності вірусу пригнічувалось у дозі 200 мкМ епігалокатехіну галату попередньо інфікованим вірусом Зіка протягом 1 години. Це свідчить про те, що даний флавоноїд має потужну віруліцидну дію на вірус. Значення $EC_{50}$ для епігалокатехіну галату було 21,4 мкМ. Також перевірили інший штам вірусу Зіка - MR766. За аналогічних умов експерименту при концентрації епігалокатехіну галату 25 мкМ було відзначено ~85% інгібування. Механізм дії епігалокатехіну галату полягав у пригніченні проникнення віруса у клітини-господарі [66].

Важлива роль флавоноїдів – це гальмування активності ядерного фактора NF-κB, видалення вільних радикалів, участь в ензим-рецепторних системах стосовно таких ферментів, як циклооксигеназа (cyclooxygenase), ліпоксигеназа (lipoxygenase), ксантиноксидаза (xanthine oxydase), альдозоредуктаза (aldose reductase), NDM-1, активатор інсулінового рецептора (insulin receptor activator). BACE-1, AChE, BChE, зниження ушкоджень при ішемії, попередження атеросклерозу, антимікробна, антиканцерогенна, протитромбозна, протизапальна, антиоксидантна та протимутагенна дія [67].

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

## 1.3. Потенційні мішені антивірусної дії флавоноїдних препаратів на рівні клітинного метаболізму

### 1.3.1. Роль рецептору епідермального фактора росту в процесі репродукції вірусів

Серед численних факторів росту епідермальний фактор росту (epidermal growth factor, EGF) належить до самих активних мітогенів. Він відіграє важливу роль в регуляції відновлення і обміну процесів, специфічно звя'зуючись з рецепторами на поверхні клітинних мембран, стимулює таксис фібробластів і епітеліальних клітин, що сприяє загоєнню ран; EGF приймає участь в індукції регенерації печінки разом з іншими факторами росту, серед яких першорядна роль належить інсуліну і глюкагону. В сполученні з інсуліном і дексіміметазоном EGF стимулює проліферацію фібробластів і хондроцитів.

Сьогодні ми знаємо також, що родина рецепторів епідермального фактору росту людини (human epidermal growth factor receptor, HER) грає центральну роль в патогенезі ряду недугів і деяких відомих пухлин людини [68]. Ці рецептори регулюють ріст і виживання клітин, їх деференціювання через шляхи передавання сигналів і участь в діленні клітин. В цю родину входить 4 структури – HER1, HER2, HER3 та HER4, які називають також ErbB1, ErbB2, ErbB3 і ErbB4. Як встановлено в детальних дослідженнях, всі 4 рецептора HER містять багатий цистеїном позаклітинний сайт, до якого приєднується ліганд, трансмембранна ліпофільна ділянка і внутріклітинна область, яка володіє каталітичною активністю тирозинкінази. Рецептор епідермального фактора росту (epidermal

growth factor receptor, EGFR, ErbB1, HER1) – це перша серед відкритих рецепторних тирозинкіназ.

Як виявилося, рецептори епідермального фактора росту розташовані на поверхні клітин в мономерному стані. Коли ж до внутріклітинних структур HER приєднуються ліганди, то білки HER утворюють димери; при цьому відбувається трансфосфорилювання тих білкових доменів, які знаходяться в середині клітини [69]. Для HER2 не знайдено лігандів, які б їх безпосередньо активували; HER2 можуть знаходитися або в стані конститутивної активації, або активуватися при гетеродимеризації з іншими членами даної родини, наприклад, з HER1 і HER3. Утворення димерів або гетеродимерів веде до аутофосфорилювання тирозинових залишків в цитоплазматичних доменах рецепторів і включає різні сигнальні шляхи, зокрема, активовану мітогенами протеїнкіназу (мітогенактивована протеїнкіназа, mitogen-activated protein kinase, MAPK), фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат-3-кіназу (phosphatidylinositol- 4,5-biphosphate 3-kinase, PI3K) і протеїнкіназу С (protein kinase C, PKC). Цей процес, в свою чергу, призводить до проліферації і виживанню клітин, до їх диференціації, а потім до ангіогенезу і до інвазії. Гетеродимери породжують сигнали значно більш високої інтенсивності у порівнянні з гомодимерами, а ті гетеродимери, які містять HER2, особливо міцно зв'язуються з лігандами і передають більш потужний сигнал, так як HER2 перебуває у відкритій конформації і в зв'язку з цим швидше приєднує партнерську молекулу.

Досить обширні дослідження, розглянуті в обзорі Клоди Хупер [70] і в ряді інших робіт, стосуються ролі рецептору епідермального фактору росту у виникненні пухлин людини. Експресія його підсилюється в пухлинних тканинах у порівнянні з нормальними, і тому кількість HER в пухлинах перевищує число цих структур в нормальних клітинах і тканинах.

Відомості, про властивості і будування факторів росту і їх прогностичного значення при лікуванні пухлин, привели до думки, що одним з підходів при лікуванні можуть бути дії, направлені проти тирозинкіназної активності ростових факторів, тобто застосування інгібіторів тирозинкінази (tyrosine kinase

inhibitors, TKI, TKi). Було досліджено ряд таких сполук, і вони суттєво доповнили можливості інших, вже раніше використаних протипухлинних сполук [71].

Віруси також різними шляхами використовують сигнальний каскад EGF «в своїх корисних цілях». Вірус гепатиту С і вірус Епштейн-Барр при зараженні (invasion) активують експресію EGR. Вірус пташиного еритробластоза (avian erythroblastosis virus) кодує скорочену (truncated) конститутивно активну форму рецептора EGF, тоді як білок Е5 вірусу папіломи людини, блокує якимось чином розпад активованих рецепторів, приводячи до того, що інтерналізований вже рецептор повертається на плазматичну мембрану [72].

З'явилася інформація про те, що деякі флавоноїди є інгібіторами тирозинкіназної активності – нові EGFR інгібітори. В роботах останніх років [73–75] повідомляється, що поліфеноли різних структурних класів впливають на активність EGFR [76].

Проте деякі з цих досліджень проводилися в безклітинних системах [73–75]. При дослідженні було розглянуто питання, чи ці інгібуючи ефекти мають відношення до інтактних клітин, чи є ефект специфічним для мішені. Ефективне інгібування рецепторного фосфорилювання призводить до пригнічення подальшого MAPK-каскаду. Таким чином, було досліджено, чи відбивається вплив на рецептор, зниженням активності RTK. Було виявлено, що дельфінідин ефективно пригнічує фосфорилювання EGFR у клітинах HT29 і A431, показуючи, що потужні інгібуючі властивості не обмежуються ізольованим препаратом рецептора. Крім того, дельфінідин був ідентифікований як потужний інгібітор рецептора ErbB2, що зменшує фосфорилювання рецептора ErbB2 у клітинах A431 у тому ж діапазоні концентрацій, що й для EGFR. Рецептор ErbB2 діє переважно як партнер EGF-стимульованого EGFR, що призводить до утворення активного гетеродимера ErbB2 EGFR [74]. Стосовно статусу фосфорилювання дельфінідин не розрізняв EGFR і рецептор ErbB2, що вказує на відсутність специфічності. Однак, щоб вплинути на статус фосфорилювання обох рецепторів, дельфінідин може або діяти як подвійний інгібітор,

націлюючись на кожен з рецепторів, або впливати насамперед на EGFR, що призводить до пригнічення фосфорилювання рецептора ErbB2 шляхом інгібування послідовності кросфосфорилювання [77]. Дослідження активності рецептора ErbB2 зі специфічним інгібітором EGFR AG1478 та інгібітором ErbB2 AG879 окремо та в комбінації показали, що в застосованих клітинних лініях дійсно присутній гетеродимер EGFR-ErbB2. В сигнальному каскаді дельфінідин істотно пригнічував активність ERK1/2 без переваги однієї ізоформи ERK. Порівняно з впливом на EGFR, дельфінідин був менш потужним щодо пригнічення активності ERK1/2. Таким чином, окрім впливу на EGFR, слід враховувати додаткові потенційно компенсуючі клітинні ефекти дельфінідину. Діапазон концентрацій, що призводить до значного зниження фосфорилювання ERK1/2, відповідає попереднім висновкам про пригнічення фосфорилювання подальшого фактора транскрипції Ets-подібної кінази 1 (ELK-1) дельфінідином, виміряним в аналізі репортерного гена [75]. На відміну від дельфінідину, його метоксилований аналог мальвідин не виявляв інгібуючої дії на аутофосфорилювання EGFR та/або рецептора ErbB2 в інтактних клітинах. Ці результати узгоджуються з попередніми дослідженнями впливу мальвідину на активність РТК EGFR у безклітинній тестовій системі, показуючи, що в межах класу антоціанідинів сусідні гідроксильні групи є необхідною умовою для потужного інгібування EGFR [74, 75] . Однак, незважаючи на те, що мальвідін не впливав на розташовані вище RTK, раніше було показано потужне пригнічення активності кіназ ERK1/2 [78]. Таким чином, спокусливо припустити, що ефективне пригнічення фосфорилювання ERK1/2 мальвідином є результатом інтерференції з перехресними сигнальними шляхами, такими як, наприклад, шлях 39,59-циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ). Раніше повідомлялося про флавонол кверцетин як інгібітор активності РТК EGFR [79, 80]. З флавоноїдів, кверцетин продемонстрував найпотужніші інгібуючі властивості щодо статусу фосфорилювання EGFR у клітинах HT29. Було виявлено, що потужне інгібування фосфорилювання EGFR кверцетином пов’язане з ефективним пригніченням активності подальших MAP-кіназ ERK1/2.

Ці дані вказують на те, що в клітинах HT29 кверцетину вдається знижувати активність сигнального каскаду EGFR-MAPK, але, очевидно, з втратою його ефективності. Дослідники спостерігали лише незначний вплив на активність EGFR у клітинах A431 до 200 мкМ [74], що свідчить про специфічність клітинного типу. Однак у підході репортерного гена в клітинах A431 повідомлялося про зниження фосфорилювання фактора транскрипції ELK-1 під час обробки кверцетином [75]. Цікаво, що в клітинах A431 кверцетин також має лише незначні інгібуючі властивості щодо активності рецептора ErbB2.

Результати в клітинах A431 вказують на те, що кверцетин впливає на альтернативні вихідні сигнальні елементи, відповідальні за пригнічення активності ERK1/2, виміряної як фосфорилювання ELK-1. Катехін зеленого чаю EGCG неодноразово описувався як потужний інгібітор активності EGFR в ізольованих тест-системах, а також в інтактних клітинах [81]. Обробка клітин A431 EGCG зменшує залежне від концентрації автофосфорилювання EGFR (70–80% інгібування при 200 мкМ). У клітинах A431 фосфорилювання рецептора ErbB2 також значно пригнічувалося EGCG, хоча й менш ефективно порівняно з дельфінідином. Поліфеноли представляють широкий спектр сполук у нашому раціоні і зустрічаються в основному як глікозиди. Схоже, що біодоступність різних поліфенолів сильно відрізняється, і найпоширеніші поліфеноли в нашому раціоні не обов’язково мають найкращий профіль біодоступності. Глікозиди дельфінідину виявляються в низьких концентраціях як неметаболізовані форми в плазмі, тоді як лише невеликі кількості метаболітів і не можна визначити аглікон дельфінідину [75]. Через незадовільні загальні показники відновлення, які все ще характерні для досліджень біодоступності антоціанів, не можна виключити, що системна біодоступність може бути недооцінена. Але, навіть якщо взяти до уваги деяку недооцінку рівнів у плазмі, видається малоймовірним, що системні концентрації дельфінідину будуть досягнуті, достатні для ефективного інгібування EGFR та рецептора ErbB2.

### 1.3.2. Роль фактору транскрипції Nrf2 при вірусних інфекціях

Вірусна інфекція активує кілька факторів транскрипції, залучених до індукції експресії генів хемокінів, цитокінів, тощо. Один з них – ядерний фактор еритроїдного 2-пов'язаного фактора 2 (Nrf2), який бере участь у складних регуляторних мережах, що контролюють експресію цитопротекторних генів та імунної відповіді. Останнім часом Nrf2 приписують нові ролі, включаючи регуляцію противірусних реакцій. Фактор 2, пов'язаний з ядерним фактором еритроїдного 2 (Nrf2), є транскрипційним фактором, спочатку відкритим як основний регулятор окисно-відновного гомеостазу в клітинах [82]. Взаємодіючі з шляхом NF-κB, Nrf2 координує клітинну відповідь на окислювальний стрес і запалення [83]. Під час окисного стресу Nrf2 дисоціює від свого супресора Kelch-like-ECH-асоційованого білка 1 (KEAP1) у цитоплазмі та переходить до ядра, де він зв'язується з елементами антиоксидантної відповіді (ARE) масиву генів, які кодують білки, що регулюють окислювальний стрес, зменшуючи запалення та забезпечуючи інші цитопротекторні ефекти на транскрипційному рівні [84]. Шлях Keap1-Nrf2-ARE взаємодіє з шляхом NF-κB, регулюючи відповідь на стрес і запалення таким чином, що знижена експресія Nrf2 підвищує експресію NF-κB за допомогою різних механізмів, що важливо для балансу про- та протизапальних факторів [83].

Завдяки таким різнобічним ефектам Nrf2 так само, як і інші фактори транскрипції, бере участь у регуляції захисних систем організму та підтримці клітинного гомеостазу. Тепер стало ясно, що вплив Nrf2 є ширшим, ніж його участь у антиоксидантній відповіді. Зокрема, Nrf2 необхідний для регуляції вродженого імунітету [85]. Експерименти з Nrf2-дефіцитними мишами продемонстрували участь Nrf2 у регуляції експресії генів нейтрофілів, а також генів, пов'язаних з фагоцитозом, функцією рецептора Fc, регуляцією комплементу та імуноглобуліну під час гострих бактеріальних інфекціях [86].

Останнім часом Nrf2 приписують нові ролі, включаючи регуляцію противірусних відповідей [87]. Активація Nrf2 була продемонстрована при багатьох вірусних інфекціях і доведено різні механізми її активації [88–90].

Механізми про- та противірусної активності Nrf2, здається, різноманітні. Є докази того, що роль Nrf2 у противірусному імунітеті може бути частково пов'язана з регуляцією інтерферонової відповіді шляхом інгібування кількох сигнальних компонентів інтерфероніндукуючих шляхів [91, 92]. Тим не менш, як вважають на даний момент, Nrf2 бере участь у репродукції вірусу переважно за допомогою інтерферон-незалежних механізмів [87].

Схоже, що Nrf2 відіграє подвійну роль у вірусних інфекціях, залежно як від типу вірусу, так і від клінічних або експериментальних умов. Багато робіт свідчать про захисну роль Nrf2 при вірусних інфекціях. Наслідки експериментальної вірусної інфекції були більш вираженими у Nrf2-дефіцитних мишей [93]. Застосування активаторів Nrf2 *in vitro* забезпечує цитопротекторний ефект і пригнічує реплікацію вірусу [94]. Противірусні ефекти *in vitro*, пов'язані з активацією Nrf2, були продемонстровані для широкого спектру вірусів різних таксономічних груп, таких як вірус грипу, вірус Зіка, вірус простого герпесу, SARS-CoV2 та інші [91]. Тим не менш, захисну роль Nrf2 при вірусних інфекціях не можна вважати унікальною, беручи до уваги кілька повідомлень про зв'язок між активацією Nrf2 і прогресуванням вірусної інфекції [90].

Транскрипція Nrf2 індукується різними речовинами різних класів. Серед природних активаторів Nrf2 є різноманітні фенольні сполуки, у тому числі флавоноїди [94, 95]. Лютеолін, апігенін, кверцетин, мірицетин, рутин, нарингенін, епікатехін і геністеїн експериментально доведено як індуктори Nrf2 [96]. З іншого боку, доведено, що ці речовини мають противірусну дію проти широкого спектру вірусів [97]. Представляє інтерес оцінка Nrf2-індукуючої активності в експериментальних системах вірусної інфекції, де була продемонстрована противірусна активність цих речовин.

Вивчення динаміки активації Nrf2 при вірусних інфекціях, асоційованих із пневмонією, набуває особливого значення з огляду на роль Nrf2 не лише у вірусній інфекції, а й у супутньому патологічному процесі в органах і тканинах.

### 1.3.3. Апоптоз індукованих вірусом клітин та його регуляція флавоноїдами

Апоптоз – це програмований тип клітинної смерті, який відіграє важливу роль в підтримці нормального фізіологічного розвитку та оптимальної кількості клітин в організмі. Процес апоптозу включає ряд ключових генів і молекул, які активуються і виконують різні функції під час цього процесу.

Каспази є центральним елементом в каскаді апоптозу. Вони діляться на ініціаторні каспази (наприклад, каспаза-8 та каспаза-9), які розпочинають процес, і ефекторні каспази (наприклад, каспаза-3, -6, та -7), які виконують фінальні стадії [98].

Важливим компонентом апоптотичного шляху є сімейство білків, широко відомих як В-клітинна лімфома-2 (Bcl-2). Основною роллю членів родини Bcl-2 є регуляція апоптозу. До Bcl-2 сімейства належать білки, які можуть бути антагоністами апоптозу (наприклад, Bcl-2, Bcl-XL) чи його сприяючими (наприклад, Bax, Bak). Вони регулюють проникнення каспаз та інші події [99].

Цитохром С є центральною фігурою в активації внутрішнього шляху апоптозу, тим самим активуючи каскад каспаз через його взаємодію з апоптоз-асоційованим фактором-1 (Apaf-1). Нещодавні дослідження [100] виявили 14-3-3ε (прямий інгібітор Apaf-1) як цитозольну мішень цитохрому С, що може свідчити про додатковий опосередкований цитохромом С механізм для модулювання апоптозу.

Білок Fas (або CD95) та його ліганд FasL є частинами системи смерті клітин, яка використовується для видалення піддатливих до апоптозу клітин [101]. Цей процес може бути важливим для забезпечення нормальної функції імунної системи та уникнення надмірної проліферації клітин.

Фактор некрозу опухолі TNF-α – це цитокін, який виконує різноманітні функції в організмі, включаючи регуляцію імунітету та запалення. Механізм викликання апоптозу TNF-α пов'язаний з активацією каспаз – класу білків-каталізаторів, які грають ключову роль у викликанні апоптозу [102]. Також, TNF-

α може взаємодіяти зі своїм рецептором, що веде до активації різних сигнальних шляхів, таких як NF-κB (фактор ядра Каппа-B), MAP-кіназні шляхи та інші [103].

Сімейство інгібіторів білків апоптозу, таких як X-зчеплений інгібітор білка апоптозу (XIAP), сурвівін і BRUCE можуть блокувати дію каспаз та інших факторів апоптозу [104].

Віруси простого герпесу (ВПГ) можуть взаємодіяти з клітинами господаря, викликаючи різноманітні ефекти, включаючи апоптозмодулюючий потенціал. Важливо зазначити, що апоптоз (програмована клітинна смерть) та його модуляція в процесі вірусної інфекції можуть відігравати складні ролі в еволюції вірусної стратегії.

Наприклад, ВПГ кодує ряд білків, таких як ICP27, які можуть взаємодіяти з компонентами клітинного апоптозного механізму [105], забезпечуючи вірусові клітинний захист від апоптозу.

Деякі білки ВПГ можуть взаємодіяти з сигнальними шляхами, які контролюють апоптоз. Наприклад, білок vMIA (вірусний мітохондріальний інгібітор апоптозу) може блокувати апоптоз шляхом взаємодії з мітохондріями та інгібувати викид цитохрому C [106 ].

Деякі гени ВПГ можуть взаємодіяти з клітинними механізмами, які контролюють клітинний цикл та поділ, дозволяючи вірусу підтримувати умови, необхідні для свого розмноження. Циклін-залежні кінази (ЦЗК) регулюють переходи між фазами клітинного циклу. Цикліни, що акумулюються в різних фазах циклу, утворюють комплекси з ЦЗК, активуючи їх та сприяючи подальшому переходу клітини через цикл [107]. Циклін-залежні кінази-інгібітори, навпаки, регулюють активність ЦЗК, заважаючи їх функції. Одним з таких інгібіторів є білок p21 [108].

ВПГ може входити в фазу латентності, коли вірусна ДНК залишається вакантною в клітині, не призводячи до активного вірусного розмноження [109]. Це також сприяє уникненню апоптозу, оскільки клітини не виявляють явних ознак інфекції.

Ретинобластома (Rb) регулює перехід від фази G1 до фази S. Фосфорилювання Rb ЦЗК призводить до його деактивації, дозволяючи клітині продовжити цикл [110].

Циклін-залежні кінази (CDK), які контролюють перехід через фазу M клітинного циклу (мітоз) [111]. Їх активація потрібна для розподілу хромосом та поділу клітини.

Один із генів коронавірусу SARS-CoV-2, ORF3a, може сприяти апоптозу через взаємодію з мітохондріями та активацію апоптозних шляхів [112].

Загалом, апоптозмодулюючий потенціал дозволяє вірусам забезпечити оптимальні умови для своєї реплікації та уникнення імунної відповіді. Це слугує однією з ключових стратегій вірусів для успішного інфікування клітин та поширення в організмі.

Флавоноїди можуть впливати на різні аспекти вірусної інфекції, включаючи апоптозмодулюючий потенціал вірусів. Деякі флавоноїди можуть сприяти апоптозу вірусно-інфікованих клітин, спричиняючи їхню програмовану смерть [113]. Це може бути досягнуто через різноманітні механізми, включаючи активацію протеїнкіназ та індукцію сигнальних шляхів, що сприяють апоптозу [114], через блокування антиапоптотичних механізмів, які використовуються вірусами для утримання клітин в живому стані [115]. Це може включати інгібіцію вірусних білків, що захищають вірусно-інфіковані клітини від апоптозу.

Отже, флавоноїди можуть впливати на апоптозмодулюючий потенціал вірусів шляхом різних механізмів, які сприяють апоптозу вірусно-інфікованих клітин та знижують вірусну реплікацію.

# РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

## 2.1. Матеріали, використані в роботі

### 2.1.1. Препарати

**Фітопрепарат** – препарат, який являє собою спиртову настойку суміші лікарської рослинної сировини (1:10): коренів лабазнику шестипелюсткового (*Filipendula vulgaris*) – 0,28 г, коренів петрушки кучерявої свіжих (*Petroselinum crispum*) – 0,225 г, коренів селери свіжих (*Apium graveolens*) – 0,17 г, трави підмареннику справжнього (*Galium verum*) – 0,135 г, трави льонку звичайного (*Linaria vulgaris*) – 0,11 г, квіток нагідок (*Calendula officinalis*) – 0,08 г (екстрагент – етанол 40 %) (Dr. Gustav Klein GmbH & Co. KG, Німеччина). Вміст екстрактивних речовин не менше 1,5 %. Вміст поліфенолів в перерахунку на пірогалол не менше 0,15 %. Ідентифікацію сполук діючих речовин препаратів здійснювали методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектором. Методом UPLC-PDA визначено домінуючі флавоноїди: кверцетин, апігенін, лінарин, лютеолін, ізорамнетин, катехін. Окрім спиртової настоянки фітопрепарат досліджувався у формі сухого екстракту (з сумарним вмістом поліфенольних сполук 0,12 мг в 1 мг сухого екстракту). Сухий екстракт був отриманий шляхом випарювання спиртової настоянки (Др. Густав Кляйн ГмбХ & Ко. КГ, Німеччина). У деяких експертиментах було використано фітопрепарат у формі капсульної маси з сухим екстрактом (з сумарним вмістом поліфенольних сполук 0,036 мг в 1 мг капсульної маси) (Др. Густав Кляйн ГмбХ & Ко. КГ, Німеччина). Склад капсульної маси: сухий екстракт – 35 мг, мікрокристалічна целюлоза – 81,188 мг, магнію стеарат – 0,812 мг. Загальна маса наповнення 1 капсули – 117 мг.

**Апігенін –** 5,7-дигідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-4H-1-бензопіран-4-он, флавоноїд з молекулярною формулою $C_{15}H_{10}O_5$. Жовта кристалічна речовина, розчинена в 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл (Fluka, Німеччина, Cat.#10798).

**Гіперозид –** 3- O – галактозид кверцетину: 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl β-D-galactopyranoside, відноситься до класу

флавоноїдів. Розчинений в 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл (MedChemExpress, США, Cat. # HY-N0452).

**Ізорамнетін –** 3,4′,5,7-Tetrahydroxy-3′-methoxyflavone, О-метильованим флавонолом з класу флавоноїдів з молекулярною формулою $C_{16}H_{12}O_7$. Речовина розчинена в 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл (Fluka, Німеччина, Cat. #17794).

**Кверцетин –** 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-4Н-хромен-4-он, флавоноїд рослинного походження. Речовина розчинена в 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл (ФСЗ ДФУ, Україна, с. № 050120).

**5,7,3',4'-тетраметоксикверцетин** – тетраметоксифлавон, який є похідним кверцетину. Речовина розчинена в 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл (CHEBI, № 85124).

**Лютеолін –** 3',4',5,7-тетрагідроксифлавон, флавон, різновид флавоноїду, жовтого кристалічного вигляду. Речовина розчинена в 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл (Sigma-Aldrich, США, Cat. # L-9283).

**Рутин** – 2-(3,4-дигідроксифеніл)-5,7-дигідрокси-3-[&альфа;-L-рамно-піранозил-(1→6)-&бета;-D-глюкопіранозилокси]-4Н-хромен-4-он, також відомий як кверцетин-3-рутинозид або софорин, є глікозидом флавонолу кверцетину, що сполучений із дисахаридом рутинозою. Речовина розчинена в 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл (ФСЗ ДФУ, Україна, с. № 121119).

**Ацикловір** – референс-препарат, який має чіткий вибірковий механізм дії (фосфорилюється вірусною тимідинкіназою та інгібує вірусну ДНК-полімеразу) (KRKA, Словенія).

Всі досліджувані речовини стерилізували фільтруванням крізь фільтр з діаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt, США).

### 2.1.2. Середовища, реактиви

У дослідженнях використовували такі основні реактиви та культуральні середовища:

- Трипсин – ТРСК (тип XIII з підшлункової залози теляти, Sigma-Aldrich, США, Cat. # N-8642);

- Середовище RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США, Cat. #R8758);
- Ембріональна сироватка (“Fetal Bovine Sera, Heat Inactivated”, Sigma-Aldrich, США, Cat. # F4135);
- PBS (Sigma-Aldrich, США, Cat. # P4417);
- DMSO (Sigma-Aldrich, США, Cat. #D8418);
- 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)2,5-дифеніл тетразоліум броміду (Sigma-Aldrich, США, Cat. # M2128);
- Спирт етиловий 96% розчин (ДП «Укрспирт», Україна)
- RIPA (Novus Biologicals, США, Cat. # NBP2-29447);
- Суміш інгібіторів протеаз (Sigma-Aldrich, США, Cat. # P8215);
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, США, Cat. # M2128);
- Poly I-Poly C – еталонний індуктор ІФН (Calbiochem, USA);
- Heberon – рекомбінантний інтерферон альфа 2в (Heber Biotec SA, Куба).

### 2.1.3. Культури клітин

Вихідні культури клітин були отримані з Депозитарію клітинних ліній і пухлинних штамів Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Для визначення цитотоксичної та антивірусної дії препаратів використовували культури клітин:

**ВНК** («Baby Hamster Kidney») – перещеплювана культура клітин фібробластів нирки хом’яка;

**СНЕВ** (свиняча нирка ембріональна версенізована) – перещеплювана лінія клітин нирки ембріона свині;

**MDBK** (Madin-Darby bovine kidney) – перещеплювана культура клітин нирки бика;

**Jurkat** – суспензійна культура, отримана з периферичної крові дитини з рецидивом Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозу;

**HeLa** (Henrietta Lacks) – перещеплювана культура клітин, отримана з карциноми шийки матки людини;

**$L_{929}$** – перещеплювана культура клітин фібробластів миші;

**К562** – іммортолізована лінія людських мієлоїдних клітин, отриманих від хворого хронічною мієлоїдною лейкемією на стадії бластного кризу.

### 2.1.4. Віруси

У роботі використовували наступні віруси:

**Вірус простого герпесу 1 типу (ВПГ-1)** – **штам VC**, одержаний з музею вірусів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Інфекційний титр ВПГ-1 в клітинній культурі ВНК складав 9,0 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл.

**Вірус простого герпесу 2 типу (ВПГ-2)** – **штам ВН**, одержаний з музею вірусів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Інфекційний титр ВПГ-2 у клітинній культурі ВНК складав 5,5 – 6,0 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл.

**Вірус трансмісивного гастроентериту свиней (ВТГС)** – етіологічний агент трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) – висококо нтагіозного кишкового захворювання свиней. Інфекційний титр ВТГС у культурі клітин СНЕВ складав 6,0–8,0 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл. **Штам $D_{52\text{-}5}$ ($BRE_{79}$)** ВТГС було отримано від Доктора Губерта Лода з Лабораторії молекулярної вірусології та імунології Центру біотехнології INRA в Жуа-ан-Жозасі (Франція).

**Вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД)**, одержаний з музею вірусів Інституту епідеміології і інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Інфекційний титр вірусу після десяти проведених пасажів в культурі клітин MDBK складав 6,0 - 8,0 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл.

**Вірус везикулярного стоматиту, штам Індіана**, одержаний з музею вірусів Інституту епідеміології і інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України. Інфекційний титр в культурі клітин $L_{929}$ складав 4,0-5,0 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл.

**Вірус папіломи 18 типу** – продукується культурою клітин HeLa, які були отримані з Депозитарію клітинних ліній і пухлинних штамів Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

До початку експериментальних досліджень весь вірусний матеріал зберігали при -70 ℃.

### 2.1.5. Тест-системи

У роботі використовували наступні комерційні тест-системи:

- Human ErbB2/HER2 ELISA Kit (Sigma, США, Cat. # RAB0173);
- Protein Quantification Kit-Rapid (Sigma-Aldrich, США, Cat. # 51254);
- Тест-набір для виявлення та диференціації ДНК вірусу папіломи людини (ТОВ «Lightgene», Україні, # LG03-HPV24).

### 2.1.6. Тварини

В роботі використовували самців безпородних морських свинок масою 250-300 г та білих нелінійних мишей, масою 14 – 18 г, одержаних з розпліднику дослідних тварин Національної академії наук України (Глеваха, Україна). Тварин утримували в стандартних умовах віварію, відповідно до «Стандартних правил по впорядкуванню, обладнанню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)».

Всі роботи з тваринами проводились у відповідності до Закону України від 21.02.2006 №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [116] та у відповідності з етичними нормами та правилами роботи з лабораторними тваринами [117], про що є висновок Комітету з медичної етики та деонтології ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» № АЕС/25/2021. Після закінчення експерименту тварин виводили із дослідження гуманним методом за умови нанесення мінімальних фізичних та психологічних страждань.

### 2.1.7. Зразки ДНК

При дослідженні специфічності олігонуклеотидних праймерів були використані наступні зразки ДНК відділу молекулярної біології та фізико-хімічних досліджень Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів:

- Коронавірусу епізоотичної діареї свиней (ВЕДС);

- Коронавірусу собак: вакцина «CvK\LCI-GK» (Форт Додж, США), вакцина інактивована (Пфайзер, США), вакцина «Біокан К» (Bioveta, Чехія);
- Коронавірусу інфекційного бронхіту птиці, серотипи: H120 (Массачусетс), QX, 4/91;
- Вірусу грипу людини ($H_1N_1$);
- Аденовірусу людини тип 4E;
- *Salmonella Enteritidis*;
- *Listeria spp.*;
- *E.coli* (O157);
- *Campylobacter spp.*;
- *Mycoplasma spp.*;
- *Pasterella spp.*;
- *Staphylococcus aureus* (MRSA);
- *Bacillus cereus*.

### 2.2. Методи, використані в роботі

#### 2.2.1. Визначення концентрації білку

Концентрацію білка у зразках вимірювали за допомогою комерційного набору «Protein Quantification Kit» (Sigma, США). Аналіз білка заснований на дії Coomassie Brilliant Blue G, який взаємодіє з білком і забарвлює у синій колір у кислих умовах. Максимальна зміна поглинання при взаємодії з білком відбувається при 595 нм. Визначення концентрації білку проводили згідно до інструкції виробника, у трьох повторах.

#### 2.2.2. Культивування культур клітин

Клітини підтримували у культурі за загальноприйнятим методом [118-120], використовуючи поживне середовище, що складалось з 90% середовища RPMI 1640 з додаванням 10% інактивованої ембріональної сироватки і антибіотиків – пеніциліну та стрептоміцину (по 100 МО/мл).

Клітини вирощували в скляних або пластикових флаконах об'ємом 50-100 мл при 37°С у середовищі із 5% $CO_2$. Кожні 3-4 дні живі клітини підраховували за допомогою трипанового синього та розсіювали в початковій концентрації клітин на 1 мл.

Перещеплювані культури клітин знімали з поверхні флакону за допомогою розчину версену або трипсину, центрифугували і до осаду додавали 1 мл поживного середовища, піпетували й підраховували у камері Горяєва кількість клітин в 1 мл поживного середовища. Клітини розсівали у планшети (плашки) для культур клітин із розрахунку 200 000 клітин в 1 мл [118-120].

### 2.2.3. Визначення цитотоксичної концентрації препаратів ($CC_{50}$)

Для визначення $CC_{50}$ препаратів використовували культури клітин ВНК, СНЕВ, HeLa. Для кожного розведення препарату в поживному середовищі використовували лунки десяти рядків 96-лункових плашек з культурою клітин. Далі планшки інкубували при 37°С та 5% $CO_2$ протягом 5 днів. Експериментальні та контрольні культури щоденно контролювали для визначення ЦПД (цитопатогенної дії).

За зміною морфології клітин (зморщування клітин, округлення, або відокремлювання від поверхні лунок, поява вогнищ дегенеративно змінених клітин) визначали ступінь цитопатогенної дії препаратів на культуру клітин за чотирьохплюсовою системою (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Ступінь цитопатогенної дії препаратів на культуру клітин

| **Ступінь ЦПД** | – | + | ++ | +++ | ++++ |
|---|---|---|---|---|---|
| Дегенерація клітинного моношару | 0 % | 25 % | 50 % | 75 % | 100% |

Цитотоксична концентрація ($CC_{50}$) препарату визначалася найвищою дозою препарату, яка не викликала 50% дегенерації клітин.

### 2.2.4. Визначення цитотоксичності препаратів МТТ-методом

Для визначення життєздатності клітин застосували колометричний автоматизований МТТ-метод, який використовується при визначенні $CC_{50}$ досліджуваних та референтних препаратів при вивченні цитопатогенної дії вірусів та відборі антивірусних ефективних препаратів *in vitro* [121]. Концентрований розчин 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)2,5-дифеніл тетразоліум броміду – МТТ, що містив 7,5 мг/мл речовини, готували на основі стерильного фосфатного буферу (pH 7,4) при кімнатній температурі та зберігали в темній склянці за температури +4°С не більше 1 місяця.

Клітини розсівали в культуральні 96 лункові планшети з початковою концентрацією $5x10^4$ клітин на лунку в 100 мкл ростового середовища, додавали по 25 мкл середовища, що містило різні концентрації препарату. Через 3-5 діб після обробки клітин різними концентраціями препаратів в лунку планшети додавали 20 мкл концентрованого розчину МТТ та інкубували протягом 4 годин за температури 37°С у середовищі із 5% $CO_2$. Далі планшети центрифугували 10 хв при 1500 об/хв в спеціальних люльках для планшет, використовуючи центрифугу К70D (Німеччина). Видаляли середовище, а до осадів фарбованих клітин додавали по 100 мкл розчинника DMSO. Сканували на рідері Elx800uv (BioTEK, USA) при довжині хвилі 570 нм, використовуючи розчинник як бланк. Концентрація речовини, що призводить до зменшення оптичної густини на 50% порівняно з необробленим моношаром клітин (контроль), визначається як $CC_{50}$. Відсоток інгібування життєдіяльності клітин під дією препарату визначали за оптичною густиною досліджуваних зразків в порівнянні з відповідним контролем клітин, який приймали за 100%. Для оцінки впливу речовин на проліферацію клітин був використаний регресійний аналіз [122], що дозволяє кількісно характеризувати цитотоксичну активність зазначеної речовини.

### 2.2.5. Визначення ефективної концентрації ($EC_{50}$)

Ефективна концентрація ($EC_{50}$) являє собою концентрацію препарату, за якої пригнічується рівень реплікації вірусу в інфікованій культурі клітин на 50 %.

Для дослідження ефективної концентрації препаратів, тест-вірус у дозі 100 $ТЦД_{50}$ вносили у відповідну культуру клітин та інкубували при температурі 37°С протягом 60 хвилин. Після адсорбції вірусу на клітинах та видалення його залишків, проводили відмивання клітин поживним середовищем. Потім досліджувані препарати вносили у відповідних розведеннях у підтримуючому середовище, яке складалося з RPMI-1640 та 2% фетальної бичачої сироватки. Відсутність цитопатичної дії (ЦПД) у клітинах, оброблених досліджуваними зразками, при наявності ЦПД в контрольних клітинах, а також зменшення інфекційного титру в оброблених культурах порівняно з контролем, дозволяли визначити ефективну концентрацію ($ЕС_{50}$) препарату.

Інфікування клітин проводили додаванням вірусу до клітинної суспензії в концентрації 4-5*$10^5$ кл./мл. Інфекційний титр визначали таким чином: десятикратні розведення вірусу з досліджуваними зразками вносили в полістиролові планшети, в лунках яких були культивовані клітини. Інфіковані клітини культивували при 37°С протягом 5 діб в атмосфері 5% $CO_2$. Потім з кожної лунки відбирали середовище і визначали наявність в ньому кінцевих розведень по ЦПД. Зниження інфекційного титру на 1,5-2,0 lg $ТЦД_{50}$ свідчило про виражену противірусну активність досліджуваних сполук.

### 2.2.6. Визначення індексу селективності препаратів

Індекс селективності (SI) препаратів визначали шляхом встановлення співвідношення $СС_{50}$ до $ЕС_{50}$ [122, 123]. Досліджувані речовини, які мали SI ≥ 16 в системі *in vitro* вважали більш активними та перспективними для подальшого дослідження.

### 2.2.7. Дослідження антигерпетичної активності фітопрепарату на моделі вірусу простого герпесу 2 типу *in vivo*

У роботі використовувалася модель герпетичної інфекції на самцях мурчаків [124] для оцінки ефективності препарату. Для цього мурчаків інфікували вірусовмісною рідиною з інфекційним титром 6,0 lg $ID_{50}$/мл, яку наносили на попередньо скарифіковану шкіру геніталіїв. Скарифікацію

виконували за допомогою хірургічного ланцету після анестезії тварин ефіром. Розмір площі скарифікації становив 4-7 мм². Вірусовмісну рідину наносили за допомогою піпетки відразу після скарифікації з подальшим втиранням.

Для оцінки клінічних симптомів експериментального генітального герпесу щодня перед проведенням лікування спостерігали протягом всього періоду хвороби. Важкість інфекційного процесу оцінювалася за такими критеріями: ступінь і площа специфічних уражень, наявність гіперемії, набряку, виділень і висипань. Кожну ознаку оцінювали за шкалою від 0 до 4 балів, де максимальна вираженість кожної ознаки оцінювалася в 4 бали [124]. Спостереження за тваринами проводили протягом 20 діб, а кожна група досліджуваних тварин складалася з 5 особин.

Ефективність препарату оцінювали на піку розвитку патологічного процесу, а саме за зниженням вираженості клінічних проявів, скороченням тривалості захворювання та індексу лікувальної дії (ІЛД) у дослідних групах порівняно з контрольною.

$$\text{ІЛД (\%)} = \frac{\sum \text{балів у контрольній групі} - \sum \text{балів у дослідній групі}}{\sum \text{балів у контрольній групі}}$$

### 2.2.8. Визначення вмісту апоптотичних клітин та розподіл за фазами клітинного циклу

Для досліджень препарати вносили до культури на початку логарифмічної фази їхнього зростання. Розчини досліджуваного препарату вносили у культуральне середовище суспензійних культур у зазначених концентраціях так, щоб кінцева концентрація етанолу не перевищувала 0,5%.

Для проведення цитометричного аналізу клітини промивали PBS і фіксували 70% етанолі. До аналізу зразки зберігали при 4°C. Безпосередньо перед проведенням аналізу клітини відмивали центрифугуванням PBS. Аналіз вмісту апоптотичних (гіподиплоїдних) клітин у препаратах проводили за методикою [125]. Клітини інкубували 30 хв при кімнатній температурі з

пропідію йодидом (10 мкг/мл) у забуференому розчині, що містить 0,1% тритон Х-100 і 2,5 мкг/мл РНК-ази А. Після цього клітини відмивали від інкубаційної суміші та суспендували в PBS. Аналіз вмісту гіподиплоїдних клітин та розподілу по фазах клітинного циклу проводили на проточному цитофлуориметрі FACScan, Becton Dickinson, США за допомогою програм WinMDI 2.8 для визначення вмісту апоптотичних клітин та ModFit LT 2.0. визначення розподілу по фазах циклу. Для кожного зразка прораховували флуоресценцію не менше 10 тис. клітин та результати представляли у вигляді гістограм. Мертві клітини та їх рештки виключали з аналізу за даними діаграм прямого та бічного світлорозсіювання. Результати виражені як відсотковий вміст апоптотичних клітин та клітин у кожній із фаз мітотичного циклу (виключаючи апоптотичні клітини). Апоптотичний індекс (AI) розраховували за такою формулою:

$$\text{AI} = \frac{\text{Кількість апоптотичних клітин}}{\text{Загальна кількість клітин}} * 100$$

Розподіл по фазах клітинного циклу вивчали у препаратах клітин, пофарбованих пропідію йодидом, за допомогою проточної цитометрії. Результати аналізували за допомогою комп'ютерних програм ModFit LT 2.0 ("Verity Software House", Topsham, ME, США) та CELLQuest ("BD Biosciences Pharmingen").

### 2.2.9. Визначення здатності препаратів до індукції інтерферону *in vivo*

Дослідження інтерфероногенної активності препаратів *in vivo* проводили на неінбредних білих мишах. Препарат вводили *per os* (по 0,2 мл) у дозі 0,096 мг/кг ваги тварини. Через 24 години після проведення експерименту мишей виводили з нього шляхом евтаназії, використовуючи метод цервікальної дислокації та визначали активність ІФН в сироватках крові та легенях мишей за допомогою стандартної методики пригнічення цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту в культурі клітин $L_{929}$ [126].

У зразках та сироватках крові доводили значення pH до 2,0, залишали при +4°С протягом 48-72 год, потім pH рідини доводили до 7,2 та визначали рівень

ІФН за методикою пригнічення цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту у моношарі перещеплюваної культури клітин $L_{929}$.

### 2.2.10. Визначення вірусного навантаження папіломавірусу людини

Для визначення вірусного навантаження використовували комерційний набір реагентів Lightgene для виявлення та диференціації ДНК вірусу папіломи людини призначений для кількісного виявлення *in vitro* методом ПЛР. Принцип методу полягає в одночасній ампліфікації (мультиплексна ПЛР) та детекції в режимі «реального часу» ділянок ДНК трьох генотипів ВПЛ і ділянки ДНК β-глобінового гену, який використовується у якості внутрішнього контролю.

Екстракцію ДНК з біологічного матеріалу проводили за допомогою набору MagMAX™ Viral/Pathogen NA Isolation Kit – Applied Biosystems™, призначеного для виділення ДНК згідно інструкції виробника.

Для кількісного визначення ДНК HPV готували серію десятикратних розведень стандартного зразку. Ампліфікацію досліджуваних зразків та контролів проводили за допомогою CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Температурний профіль приладу для ПЛР у реальному часі представлено у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Температурний профіль приладу

| **Температура** | **Час** | **Кількість циклів** |
|---|---|---|
| 50 °C | 5 хв | 1 |
| 95 °C | 5 хв | 1 |
| 94 °C | 10 с | 5 |
| 58 °C | 30 с | |
| 94 °C | 5 с | 40 |
| 56 °C | 35 с<br>Детекція флуоресцентного сигналу по каналах FAM, VIC, ROX, Cy5 | |

Результати були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення, що було встановлене на приладі, використовуваному для проведення полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. За інструкцією, для

негативного контролю значення Ct по каналу Cy5 Red має бути ≤ 30,00, а значення Ct в інших 3 каналах має бути негативним. Для позитивного контролю значення Ct по 4 каналах виявлення повинно бути позитивним Ct має бути ≤ 34,00. Прилад автоматично розраховував концентрації HPV у зразках по заданим значенням розведень стандартного зразку.

### 2.2.11. Метод інгібування РНК-синтезу в системі транскрипції *in vitro* (РНКП Т7)

Вплив досліджуваних препаратів на синтез РНК перевіряли в системі транскрипції РНКП Т7 [127], застосовуючи комерційні реагенти фірми «Fermentas» (Литва). Транскрипцію проводили в 20 мкл реакційної суміші, яка містить 0,5 мкг лінеаризованої ДНК плазміди *pTZ19R* з промотором РНКП Т7, рибонуклеозидтрифосфати – кожний у концентрації 2 мМ, 20 од.акт.інгібітора РНКаз RiboLock™ за присутності 40 мМ трис-HCl, pH 7,9; 6 мМ $MgCl_2$, 2 мМ спермідину, 10 мМ NaCl, 10 мМ дитіотреїтолу (ДТТ) та 12 од.акт. Т7 РНК-полімерази. Речовини розчиняли в ДМСО (1мг/мл). Концентрація ДМСО у контрольній і дослідних пробах становить 2,5 % (концентрація, яка не впливає на продуктивність синтезу РНК). Реакційну суміш витримували впродовж 45 хв за температури 37°С та зупиняли охолодженням (до –20°С). Продукти реакції детектували за допомогою гель-електрофорезу в 1 %-й агарозі з додаванням 0,3 мкг/мл бромистого етидію. РНК-транкрипти візуалізували на трансілюмінаторі в УФ-світлі. Інтенсивність смуг РНК на фотографії вимірювали денситометрично за допомогою програми Scion Image [128].

ПЛР проводили за стандартною методикою, використовуючи набір реагентів для ПЛР «Амплісенс» і ДНК – рекомбінантну плазміду на основі вектору PUC 28, що містить послідовність, що кодує ген LIF (leukemia inhibitory factor) людини як матрицю. Концентрація ДНК становила 1-12 пкг/ 100 мкл суміші для реакції. Ампліфікацію ДНК проводили в термостаті для ПЛР аналізу «Терцик».

### 2.2.12. Визначення впливу фітопрепарату на синтез ДНК

У даному дослідженні результати були оцінені за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Ген GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), який кодує фермент, що бере участь у гліколізі [129, 130], використовувався як "нормалізуючий" ген у реакціях ПЛР та інших експериментах через його широке розповсюдження у більшості клітин і тканин та стабільний рівень експресії [131, 132].

У реакціях ПЛР використовувався кінцевий об’єм 25 мкл, що складається з 5 мкл геномної ДНК, 10× реакційного буфера, 2,0 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ кожного dNTP, 0,4 мкМ кожного праймера [133], 1,25 ОД полімерази Taq, і надчистої води до досягнення кінцевого об'єму. Використаний протокол ампліфікації включав початкову стадію денатурації при 95 °C протягом 5 хв, потім 40 циклів при 94 °C протягом 30 с для денатурації, відпал при 52 °C протягом 1 хв, подовження при 72 °C протягом 1 хв, і остаточне розширення при 72 °C протягом 5 хв [134].

Для аналізу результатів використовували показники RFU (Relative Fluorescence Units) та Mean Cq (Cycle Quantification). Значення RFU, що вимірює флуоресценцію, свідчили про наявність ампліфікації та кількість продукту у реакції. Зниження RFU вказувало на можливе інгібування процесу. Кількість циклів ампліфікації, виражена у значеннях Cq, свідчила про кількість циклів, необхідних для досягнення порогу детекції ПЛР. Вищі показники за контрольні означали меншу кількість ампліфікованого продукту, що може бути пов’язано з інгібуванням процесу.

### 2.2.13. Дослідження впливу фітопрепарату на експресію генів вірусу простого герпесу 1 типу

Для пошуку нуклеотидних послідовностей таргетних генів вірусу герпесу 1 типу (ВПГ-1) використовували базу даних GenBank (США) [135]. Вирівнювання та аналіз відібраних нуклеотидних послідовностей, підбір специфічних олігонуклеотидних праймерів проводили за допомогою програм “Vector NTI” v.10.0.1 (Invitrogen, США), “SeqBuilder Pro” та інструменту пошуку

базового локального вирівнювання “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) National Center for Biotechnology Information” (NCBI) США. Синтез олігонуклеотидних праймерів виконаний фірмою “Generi-biotech”, Чехія [136]. Праймери, використані в дослідженнях, представлені у табл. 2.3 та на рис. 2.1.

Таблиця 2.3

Специфічність олігонуклеотидних праймерів до генів вірусу простого герпесу 1 типу

| № | Назва | Послідовність (5’—>3’) | Фрагмент, п.н. | Таргетний ген |
|---|---|---|---|---|
| 1 | d1Pol-F4 * | CTGAAGGACAAGAAGAAGGACCTG | 239 | Полімераза UL30 |
| 2 | d1Pol-R2 * | CGCAGCAGGCACGTAAAGAC | | |
| 3 | d1Pol-F1 | GACGCCATCACACCGACG | 333 | |
| 4 | d1Pol-R1 | CGCACAGGTACGACAGCACG | | |
| 5 | d1gM-F1 * | TCAGGTTGGACACGCAGAGC | 333 | Глікопротеїн M UL10 |
| 6 | d1gM-R1 * | GCAGATACGTCCCGCTCAGG | | |
| 7 | d1gM-R2 | CAAAATACACCAGACACGCAAAG | 288 | |
| 8 | d1Tmk-F1* | AGGTCGCAGATCGTCGGTATG | 412 | Тимідинкіназа UL23 |
| 9 | d1Tmk-R1* | CTTGACCTGGCTATGCTGGC | | |
| 10 | d1Tmk-R2 | CCAACGGCGACCTGTATAACG | 193 | |
| 11 | d1UL48-F2 | GTTAAGTGCTCGCGAATGTGGT | 308 | Трансактивуючий тегументний протеїн VP-16 UL48 |
| 12 | d1UL48-R1* | GCGACCTGGGAGAAATGCTG | | |
| 13 | d1UL48-F1* | TCAACACCATAAAGTACCCAGAGG | 417 | |
| 14 | d1L-R1* | TTTCTGTTTCCTGGGTGTYGGC | 243 | Глікопротеїн L UL1 |
| 15 | d1L-F1* | TAAAGGTGCCTTGTGTGCCGCT | | |

Примітка: * - олігонуклеотидні праймери, які були відібрані для досліджень після верифікації в ПЛР

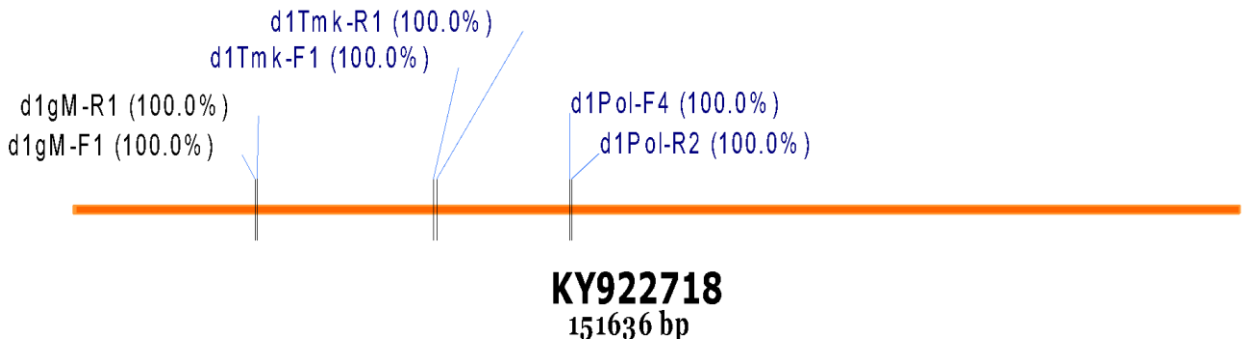



Рис. 2.1. Гомологія відібраних олігонуклеотидних праймерів до послідовностей 3 генів ВПГ-1 (Human alphaherpesvirus 1, isolate HSV-R-13, complete genome)

Виділення ДНК виконували комерційним набором “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche Diagnostics, США), згідно інструкції виробника, виділення РНК виконували комерційним набором “GeneJet RNA Purification Kit” (Thermo Fisher Scientific, США), згідно інструкції виробника. Концентрацію РНК вимірювали на спектрофотометрі Nano Drop 1000C (Thermo Fisher Scientific, США).

Реакцію зворотної транскрипції виконували комерційним набором “Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific, США). Для реакції зворотної транскрипції використовували зворотні специфічні праймери до генів UL30, UL10, UL23, UL1 та UL48.

Реакційна суміш вміщувала на 1 зразок: РНК~370 пг (7 мкл), зворотній ген-специфічний праймер – 2 мкл (10 пкМ/мкл), 10 мМ суміш дезоксинуклеотидів (dNTP, кінцева концентрація 0,5 мМ) – 1 мкл, 5X RT Buffer – 4 мкл, Maxima H Minus Enzyme Mix – 1 мкл, вода вільна від нуклеаз – 5 мкл, загальний об’єм – 20 мкл. Реакцію виконували в мікропробірках з маркуванням “RNase-free”/“DNase-free”. Умови проведення ревертазної реакції наступні: реакційну суміш інкубували протягом 10 хв за температури 25 °С та 15 хв за температури 50 °С, після чого фермент RevertAid Premium Reverse Transcriptase інактивували, прогріваючи суміш протягом 5 хв за температури 85 °С.

Враховуючи, що деякі гени ВПГ-1 багаті на гуанін і цитозин, для підвищення ефективності ревертазної реакції проводили деструкцію вторинної

структури РНК, а саме: суміш РНК, dNTP та ген-специфічного праймеру струшували і прогрівали за температури +65 °С впродовж 5 хвилин, після чого негайно переносили на сніг, додавали інші компоненти і проводили реакцію.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в мікропробірках з маркуванням “RNase-free”/“DNase-free” в об’ємі 25 мкл на термоциклері “T1 Personal Comby” (Biometra, Німеччина).

Для проведення ПЛР використовували два набори реагентів.

“Thermo Fisher Scientific” (США). Склад реакційної суміші в розрахунку на 1 зразок, складався: 0,13 мкл DreamTaq DNA Polymerase; 2,5 мкл 10X DreamTaq Green Buffer; 2,5 мкл 10X dNTP (по 2мМ кожного); по 2 мкл (10 пкМ/мкл) прямого і 2 мкл (10 пкМ/мкл) зворотного праймерів; 10,87 мкл Nuclease Free Water (Qiagen, Німеччина) та 5 мкл ДНК/кДНК. Загальний об'єм реакції – 25 мкл. Термопрофіль реакції ампліфікації (ПЛР) представлений в табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Термопрофіль реакції ампліфікації (ПЛР) для набору “Thermo Fisher Scientific”

| **Етап** | **Режим ампліфікації** | **Тривалість** | **Процес** | **Кількість циклів** |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 95 °С | 3 хв | Початкова денатурація ДНК | 1 |
| 3 | 95 °С | 30 с | Денатурація | 35 |
| | 60 °С | 30 с | Відпал праймерів | |
| | 72 °С | 1 хв | Елонгація | |
| 4 | 72 °С | 5 хв | Завершальна елонгація | 1 |
| 5 | 10 °С | ─ | Зберігання | ─ |

Набір “New England BioLabs Inc” (Велика Британія). Склад реакційної суміші в розрахунку на 1 зразок, складався: 10X ThermoPol Reaction Buffer – 2,5 мкл; 10 mM dNTP (mix) – 0,5 мкл; по 1 мкл (10 пкМ/мкл) прямого і 1 мкл (10 пкМ/мкл) зворотного праймерів; Taq DNA Polymerase (5 о.о./ мкл) – 0,125 мкл; Nuclease Free Water – 14,875 мкл; кДНК – 5 мкл. Загальний об'єм реакції – 25 мкл. Термопрофіль реакції ампліфікації (ПЛР) представлений в таблиці 2.5.

Таблиця 2.5

Термопрофіль реакції ампліфікації (ПЛР) для набору “New England BioLabs Inc”

| Етап | Режим ампліфікації | Тривалість | Процес | Кількість циклів |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 95 °C | 30 с | Початкова денатурація ДНК | 1 |
| 3 | 95 °C | 30 с | Денатурація | 35 |
| | 62 °C | 30 с | Відпал праймерів | |
| | 68 °C | 1 хв | Елонгація | |
| 4 | 68 °C | 5 хв | Завершальна елонгація | 1 |
| 5 | 10 °C | ─ | Зберігання | ─ |

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації виконували за методикою, описаною в п. 2.2.16.

### 2.2.15. Дослідження впливу фітопрепарату на експресію генів коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС)

Для пошуку нуклеотидних послідовностей ВТГС були використані бази даних: GenBank (США), EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних). Вирівнювання відібраних нуклеотидних послідовностей проводили з використанням модулю “ClustalW” з програмного пакету “Vector NTI” v.11.0.1 (Invitrogen, США) та за допомогою електронної служби BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США. Конструювання специфічних олігонуклеотидних праймерів виконано з використанням програмного забезпечення “Vector NTI” v.11.0.1.

Для обробки результатів, отриманих в ПЛР-РЧ, була використана програма “Bio-Rad CFX Manager 2.1” (v. 2.1.1022.0523). Виділення вірусної РНК виконали набором реагентів “РНК-сорб” (Синтол), а кДНК в зворотно-транскриптазній реакції отримали за допомогою набору “Thermo Scientific Revert Aid Premium Reverse Transcriptase” (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацію препаратів кДНК визначали на спектрофотометрі «Nano Drop 1000C» (США). Олігонуклеотидні праймери були синтезовані фірмою “Metabion” (Німеччина).

Для ПЛР з візуалізацією продуктів методом електрофорезу були використані: Taq-Polymerase DreamTaq DNA Polymerase, 10X DreamTaq Green Buffer, 10X суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP) (Thermo Fisher Scientific, США); реакцію ампліфікації проводили на термоциклері "T1 Personal Comby" (Biometra, Німеччина). Перегляд та документування результатів електрофорезу виконали за допомогою системи гель-документування "GelDoc XR Plus" (BioRad Laboratories, США). Термопрофіль реакції ампліфікації (ПЛР) представлений в табл. 2.6.

Таблиця 2.6

Температурний профіль полімеразної ланцюгової реакції з парами праймерів dTGpol-R/dTGpol-F, dORF1a-F/dORF1a-R, dTGS-R/dTGS-F та dORF3b-F/dORF3b-R

| № | Етапи | Температура (°C) | Експозиція (тривалість циклу) | Кількість циклів |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Початкова денатурація | 95 | 5 хв | 1 |
| 2 | Денатурація ДНК | 95 | 30 с | 35 |
| | Відпалювання праймерів | 58 | 30 с | |
| | Елонгація ланцюгів ДНК | 72 | 1 хв | |
| 3 | Фінальна елонгація | 72 | 7 хв | 1 |

Для ПЛР-РЧ був використаний набір "Набор реагентов для проведения ПЛР-РЧ в присутності SYBR Green I" (Синтол). Реакцію проводили на термоциклері "CFX-96" (BioRad, США), термопрофіль реакції представлений у табл. 2.7.

Таблиця 2.7

Температурний профіль полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу з праймерами dTGpol-R/ dTGpol-F та dORF1a-F/ dORF1a-R

| № | Етапи | Температура (°C) | Експозиція (тривалість циклу) | Кількість циклів |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Початкова денатурація | 95 | 5 хв | 1 |
| 2 | Денатурація ДНК | 95 | 20 с | 45 |
| 3 | Відпалювання праймерів та елонгація ланцюгів ДНК | 60 | 1 хв | |

### 2.2.16. Аналіз продуктів ампліфікації методом електрофорезу

Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації виконували методом електрофорезу в 1,5 % гелі агарози “NA” (Pharmacia AB, Швеція) з інтеркалятором етидія бромід в робочій концентрації 0,5 мкг/мл (Sigma, США) для візуалізації продуктів ампліфікації. Перегляд та документування результатів електрофорезу виконували за допомогою трансілюмінатора “TPC-20-MC” (Франція) та системи гель-документування “GelDoc XR Plus” (BioRad Laboratories, США). Як маркер розміру фрагментів ДНК, використовували “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder” (Thermo Fisher Scientific, США).

### 2.2.17. Дослідження впливу фітопрепарату на експресію Nrf2 за допомогою ПЛР аналізу

Нуклеотидні послідовності цільових генів (Nrf2 та Keap1) шукали в базі даних GenBank [135]. Відібрані послідовності були вирівняні та проаналізовані, а специфічні праймери були сконструйовані на основі програмного забезпечення «Vector NTI v.10.0.1» (Invitrogen, США) та «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST) (Національний центр біотехнологічної інформації (NCBI), США). Праймери були синтезовані фірмою «Generi-biotech», Чехія [136], і представлені у табл. 2.8.

Таблиця 2.8

Праймери для дослідження Nrf2

| Назва | Послідовність |
|---|---|
| dhNrf2-F1 | 5’-AGCCCAGCACATCCAGTCAG-3’ |
| dhNrf2-R | 5’-ATGTCTGCGCCAAAAGCTGC-3’ |
| dhNrf2-Probe | FAM– ACTCCCAGGTTGCCCACATTCCCA –BHQ1 |
| dhK1-F | 5’- TTCAACCTGTCCCACTGCCA -3’ |
| dhK1-R | 5’- GACCCAGTTGATGCAGGCG -3’ |
| dhK1-Probe | ROX– ACCTGAACGTGCGCTGCGAGTCCG –BHQ2 |

РНК із клітин виділяли за допомогою «GeneJet RNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) згідно з інструкцією виробника. Концентрацію РНК вимірювали на спектрофотометрі Nano Drop 1000C (Thermo Fisher Scientific, США).

ПЛР-РЧ аналіз за технологією TaqMan використовувався з використанням «Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit» (BioLabs, Велика Британія). Інкубаційна суміш містила 10 мкл «Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix» (2x); 0,8 мкл прямого праймера (10 мкмоль); 0,8 мкл зворотного праймера (10 мкмоль); 0,4 мкл зонда з флуорофором (FAM); 2 мкл води без нуклеаз і 5 мкл РНК. ЗТ-ПЛР проводили в мікропробірках на термоциклері CFX-96 (BioRad, США). Термічний профіль реакції був таким: зворотна транскрипція (55 ºС, 10 хв) – початкова денатурація (інактивація ревертази) (95 ºС, 1 хв) – денатурація/відпал/елонгація (95 ºС – 60 ºС, 10 с – 30 ºС; 40 циклів). Флуоресценцію вимірювали один раз за цикл в кінці сегмента 60°С. Обробку результатів проводили за допомогою «Bio-Rad CFX Manager 2.1» (v. 3.1).

Відносний вміст специфічного транскрипту в зразках РНК визначали методом кінцевого розведення. Для кожного зразка проводили (у реальному часі) ЗТ-ПЛР у десятикратних серійних розведеннях, у чотирьох повторах кожне. Log порогового розведення початкового зразка РНК, який не продукував специфічний сигнал (Ct перевищував 38 у наших експериментальних умовах), був прийнятий як відносний показник вмісту специфічного транскрипту у вихідному зразку.

### 2.2.18. Аналіз експресії гена рецептора епідермального фактора росту HER-2

Визначення рівня експресії гена HER-2 у зразках проводили за допомогою кількісної ПЛР у режимі реального часу за технологією TaqMan.

Виділення ДНК та РНК проводили зразками використовуючи комерційний набір “Patho Gene-spinTM DNA/RNA Extraction Kit” (виробництва iNtRON Biotechnology, Корея) відповідно до інструкції виробника. Концентрацію РНК

вимірювали на спектрофотометрі Nano Drop 1000C (Thermo Fisher Scientific, США).

Для проведення кількісної ПЛР ДНК використовували TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (виробництва Appliedbiosystems, Велика Британія).

Для кількісної ПЛР зі зворотньою транскрипцією РНК використовували набір “Luna Universal Probe One-Step RT-gPCR Kit” (виробництва NEW ENGLAND Biolabs ® Inc., Велика Британія).

В табл. 2.9 представлено розроблені та синтезовані праймери для тестування Her-2 у культуральному середовищі клітин тканини.

Таблиця 2.9

Праймери для дослідження HER-2

| **Назва** | **Послідовність** |
|---|---|
| HER2-F | 5’-CCAGCTGGCTCTCACACTG-3’ |
| HER2-R | 5’-AGCCCTTACACATCGGAGAAC-3’ |
| HER2-Probe | FAM- AGGCCCGAGAGCGGTTGGTGT –BHQ1 |

Дослідження проводили на термоциклері «CFX-96» (виробництва BioRad, USA).

### 2.2.19. Молекулярий докінг

Застосовувався алгоритм систематичного докінгу (SDOCK+), реалізований у пакеті QXP, який показав високу відтворювальну здатність конформації ліганду з мінімальним RMSD порівняно з кристалографічними даними [137]. Максимальна кількість кроків SDOCK+ було встановлено на 200, і 10 кращих структур (на основі вбудованої функції скорінгу QXP [138]) були збережені для кожної сполуки. Відповідно до визначених фармакофорних моделей, отримані комплексні білково-лігандні структури були відфільтровані власними Flo+ фільтрами та пакетом програмного забезпечення multiRMSD [139].

**Для коронавірусу.** Моделі сайтів зв'язування були створені на основі PDB 7BV2 [140], 6WVN [141] та 6M2N [142]. Фільтрація ґрунтувалася на таких критеріях, як вбудована функція підрахунку QXP, кількість водневих зв'язків, площа контактної поверхні білка-ліганду і відстань від ліганду до ключових точок відповідної фармакофорної моделі.

**Для папіломавірусу.** Модель зв'язку сайтів була створена на основі комплексу PDB 1TUE [143], що містить домен активації E2 HPV18, пов’язаний з геліказним доменом E1 PDB 1R9W [144] та PDB 1JJ4 [145]. Фільтрація ґрунтувалася на таких критеріях, як вбудована функція підрахунку QXP, кількість водневих зв’язків, площа контактної поверхні білка-ліганду та відстань від ліганду до ключового току відповідної фармакофорної моделі.

## 2.3. Статистична обробка результатів досліджень

Отримані дані виражали як середнє ± стандартна помилка середнього (M±SEM) і аналізували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Тьюкі з використанням програмного забезпечення OriginPro 7.5. Відмінності вважалися статистично значущими при $p < 0,05$.

Для розрахунку $EC_{50}$, $CC_{50}$ та SI було проведено нелінійний регресійний аналіз [146].

# РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ФІТОПРЕПАРАТУ ТА ЙОГО АКТИВНИХ ФЛАВОНОЇДНИХ КОМПОНЕНТІВ

## 3.1. Визначення цитотоксичності фітопрепарату на культурах клітин

### 3.1.1. Визначення цитотоксичності ($CC_{50}$) фітопрепарату за ступенем цитопатичної дії

Цитотоксичність – цитотоксична концентрація ($CC_{50}$), що спричиняє зменшення життєздатності культури клітин на 50%. Для визначення цитотоксичної концентрації спиртового розчину фітопрепарату готували серію розведень від 400 мкг/мл до 0,78 мкг/мл, у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук. Результати дослідження на цитотоксичність фітопрепарату у формі спиртового розчину, проведеного на культурах клітин ВНК, CHEB, MDBK та HeLa представлені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Результати визначення $CC_{50}$ фітопрепарату (спиртовий розчин)

| **Назва культури клітин** | **Концентрація, мкг/мл** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **400** | **200** | **100** | **50** | **25** | **12,5** | **6,25** | **3,12** | **1,56** | **0,78** |
| ВНК | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| CHEB | 10/10 | 10/10 | 5/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| MDBK | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| HeLa | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |

Примітки: чисельник – кількість лунок з дегенерацією моношару клітин; знаменник – кількість лунок, взятих у дослід

Експериментальне дослідження цитотоксичної дії фітопрепарату показало, що у КК CHEB, MDBK та у КК HeLa цитотоксичність спиртового розчину фітопрепарату спостерігалась при концентрації 100 мкг/мл. У клітинній культурі ВНК цитотоксичність спостерігалася при концентрації 50 мкг/мл.

Для визначення цитотоксичної концентрації фітопрепарату у формі капсул та екстракту готували серію розведень від 500 мкг/мл до 3,9 мкг/мл у

перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук. Результати дослідження на цитотоксичність фітопрепарату у формі капсул та екстракту, проведеного на культурах клітин ВНК, СНЕВ та HeLa представлені у табл. 3.2.

Таблиця 3.2.

Результати визначення $CC_{50}$ фітопрепарату (екстракт, капсульна маса)

| **Назва культури клітин** | **Форма фітопрепарату** | **Концентрація препарату, мкг/мл** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **500** | **250** | **125** | **62,5** | **31,2** | **15,6** | **7,8** | **3,9** |
| ВНК | екстракт | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| | капсульна маса | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| СНЕВ | екстракт | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| | капсульна маса | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| HeLa | екстракт | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| | капсульна маса | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |

Примітки: чисельник – кількість лунок з дегенерацією моношару клітин; знаменник – кількість лунок, взятих у дослід

Результати дослідження цитотоксичності за ступенем ЦПД показали, що $CC_{50}$ фітопрепарату у формі капсул та екстракту для культур клітин ВНК, СНЕВ та HeLa складала 62,5 мкг/мл.

### 3.1.2. Визначення цитотоксичності фітопрепарату МТТ-методом

МТТ-метод відображає загальний функціональний стан клітин, адже залежить від роботи ферментів дегідрогеназного комплексу (мітохондріальної сукцинатдегідрогенази) [121, 147].

Для визначення цитотоксичної концентрації фітопрепарату (спиртовий розчин) МТТ-методом готували серію розведень від 400 мкг/мл до 6,25 мкг/мл у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук. Кожну концентрацію речовини перевіряли мінімум у 3 повторах. Методом МТТ у культурах клітин ВНК та СНЕВ визначали $CC_{50}$ препарату. Відсоток інгібування життєдіяльності клітин під дією препарату визначали за оптичною густиною досліджуваного зразку в порівнянні з відповідним контролем, який приймали за 100%. Результати визначення $CC_{50}$ методом МТТ представлені на рис. 3.1.

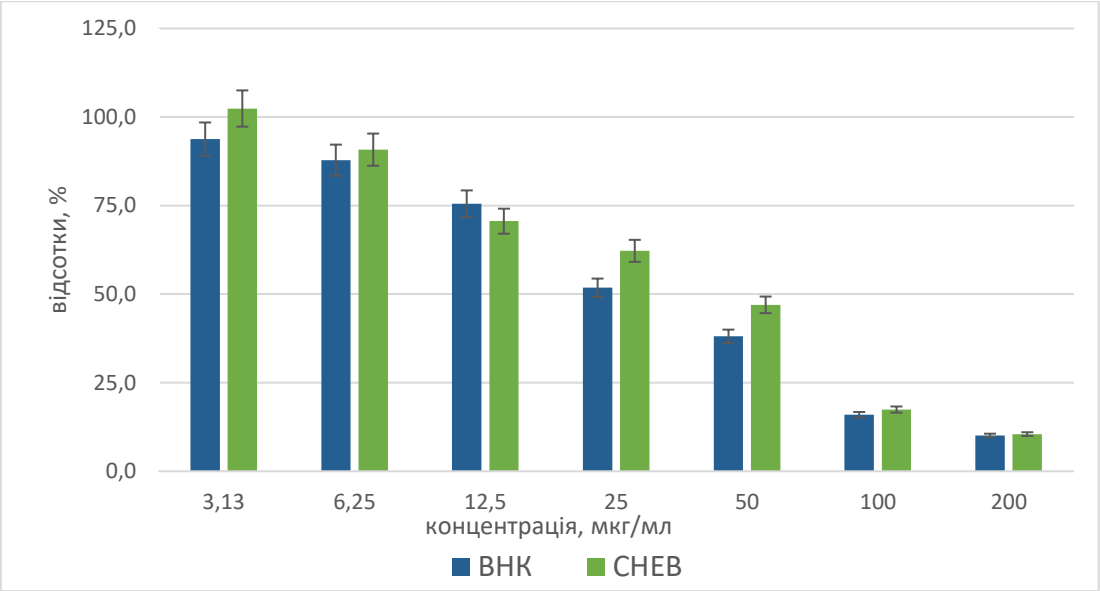



Рис. 3.1. Результати визначення цитотоксичності фітопрепарату (спиртовий розчин) за допомогою МТТ-тесту у культурах клітин ВНК та СНЕВ

За допомогою регресійного аналізу результатів МТТ-тесту було розраховано, що цитотоксична концентрація фітопрепарату в культурі клітин ВНК 55,6 мкг/мл, а в культурі клітин СНЕВ 68,7 мкг/мл.

### 3.1.3. Результати визначення цитотоксичності препаратів синтетичних флавоноїдів МТТ-методом

Для визначення цитотоксичної концентрації МТТ-методом у культурі клітин ВНК препаратів флавоноїдів (апігенін, гіперозид, ізорамнетин, кверцетин, рутин, лютеолін) готували серію розведень від 200 мкг/мл до 3,13 мкг/мл у перерахунку на концентрацію поліфенолів. Кожну концентрацію речовини перевіряли в 3 повторах. Відсоток інгібування життєдіяльності клітин під дією препарату визначали за оптичною густиною досліджуваних зразків в порівнянні з відповідним контролем клітин, який приймали за 100% [122]. Результати визначення $CC_{50}$ синтетичних флавоноїдних препаратів в культурі ВНК методом МТТ представлено на рис. 3.2.

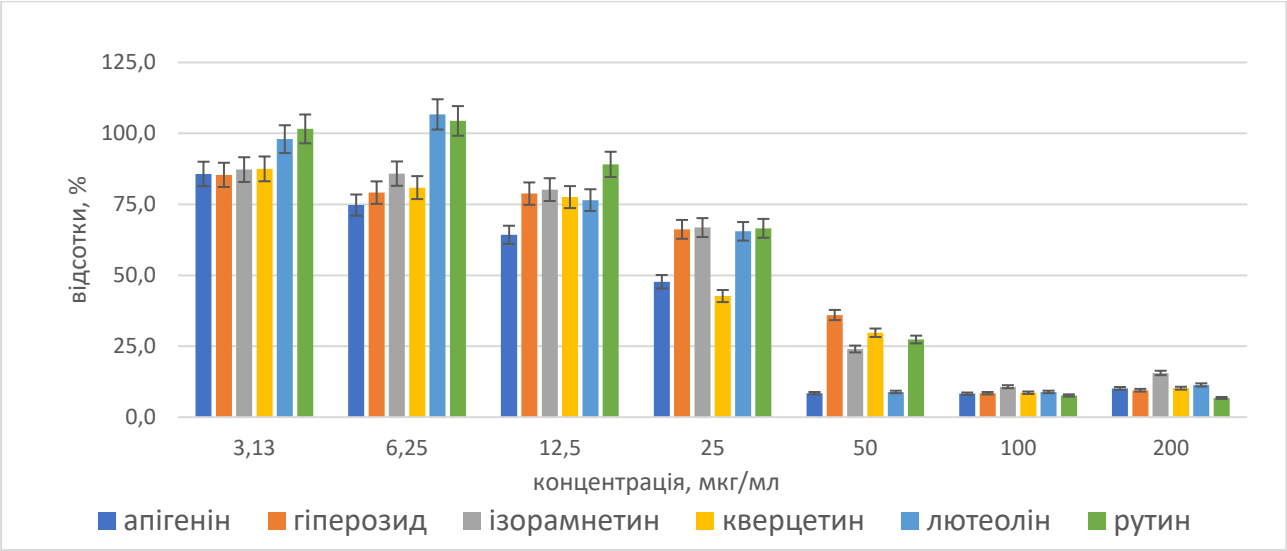



Рис. 3.2. Результати визначення цитотоксичності синтетичних флавоноїдних препаратів за допомогою МТТ-тесту у культурі клітин ВНК

В результаті, отримані результати визначення $CC_{50}$ становили: для апігеніну – 17,8 мкг/мл; гіперозиду – 27,3 мкг/мл; ізорамнетину та лютеоліну – 28,6 мкг/мл; кверцетину – 22,9 мкг/мл; рутину – 32,8 мкг/мл.

Для визначення цитотоксичної концентрації МТТ-методом у культурі клітин СНЕВ препаратів флавоноїдів (апігенін, гіперозид, ізорамнетин, кверцетин, рутин, лютеолін) готували серію розведень від 200 мкг/мл до 3,13 мкг/мл. Кожну концентрацію речовини перевіряли в 3 повторах. Відсоток інгібування життєдіяльності клітин під дією препарату визначали за оптичною густиною досліджуваних зразків в порівнянні з відповідним контролем клітин, який приймали за 100%. Результати визначення $CC_{50}$ синтетичних флавоноїдних препаратів в культурі ВНК методом МТТ представлено на рис. 3.3.

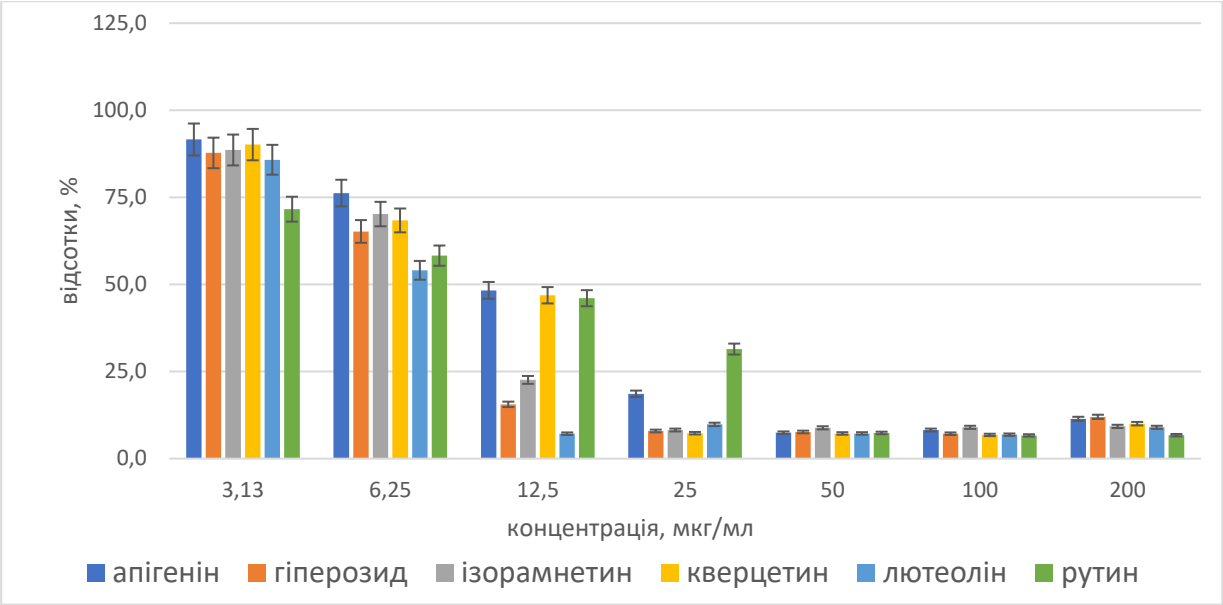



Рис. 3.3. Результати визначення цитотоксичності синтетичних флавоноїдних препаратів за допомогою МТТ-тесту у культурі клітин СНЕВ

В результаті, отримані результати визначення $CC_{50}$ становили: для апігеніну – 7,3 мкг/мл; гіперозиду – 5,8 мкг/мл; ізорамнетину – 4,0 мкг/мл; кверцетину – 6,7 мкг/мл; лютеоліну – 5,9 мкг/мл; рутину – 8,2 мкг/мл.

Для перевірки цитотоксичності розчинника МТТ-тестом проводили серію розведень спирту етилового 96% у культурах клітин ВНК та СНЕВ від 19,2% до 0,3%. Кожну концентрацію розчинника перевіряли в 3 повторах. Відсоток інгібування життєдіяльності клітин під дією препарату визначали за оптичною густиною досліджуваних зразків в порівнянні з відповідним контролем, який приймали за 100%. Результати визначення $CC_{50}$ розчинника в культурах клітин ВНК та СНЕВ МТТ-методом представлено на рис. 3.4.

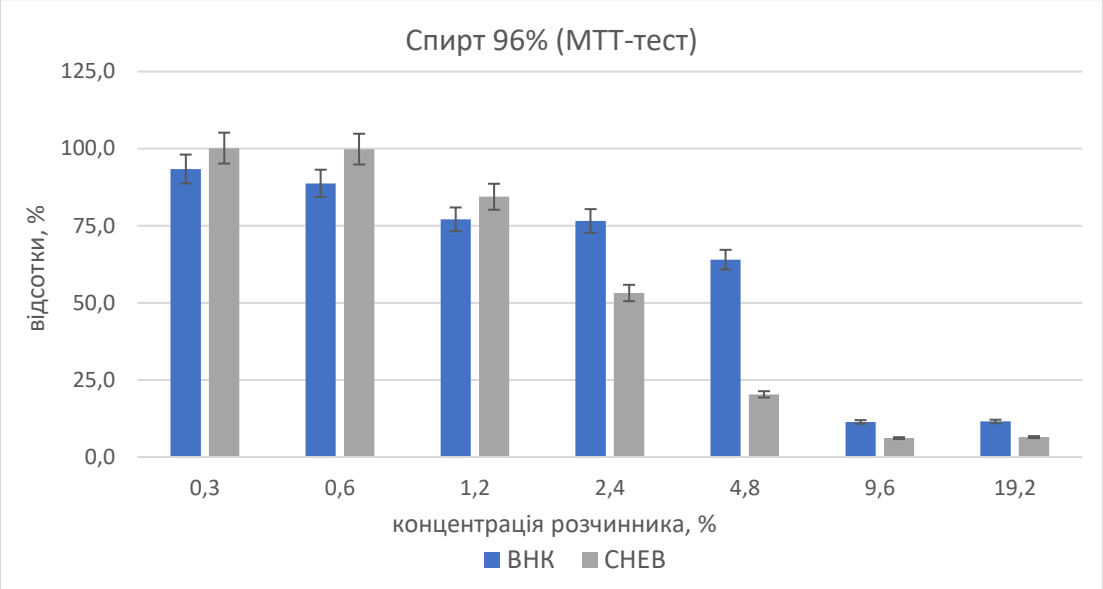



Рис. 3.4. Результати визначення цитотоксичності розчинника за допомогою МТТ-тесту у культурах клітин ВНК та СНЕВ

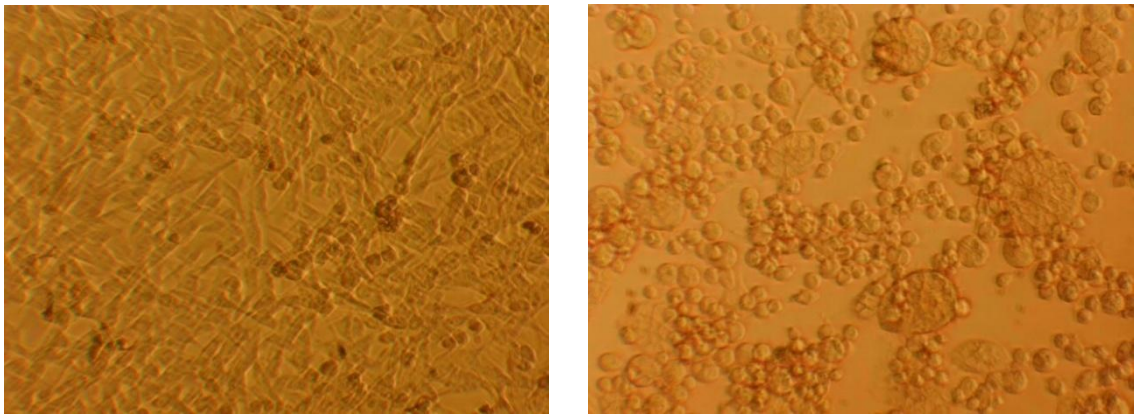
В результаті, було визначено, що цитотоксичність розчинника (спирту етилового 96%) становила 3,9% у культурі клітин ВНК та 2,7% у культурі клітин СНЕВ.

## 3.2. Дослідження антигерпетичної активності фітопрепарату на моделі вірусу простого герпесу 1 та 2 типів

### 3.2.1. Дослідження антигерпетичної активності на моделі вірусу простого герпесу 1 та 2 типів *in vitro*

Для вивчення антигерпетичної активності препаратів використовували добові культури клітин ВНК. Середовище росту зливали, на моношар клітин вносили досліджувані препарати в різних концентраціях, кожна концентрація у трьох повторах. Через 1 годину контакту вносили вірус простого герпесу 1 або 2 типу в дозі 100 $ТЦД_{50}$. Культури інкубували в термостаті з подачею $CO_2$ протягом 5 діб, щоденно контролюючи за допомогою мікроскопу і відмічаючи репродукцію вірусу по цитопатогенній дії ВПГ-1/ВПГ-2 на клітини ВНК у порівнянні з контрольними культурами, де моношар не обробляли [123].

Морфологічно, вплив вірусу простого герпесу 1 типу на клітини виражається у формуванні синцитіїв або округлих клітин, що супроводжується проліферацією та появою гігантських багатоядерних клітин (рис. 3.5).



**а** **б**

Рис. 3.5. Результати світлової мікроскопії культури клітин ВНК (х400) (де **а** – інтактна культура, **б** – культура клітин ВНК, інфікована ВПГ-1 (синцитії))

Через три доби після введення препаратів у різних концентраціях визначали інфекційний титр для кожної проби. Результати дослідження анти-ВПГ-1 активності ($EC_{50}$) спиртового розчину фітопрепарату у КК ВНК представлені на рис. 3.6.

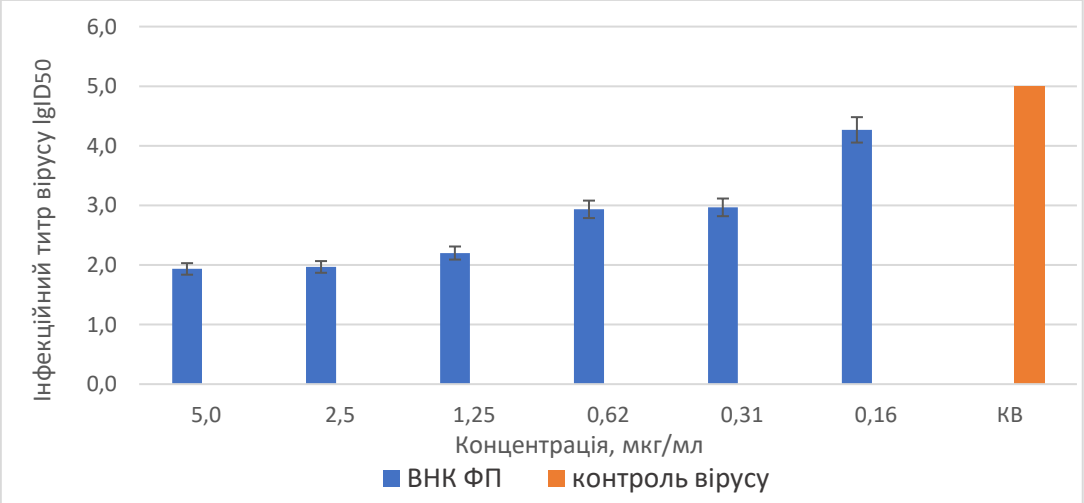



Рис. 3.6. Результати визначення анти-ВПГ-1 активності спиртового розчину фітопрепарату в культурі клітин ВНК

Таким чином, було встановлено, що спиртовий розчин фітопрепарату здатний інгібувати репродукцію ВПГ-1 до концентрації 0,313 мкг/мл, що відповідає зниженню інфекційного титру на 2,0 lg $ТЦД_{50}$.

Наступним було проведено дослідження антигерпетичної активності для фітопрепарату у формі екстракту і у капсульній масі фітопрепарату. Результати визначення анти-ВПГ-1 активності ($ЕС_{50}$) фітопрепарату у формі капсул та у формі екстракту в культурі клітин ВНК представлені на рис. 3.7.

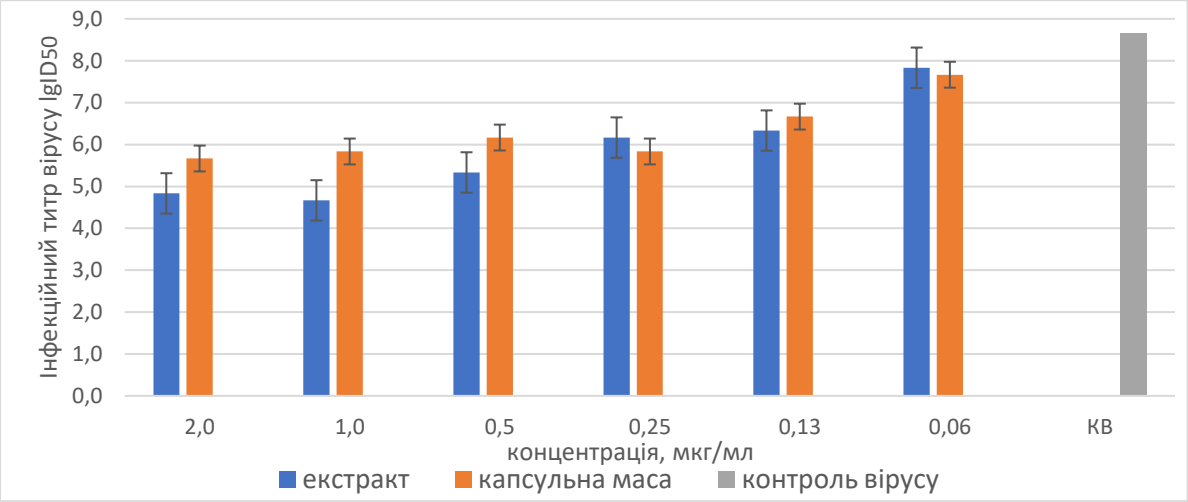



Рис. 3.7. Результати визначення анти-ВПГ-1 активності фітопрепарату у формі екстракту та капсул у культурі клітин ВНК (де КВ – контроль вірусу)

В результаті проведених досліджень було показано, що фітопрепарат і у формі капсул, і у формі екстракту пригнічував репродукцію вірусу герпесу 1 типу до концентрації 0,125 мкг/мл на 2,0-2,2 lg $ТЦД_{50}$.

Далі було проведене дослідження по визначенню анти-ВПГ-1 активності ($ЕС_{50}$) синтетичних флавоноїдних препаратів у КК ВНК, результати якого представлені на рис. 3.8 та 3.9.

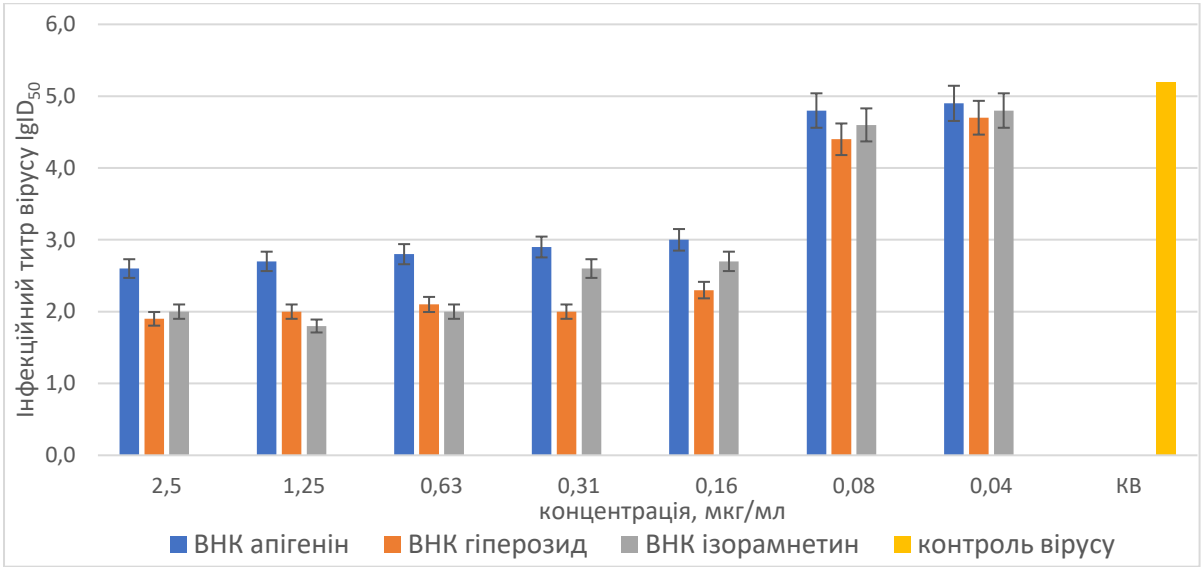



Рис. 3.8. Анти-ВПГ-1 активність препаратів апігенін, гіперозид, ізорамнетин в культурі клітин ВНК

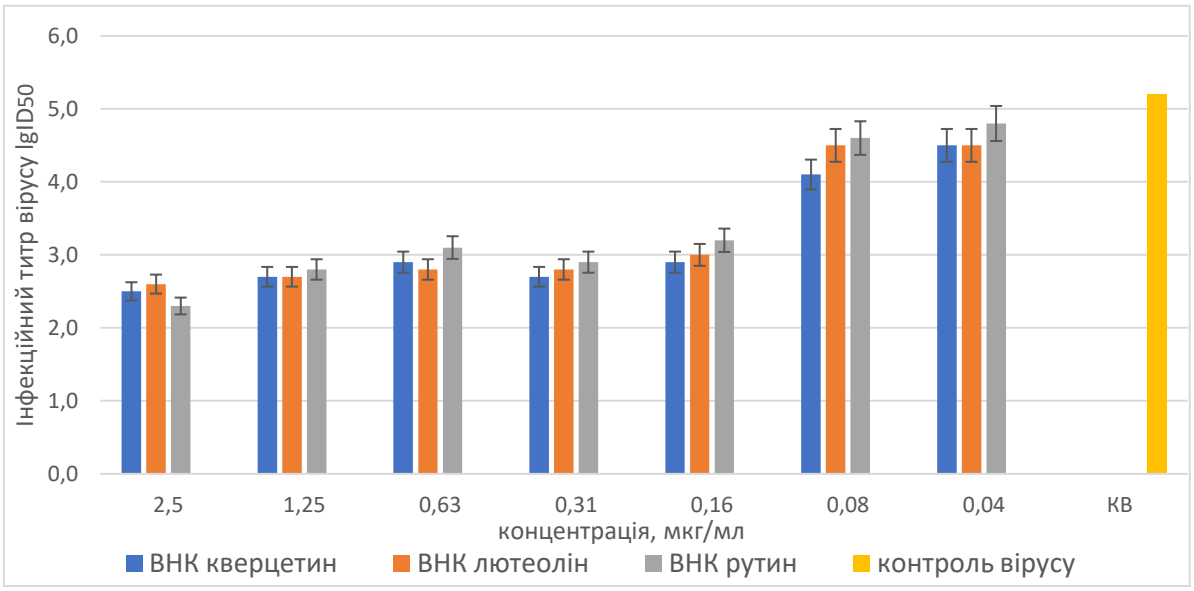



Рис 3.9. Анти-ВПГ-1 активність препаратів кверцетин, лютеолін, рутин в культурі клітин ВНК

В результаті проведених досліджень було показано, що всі досліджувані препарати синтетичних флавоноїдів пригнічували репродукцію вірусу герпесу 1 типу на 2,0 lg $ТЦД_{50}$ в концентрації 0,155 мкг/мл (у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук).

За результатами дослідження було проаналізовано цитотоксичну дію та протигерпетичну активність фітопрепарату у трьох формах, а також його активних фармакологічних інгредієнтів, на моделі герпесвірусної інфекції 1 типу

*in vitro*. Встановлено, цитотоксичну ($CC_{50}$) та ефективну ($EC_{50}$) концентрації сполук на кожній з досліджених моделей. Для визначення перспективності сполук та їх подальших досліджень використовують індекс селективності (SI). Індекс селективності розраховують, як відношення показників цитотоксичної концентрації до ефективної концентрації. За літературними даними, перспективними вважаються сполуки, індекс селективності яких дорівнює або перевищує 16 [122]. Отримані та проаналізовані дані представлені у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Індекс селективності флавоноїдних препаратів для вірусу простого герпесу 1 типу у культурі клітин ВНК

| **Препарат** | **$CC_{50}$, мкг/мл** | **$EC_{50}$, мкг/мл** | **SI** |
|---|---|---|---|
| Фітопрепарат (спиртовий розчин) | 55,6 | 0,313 | 178 |
| Фітопрепарат (екстракт) | 62,5 | 0,125 | 500 |
| Фітопрепарат (капсульна маса) | 62,5 | 0,125 | 500 |
| Апігенін | 17,8 | 0,155 | 115 |
| Гіперозид | 27,3 | 0,155 | 176 |
| Ізорамнетин | 28,6 | 0,155 | 185 |
| Кверцетин | 22,9 | 0,155 | 148 |
| Лютеолін | 28,6 | 0,155 | 185 |
| Рутин | 32,8 | 0,155 | 212 |

Примітки: $CC_{50}$ – цитотоксична концентрація; $EC_{50}$ – ефективна концентрація; SI – індекс селективності.

Величина індексу селективності свідчить про те, що фітопрепарат (спиртовий розчин, екстракт, капсульна маса) та окремі флавоноїди (апігенін, гіперозид, ізорамнетин, кверцетин, рутин та лютеолін) мають індекс селективності вищій за 16, що може характеризувати їх як перспективні анти-ВПГ-1 препарати.

Наступним етапом було проведено дослідження антивірусної активності фітопрепарату щодо вірусу простого герпесу 2 типу. Результати визначення

анти-ВПГ-2 активності ($EC_{50}$) спиртового розчину фітопрепарату у КК ВНК представлені на рис. 3.10.

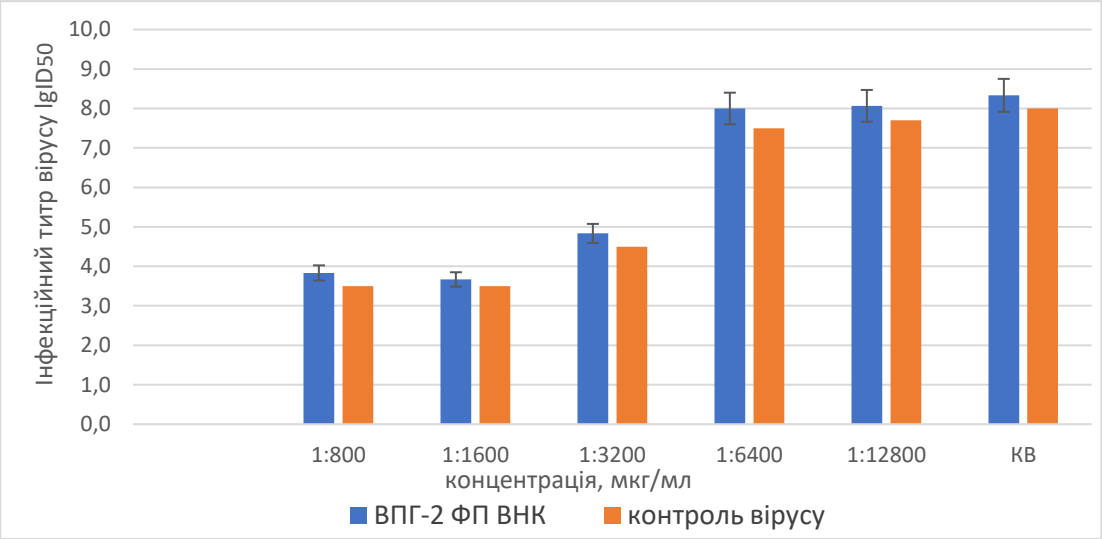



Рис. 3.10. Результати визначення анти-ВПГ-2 активності спиртового розчину фітопрепарату в культурі клітин ВНК

В результаті проведених досліджень було показано, що спиртовий розчин фітопрепарату інгібує репродукцію вірусу герпесу 2 типу до концентрації 0,625 мкг/мл на 3,0 lg $ТЦД_{50}$.

Визначення анти-ВПГ-2 активності ($EC_{50}$) фітопрепарату у формі капсул та у формі екстракту в культурі клітин ВНК представлені на рис. 3.11.

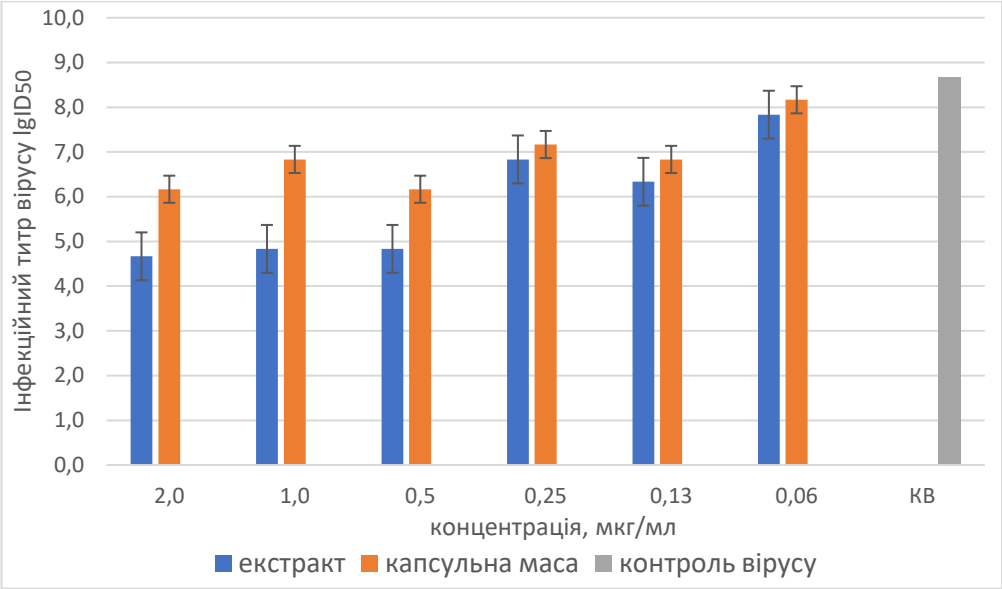



Рис. 3.11. Результати визначення анти-ВПГ-2 активності фітопрепарату у формі екстракту та капсул в культурі клітин ВНК

В результаті проведених досліджень було показано, що фітопрепарат і у формі капсул, і у формі екстракту пригнічував репродукцію вірусу герпесу 2 типу до концентрації 0,125 мкг/мл на 2,0-2,2 lg $ТЦД_{50}$.

Таким чином, було встановлено цитотоксичну дію та анти-ВПГ-2 ефективність фітопрепарату у трьох формах на моделі герпесвірусної інфекції 2 типу *in vitro*. Для визначення перспективності сполук та їх подальших досліджень було розраховано індекс селективності, що представлено у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Індекс селективності флавоноїдних препаратів для вірусу простого герпесу 2 типу у культурі клітин ВНК

| **Препарат** | **$CC_{50}$, мкг/мл** | **$EC_{50}$, мкг/мл** | **SI** |
|---|---|---|---|
| Фітопрепарат (спиртовий розчин) | 55,6 | 0,625 | 89 |
| Фітопрепарат (екстракт) | 62,5 | 0,125 | 500 |
| Фітопрепарат (капсульна маса) | 62,5 | 0,125 | 500 |

Примітки: $CC_{50}$ – цитотоксична концентрація; $EC_{50}$ – ефективна концентрація; SI – індекс селективності.

Таким чином проведене дослідження антигерпетичного потенціалу фітопрепарату у трьох формах а також його активних фармакологічних інгредієнтів на моделі герпесвірусної інфекції 2 типу *in vitro* дозволило віднести всі форми досліджуваного фітопрепарату до групи перспективних анти-ВПГ-2 агентів.

### 3.2.2. Дослідження антигерпетичної активності фітопрепарату на моделі вірусу простого герпесу 2 типу *in vivo*

Створена експериментальна модель захворювань, що виникають внаслідок герпесвірусів, зокрема вірусу простого герпесу 2 типу (ВПГ-2), імітує генітальне ураження через місцеве введення ВПГ-2 самцям мурчаків. Механізм введення вірусу у тварин при інфікуванні максимально наближений до природного, що робить цю модель аналогічною до полового герпесу у людей. Також варто відзначити, що захворювання у експериментальних тварин супроводжується ураженням центральної нервової системи та латентним збереженням вірусу в організмі, що відтворює можливість багаторазових рецидивів захворювання. Важкість інфекційного процесу оцінювалася за такими критеріями, як площа та ступінь специфічних уражень, присутність набряку, гіперемії, висипань і виділень [124].

Результати вивчення ефективності фітопрепарату у формі спиртового розчину на моделі генітального герпесу мурчаків представлені у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Результати дослідження противірусної активності фітопрепарату (спиртовий розчин) на моделі генітального герпесу мурчаків *in vivo*

| № | Композиція | Термін хвороби, діб | Облік вираженості інфекції, балів | ІЛД, % |
|---|---|---|---|---|
| 1 | ВПГ-2 | 15,00±3,20 | 51,0 | |
| 2 | ВПГ-2 + Розчин фітопрепарату *per os* | 9,25±2,45* | 31,0 | 39,22 |
| 3 | ВПГ-2 + фітопрепарат *per os* +аплікація розчину (Комбінована схема) | 4,75±1,80* | 24,0 | 52,94 |
| 4 | ВПГ-2 + Ацикловір, аплікації | 9,75±2,86* | 22,0 | 56,86 |

Примітка: зірочкою позначено $P < 0,05$ (порівняно з групою 1)

В результаті дослідження противірусної активності фітопрепарату (спиртового розчину) на моделі генітального герпесу мурчаків *in vivo* було показано, що тривалість захворювання при застосуванні фітопрепарату у формі спиртового розчину (*per os*) в комбінації з аплікацією розчину скоротилася на 10 діб порівняно з групою, що не була лікованою. Інтенсивність вираженості захворювання – 24,0 бали та ІЛД – 52,94 % показують, що комбінована схема застосування фітопрепарату має вищу ефективність порівняно із групою тварин, яки отримували фітопрепарат тільки *per os*. Ефективність застосування фітопрепарату (тільки *per os*) одноразово упродовж 5 діб проявлялася у меншому індексу лікувальної дії 39,22 %, порівняно з ацикловіром – 56,86 % та комбінованою схемою лікування – 52,94 %.

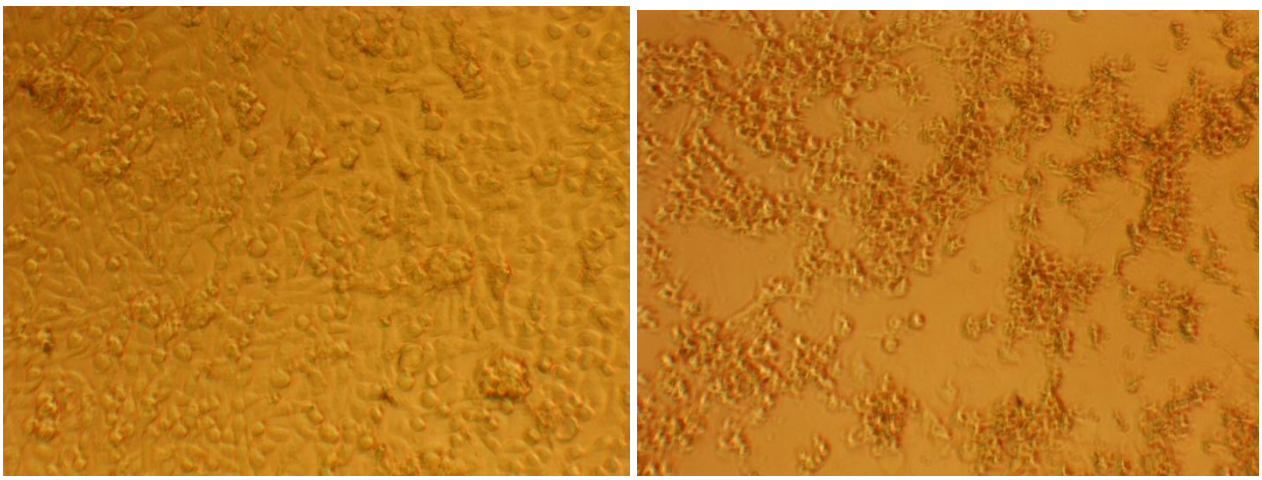
Результати наших досліджень показали, що комбінована схема введення фітопрепарату (*per os* + аплікації на інфіковану рану) була найефективнішою на експериментальній моделі генітального герпесу мурчаків.

### 3.3. Дослідження антикоронавірусної активності фітопрепарату на моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней *in vitro*

Для вивчення антикороновірусної активності досліджуваних препаратів використовували перещеплювану культуру клітин нирки ембріона свині (СНЕВ). Культивування клітин проводили у поживному середовищі RPMI-1640, збагаченому 10% фетальної сироватки, в 96-лункових плашках за температури 37 °С у атмосфері 5 % $CO_2$. В якості моделі коронавірусної інфекції був використаний вірус, що належить до родини *Coronaviridae* – вірус трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС) штам $D_{52\text{-}5}$.

Під час дослідження антикоронавірусної активності препаратів, використовували 24-годинні клітинні культури СНЕВ. Середовище зростання зливали, на моношар клітин вносили коронавірус ТГС в дозі 100 $ТЦД_{50}$. Через 1 годину контакту вносили досліджувані препарати у різних концентраціях, нижчих за $СС_{50}$. Далі плашки з клітинними культурами інкубували за температури 37 °С у атмосфері 5 % $CO_2$ впродовж трьох діб. щоденно контролюючи за допомогою мікроскопа та відзначаючи репродукцію вірусу за цитопатогенною дією ТГС на клітини СНЕВ порівняно з контрольними культурами, де моношар не піддавався ніяким впливам. Щоденно проводилось мікроскопічне спостереження та оцінка репродукції вірусу ТГС через цитопатогенні зміни на клітинах СНЕВ, порівняно з контрольними культурами, які не зазнавали впливу вірусу та/або досліджуваних препаратів.

На рис. 3.12 видно, що у порівнянні з інтактними культурами СНЕВ (рис. 3.12, а), спостерігалися видимі зміни у морфології клітин СНЕВ, на які впливав коронавірус ТГС – у формі дрібноклітинної дегенерації (рис. 3.12, б).



**а** **б**

Рис. 3.12. Результати світлової мікроскопії культури клітин СНЕВ (х400), де **а** – інтактна культура, **б** – культура клітин СНЕВ, інфікована вірусом ТГС)

Після 72-годинного культивування, проводили визначення інфекційного титру у лунках плашок. Результати дослідження анти-ТГС активності спиртового розчину фітопрепарату ($EC_{50}$) у культурі клітин СНЕВ наведено на рис. 3.13.

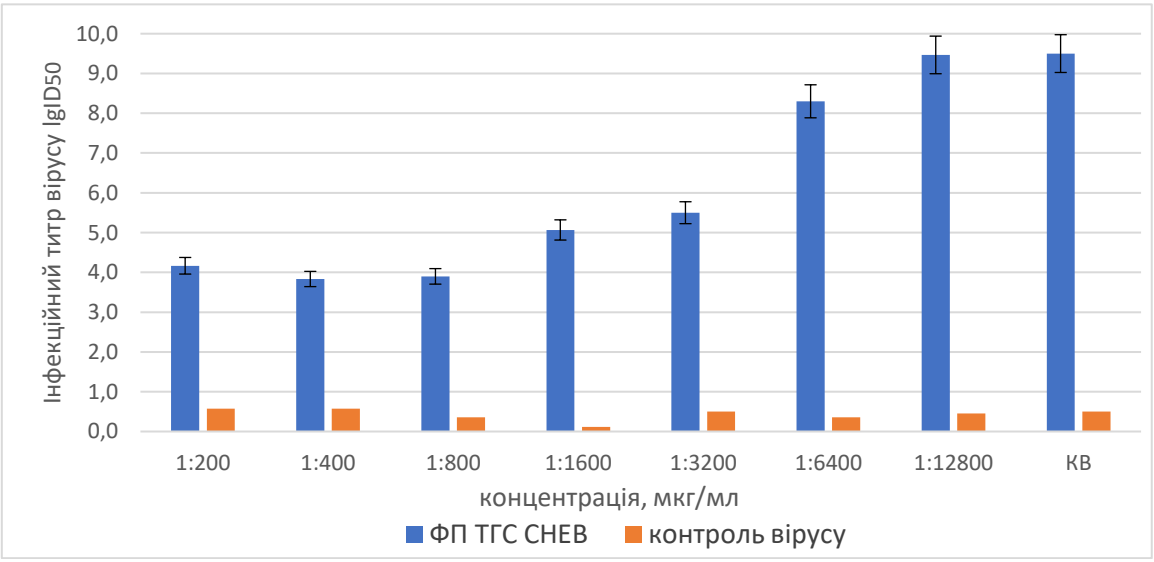



Рис. 3.13. Результати визначення інфекційного титру вірусу ТГС для різних розведень спиртового розчину фітопрепарату

За результатами проведених експериментальних досліджень було показано, що спиртовий розчин фітопрепарату проявляє противірусну активність при концентрації до 0,625 мкг/мл на 4,0 lg $ТЦД_{50}$.

Далі проводили визначення анти-ТГС активності ($ЕС_{50}$) фітопрепарату інших лікарських форм: капсул та екстракту у клітинній культурі СНЕВ. Результати цього дослідження представлено на рис. 3.14.

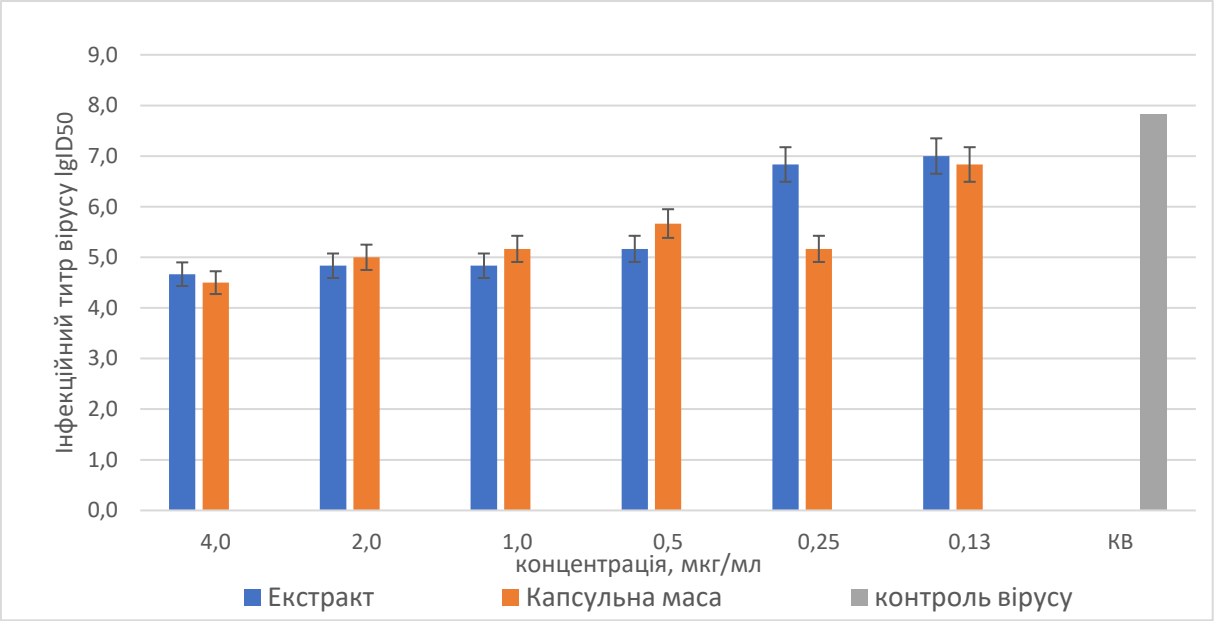



Рис. 3.14. Результати визначення інфекційного титру вірусу ТГС для різних розведень фітопрепарату у формі екстракту та капсул

В результаті проведених досліджень було показано, що фітопрепарат у формі капсул пригнічував репродукцію вірусу ТГС до концентрації (у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук) 0,25 мкг/мл, а у формі екстракту до концентрації 0,5 мкг/мл на 2,8 та 2,6 lg $ТЦД_{50}$, відповідно.

Іншою складовою вивчення анти-ТГС активності фітопрепарту було дослідження анти-ТГС активності окремих синтетичних флавоноїдів у тій самій клітинній культурі (СНЕВ). Результати визначення їх ефективної концентрації ($ЕС_{50}$) представлено на рис. 3.15-3.17.

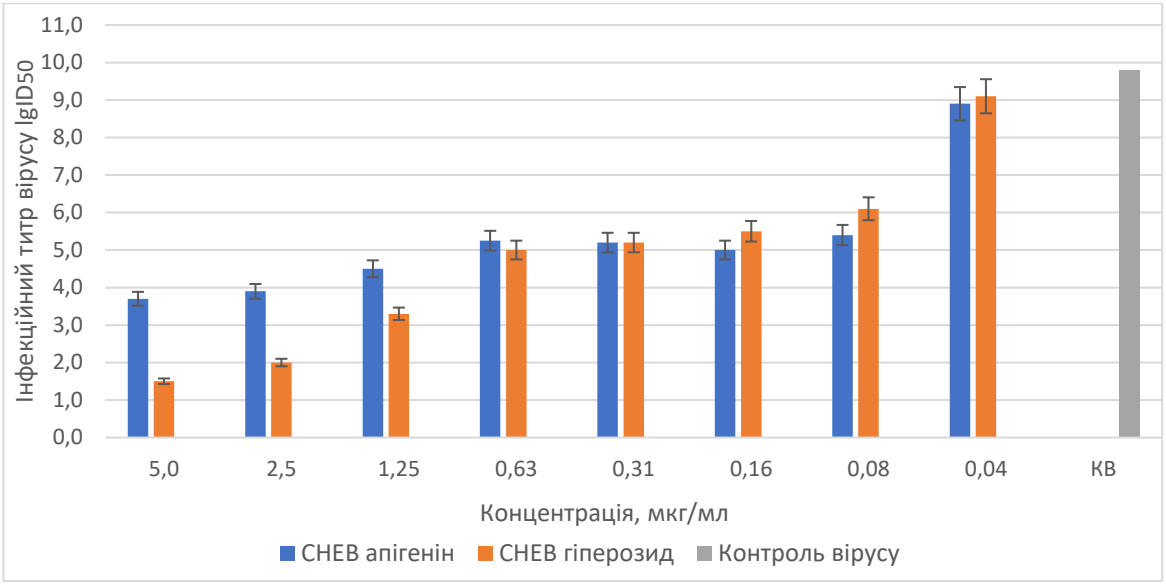



Рис. 3.15. Результати визначення інфекційного титру вірусу ТГС для різних розведень препаратів апігенин та гіперозид

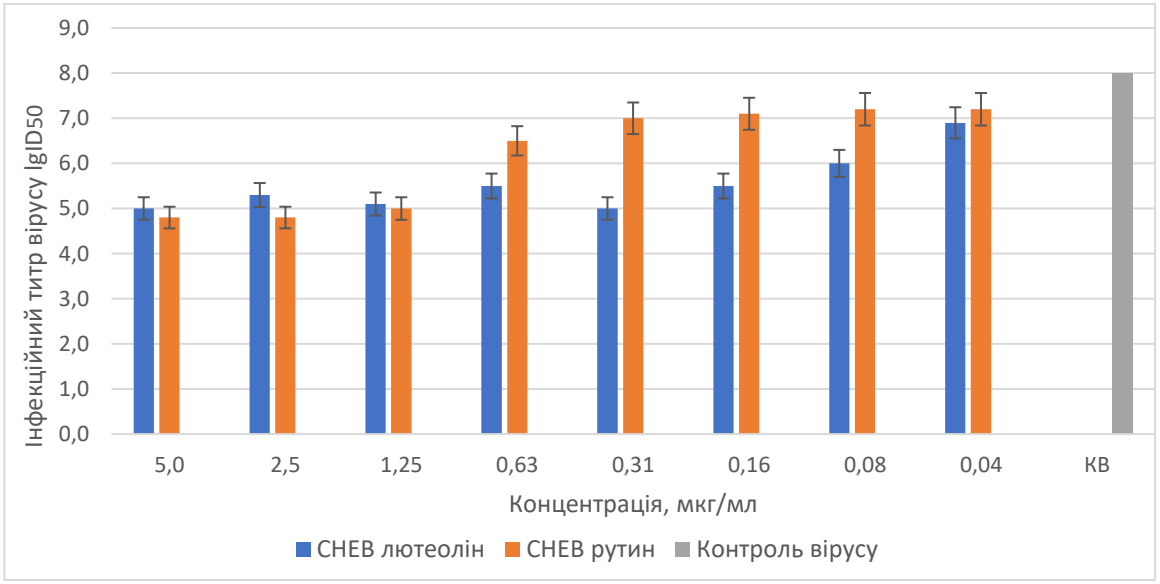



Рис. 3.16. Результати визначення інфекційного титру вірусу ТГС для різних розведень препаратів лютеолін та рутин

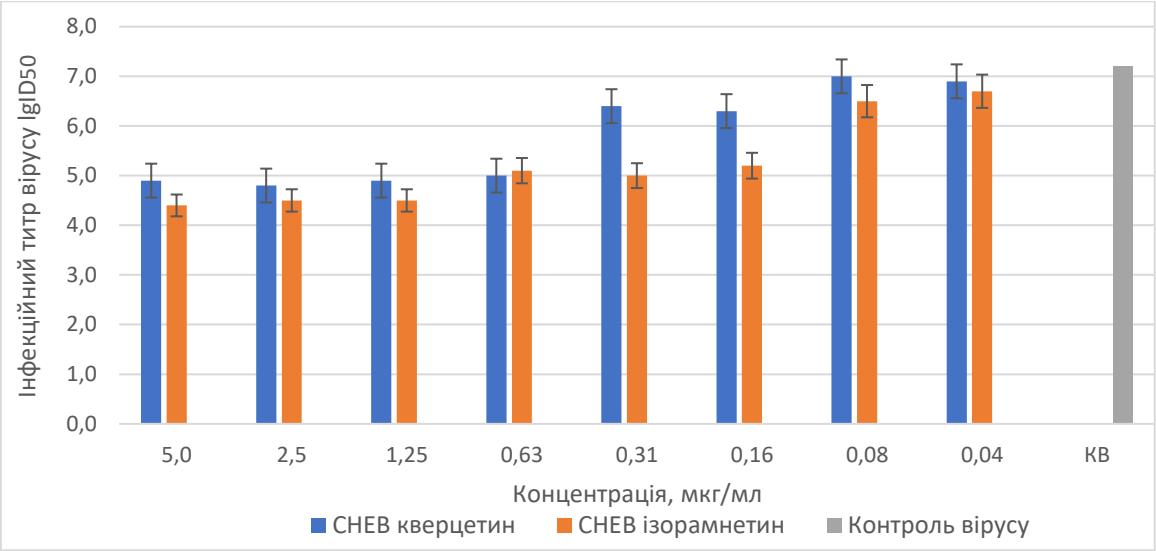



Рис. 3.17. Результати визначення інфекційного титру вірусу ТГС для різних розведень препаратів кверцетин та ізорамнетин

Згідно отриманих даних синтетичні препарати апігенін, гіперозид та лютеолін інгібували вірус ТГС в концентрації 0,08 мкг/мл; рутин – в концентрації 1,25 мкг/мл, кверцетин – в концентрації 0,62 мкг/мл, апігенін – в концентрації 0,16 мкг/мл.

Таким чином, після встановлення цитотоксичної ($CC_{50}$) та ефективної ($EC_{50}$) концентрації сполук на моделі коронавірусу ТГС, були розраховані індекси селективності (SI) досліджуваних препаратів у табл. 3.6.

Таблиця 3.6

Індекс селективності флавоноїдних препаратів на моделі коронавірусу ТГС у культурі клітин СНЕВ

| **Препарат** | **$CC_{50}$, мкг/мл** | **$EC_{50}$, мкг/мл** | **SI** |
|---|---|---|---|
| Фітопрепарат (спиртовий розчин) | 68,7 | 0,625 | 110 |
| Фітопрепарат (екстракт) | 62,5 | 0,500 | 125 |
| Фітопрепарат (капсульна маса) | 62,5 | 0,250 | 250 |
| Апігенін | 7,3 | 0,080 | 91 |
| Гіперозид | 5,8 | 0,080 | 73 |
| Ізорамнетин | 4,0 | 0,16 | 25 |
| Кверцетин | 6,7 | 0,620 | 11 |
| Лютеолін | 5,9 | 0,080 | 74 |
| Рутин | 8,2 | 1,25 | 7 |

Величина індексу селективності свідчить про те, що фітопрепарат (спиртовий розчин, екстракт, капсульна маса) та окремі синтетичні флавоноїди (апігенін, гіперозид, ізорамнетин та лютеолін) мають індекс селективності вищій за 16, що вказує на перспективність подальших досліджень відносно їх коронавірусної дії.

### 3.4. Дослідження анти-ВГС активності на моделі вірусу бичачої вірусної діареї *in vitro*

Визначення антивірусної активності фітопрепарату в культурі клітин МДВК на моделі сурогатного вірусу гепатиту С – вірусу бичачої вірусної діареї (ВБВД) представлені на рис. 3.18.

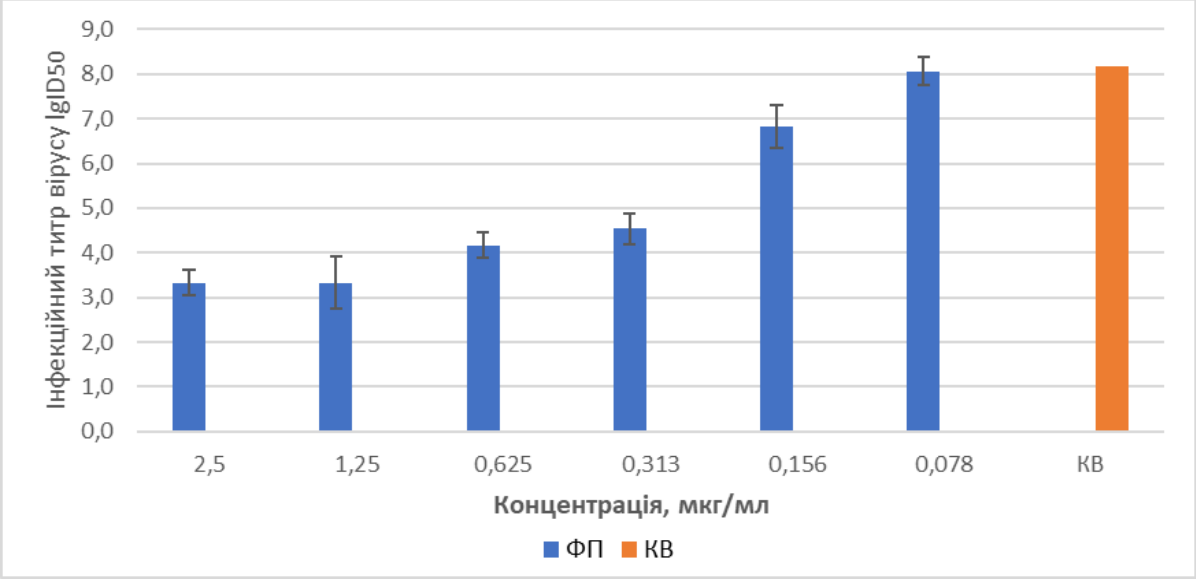



Рис. 3.18. Результати визначення інфекційного титру вірусу бичачої вірусної діареї для різних розведень спиртового розчину фітопрепарату

За результатами проведених експериментальних досліджень було показано, що спиртовий розчин фітопрепарату проявляє противірусну активність при концентрації до 0,313 мкг/мл (у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук) на 3,5 lg $ТЦД_{50}$.

За показниками цитотоксичної ($СС_{50}$ = 100,0 мкг/мл) та ефективної ($ЕС_{50}$ = 0,313 мкг/мл) концентрацій був розрахований індекс селективності (SI = 320)

фітопрепарату у лікарській формі спиртового розчину на моделі сурогатного вірусу гепатиту С – вірусу бичачої вірусної діареї. Величина індексу селективності свідчить про те, що фітопрепарат (спиртовий розчин) є активним анти-ВГС препаратом.

### 3.5. Дослідження впливу фітопрепарату на репродукцію вірусу папіломи людини *in vitro*

Для дослідження впливу фітопрепарату на репродукцію вірусу папіломи людини *in vitro* була використана модель продукуючої вірус папіломи людини (ВПЛ) 18 типу перещеплювальної культури злоякісних клітин рака шийки матки HeLa.

Дослідження проводили у два етапи: перший етап – визначення ефективної концентрації форм фітопрепарату; другий етап – визначення ефективності схем обробки продукуючої культури HeLa різними лікарськими формами фітопрепарату.

Перший етап проводили в 6-луночних плашках з різними концентраціями фітопрепарату (у формі спиртового розчину, екстракту та капсул). В результаті визначення вірусного навантаження, використовуючи комерційний набір реагентів ПЛР, отримали наступні значення (табл. 3.7). У якості контролю виступала ВПЛ-18 продукуюча перещеплювальна культура злоякісних клітин рака шийки матки HeLa.

Таблиця 3.7

Визначення ефективної концентрації різних форм фітопрепарату

| **Назва** | **Концентрація** | | **Вірусне навантаження $lg/10^5$кл.** | **Інгібування $lg/10^5$кл.** |
|---|---|---|---|---|
| | **Розв. препар.** | **мкг/мл** | | |
| Екстракт ФП | 1:50<br>1:500<br>1:5000 | 20<br>2<br>0,2 | 2,85<br>----<br>2,3 | + 0,3<br>**повне**<br>0,25 |
| Капсульна маса ФП | 1:50<br>1:500<br>1:5000 | 20<br>2<br>0,2 | 3,0<br>2,3<br>2,5 | + 0,45<br>**0,25**<br>0,05 |
| ФП (спиртовий розчин) | 1:50<br>1:500<br>1:5000 | 40<br>4<br>0,4 | 2,8<br>2,3<br>2,55 | + 0,25<br>**0,25**<br>0 |
| ВПЛ-18 HeLa | | | 2,55 | ---- |

В результаті проведених досліджень було показано, що концентрація 2 мкг/мл для фітопрепарату у формі екстракту була ефективною, концентрація 2 мкг/мл для фітопрепарату у формі капсул та 4 мкг/мл для фітопрепарату у формі спиртового розчину найбільш ефективно знижувала вірусне навантаження – на 0,25 $lg/10^5$ кл.

Другий етап досліджень – визначення ефективної схеми введення форм фітопрепарату проводили у 6-лункових плашках. Схема досліджень була наступною:

I – клітини HeLa обробляли фітопрепаратом: 1а – екстрактом (концентрація 2 мкг/мл); 2а – капсульна маса (концентрація 2 мкг/мл) та спиртовим розчином фітопрепарату (концентрація 4 мкг/мл) один раз;

II – клітини HeLa обробляли фітопрепаратом: 4а – екстракт; 5а – капсульна маса; 6а – спиртовий розчин фітопрепарату 2 рази на добу упродовж трьох діб.

На четверту добу збирали культуральну рідину, в якій визначали вірусне навантаження ВПЛ методом ПЛР за допомогою комерційного набору реагентів. Інгібування вірусного навантаження розраховувалось відносно значення

контролю – необробленої продукуючої культури HeLa. Результати проведених досліджень представлені у табл. 3.8.

Таблиця 3.8

Визначення ефективності схем обробки продукуючої культури HeLa формами фітопрепарату

| **Схема** | | **Варіант експерименту** | **Вірусне навантаження на 4 добу** | **Інгібування lg/10$^5$кл.** |
|---|---|---|---|---|
| I | 1а | HeLa + екстракт фітопрепарту, 2 мкг/мл | відсутнє | Повне інгібування |
| | 2а | HeLa + капсульна маса фітопрепарату, 2 мкг/мл | 2,6 | 0,1 |
| | 3а | HeLa + спиртовий розчин фітопрепарату 4 мкг/мл | 3,8 | +1,1 |
| II | 4а | HeLa + екстракт фітопрепарату 2 мкг/мл упродовж 3 діб 2 рази на добу упродовж 3 діб | 2,15 | 0,55 |
| | 5а | HeLa + капсульна маса фітопрепарату 2 мкг/мл 2 рази на добу упродовж 3 діб | 2,2 | 0,5 |
| | 6а | HeLa + спиртовий розчин фітопрепарату 4 мкг/мл 2 рази на добу упродовж 3 діб | 2,75 | +0,05 |
| Контроль | | ВПЛ-18 продукуюча КК HeLa | 2,7 | |

Згідно з отриманими результатами було показано, що при першій схемі введення фітопрепарату: у лікарській формі екстракту в концентрації 2 мкг/мл на 100% знижувало вірусне навантаження, у формі капсул у концентрації 2 мкг/мл не знижувало вірусне навантаження, а у формі спиртового розчину – навіть стимулював експресію вірусу ВПЛ.

При другій схемі введення фітопрепарату: додавання лікарських форм екстракту та капсул в культуральному середовищі значно знижувало вірусне навантаження на 0,50 – 0,55 lg/10$^5$ клітин. У формі спиртового розчину – не впливало на вірусне навантаження.

Отже, за показниками цитотоксичної ($CC_{50}$) та ефективної ($EC_{50}$) концентрацій був розрахований індекс селективності (SI) фітопрепарату у двох

формах на моделі папіломавірусу людини 18 типу у продукуючій культурі клітин HeLa. Результати визначення представлені у табл. 3.9.

Таблиця 3.9

Індекс селективності фітопрепарату на моделі ВПЛ-18-продукуючої культури клітин HeLa

| **Форма фітопрепарату** | **$CC_{50}$, мкг/мл** | **$EC_{50}$, мкг/мл** | **SI** |
|---|---|---|---|
| Фітопрепарат (спиртовий розчин) | 100 | -* | - |
| Фітопрепарат (екстракт) | 62,5 | 2 | 31 |
| Фітопрепарат (капсульна маса) | 62,5 | 2 | 31 |

Примітки: * - не впливав на вірусне навантаження.

Зважаючи на індекс селективності SI≥16, фітопрепарат у двох досліджуваних формах – екстракт і капсули – можна вважати перспективним антипапіломавірусним препаратом.

Таким чином, проведене дослідження антивірусного потенціалу фітопрепарату у трьох формах на моделях герпесвірусної інфекції 1 та 2 типу, коронавірусу ТГС, папіломавірусу людини 18 типу та вірусу бичачої вірусної діареї *in vitro* дозволило віднести всі форми фітопрепарату (окрім спиртового розчину на моделі ВПЛ-18-продукуючої культури клітин HeLa) до групи перспективних антивірусних агентів.

Всі синтетичні препарати флавоноїдів (окрім рутину на моделі коронавірусу ТГС), на всіх досліджуваних моделях вірусних інфекцій мали SI ≥ 16, що свідчить про їх антивірусну активність. Апігенін, лютеолін, кверцетин входять до складу АФІ фітопрепарату, тому можна вважати, що антивірусна активність фітопрепарату відбувається за рахунок цих флавоноїдів.

Результати досліджень на експериментальній моделі генітального герпесу мурчаків *in vivo* показали ефективність комбінованої схеми введення фітопрепарату (*per os* + аплікації на інфіковану рану).

Наступним етапом дослідження було доцільним розглянути можливі механізми, за рахунок яких фітопрепарат може мати вищеперераховані антивірусні властивості.

# РОЗДІЛ 4. МЕХАНІЗМИ ПРОТИВІРУСНОЇ ДІЇ ФІТОПРЕПАРАТУ ТА ЙОГО АКТИВНИХ ФЛАВОНОЇДНИХ КОМПОНЕНТІВ

## 4.1. Дослідження впливу фітопрепарату на синтез РНК в системі транскрипції РНКП Т7 *in vitro*

Для дослідження інгібування синтезу РНК була обрана ефективна та легка у застосовуванні модельна система транскрипції на основі ДНК-залежної РНК-полімерази фагу Т7 (РНКП Т7) [148, 149]. Вибір цієї РНК-полімерази обумовлений тим, що вона може відтворювати повний цикл транскрипції без потреби у додаткових білкових факторах, що відрізняє її не лише від еукаріотичних, але й від багатьох прокаріотичних багатосубодиничних полімераз. А значна кількість РНК-продукту, що утворюється у цьому процесі, дозволяє візуалізувати синтезовані транскрипти без використання радіоактивного маркування.

Хоча прямої кореляції між структурою різних полімераз немає, відомо, що вони мають схожі структурні фрагменти [150], а також спільний механізм зчитування інформації та ідентичний механізм утворення фосфодіестерного зв’язку. Ці подібності у механізмі та у структурі роботи дозволяють припустити, що речовини, які впливають на роботу однієї полімерази, можуть також впливати на ферменти інших класів.

Ця модельна система успішно використовувалася для виявлення ефективних інгібіторів транскрипції, таких як антимікробні та/або антивірусні агенти [151, 152]. Вибір цієї системи також виправданий тим, що клітинна система транскрипції є однією з ключових мішеней для антимікробної та противірусної терапії.

За допомогою ПЛР було визначено властивості фітопрепарату інгібувати синтез РНК в системі РНКП Т7. Результати дослідження наведені на рис. 4.1.

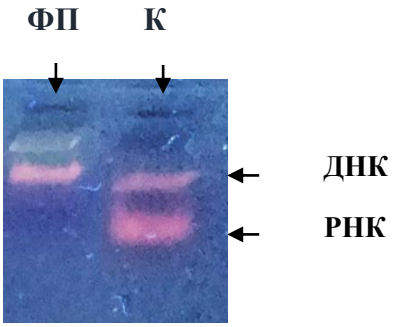



Рис. 4.1. Електрофореграма результату реакції транскрипції *in vitro* (де ФП – фітопрепарат (спиртовий розчин), К – контроль реакції)

Верхня рожева смужка представляє собою матрицю ДНК, а нижня – продукт РНК. Відсутність утворення РНК-продукту свідчить про інгібування реакції транскрипції.

Результати дослідження показали, що фітопрепарат блокує синтез РНК *in vitro*, що є досить характерним [128] для флавоноїдів рослинного походження.

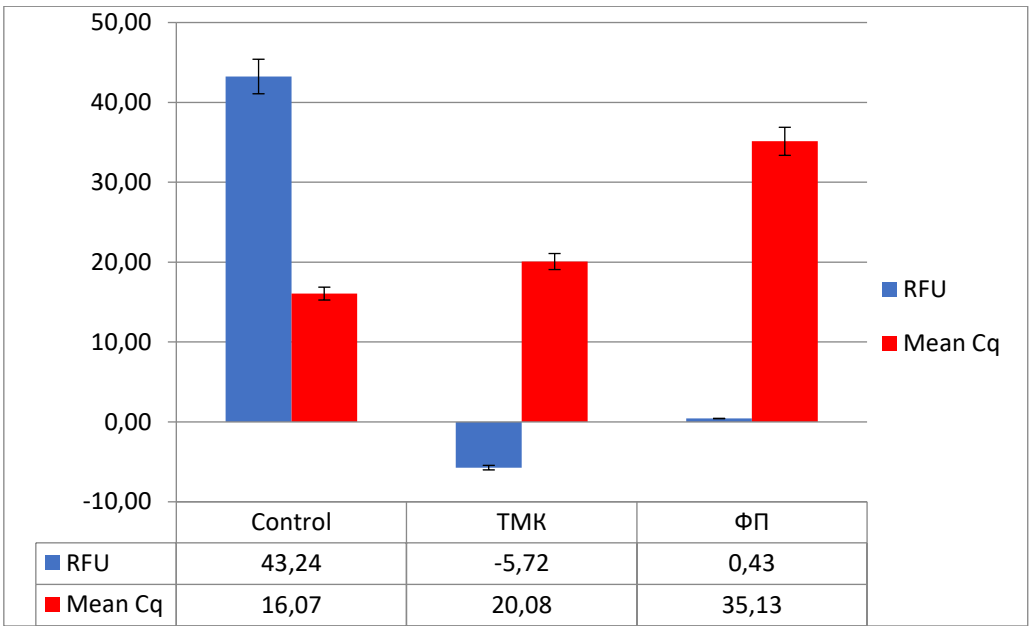
### 4.2. Дослідження впливу фітопрепарату на синтез ДНК

Ген GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – це ген, що кодує фермент, який бере участь у гліколізі. У біологічних дослідженнях ген GAPDH використовується як "нормалізуючий" ген у реакціях ПЛР та інших експериментах, оскільки він зустрічається у більшості клітин і тканин та має стабільний рівень експресії. кДНК було виділено із клітинної лінії К562 (клітини хронічної мієлоїдної лейкемії, отримані від хворого на стадії бластного кризу).

Для визначення впливу фітопрепарату на синтез ДНК проводили дослідження його впливу на експресію гена GAPDH. Для кожного зразка порівнювали отримані значення із отриманими значеннями для контролю.

У дослідження було взято такі варіанти: Control – IC-GAPDH; ТМК – тетраметоксикверцетин, 0,5 мг/мл; ФП – фітопрепарат екстракт, 1 мг/мл.

Результати ЗТ-ПЛР представлені на рис. 4.2.




| | Control | ТМК | ФП |
|---|---|---|---|
| RFU | 43,24 | -5,72 | 0,43 |
| Mean Cq | 16,07 | 20,08 | 35,13 |

Рис. 4.2. Результати ЗТ-ПЛР, експресія гена GAPDH, показники RFU (синій колір), Mean Cq (червоний колір)

Було встановлено, що речовини тетраметоксикверцетин та фітопрепарат мали інгібуючий вплив на експресію гена GAPDH, що свідчить про їх інгібуючий вплив на синтез ДНК.

### 4.3. Дослідження індукції інтерферону фітопрепаратом

Дослідження інтерфероногенної активності фітопрепарату було проведено в експерименті *in vivo* на білих нелінейних мишах, яким препарати вводили перорально. Мишей було виведено з експерименту шляхом евтаназії через 24, 48 та 72 години. Після цього було визначено рівень інтерферону в сироватці крові за допомогою методу дослідження пригнічення ЦПД вірусу везикулярного стоматиту в перещеплюваній лінії клітин $L_{929}$. Для встановлення типу інтерферону визначали його кислоточутливість, для цієї мети у зразках доводили значення pH до 2,0, залишали при + 4°С протягом 48-72 год, потім pH рідини доводили до 7,2 та визначали рівень ІФН за тією самою методикою. Результати дослідження інтерфероногенної активності фітопрепарату в сироватках мишей наведені у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Інтерфероногенна активність форм фітопрепарату

| Термін визначення, годин | Титри ІФН, індукованого фітопрепаратом, од.акт/мл | | | | | | Титри ІФН, індукованого Poly(I)·Poly(C), од.акт/мл | | Вихідні титри ІФН у мишей, од.акт/мл | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | екстракт | | капсульна маса | | спиртовий розчин | | | | | |
| | pH (+) | pH (-) | pH (+) | pH (-) | pH (+) | pH (-) | pH (+) | pH (-) | pH (+) | pH (-) |
| 24 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | 1:320 | 1:320 | 1:2048 | 1:2048 | 10 | 10 |
| 48 | 1:160 | 1:160 | 1:80 | 1:80 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1024 | 1:1024 | - | - |
| 72 | 1:80 | 1:80 | 1:40 | 1:40 | 1:640 | 1:640 | 1:1024 | 1:1024 | - | - |

Де pH (+) – відбувалась зміна pH, pH (-) – не змінювали pH.

Аналіз цих даних показав, що титри інтерферону досягають свого максимального значення через 48 годин для кожної форми фітопрепарату. Індукований фітопрепаратом інтерферон можна віднести до α-інтерферону, тому що зміна pH не впливала на активність інтерферону.

## 4.4 Визначення вмісту апоптотичних клітин та розподіл за фазами клітинного циклу

Флавоноїди відрізняються за своєю здатністю індукувати апоптоз та диференціювання, маючи вибіркову активність по відношенню до лейкозних та нормальних клітин [153]. Ці речовини виявляють відносно низьку токсичність в діапазоні концентрацій, при яких вони сприяють диференціації або апоптозу лейкемічних клітин, чим і відрізняються від цитотоксичних хіміопрепаратів. Внутрішньоклітинні мішені цих сполук на рівнях геному та протеому залишаються поки що недослідженими. Загалом відомо, що флавоноїди мають специфічний вплив на різні сигнальні системи, що регулюють процеси апоптозу та клітинного циклу [154].

Аналіз вмісту гіподиплоїдних (апоптотичних) клітин та розподілу по фазах клітинного циклу проводили на проточному цитофлуориметрі FACScan, Becton Dickinson, США за допомогою програм WinMDI 2.8 для визначення вмісту

апоптотичних клітин та ModFit LT 2.0. визначення розподілу по фазах циклу. Для кожного зразка прораховували флуоресценцію не менше 10 тис. клітин та результати представляли у вигляді гістограм. Мертві клітини та їх рештки виключали з аналізу за даними діаграм прямого та бічного світлорозсіювання.

У дослідження брали такі варіанти клітин:

1. Інтактні клітини Jurkat;
2. Клітини Jurkat, оброблені вірусом ВПГ-1;
3. Клітини Jurkat, оброблені вірусом ВПГ-1 та фітопрепаратом у формі екстракту з концентрацією 10 мкг/мл;
4. Клітини Jurkat, оброблені вірусом ВПГ-1 та синтетичним флавоноїдом лютеоліном з концентрацією 3,3 мкг/мл;
5. Клітини Jurkat, оброблені вірусом ВПГ-1 та синтетичним флавоноїдом апігеніном з концентрацією 3,3 мкг/мл.

Результати, виражені як відсотковий вміст апоптотичних клітин і клітин у кожній із фаз мітотичного циклу (виключаючи апоптотичні клітини), представлені на рис. 4.3 – 4.7 та у табл. 4.2.

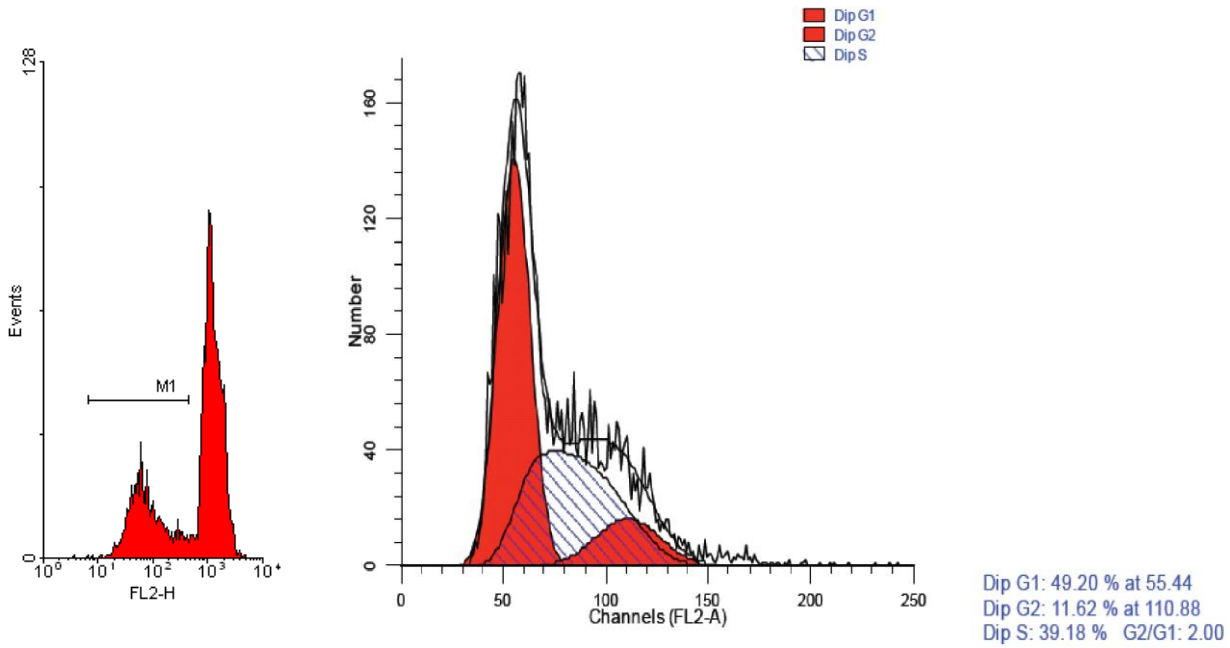



Рис. 4.3. Результати проточного цитометричного аналізу інтактних клітин Jurkat

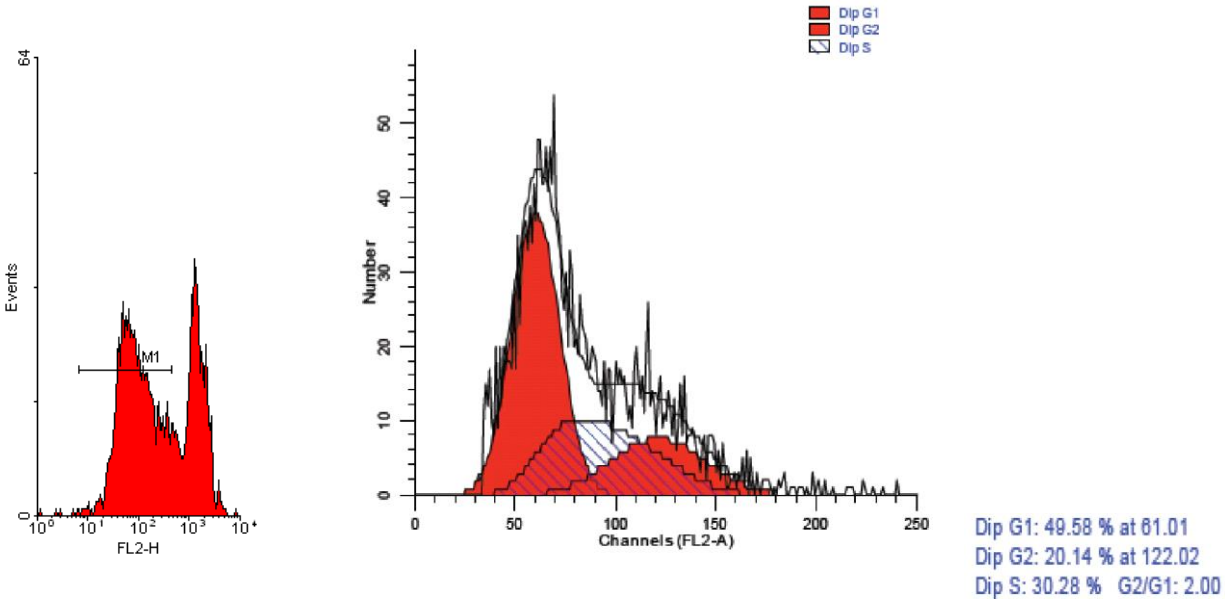



Рис. 4.4. Результати проточного цитометричного аналізу клітин Jurkat, оброблених ВПГ-1

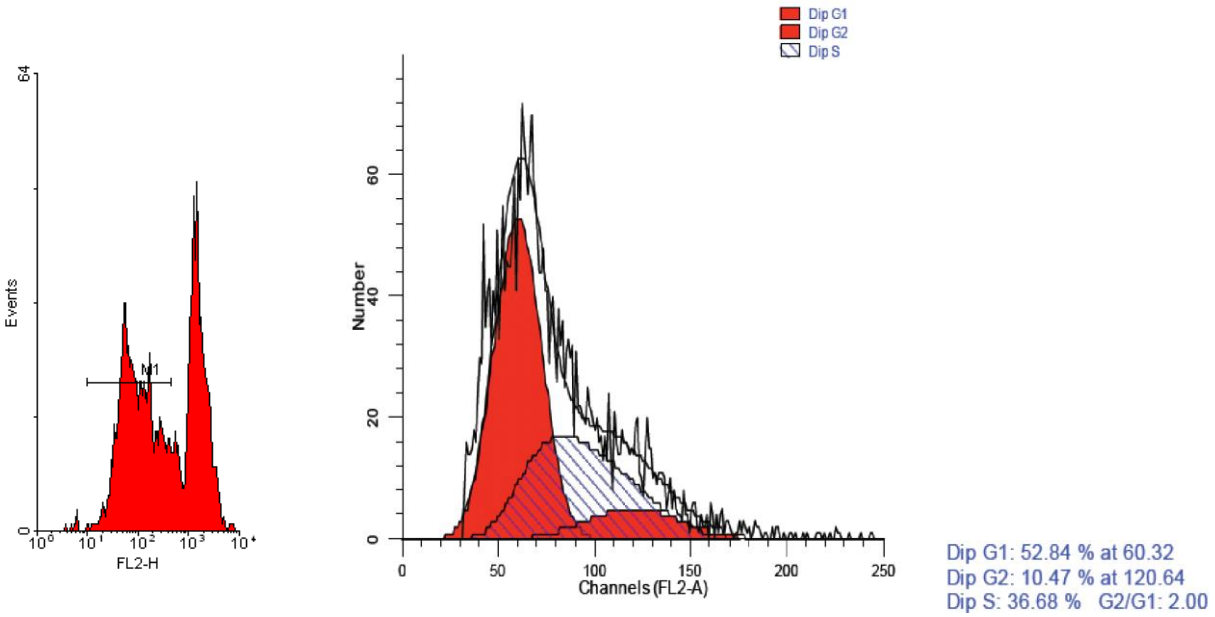



Рис. 4.5. Результати проточного цитометричного аналізу клітин Jurkat, оброблених ВПГ-1 та фітопрепаратом

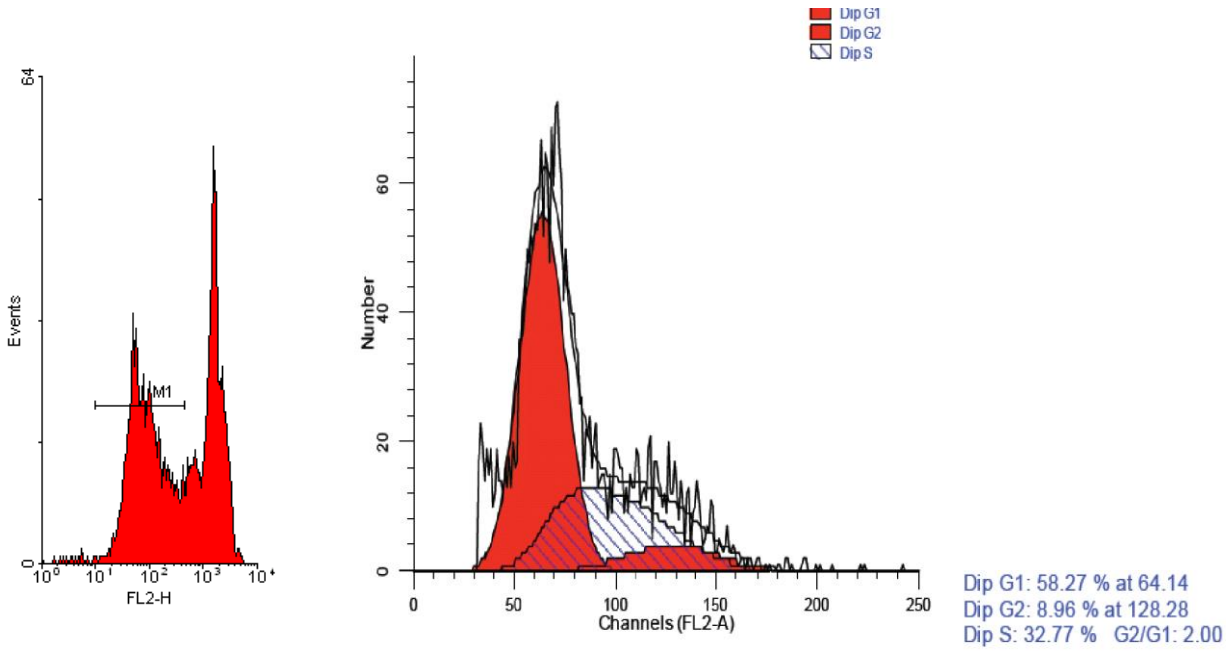



Рис. 4.6. Результати проточного цитометричного аналізу клітин Jurkat, оброблених ВПГ-1 та лютеоліном

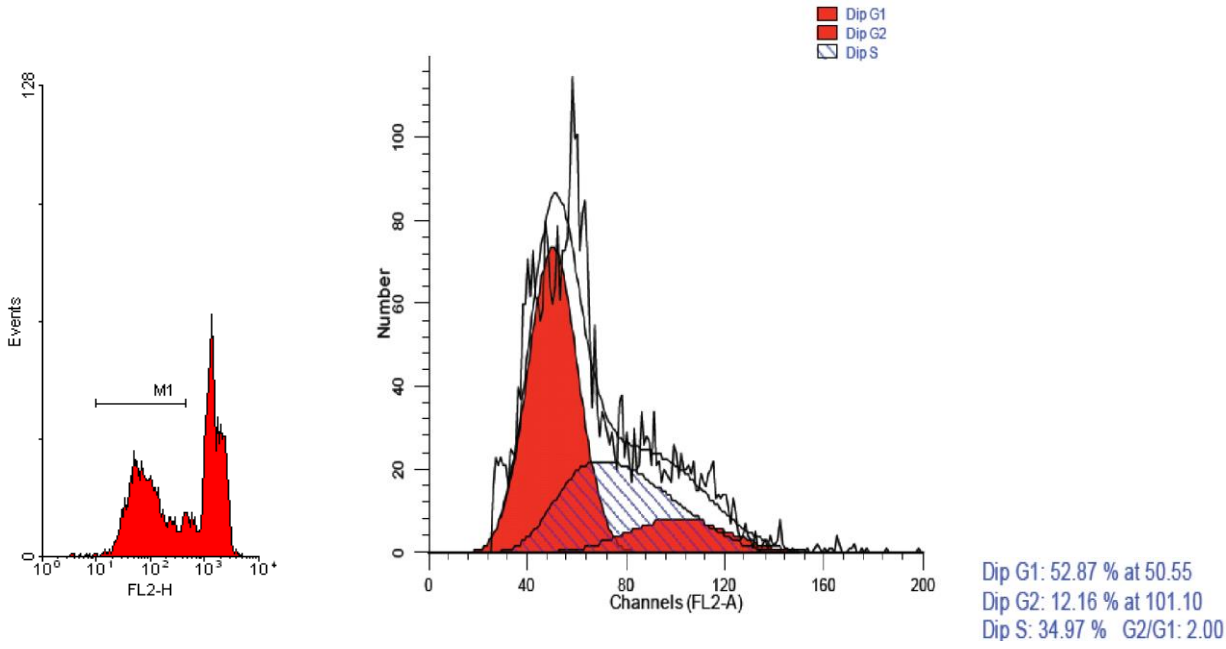



Рис. 4.7. Результати проточного цитометричного аналізу клітин Jurkat, оброблених ВПГ-1 та апігенином

Таблиця 4.2

Частка апоптотичних клітин Jurkat при інкубації з досліджуваними флавоноїдними препаратами

| Варіанти клітин | Вміст апоптотичних клітин, % |
|---|---|
| КК Jurkat | 27,4 |
| КВ Jurkat + ВПГ-1 | 61,7 |
| Jurkat + ВПГ-1 + ФП | 53,7 |
| Jurkat + ВПГ-1 + лютеолін | 51,6 |
| Jurkat + ВПГ-1 + апігенін | 45,7 |

У клітинах інфікованих ВПГ-1 відзначалося значне підвищення апоптозу на понад 30% порівняно з контролем. Знижувався також вміст клітин у фазі S та підвищувався вміст клітин у фазі G2/M. Фітопрепартат помітно знижував вміст апоптотичних клітин. Флавоноїди лютеолін та апігенін також знижували вміст апоптотичних клітин. Найбільшою мірою цей ефект був виражений у апігеніну (зниження вмісту апоптотичних клітин більш ніж на 15%). При дії кожного із випробуваних препаратів нормалізувався розподіл клітин за фазами циклу.

### 4.5. Аналіз впливу фітопрепарату на гени вірусу простого герпесу 1 типу

При дослідженні впливу фітопрепарату на гени ВПГ-1 спочатку проводили верифікацію наявності генетичного матеріалу (ДНК) ВПГ-1 у зразках (UL10, UL23 та UL30). У дослідження було взято такі варіанти клітинних культур:

Е – Фітопрепарат екстракт (1 мкг/мл);

К – Фітопрепарат капсульна маса (1 мкг/мл);

А – Апігенин (2,5 мкг/мл);

Л – Лютеолін (2,5 мкг/мл);

К+ – Контроль вірусу ВПГ-1 ($10^{-3}$);

К- – Контроль КК ВНК.

Типові електрофореграми продуктів ампліфікації з праймерами до генів ВПГ-1 представлені на рис. 4.8, 4.9, а узагальнені результати верифікації наявності генетичного матеріалу ВПГ-1 – у табл. 4.3.

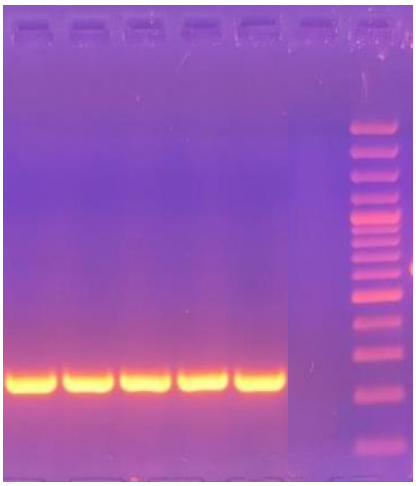



Рис. 4.8. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами d1Pol-F4/ d1Pol-R2 до гену UL30 (Е, К, А, Л – зразки, К+ – контроль вірусу, К- – Контроль КК, М – маркер розміру фрагментів ДНК «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder»)

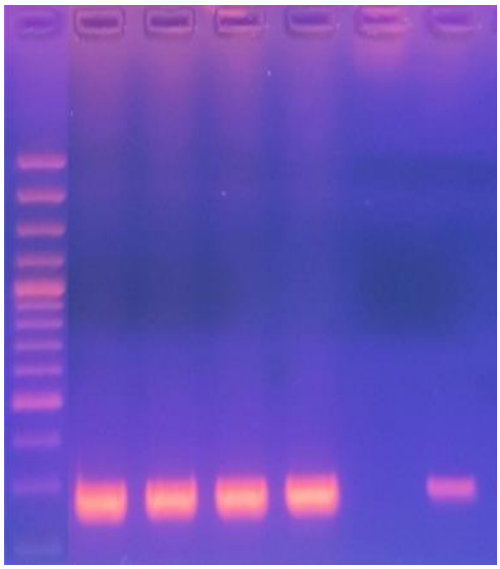



Рис. 4.9. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами d1Tmk-F1/d1Tmk-R2 до гену UL23 (М – маркер розміру фрагментів ДНК «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder», Е, К, А, Л – зразки, К- – Контроль КК, К+ – контроль вірусу)

Таблиця 4.3

Верифікація наявності генетичного матеріалу ВПГ-1

| **Зразок** | **Наявність ДНК ВПГ-1 в зразках “Thermo Fisher Scientific** | | | **Наявність мРНК ВПГ-1 в зразках “Thermo Fisher Scientific** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **UL30** | **UL10** | **UL23** | **UL30** | **UL10** | **UL23** |
| Фітопрепарат екстракт | + | + | + | + | – | + |
| Фітопрепарат капсульна маса | + | + | + | + | – | + |
| Апігенин | + | + | + | + | – | + |
| Лютеолін | + | + | + | + | – | + |
| Контроль вірусу | + | + | + | + | – | + |
| Контроль КК ВНК | – | – | – | – | – | – |

Наступним етапом дослідження було проведення якісного аналізу експресії генів (мРНК) UL10, UL23 та UL30 вірусу герпесу 1 типу. Типова електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до генів ВПГ-1 d1Pol-F1/d1Pol-R1 до гену UL30 представлена на рис. 4.10.

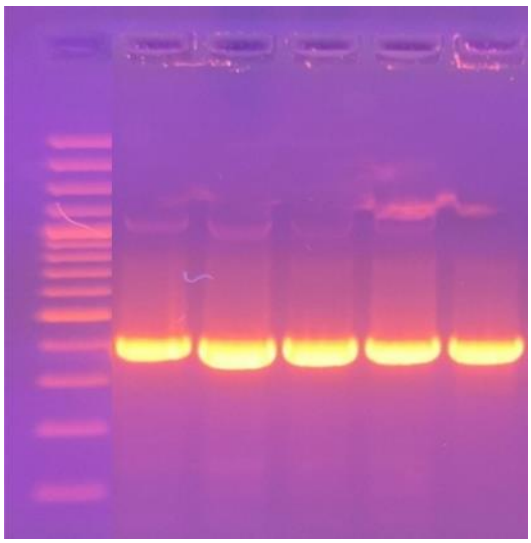
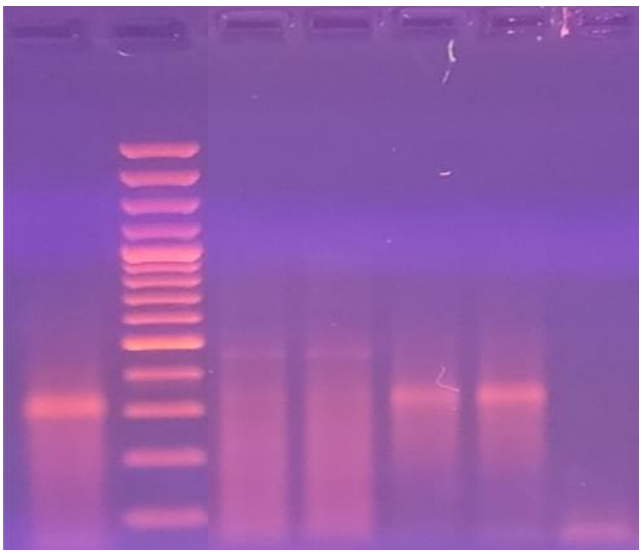



Рис. 4.10. Аналіз експресії генів ВПГ-1 (мРНК). Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами d1Pol-F1/d1Pol-R1 до гену UL30 (М – маркер розміру фрагментів ДНК «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder», Е, К, А, Л – зразки, К+ – контроль вірусу)

Аналогічний результат (присутність гену в усіх зразках) був отриманий для гена UL23, а для гена UL10 – негативний з усіма зразками, включаючи контроль вірусу.

Для отримання достовірних результатів по експресії гена UL10, усі наступні дослідження були проведені після деструкції вторинної структури мРНК вірусу. ПЛР проводили, використовуючі 2 разні набори реагентів: 1 – “Thermo Fisher Scientific” (США); 2 – “New England BioLabs Inc” (Велика Британія). На рис. 4.11 представлена типова електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами d1M-F1/d1M-R1. Експресія генів (мРНК) ВПГ-1 в зразках після деструкції вторинної структури РНК представлена в узагальненій таблиці 4.4.



**К+ М Е К А Л К-**

Рис. 4.11. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами d1M-F1/d1M-R1, для аналізу експресії гена UL10 (Е, К, А, Л – зразки, К+ – контроль вірусу, К- – Контроль КК, М – маркер розміру фрагментів ДНК «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder»)

Таблиця 4.4

Експресія генів (мРНК) ВПГ-1 в зразках після деструкції вторинної структури РНК

| **Зразок** | **Експресія генів (мРНК) ВПГ-1 в зразках *після деструкції вторинної* структури РНК** **"Thermo Fisher Scientific"** | | | **Експресія генів (мРНК) ВПГ-1 в зразках *після деструкції вторинної* структури РНК** **"New England BioLabs Inc"** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **UL30** | **UL10** | **UL23** | **UL30** | **UL10** | **UL23** |
| Фітопрепарат екстракт (1/1000) | + | – | + | + | – | + |
| Фітопрепарат капсульна маса (1/1000) | + | – | + | + | – | + |
| Апігенин (1/400) | + | – | + | + | + | + |
| Лютеолін (1/400) | + | + | + | + | + | + |
| Контроль вірусу ВПГ-1 | + | + | + | + | + | + |
| Контроль КК ВНК | – | – | – | – | – | – |

За результатами аналізу в якісній ревертазно-полімеразній ланцюговій реакції відмічається, що фітопрепарат у обох досліджуваних формах інгібує експресію гена UL10 (gM).

Оскільки вплив на певний ген препаратів з антивірусною активністю може бути не прямим, а опосередкованим, доцільно було додатково проаналізувати їх вплив на деякі інші гени, а саме – gL (для підтвердження специфічності інгібіції експресії UL10), UL48 (відповідає за активацію транскрипції ранніх вірусних білків). Результати цих досліджень представлені на рис. 4.12 та 4.13.

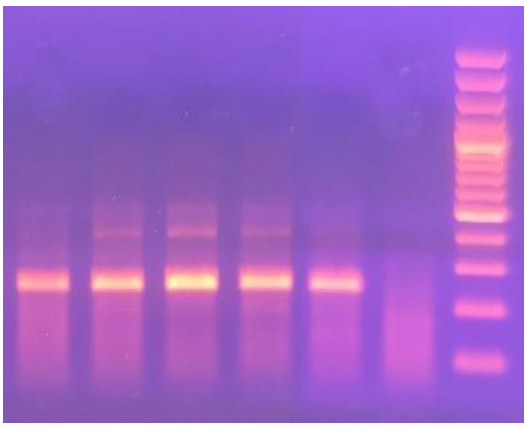



Рис. 4.12. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами d1L-F1/d1L-R1 до гену UL1 (Е, К, А, Л – зразки, К+ – контроль вірусу, К- – Контроль КК, М – маркер «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder»)

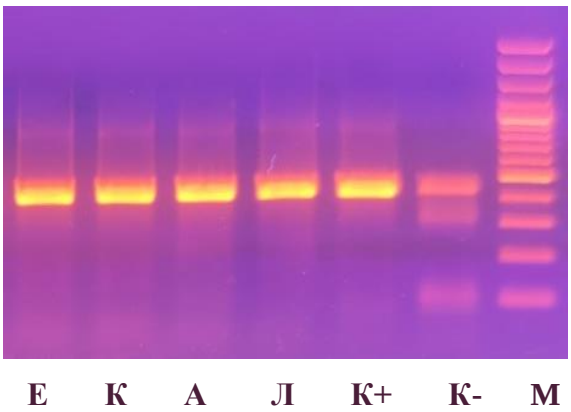



Рис. 4.13. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами d1UL48-F1/d1UL48-R1 до гену UL48 (Е, К, А, Л – зразки, К+ – контроль вірусу, К- – Контроль КК, М – маркер «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder»)

Таким чином, було підтверджено, що фітопрепарат специфічно інгібує ген UL10, який кодує глікопротеїн M, необхідний для реплікації вірусу в культурі клітин.

### 4.6. Дослідження мішеней антикоронавірусної дії фітопрепарату

#### 4.6.1 Молекулярний докінг флавоноїдних компонентів фітопрепарату у мішені SARS-CoV-2

Доступним способом визначити можливий механізм дії компонентів фітопрепарату є комп'ютерне моделювання, як механізм комп'ютерного моделювання був обраний молекулярний докінг.

Використовувався алгоритм систематичного стикування (SDOCK+). Всі розрахунки проводилися в силовому полі AMBER. Перед початком роботи, були зроблені розрахунки для кожної мішені та визначені ключові атоми для взаємодії з лігандом. Потім шляхом систематичного докінгу були відібрані найбільш енергетично вигідні комплекси відповідно до внутрішньої скорингової функції QXP і залишені для подальшого дослідження. Для кожного окремого варіанту докінгу оцінювали енергію білок-лігандного комплексу, енергію білок-лігандного зв'язку, внутрішню енергію лігандного напруження, енергії ван-дер-ваальсової та електростатичної взаємодій, кількість H-зв'язків між атомами білка та ліганду (при виборі кандидатів - ліганд особливу увагу відбирали молекули з великою кількістю акцепторів H-зв'язків), і, нарешті, оцінювали площу ліганду, що контактує з білком. Важливо відзначити, що в розрахунках враховувалася рухливість різних взаємодіючих структур, починаючи від невеликих бічних ланцюгів і закінчуючи великими доменними переміщеннями. Результати були відфільтровані за допомогою multyRmsd та внутрішніх flo+ фільтрів.

Фільтрацію проводили за наступним алгоритмом: (1) застосування фільтра, заснованого на кількості водневих зв'язків (ліганд повинен мати не менше трьох (бажано) таких зв'язків з білком); (2) зв'язування між конкретним білком і атомами ліганду відповідно до заданої фармакофорної моделі; потрібно

звернути увагу на те, що інші фільтри застосовувалися в залежності від характеристик зв'язувальної кишені конкретної структури.

За результатами вивчення взаємодії всіх доступних на теперішній час в наявності потенційних мішеней SARS-CoV-2 з трьома інгібіторами (кверцетин, лютеолін та апігенін) ми зупинились на 3 найбільш вдалих, на наш погляд, утворених комплексах: білково-нуклеїновий комплекс NSP16-NSP10-РНК – метилтрансфераза, основна протеаза вірусу SARS-CoV-2 (її ферментативний сайт) та РНК-залежна РНК-полімераза.

Результат молекулярного докінгу флавоноїдних сполук у комплекс РНК-залежної РНК-полімерази вірусу SARS-CoV-2 (PDB ID 7BV2) [140] показано на рис. 4.14.

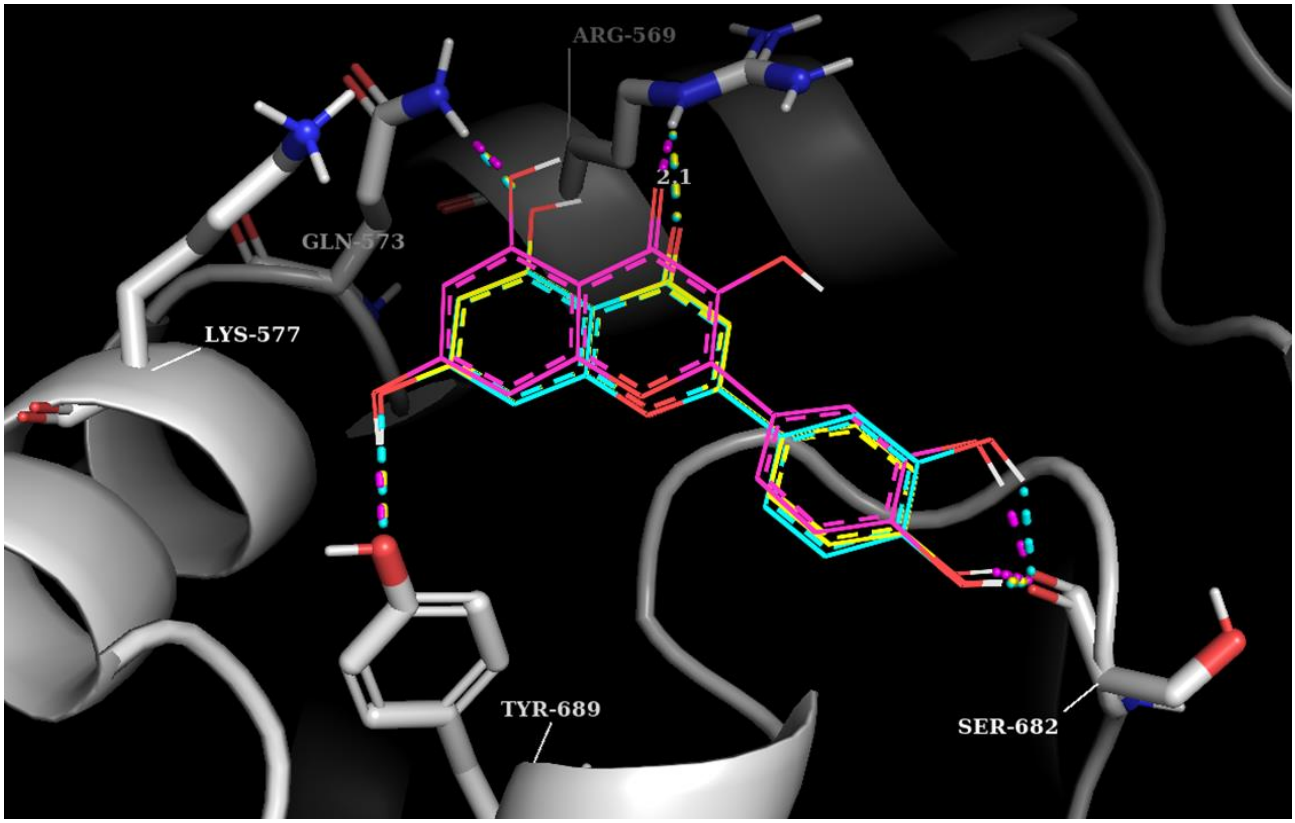



Рис. 4.14. Взаємодія кверцетину, лютеоліну та апігеніну з моделлю сайту зв’язування РНК-залежної РНК-полімерази вірусу SARS-CoV-2

Взаємодія відбувається в просторовій близькості до ферментативного центру. Усі три сполуки імітують структурні елементи будівельного блоку

нуклеотидів РНК та утворюють ковалентні взаємодії з молекулою реплікаційної РНК, що призводить до блокування подальшого процесу синтезу РНК.

Результат молекулярного докінгу флавоноїдних сполук у основну протеазу вірусу SARS-CoV-2 (3CL pro) (PDB ID 6M2N) [142] показано на рис. 4.15.

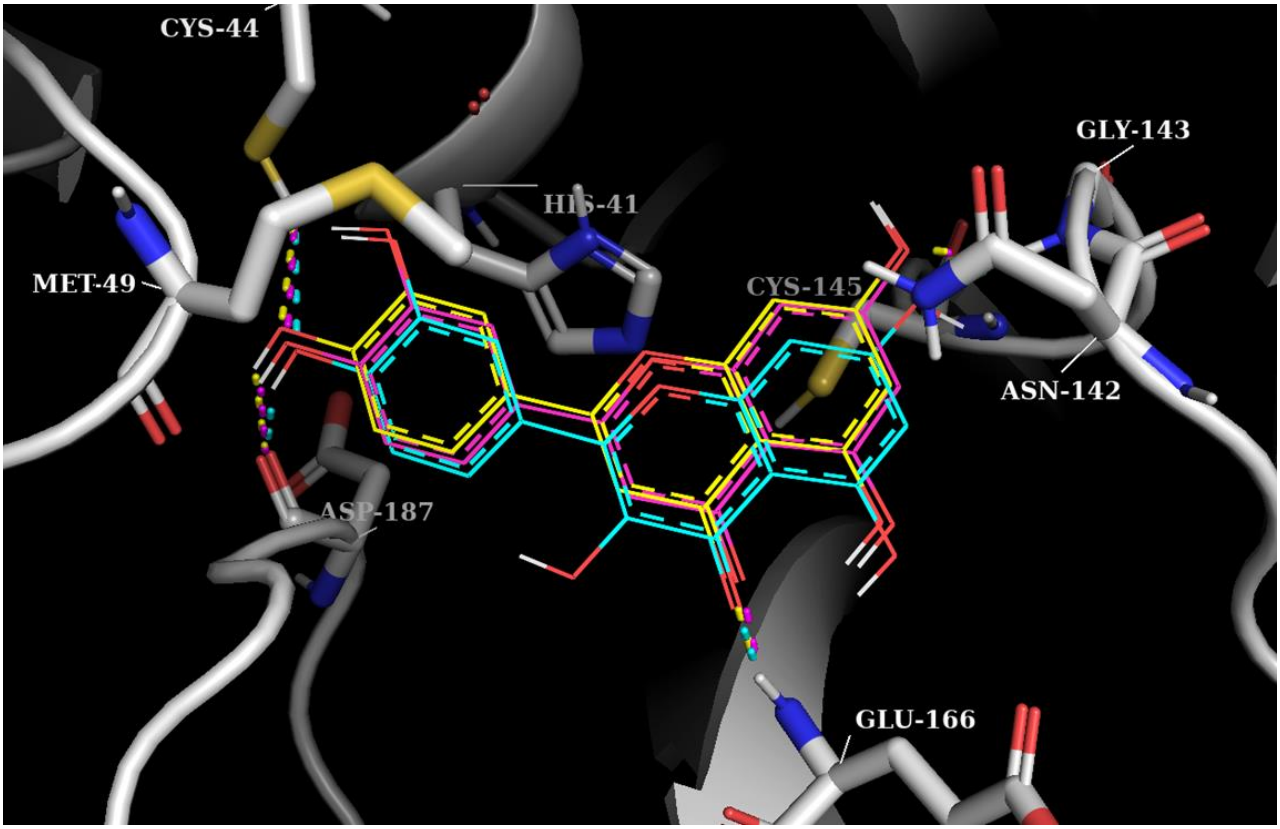



Рис. 4.15. Взаємодія кверцетину, лютеоліну та апігеніну з моделлю сайту звязування основної протеази вірусу SARS-CoV-2

При докінгу у основну протеазу вірусу SARS-CoV-2 (3CL pro) відбувається блокування каталітичної діади, принципова фармакофорна модель залишається одна й таж сама. Але кверцетин лежить в кишені дещо по іншому ніж інші похідні.

Результат молекулярного докінгу кверцетину, лютеоліну та апігеніну з моделлю сайту зв'язування метилтрансферази вірусу SARS-CoV-2 – кристалічною структурою Nsp16-Nsp10 із SARS-CoV-2 (PDB code 6WVN) [141] представлено на рис. 4.16.

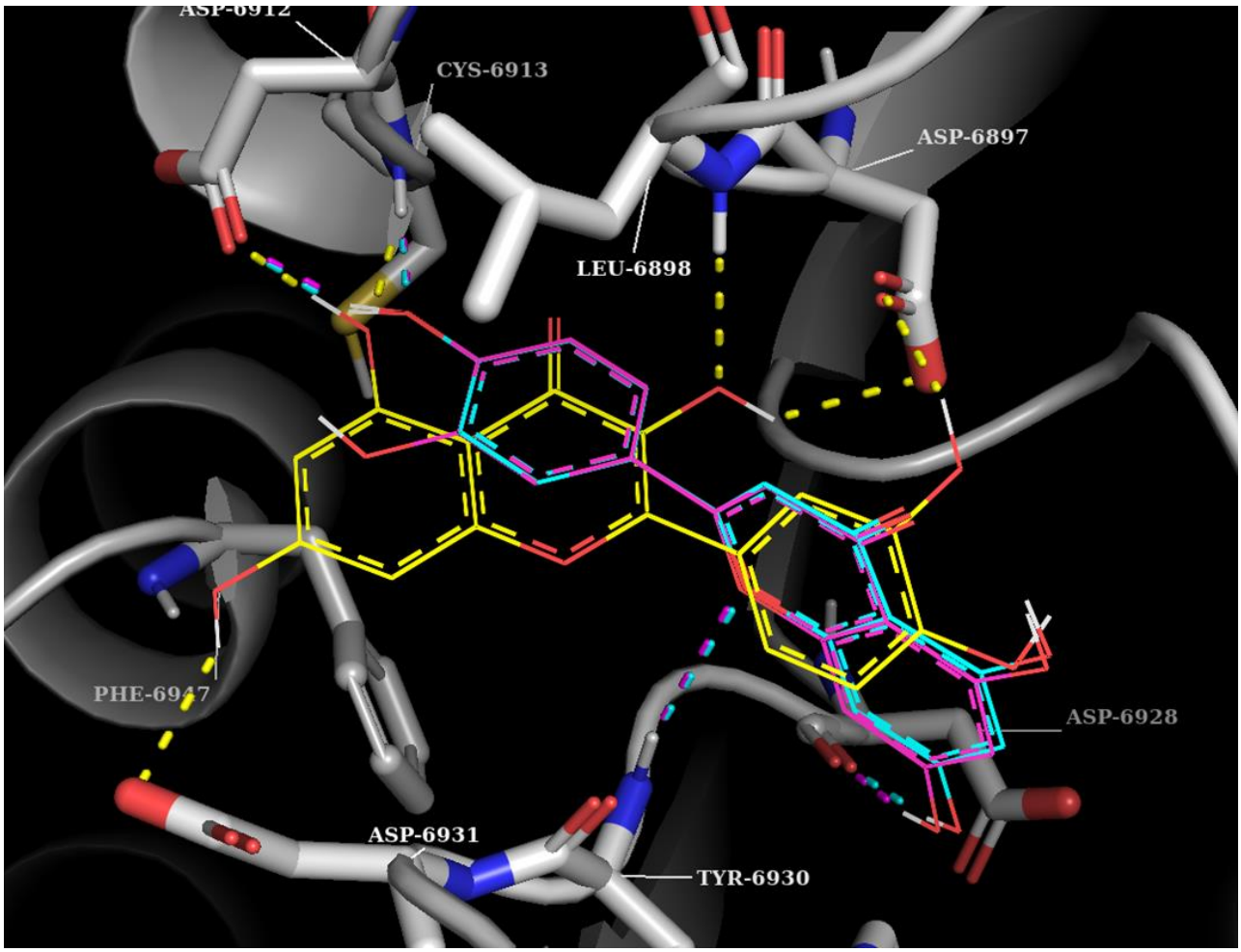



Рис. 4.16. Взаємодія кверцетину, лютеоліну та апігеніну з моделлю сайту зв'язування метилтрансферази вірусу SARS-CoV-2

Для комплексу Nsp16-Nsp10 РНК блокування SAM сайту зв’язування блокує ферментативну активність даного комплексу.

Для NSP16 метилтрансферази інгібітори займають важливу регуляторну кишеню SAM блокуючи роботу білково-нуклеїнового комплексу. Для протеази відбувається блокування каталітичної діади, принципова фармакофорна модель залишається подібною щодо референтного інгібітора та включає в себе такі залишки амінокислот: водневі звязки з Asp187, Cys44, Glu166, стекінг взаємодії з His41, Cys145 та інші типи взаємодій. Для полімерази взаємодія відбувається поблизу місця зв'язування ремдесивіру та стерично близько до ферментативного центру, при цьому блокується синтез РНК та взаємні рухи фермент-нуклеїнові кислоти. Всі три сполуки, в цьому випадку, взаємодіють подібно одна до одної.

Можливо висунути наступну гіпотезу: присутність всіх сполук у досліджуваному фітопрепараті та подібний і ефективний їхній вплив на зазначені мішені забезпечує значну антивірусну дію досліджуваного препарату за відсутності токсичної дії.

### 4.6.2. Розробка методу молекулярно-генетичної індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС)

Для того щоб більш об'єктивно судити про ефективність досліджуваних препаратів та їх механізмів дії була розроблена методика молекулярно-генетичної індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней ТГС (TGEV) на основі сконструйованих високоспецифічних олігонуклеотидних праймерів і кількісним аналізом продуктів ПЛР в режимі реального часу з інтеркалятором SYBR Green I (ПЛР-РЧ) і методом електрофорезу в агарозному гелі.

При проведені досліджень з оцінки антикоронавірусної активності препаратів, одним з найбільш складних і важливих етапів є правильний вибір можливих таргетних генів вірусу. При аналізі і використанні моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС), який проявляє тропізм до шлунково-кишкового тракту та респіраторного тракту тварин, і враховуючи особливості його реплікації, в якості найбільш ймовірних були обрані гени, що кодують: ORF1a (репліказа 1a), ORF3b – неструктурний білок, довжиною біля 250 амінокислотних залишків, який знаходиться на тій же мРНК, що і ORF3a, приймає участь в патогенезі ТГС, полімерази та спайкового (S) білку (табл. 4.5, рис. 4.17).

Таблиця 4.5

Олігонуклеотидні праймери до таргетних генів коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней

| №\ № | Праймер | Послідовність праймера (5’ ---> 3’) | Фрагмент (п.н.) | Ген |
|---|---|---|---|---|
| 1 | dTGS-F | GGCTCACCACCTACTACCACCA | 261 | S |
| | dTGS-R | CGTGCCAGCGRYTTCTAATG* | | |
| 2 | dTGpol-R | TTCCGTGATTTTAATGGCAAC | 527 | Polymerase |
| | dTGpol-F | CACAACTCCAATCTGCTGAATG | | |
| 3 | dORF1a-F | GCTGGTGATGTTGAAGGTGTCT | 439 | ORF1a |
| | dORF1a-R | TAACACGATTGTCTGGAACCAC | | |
| 4 | dORF3b-R | CATTGTGAACACCGACTACGG | 243 | ORF3b |
| | dORF3b-F | TACATGGCAGAGCTACACCGT | | |

*Примітка: R=A/G, Y=C/T

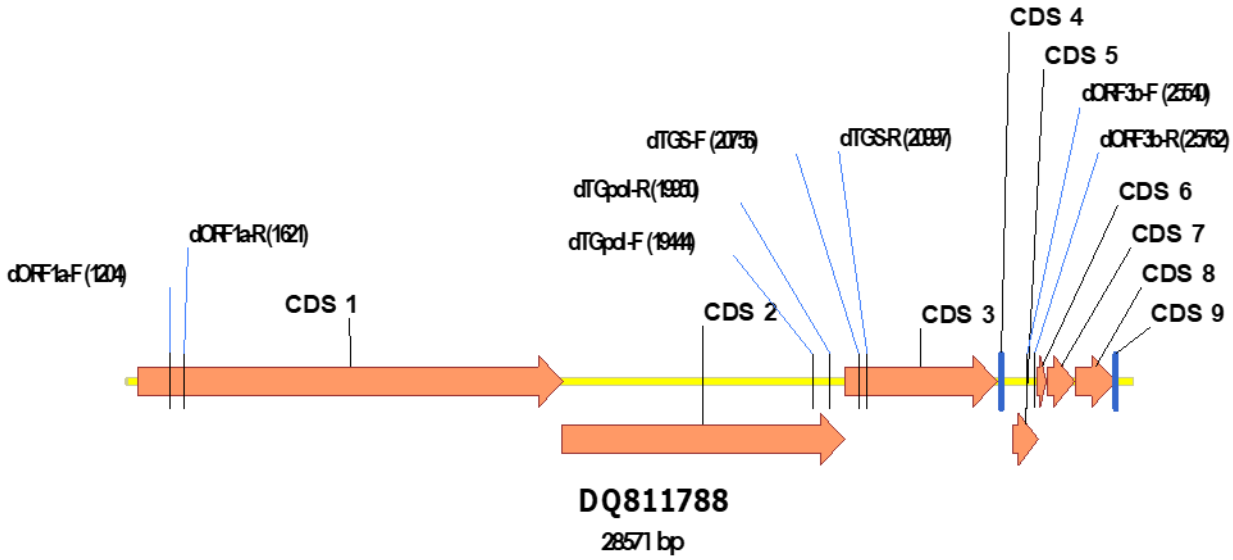



Рис. 4.17. Позиція олігонуклеотидних праймерів на послідовностях таргетних генів коронавірусу ТГС (референтного штаму Purdue 115)

Специфічність усіх пар праймерів була перевірена у ПЛР з кДНК вірусу ТГС штам $D_{52\text{-}5}$ (рис. 4.18).

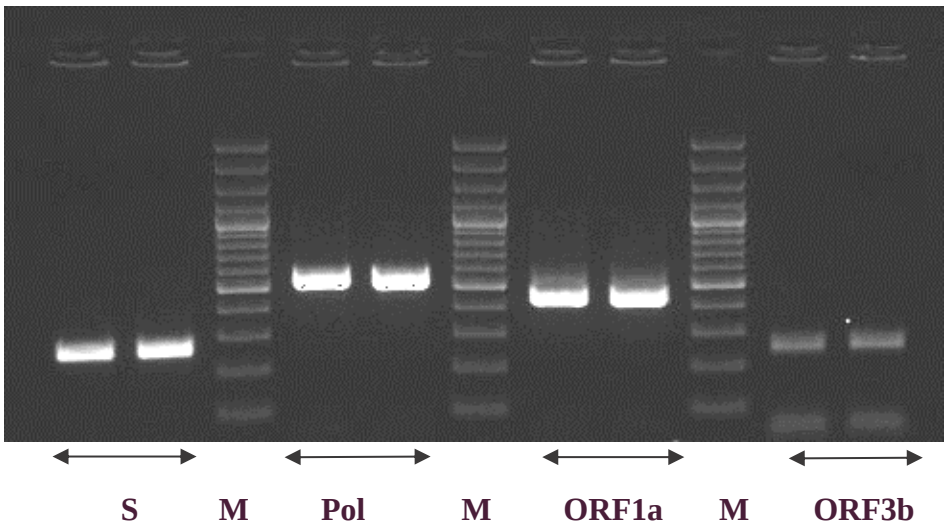



Рис. 4.18. Результати електрофоретичного аналізу в 1,5% гелі агарози продуктів ПЛР з праймерами до 4 генів вірусу ТГС (М-маркер розміру фрагментів ДНК «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder», S – спайковий білок, Pol – полімераза, ORF1a та ORF3b)

Критерієм специфічності олігонуклеотидних праймерів вважали їх неспроможність гібридизуватись з ДНК гетерологічних зразків, що супроводжувалось в ПЛР-РЧ, як більш чутливого варіанту ПЛР, відсутністю будь-яких значень у цих пробах при детекції флуоресценції по відповідному каналу. Специфічність складала 100 % (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Результат перевірки в ПЛР-РЧ специфічності праймерів з гетерологічними зразками ДНК/кДНК

| № з/п | Опис зразка ДНК | Значення Ct за каналом SYBR | Результат |
|---|---|---|---|
| 1 | Коронавірус трансмісивного гастроентериту свиней (ВТГС) штам $D_{52}$ (КК Vero) | 15,52 | **Позитивний** |
| 2 | Коронавірус епізоотичної діареї свиней (ВЕДС) | - | Негативний |
| 3 | Коронавірус собак:<br>вакцина «CvK/LCI-GK» (Форт Додж, США),<br>вакцина інактивована (Пфайзер, США),<br>вакцина «Біокан К» (Bioveta, Чехія) | - | Негативний |
| 4 | Коронавірус інфекційного бронхіту птиці, серотипи: H120 (Массачусетс), QX, 4/91 | - | Негативний |
| 5 | Вірус грипу людини (H1N1) | - | Негативний |

| № з/п | Опис зразка ДНК | Значення Ct за каналом SYBR | Результат |
|---|---|---|---|
| 6 | Аденовірус людини тип 4E | - | Негативний |
| 7 | Salmonella Enteritidis | - | Негативний |
| 8 | Listeria spp | - | Негативний |
| 9 | E.coli (O157) | - | Негативний |
| 10 | Campylobacter spp | - | Негативний |
| 11 | Mycoplasma spp | - | Негативний |
| 12 | Pasterella spp | - | Негативний |
| 13 | Staphylococcus aureus (MRSA) | - | Негативний |
| 14 | Bacillus cereus | - | Негативний |

Аналітичну чутливість розроблених праймерів (молекулярно-генетичних засобів) визначали в кількісному варіанті ПЛР-РЧ з праймерами до генів полімерази та реплікази 1a (рис. 4.19), для чого були приготовлені серії послідовних 10-кратних розведень кДНК (рис. 4.20).

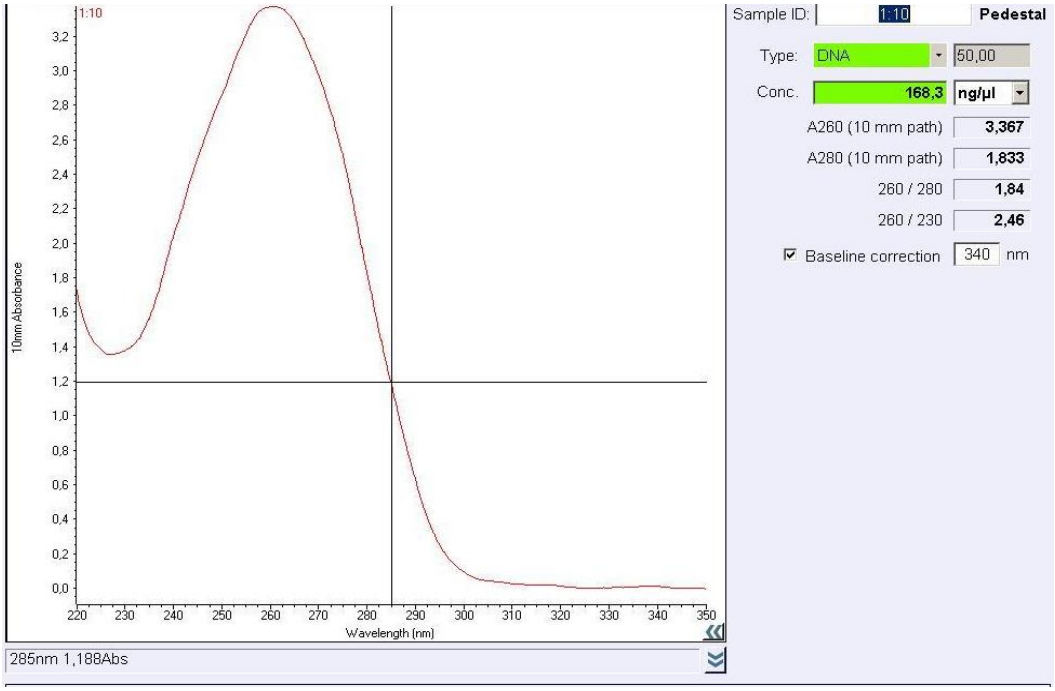



Рис. 4.19. Спектрофотометричне визначення концентрації кДНК після реакції зворотної транскрипції.

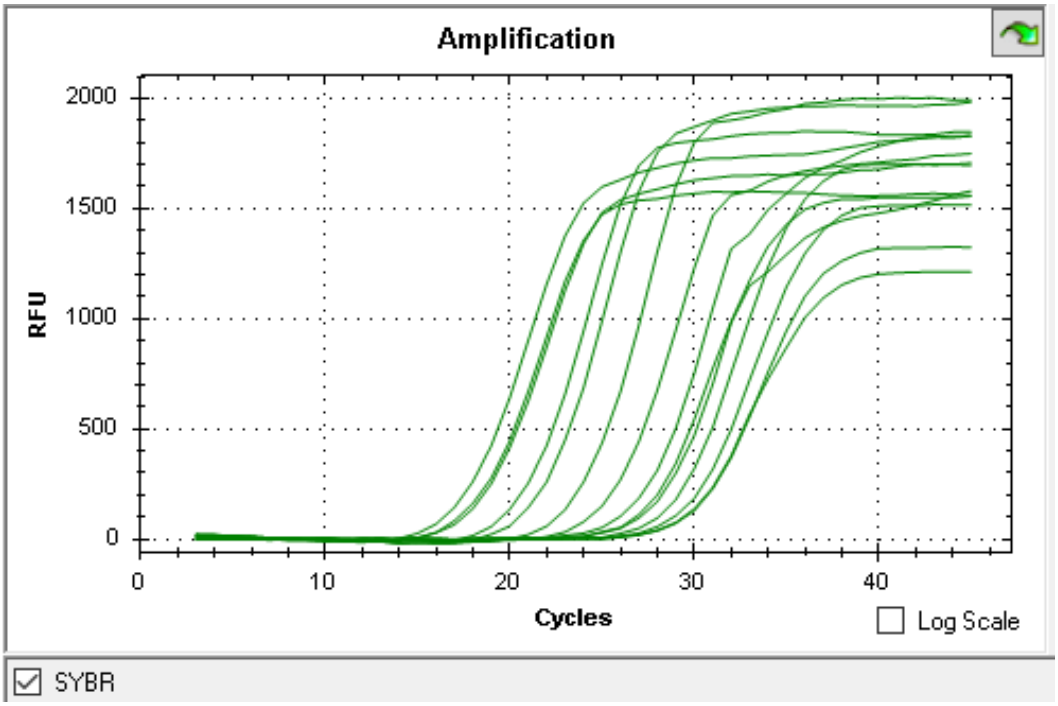



Рис. 4.20. Аналітична чутливість для пар праймерів dORF1a-F/dORF1a-R та dTGpol-R/dTGpol-F в ПРЛ-РЧ з SYBR Green I

Результати визначення аналітичної чутливості праймерів, специфічних до генів ORF1a та полімерази, представлені в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Результати визначення аналітичної чутливості праймерів dTGpol-R/ dTGpol-F та dORF1a-F/ dORF1a-R

| **Таргетний ген** | **Кількість кДНК вірусу, нг** | **Розведення** | **Результат (Ct на каналі SYBR GreenI)** |
|---|---|---|---|
| **Pol** (Полімераза) | 504,9 | $10^{-1}$ | 16,42 |
| | 50,49 | $10^{-2}$ | 17,38 |
| | 5,049 | $10^{-3}$ | 20,58 |
| | 0,504 | $10^{-4}$ | 24,28 |
| | 0,050 | $10^{-5}$ | 26,68 |
| | 0,005 | $10^{-6}$ | 28,97 |
| | *0,0005* | $10^{-7}$ | *29,31* |
| **ORF1a** (Репліказа1а) | 504,9 | $10^{-1}$ | 17,01 |
| | 50,49 | $10^{-2}$ | 19,58 |
| | 5,049 | $10^{-3}$ | 22,67 |
| | 0,504 | $10^{-4}$ | 25,90 |
| | 0,050 | $10^{-5}$ | 26,74 |
| | 0,005 | $10^{-6}$ | 28,97 |
| | *0,0005* | $10^{-7}$ | *28,13* |

Таким чином, аналітична чутливість для пар праймерів dORF1a-F/dORF1a-R та dTGpol-R/dTGpol-F в ПРЛ-РЧ з SYBR Green I складає 5 пкг кДНК на зразок.

### 4.6.3. Дослідження впливу фітопрепарату на гени коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней

Для визначення гену вірусу ТГС на який впливає фітопрепарат (спиртовий розчин) були проведені наступні дослідження. У лунки з культурою клітин СНЕВ вносили вірус ТГС, після чого додавали препарати (фітопрепарат у формі спиртового розчину та деякі його активні фармакологічні інгредієнти).

Експеримент складався з таких варіантів клітин: КК – інтактна культура клітин СНЕВ; КВ – Культура клітин СНЕВ + вірус ТГС $10^{-3}$; ФП – культура клітин СНЕВ + вірус ТГС $10^{-3}$ + Фітопрепарат (спиртовий розчин) 4 мкг/мл; А – культура клітин СНЕВ + вірус ТГС $10^{-3}$ + апігенін 2,5 мкг/мл; К – культура клітин СНЕВ + вірус ТГС $10^{-3}$ + кверцетин 2,5 мкг/мл.

На третю добу з культур різних варіантів експерименту були виділені РНК, методом зворотньої транскрипції отримані кДНК різних варіантів експерименту і проведений електрофоретичний аналіз в 1,5% гелі агарози продуктів ПЛР з праймерами до генів вірусу ТГС. Типові електрофореграми представлені на рис. 4.21 та 4.22.

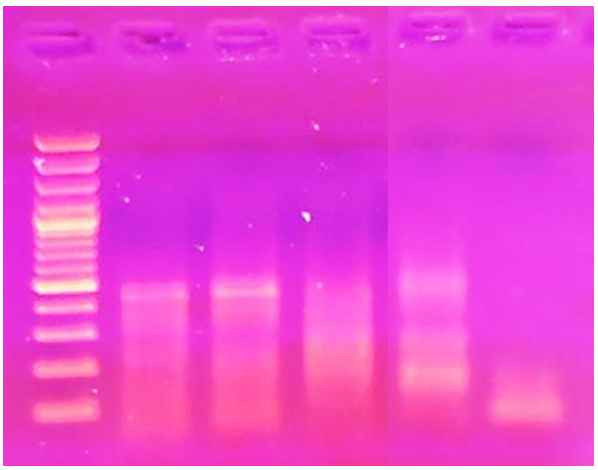



Рис. 4.21. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами dORF1a-F/dORF1a-R до гену ORF1a (439 п.н.) (де М – маркер розміру фрагментів ДНК «GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder»; ТМК, А, ФП – зразки; КВ – контроль вірусу; КК – контроль культури клітин CHEB)

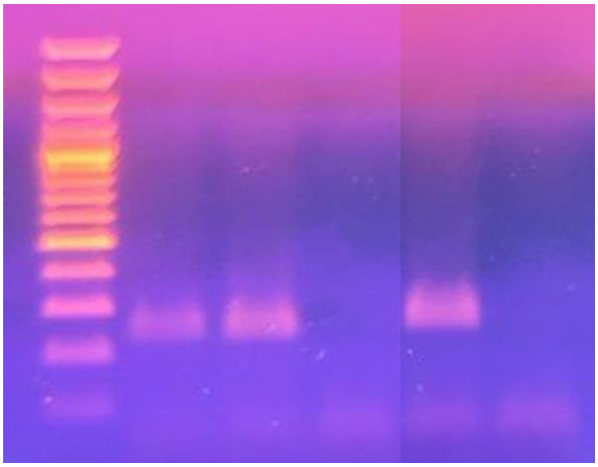



Рис. 4.22. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації з праймерами dORF3b-F/dORF3b-R до гену ORF3b (243 п.н.) (де М – маркер розміру фрагментів ДНК«GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder»; ТМК, А, ФП – зразки; КВ – контроль вірусу; КК – контроль культури клітин CHEB)

Згідно отриманим результатам, фітопрепарат інгібував експресію генів ORF1a та ORF3b вірусу ТГС. Тобто інгібування репродукції коронавірусу ТГС можливо відбувалося за рахунок інгібування генів ORF1a та ORF3b.

### 4.7. Молекулярний докінг флавоноїдних компонентів фітопрепарату до сайтів зв'язування гелікази папіломавірусу людини

У світлі поширення папіломавірусу людини та постійної потреби у нових підходах до боротьби з ним, молекулярний докінг флавоноїдних компонентів фітопрепарату до сайтів зв'язування вірусних ферментів стає предметом зростаючого інтересу. Геліказа є ключовим ферментом для реплікації папіломавірусу людини, і виявлення потенційних інгібіторів для цієї мішені може мати велике значення для розробки нових противірусних засобів.

Перевірка поверхонь білків [143], E1 [144] і E2 [145], задіяних у вірусній реплікації та регуляції генів, була проведена за допомогою онлайн сервісу FT-MAP на наявність сайтів зв'язування інгібіторів білок-білкової взаємодії. В результаті аналізу було передбачено три сайти зв'язування на поверхні кожного учасника, як безпосередньо на поверхні інтерфейсів взаємодії, так і у віддалених ділянках (рис. 4.23). Тобто, можлива посадка та інгібування як прямим, так і алостеричним шляхом. Мінімальний розмір зондових молекул був 3.5Å, при більшому радіусі молекул зонду виявлявся тільки один сайт зв'язування у віддалених від PPI інтерфейсів областях.

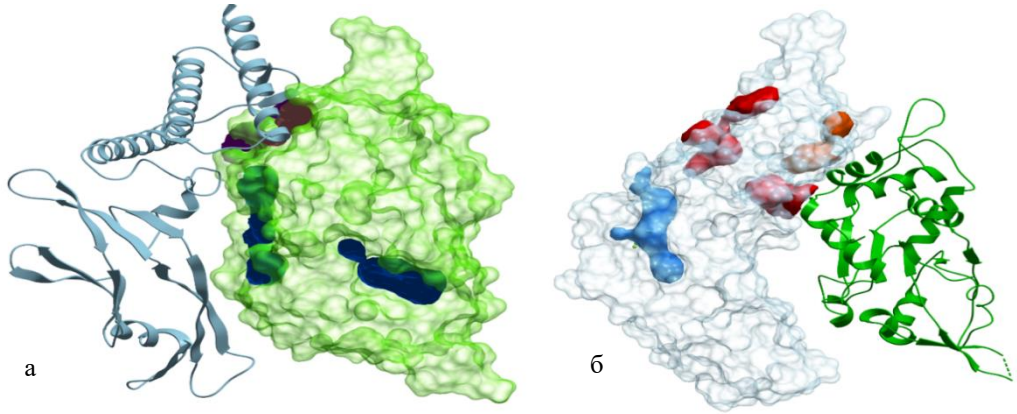
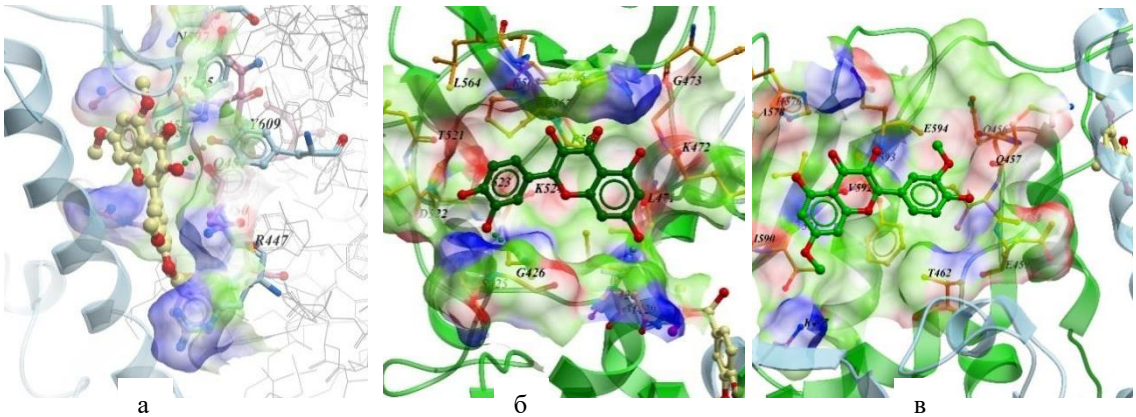



Рис. 4.23. Поверхня та сайти зв'язування інгібіторів білків партнерів димеру E1-E2 (E1 – зелений, E2 – блакитний)

У кожний із сайтів субодиниці даного комплексу було проведено докінг ряду флавоноїдів, мінімальна кількість конформацій та таутомерів для кожної

речовини було 4, чого з урахуванням загальної ригідності скеффолдів було цілком достатньо.

Найбільше значення оціночних функцій для субодиниці E1 (-24.5) було виявлено у місці білок-білкової взаємодії (рис. 4.24, а). У зв'язуванні всіх трьох лігандів брали участь залишки Y609, Q457 та R454. Ефект від такої ліганд-білкової взаємодії може бути пояснений, по-перше, перекриттям порожнини, комплементарної субодиниці E1, по-друге, можливим зміщенням бічних радикалів залишків R447, Q457 і R454, необхідних для утворення водневих містків між двома субодиницями. Другий сайт зв'язування (рис. 4.24, б) утворений порожниною і забезпечує водневі зв'язки між лігандом (C15H10O7) і залишками K524 і M429 (-20.57). Третій потенційний сайт зв'язування (-16.91) на поверхні E1 субодиниці визначався більше гідрофобною та стекінговою взаємодією з F593, ніж з Q447 (рис. 4.24, в).



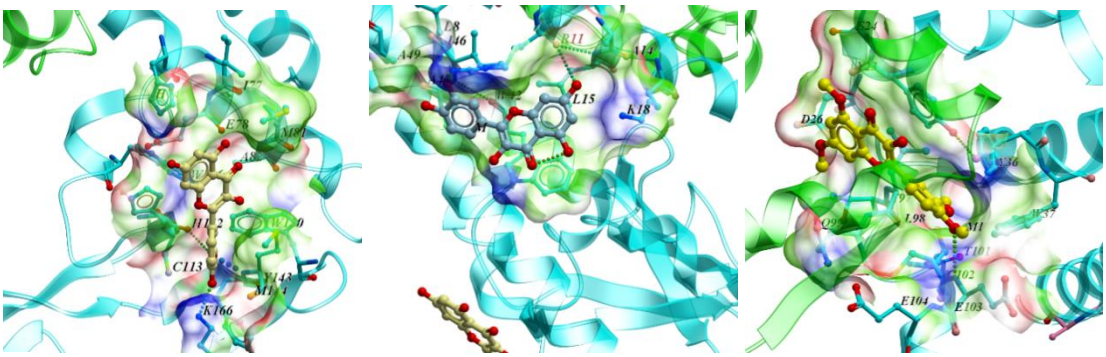

а б в

Рис. 4.24. Потенційні сайти зв'язування на поверхні субодиниці E1.

Примітно, що перший сайт зв'язування укладаються всі три молекули лігандів, практично з однаковим значенням оціночної функції. Приклад посадки першого сайту зв'язування (а). Жовта молекула ліганду з першого сайту зв'язування спеціально показана на інших зображеннях (б, в) для орієнтації у просторі.

Докінг у сайти зв'язування на другій білковій молекулі димеру (E2) показав найбільшу активність (-30.14) у віддаленому положенні від місця зв'язування з

E1 (синій сайт на рис. 4.23, б). Залишки H112, K166 та M144 беруть участь в утворенні водневих містків із $C_{15}H_{10}O_7$ (рис. 4.25, а). Крім тогоW106 і H112 створюють гідрофобну та Т-стекінг взаємодію з площиною ліганду. Далі за значенням оціночної функції стоїть другий сайт зв'язування (рис. 4.25, б) з положенням $C_{15}H_{10}O_7$, знов-таки з протилежної від білок-білкового інтерфейсу сторони (-26.01). Водневі зв'язки утворені бічним радикалом і киснем кістяка залишку R11, а за гідрофобні та потужний стекінг відповідають L15 та W42, відповідно. Останній за значенням стоїть сайт білок-білкової взаємодії (-24.02 для $C_{19}H_{18}O_7$), молекула координується водневим зв'язком з E103 та Pi-стекінгом з Y23 (рис. 4.25, в).




а б в

Рис. 4.25. Три різні положення інгібіторів на поверхні молекули E2.

За результатами дослідження найкраще значення докінгу показано для віддаленого сайту зв'язування (а), а найгірше – для інтерфейсу PPI (в). Незважаючи на середнє оцінне значення для сайту другого зв'язування (б), він навряд чи може бути корисним для подальшої роботи.

Таким чином, димер геліказних білків ВПЛ E1-E2 може бути мішенню дії флавоноїдних молекул. Результати молекулярного докінгу у сайт зв’язування димера E1-E2 із апігеніном, лютеоліном та тетраметоксикверцетином – флавоноїдними компонентами фітопрепарату, представлені на рис. 4.26.

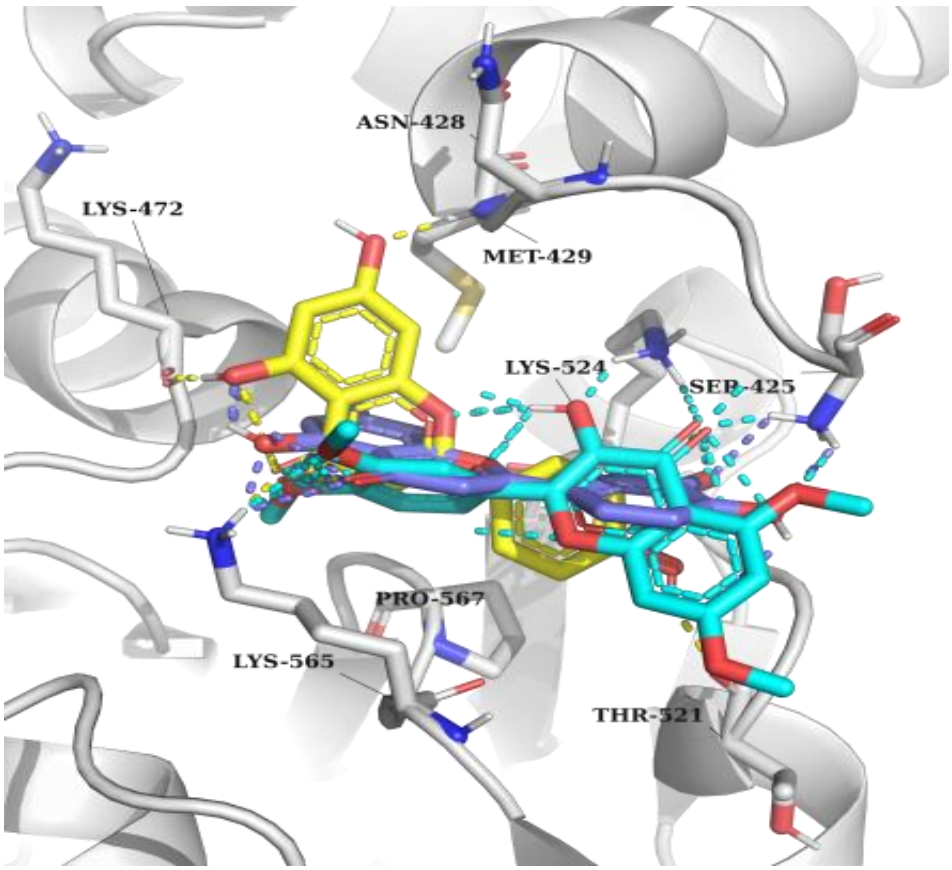



Рис. 4.26. Результати молекулярного докінгу у сайт зв’язування димера E1-E2 із апігеніном, та лютеоліном – жовтий та сіреневий кольори, 5,7,3',4'-тетраметоксикверцетин – блакитний колір

Відповідно до результатів докінгу флавоноїдних компонентів фітопрепарату, що представлені апігеніном, лютеоліном та тетраметоксикверцетином змінюють модель зв’язування для хелікази папіломавірусу, але тетраметоксикверцетин відрізняється від кверцетину та його близьких аналогів.

### 4.8. Вплив фітопрепарату на експресію гену транскрипційного фактору Nrf2 при вірусних інфекціях

Вплив фітопрепарату на експресію Nrf2 *in vitro* в клітинах Jurkat, інфікованих одним із вірусів та/або оброблених фітопрепаратом (ФП). Клітини інфікували 100 мкл коронавірусу ТГС/ вірусу герпесу 1 типу у дозі 100 $ТЦД_{50}$ за стандартною методикою. Після поглинання вірусу додавали середовище, що

містило досліджувані препарати. Культуру клітин інкубували в стандартному середовищі RPMI-1640. Після одноденного культивування клітини збирали та виділяли РНК. Десятикратні розведення початкової РНК аналізували за допомогою ПЛР-РЧ з праймерами, специфічними для людського Nrf2.

Експеримент складався з таких варіантів клітин:

1. Клітини Jurkat + коронавірус ТГС + фітопрепарат спиртовий розчин 1:500;
2. Клітини Jurkat + коронавірус ТГС;
3. Клітини Jurkat + фітопрепарат спиртовий розчин 1:500;
4. Контроль культури клітин Jurkat.

Рівень мРНК у зразках клітинних культур, визначених методом ПЛР-РЧ, представлено у табл. 4.8. Цифрами виражені Cq (кількість циклів). Чим менше циклів, тим більше копій мРНК Nrf2.

Таблиця 4.8

Рівень мРНК Nrf2 у варіантах клітинних культур (коронавірус ТГС)

| **Назва варіантів** | **Результати (Cq)** |
|---|---|
| Клітини Jurkat + ТГС + ФП | 23,91 |
| Клітини Jurkat + ТГС | *24,79* |
| Клітини Jurkat + ФП | 23,96 |
| Контроль КК Jurkat | **24,50** |

Інфікування коронавірусом ТГС призвело до незначного зменшення експресії Nrf2. Але у клітинах, оброблених ФП та інфікованих і неінфікованих коронавірусом ТГС рівень експресії Nrf2 збільшувався.

У наступний експеримент було взято такі варіанти клітинних культур:

1. Клітини Jurkat + вірус простого герпесу 1 типу + фітопрепарат спиртовий розчин 1:500;
2. Клітини Jurkat + вірус простого герпесу 1 типу;
3. Клітини Jurkat + фітопрепарат спиртовий розчин 1:500;
4. Контроль КК Jurkat.

Рівень мРНК у зразках клітинних культур, визначених методом ПЛР-РЧ, представлено у табл. 4.9. Цифрами виражені Cq (кількість циклів). Чим менше циклів, тим більше копій мРНК Nrf2.

Таблиця 4.9

Рівень мРНК Nrf2 у варіантах клітинних культур Jurkat (вірус простого герпесу 1 типу)

| **Назва варіантів** | **Результати (Cq)** |
|---|---|
| Клітини Jurkat + ВПГ-1 + ФП | 23,25 |
| Клітини Jurkat + ВПГ-1 | *25,07* |
| Клітини Jurkat + ФП | 25,58 |
| Контроль культури клітин Jurkat | **23,80** |

Інфікування ВПГ-1 та обробка клітин фітопрепаратом призводили до зменшення експресії Nrf2. Але у клітинах, інфікованих ВПГ-1 та оброблених ФП рівень експресії Nrf2 збільшувався до рівня Nrf2 нормальних клітин.

## 4.9. Вплив фітопрепарату на експресію гена рецептора епідермального фактора росту HER-2

В роботах останніх років [74–76] було виявлено, що поліфеноли мірицетин, дефінідін, кверцетін та епігалокатехін та ін. пригнічують фосфорилювання рецептора епідермального фактору росту у пухлинних клітинах людини. Цей факт має велике значення для розробки нових антивірусних препаратів тому що рецептор епідермального фактору росту бере участь в одному з перших етапів репродукції вірусів – їх прикріплені та інтерналізації. Рахуючи що більшість флавоноїдів мають антивірусні властивості, а також володіють антиоксидантними, антитромботичними, нейропротекторними та протизапальними властивостями [7, 27] – флавоноїди мають великий потенціал для розробки нових противірусних засобів, які не тільки інгібують репродукцію вірусів, а також можливо інгібують перехід

гострої інфекції в персистентну, фіброз та канцерогенез. Зважаючи на це були проведені дослідження щодо визначення експресії гена HER-2 під впливом фітопрепарату в клітинній культурі Jurkat.

Експеримент складався з таких варіантів клітин:

1. КК Jurkat + ВПГ-1 + Фітопрепарат екстракт 2 мкг/мл;
2. КК Jurkat + ВПГ-1 + Кверцетин 2,5 мкг/мл;
3. КК Jurkat + ВПГ-1 + Ізорамнетин 2,5 мкг/мл;
4. Контроль вірусу (КК Jurkat + ВПГ-1);
5. Контроль КК Jurkat.

### 4.9.1. Аналіз кількості копій гену HER-2 у клітинах після обробки фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами

Рівень ДНК у зразках клітинних культур, визначених методом ПЛР, представлено в табл. 4.10. Цифрами виражені Cq (кількість циклів). Чим менше циклів, тим більше копій ДНК HER-2.

Таблиця 4.10

Рівень ДНК HER-2 у зразках клітинних культур, визначених методом ПЛР

| **Назва варіантів** | **Результати (Cq)** |
|---|---|
| Клітини Jurkat + ФП | 30,08 |
| Клітини Jurkat + кверцетин | 29,25 |
| Клітини Jurkat + ізорамнетин | 29,23 |
| Клітини Jurkat + ВПГ-1 | *28,02* |
| Контроль КК Jurkat | **28,97** |

З зазначених даних можна зробити висновок, що вірус простого герпесу 1 типу сприяє збільшенню рівня експресії ДНК HER-2 у клітинних культурах. А обробка клітин фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами призводить до зменшення рівня експресії цієї ДНК.

### 4.9.2. Транскрипційний аналіз експресії гена HER-2 після обробки клітин фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами

Рівень мРНК у зразках клітинних культур, визначених методом ЗТ-ПЛР, представлено в табл. 4.11. Цифрами виражені Cq (кількість циклів). Чим менше циклів, тим більше копій мРНК HER-2.

Таблиця 4.11

Рівень мРНК HER-2 у зразках клітинних культур, визначених методом ПЛР-РЧ

| **Назва варіантів** | **Результати (Cq)** |
|---|---|
| Клітини Jurkat + ФП | 26,36 |
| Клітини Jurkat + кверцетин | 26,23 |
| Клітини Jurkat + ізорамнетин | 26,14 |
| Клітини Jurkat + ВПГ-1 | *25,51* |
| Контроль КК Jurkat | **25,51** |

Було виявлено, що інфікування клітин Jurkat цим вірусом не викликає змін у рівні мРНК HER-2. Це може вказувати на те, що цей вірус, принаймні в даному контексті, не суттєво впливає на експресію гену HER-2 в клітинах. Обробка клітин фітопрепаратом у формі екстракту та синтетичними флавоноїдами призвела до зменшення рівня мРНК HER-2. Цей ефект був особливо виражений у випадку фітопрепарату. Такий результат може вказувати на потенційну ефективність цих сполук як інгібіторів експресії гену HER-2 в клітинах Jurkat.

# РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проблема створення ефективних та безпечних противірусних лікарських засобів пов'язана з необхідністю поєднання властивостей специфічно (вибірково) пригнічувати репродукцію вірусів із відсутністю негативного впливу на процеси життєдіяльності клітин макроорганізму. Наявність специфічних ферментів, які беруть участь у реплікації вірусів, значно полегшує завдання розробки етіологічних методів терапії вірусних інфекцій, що є одне з основних напрямів сучасної вірусології та фармакології.

Речовини рослинного походження залишаються у фокусі при розробці антимікробних та антивірусних препаратів [7]. Особливе місце серед них займають рослинні поліфеноли та, зокрема, флавоноїди. Вперше противірусна активність природних флавоноїдів була описана ще у середені 20-го століття. Наразі ефективне пригнічення репродукції вірусів різних таксономічних груп показано в експериментах *in vitro* та *in vivo* [155]. Останні десятиліття було розкрито низку молекулярних механізмів противірусних ефектів флавоноїдів. Значна частина досліджень у цьому напрямку була зосереджена на виявленні модифікуючої дії флавоноїдів на клітинні та вірусні ферменти. Флавоноїди різних класів, які є інгібіторами низки ферментів, зокрема гідролаз, оксидоредуктаз, ДНК-синтаз, РНК-полімераз, фосфатаз, протеїнфосфокіназ, оксигеназ. Численні ефекти флавоноїдів у клітинах залежать від здатності надавати модулюючий вплив на різні компоненти каскадів внутрішньоклітинної передачі сигналів, включаючи каскади тирозинкіназ, MAP-кіназ (mitogen-activated protein kinase), протеїнкінази С та інші [156]. Такий інгібуючий вплив на ферменти може бути конкурентним та неконкурентним, найчастіше має місце алостеричний механізм інгібування [157].

Фітопрепарат, який представлений для дослідження, являє собою настоянку лікарської рослинної сировини: *Filipendula vulgaris radices, Petroselinum crispum radices, Apium graveolens, Galium verum gramen, Linaria vulgaris gramen, Calendula officinalis flores* [158]. Препарат стандартизовано за

вмістом флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, іридоїдів та терпеноїдів. Ці компоненти здійснюють гормонорегулюючу, антипроліферативну, протизапальну, седативну та загальнозміцнюючу дію [159]. Флавоноїди активних компонентів фітопрепарату структурно подібні ендогенному естрогену, але без естрогеноподібної активності. Вони можуть вступати в конкурентну взаємодію з рецепторами для естрогену (або андрогену) у випадку перевищення рівня естрогену (або андрогену) або їх рецепторів у цільових органах [158, 159].

Зважаючи на склад біологічно активних речовин фітопрепарату логічним було передбачувати й його противірусну активність. Саме тому метою нашого дослідження було вивчення впливу фітопрепарату на репродукцію *in vitro* РНК-вірусу (коронавірус трансмісивного гастроентериту свиней) та ДНК-вірусів – вірусу простого герпесу 1, 2 типу та папіломавірусу, а також ефективності застосування фітопрепарату для лікування генітального герпесу на моделі *in vivo*. Дані віруси, з одного боку, являють собою зручні моделі для дослідження антивірусної активності фітопрепаратів [128], а, з іншого, – відповідні вірусні хвороби є вкрай актуальними медико-соціальними проблемами людства.

Як будь-які фармакологічні й токсикологічні дослідження біологічно активних речовин у культурі клітин ми розпочали з визначення ефективної ($EC_{50}$) та цитотоксичної ($CC_{50}$) концентрації, а також індексу селективності (SI). Без визначення даних показників подальша інтерпретація отриманих експериментальних даних була неможливою. Зазначимо, що окрім активних фармакологічних інгредієнтів рослинного походження до складу спиртової форми фітопрепарату входить допоміжна речовина з вираженими цитотоксичними властивостями – етанол, вплив якого у згадані вище параметри, очевидно, є значним. У наших експериментах із визначення $CC_{50}$ використовували три клітинні лінії (ВНК, CHEB та HeLa) та отримали різні, але близькі цифрові дані щодо цитотоксичного впливу фітопрепарату у формі спиртового розчину: у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук $CC_{50}$ склав: 0,05 мг/мл для ВНК, 0,1 мг/мл для CHEB та 0,1 мг/мл для HeLa. Зазначимо,

що дані інших авторів щодо визначення $CC_{50}$ спиртових настоянок (етанол як екстрагент), є співставними із отриманими нами результатами. Так, наприклад, у роботі [160] $CC_{50}$ спиртового екстракту прополісу склала 0,375 мг/мл, а цей же показник для олійного екстракту становив 1,66 мг/мл (використовували human keratinocytes cell line). У роботі [161] значення $CC_{50}$ для спиртового та водного *Acacia aroma* leaf extracts також відрізнялась на порядок: 0,465 та 1,8 мг/мл, відповідно (на культурі клітин Vero). Цитотоксична концентрація фітопрепарату у формі екстракту та капсул у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук становила 0,06 мг/мл для BHK, CHEB та HeLa.

Не менш цікавими та важливими є результати щодо визначення ефективної концентрації ($EC_{50}$) фітопрепарату. Показник $EC_{50}$ фітопрепарату у формі спиртового розчину у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук становив 0,31 мкг/мл у випадку ВПГ-1 та 0,63 мкг/мл у випадку ВПГ-2. Для фітопрепарату у формі екстракту та капсул у перерахунку на концентрацію поліфенольних сполук $EC_{50}$ становила 0,13 мкг/мл для ВПГ-1 та ВПГ-2. Зазначимо, що ефективні дози *in vitro* для досліджуваного препарату були відчутно нижчими у порівнянні із аналогічними ефективними (інгібуючими) концентраціями для інших поліфенол-вмісних препаратів чи окремих поліфенольних сполук. Так, у роботі [160] $EC_{50}$ спиртового екстракту прополісу по відношенню до ВПГ-2 склала 2,9 мкг/мл (у порівнянні із ацикловіром – 5,5 мкг/мл) [162].

У випадку коронавірусу ТГС (що розглядався нами в якості моделі SARS-CoV-2) показник $EC_{50}$ фітопрепарату становив 0,63 мкг/мл для фітопрепарату у формі спиртового розчину, 0,5 мкг/мл для фітопрепарату у формі екстракту та 0,25 мкг/мл для фітопрепарату у формі капсул. Хіе та ін. показали, що для свинячого коронавірусу PEDV, що має > 70% ідентичності з TGEV, $EC_{50}$ хімічного референс-препарату ремдесивір становила 0,45 мкг/мл [163]. Зазначимо, що згідно даних [62, 164] $EC_{50}$ для епігалокатехін галату та кверцетину по відношенню до SARS-CoV становило близько 22 мкг/мл.

У випадку папіломавірусу на моделі продукуючої культури клітин HeLa ефективна концентрація фітопрепарату у формі екстракту та капсул становила 2 мкг/мл. Так, наприклад, у роботі [165] концентрації ≥31 мкг/мл танінів з екстракту гамамелісу знижували відносну інфекцію ВПЛ 16 нижче 2% порівняно з необробленими контрольними культурами за відсутності цитотоксичності на клітинах HaCaT.

Отже, комплекс поліфенольних сполук досліджуваного фітопрепарату інгібує репродукцію вірусів (принаймні, вірус простого герпесу, коронавірус ТГС, та папіломавірус) *in vitro* у меншій концентрації, ніж раніше описані поліфенольні сполуки та їх комбінації (фітоекстракти).

Слід зазначити, що отримані нами значення індексу селективності фітопрепарату у формі спиртового розчину (80 для ВНК/ВПГ-2 та 160 для ВНК/ВПГ-1 й СНЕВ/ТГС) є перспективними, а значення SI для фітопрепарату у формі екстракту та капсул (500 для ВНК/ВПГ-1,2) – значними, у порівнянні з даними інших авторів, отриманих для поліфенолвмісних фітоекстрактів. SI для фітопрепарату у формі екстракту та капсул (на моделі ВПЛ-продукуючої культури клітин HeLa) становив 31, що також може характеризувати його як перспективний антипапіломавірусний препарат. Так, наприклад, при визначенні протигерпетичної активності (anti-ВПГ-1) екстракту Pistachios Kernels (*Pistacia vera* L.) SI склав лише 3 [166], а в аналогічному дослідженні SI для препарату *Euphorbia spinidens* склав 15 [167]. Отримані дами дані щодо індексу селективності фітопрепарату є співставними з аналогічним показником для ацикловіру (179) [162]. Зазначимо, що у роботі [168] екстракт *L. Barbarum* продемонстрував SI щодо CAL27 і SCC090 1,4 та 2,4 відповідно.

Такого роду *in vitro* дані корелюють із терапевтичною ефективністю досліджуваного фітопрепарату на моделях генітального герпесу *in vitro*: застосування фітопрепарату *per os* було дещо менш ефективним (індекс лікувальної дії 39,22 %) комбінованого лікування (схема *per os* + applications) (індекс лікувальної дії 52,94 %), ефективність якого була наближена до традиційної схеми лікування ацикловіром (applications) (індекс лікувальної дії

56,86 %).

Проведені нами дослідження продемонстрували один із молекулярних механізмів пригнічення реплікації як РНК-, так й ДНК-вірусів (фітопрепарат мав інгібуючий вплив на синтез РНК в системі транскрипції РНКП Т7 *in vitro* та на синтез ДНК, тобто експресію гена GAPDH).

Зазначимо, що перспективний лікувальний противірусний потенціал досліджуваних форм фітопрепарату адресується й до імуномоделюючого впливу *in vivo* за рахунок індукції інтерферону. Причому рівень індукції ендогенного αIFN досліджуваним фітопрепаратом подібний до ефекту, який опосередкований референтними полінуклеотидами Poly(I)•Poly(C). Аналогічні результати демонструють й інші флавоноїдвмісні препарати [169].

Отримані нами результати визначення вмісту апоптотичних клітин та розподілу за фазами клітинного циклу вказували на потенційну антивірусну активність деяких препаратів, зокрема фітопрепарату та флавоноїдів, проти інфекції ВПГ-1 в клітинах Jurkat. За результатами, інфікування ВПГ-1 значно збільшило вміст апоптотичних клітин порівняно з контролем, що свідчить про активність вірусу в спричиненні клітинної смерті. Слід зауважити також, що зниження вмісту апоптотичних клітин спостерігалося при дії фітопрепарату та окремих флавоноїдів, таких як лютеолін та апігенін, що може свідчити про їхню здатність зменшувати апоптоз, який спричиняється інфекцією ВПГ-1. Також було виявлено, що інфікування ВПГ-1 призводило до зниження вмісту клітин у фазі S та підвищення вмісту клітин у фазі G2/M, що може свідчити про нормалізацію клітинного циклу на цих етапах. Загалом, отримані результати підтверджують потенційну ефективність досліджуваних препаратів як інгібіторів репродукції ВПГ-1 шляхом зменшення клітинної смерті та нормалізації клітинного циклу у клітинах Jurkat.

Під час аналізу експресії генів при герпетичній інфекції було виявлено, що фітопрепарат, а також зразки флавоноїдів апігенину і лютеоліну інгібували експресію гена глікопротеїну М (UL10), в той час як експресія генів тимідинкінази (UL23) та ДНК-полімерази (UL30) залишалася практично

незмінною, що свідчило про те, що досліджувані препарати не впливали на їхню експресію. Додаткове дослідження їх впливу на гени gL (для підтвердження специфічності інгібіції експресії UL10) та UL48 (активація транскрипції ранніх вірусних білків) підтвердило, що фітопрепарат специфічно інгібує ген UL10, який кодує глікопротеїн M, необхідний для реплікації вірусу в культурі клітин.

Результати дослідження взаємодії трьох потенційних мішеней SARS-CoV-2 з інгібіторами (кверцетин, лютеолін та апігенін) свідчать про їхню здатність ефективно взаємодіяти з важливими компонентами вірусу. Зокрема, інгібітори успішно утворюють комплекси з білково-нуклеїновим комплексом NSP16-NSP10-РНК, метил трансферазою, основною протеазою та РНК-залежною РНК полімеразою. Аналіз взаємодії показує, що інгібітори блокують активність ферментів вірусу шляхом зайняття важливих регуляторних кишень або блокування каталітичної діади. Це може призвести до зниження здатності вірусу розмножуватися та поширюватися. Гіпотеза про антивірусну дію досліджуваного фітопрепарату за відсутності токсичної дії підкріплюється результатами, що свідчать про схожий та ефективний вплив трьох інгібіторів на мішені вірусу.

Отримані результати дослідження впливу фітопрепарату на гени коронавірусу ТГС свідчать про здатність фітопрепарату у формі спиртового розчину інгібувати експресію генів ORF1a та ORF3b вірусу ТГС. Коронавірусні Nsps кодуються в ORF1a та в ORF3b генах. Після інфікування геномна РНК вивільняється з цитоплазми клітини і транслюється в два довгих поліпротеїна – pp1a і pp1ab, які аутопротеолітично розщеплюються двома вірусними протеазами Nsp3 і Nsp5 на менші субодиниці. Nsp2 – одна з таких субодиниць, які включають альфа- і бета-коронавіруси. Функції Nsp2 залишаються ще не зрозумілими, але виділення Nsp2 з геному SARS-CoV-2 призводить до зниження інфекційного титру коронавірусу. Скоріш за все, мішенню взаємодії фітопрепарату з вірусом ТГС і є пептид Nsp2, який кодується ORF1a.

Результати молекулярного докінгу флавоноїдних компонентів фітопрепарату до сайтів зв'язування гелікази папіломавірусу людини вказують

на потенційну можливість цих сполук впливати на активність вірусу. Зокрема, виявлено, що тетраметоксикверцетин демонструє змінений зразок зв'язування до гелікази папіломавірусу, що відрізняється від кверцетину та інших аналогів. Це вказує на те, що тетраметоксикверцетин може мати унікальну взаємодію з геліказою папіломавірусу, що може вплинути на його активність та можливості розмноження. Порівняно з аналогічними дослідженнями [128], важливо відзначити, що ці результати додатково підтверджують можливість використання флавоноїдів як потенційних антивірусних агентів.

Отримані результати щодо експресії Nrf2 в клітинах Jurkat під впливом інфікування коронавірусом ТГС та обробки фітопрепаратом (ФП) вказують на складний вплив вірусної інфекції та фітопрепарату на молекулярні механізми клітинної відповіді. Виявлене незначне зменшення експресії Nrf2 після інфікування коронавірусом ТГС може свідчити про можливе пригнічення вірусом ключового фактора транскрипції, який регулює природні захисні відповіді клітини. Цікавим є те, що обробка клітин фітопрепаратом, навпаки, призводить до збільшення експресії Nrf2. Це може свідчити про потенційну здатність фітопрепарату стимулювати вроджені захисні механізми в клітинах. Цей ефект може бути цінним в контексті зменшення запалення та підвищення клітинної відповіді на вірусну інфекцію. У другому експерименті інфікування клітин вірусом простого герпесу 1 типу (ВПГ-1) також призвело до зменшення експресії Nrf2. Це може вказувати на специфічний вплив герпесвірусу на молекулярні механізми клітинного відгуку, який може пригнічувати захисні шляхи вродженого імунітету. Проте, обробка клітин фітопрепаратом після інфікування ВПГ-1 показала збільшення експресії Nrf2 до рівня, порівнянного з нормальними клітинами. Це може вказувати на потенційну здатність фітопрепарату відновлювати або збільшувати рівень протизапальних та захисних відповідей в клітинах, що піддані вірусній інфекції. Порівнюючи ці результати з аналогічними дослідженнями інших вчених, слід зазначити, що вони отримали подібні зміни в експресії Nrf2 під впливом вірусних інфекцій та фітопродуктів. Дослідження [170] показують, що куркумін, активний компонент

куркуми, може активувати Nrf2, який в свою чергу може зменшувати вірусне навантаження та запалення, пов'язане з інфукуванням грипом. Деякі дослідження [171] вказують на те, що катехіни з зеленого чаю можуть активувати Nrf2, що може впливати на підвищення антиоксидантної захисної системи та зниження вірусної реплікації. Вивчення ефектів екстрактів з рослини меліси на Nrf2 у контексті інфекції вірусом герпесу може розкрити їхні антивірусні механізми дії, включаючи вплив на антиоксидантні шляхи та запобігання вірусній реплікації [172].

HER-2, відомий як рецептор для епідермального фактора росту 2 (HER-2/neu або Erbb2), є членом сімейства рецепторів епідермального фактора росту (EGFR). Цей білок грає ключову роль в регуляції проліферації, диференціації та може сприяти виживанню клітин, утримуючи їх у живому стані. Це може бути здійснено шляхом активації протизапальних або антивірусних шляхів, які допомагають клітинам відстоятися від стресу або пошкоджень. Ці процеси можуть бути взаємопов'язаними і можуть відбуватися одночасно або послідовно в залежності від контексту і умов. Крім того, цей процес може стимулювати інші клітинні механізми, такі як метастазування (поширення ракових клітин в організмі), ангіогенез (утворення нових судин кровообігу). Коли HER-2 активується, він сприяє подальшій передачі сигналу всередині клітини, що впливає на різноманітні біологічні процеси.

Активація HER-2 може відбуватися через різноманітні механізми, включаючи димеризацію з іншими членами сімейства ErbB, зокрема EGFR (HER-1). Після активації HER-2 спостерігається фосфорилювання тирозинових залишків в його внутрішньоклітинній домені. Це фосфорилювання активує різноманітні сигнальні шляхи, включаючи шляхи PI3K/AKT, RAS/MAPK та JAK/STAT, які впливають на клітинний цикл, міграцію, інвазію та апоптоз.

Результатом інфікування культури клітин Jurkat ВПГ-1 було збільшення рівня експресії ДНК HER-2, а обробка цих клітин фітопрепаратом призводила до зменшення рівня експресії ДНК HER-2. Це може призвести до затримки клітинного росту та проліферації, змін у процесах диференціації, а також до

зниження здатності клітин до виживання. Зменшення експресії ДНК HER-2 може свідчити про можливий потенційний антивірусний ефект фітопрепарату, який може бути пояснений тим, що зменшення рівня HER-2 може призводити до зниження можливостей вірусу використовувати клітинні механізми для свого розмноження та поширення.

Рівень мРНК HER-2 дозволяє встановити прямий вплив препаратів на транскрипцію гену HER-2 та з'ясувати молекулярні механізми їх дії. Інфікування клітин вірусом простого герпесу 1 типу не викликало змін у рівні мРНК HER-2, це може означати, що сам процес інфікування не впливав на транскрипцію гену HER-2. Зменшення рівня мРНК HER-2 після обробки клітин фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами може свідчити про те, що ці препарати мали здатність регулювати експресію гену HER-2 на рівні транскрипції. Цей ефект був особливо виражений у випадку фітопрепарату, що може вказувати на його високу ефективність у зниженні рівня мРНК HER-2. В аналогічних дослідженнях також спостерігали подібний ефект зменшення рівня мРНК HER-2 після обробки клітин різними речовинами. Наприклад, деякі дослідження [75, 76] показали, що інші природні сполуки, такі як поліфеноли зеленого чаю або екстракти з інших рослин, також можуть впливати на експресію гену HER-2. Вони демонструють подібний антипроліферацийний ефект та здатність знижувати рівень HER-2 в деяких клітинах. Такі спостереження підтверджують закономірність результатів і вказують на можливість використання різних природних речовин у регулюванні експресії гену HER-2.

# ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично узагальнено й представлено нові шляхи розв'язання наукової проблеми, що стосується виявлення противірусних властивостей флавоноїдвмісних фітопрепаратів та встановлення молекулярних механізмів противірусної дії. Результати наших досліджень дають можливість зробити наступні висновки.

**1.** Доведено виражені противірусні властивості флавоноїдвмісної фітокомпозиції на основі лікарських рослин *Filipendula vulgaris, Petroselinum crispum, Apium graveolens, Galium verum, Linaria vulgaris, Calendula officinalis* по відношенню до вірусів простого герпесу I та II типів, вірусу трансмісивного гастроентериту свиней, вірусу гепатиту С та папіломавірусу людини 18 типу в умовах *in vitro*: індекси селективності (SI) на відповідних вірусних моделях склали 178, 89, 110, 320, 31, відповідно. Показана висока терапевтична ефективність флавоноїдвмісного фітопрепарату на *in vivo* моделі генітального герпесу: за різних схем експериментального лікування індекси лікувальної дії (ІЛД) склали 41-54%, що є співставним із ефективністю ацикловіру (ІЛД = 56%). Встановлено, що противірусна активність фітопрепарату опосередкована біологічною активністю щонайменше флавоноїдів апігеніну, лютеоліну і кверцетину.

**2.** Доведено низку молекулярних механізмів противірусної дії флавоноїдвмісної фітокомпозиції. Показано, що фітопрепарат блокує синтез РНК в системі транскрипції РНКП Т7 *in vitro* та інгібує експресію гена GAPDH, що свідчить про його інгібуючий вплив на синтез ДНК. Встановлено інтерфероногенну активність фітопрепарату *in vivo* за рахунок індукції інтерферону-α: через 48 год після внутрішньочеревного введення фітопрепарату мишам у дозі 0,096 мг/кг титр інтерферону дещо перевищував відповідне значення для референтного препарату – поліінозинової-поліцитидилової кислоти. Виявлено зниження вмісту апоптотичних клітин та нормалізацію розподілу клітин за фазами клітинного циклу в результаті впливу фітопрепарату на клітини, інфіковані вірусом простого герпесу I типу.

**3.** Виявлено мішені взаємодії фітопрепарату з вірусами простого герпесу I типу, трансмісивного гастроентериту свиней та папіломавірусу людини. Показано, що ефективне інгібування репродукції вірусу простого герпесу I типу фітопрепаратом в культурі клітин, відбувається за рахунок специфічного інгібування гену UL10, який кодує глікопротеїн M, необхідний для реплікації даного вірусу. Показано ефективну взаємодію флавоноїдних компонентів фітопрепарату з трьома важливими потенційними мішенями коронавірусу SARS-CoV-2 методом молекулярного докінгу. Доведено, що фітопрепарат інгібує експресію генів ORF1a та ORF3b модельного коронавірусу - вірусу трансмісивного гастроентериту свиней. Встановлена взаємодія флавоноїдних компонентів фітопрепарату з димером E1-E2 геліказних білків папіломавірусу.

**4.** Визначено деякі молекулярні механізми впливу фітопрепарату на патогенез вірусних інфекцій, а саме: обробка фітопрепаратом клітин, що інфіковані ВПГ-1, призводить до збільшення рівня експресії транскрипційного фактору Nrf2 характерного для неінфікованих клітин Jurkat; обробка клітин фітопрепаратом та синтетичними флавоноїдами (кверцетин, ізорамнетин) приводила до зменшення рівня мРНК рецептора епідермального фактора росту HER-2, що вказує на потенційну ефективність цих сполук як інгібіторів експресії гену рецептора епідермального фактора росту HER-2 в клітинах Jurkat.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ


1. Nayak AK, Dhara AK. *Viral Infections and Antiviral Therapies*. Academic Press; 2022.
2. Clercq ED. *Advances in Antiviral Drug Design*, Volume 5. Elsevier Science; 2007.
3. Clercq ED. *Antiviral Agents*. Elsevier Science & Technology Books; 2013.
4. Scotti L, Ishiki H, Mendonca FJ та ін. Flavonoids as Multi-Target Compounds in Drug Discovery. *Mini Rev Org Chem*. 2017;14(4). doi:10.2174/1570193x14666170518112248
5. Peters JU. Polypharmacology – Foe or Friend? *J Med Chem*. 2013;56(22):8955-8971. doi:10.1021/jm400856t
6. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Food Chem. 2022 Jul 30;383:132531. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132531
7. 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
8. Badshah SL, Faisal S, Muhammad A, Poulson BG, Emwas AH, Jaremko M. Antiviral activities of flavonoids. *Biomed. Pharmacother*. 2021;140: 111596. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111596
9. Strasfeld L, Chou S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infect Dis Clin North Am*. 2010 Jun;24(2):413-37. doi: 10.1016/j.idc.2010.01.001
10. Chojnacka K, Skrzypczak D, Izydorczyk G, Mikuła K, Szopa D, Witek-Krowiak A. Antiviral Properties of Polyphenols from Plants. *Foods*. 2021 Sep 26;10(10):2277. doi: 10.3390/foods10102277
11. Ahmad A, Kaleem M, Ahmed Z, Shafiq H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Res Int*. 2015;77:221-235. doi:10.1016/j.foodres.2015.06.021

12. Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol.* 2003;95(3):412-427. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x
13. Ojo OO, Oluyege JO, Famurewa O. Antiviral properties of two Nigerian plants. *African Journal of Plant Science*. 2009; 3(7):157-159.
14. Liu AL, Du GH. Antiviral Properties of Phytochemicals. *Dietary Phytochemicals and Microbes.* 2012;93-126. Published 2012 Feb 18. doi:10.1007/978-94-007-3926-0_3
15. Ben-Shabat S, Yarmolinsky L, Porat D, Dahan A. Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. *Drug Deliv Transl Res*. 2020;10(2):354-367. doi:10.1007/s13346-019-00691-6
16. Ryu YB, Curtis-Long MJ, Kim JH, Jeong SH, Yang MS, Lee KW, Lee WS, Park KH. Pterocarpans and flavanones from Sophora flavescens displaying potent neuraminidase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Dec 1;18(23):6046-9. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.10.033
17. Ninfali P, Antonelli A, Magnani M, Scarpa ES. Antiviral Properties of Flavonoids and Delivery Strategies. *Nutrients*. 2020;12(9):2534. Published 2020 Aug 21. doi:10.3390/nu12092534
18. Dimeglio C, Mansuy JM, Charpentier S, Claudet I, Izopet J. Children are protected against SARS-CoV-2 infection. *J Clin Virol*. 2020;128:104451. doi:10.1016/j.jcv.2020.104451
19. Naithani R, Huma LC, Holland LE, Shukla D, McCormick DL, Mehta RG, Moriarty RM. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini Rev Med Chem*. 2008 Oct;8(11):1106-33. doi: 10.2174/138955708785909943
20. Russo M, Moccia S, Spagnuolo C, Tedesco I, Russo GL. Roles of flavonoids against coronavirus infection. *Chem Biol Interact*. 2020;328:109211. doi:10.1016/j.cbi.2020.109211
21. Yu R, Chen L, Lan R, Shen R, Li P. Computational screening of antagonists against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;56(2):106012. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106012

22. Fujimoto KJ, Nema D, Ninomiya M, Koketsu M, Sadanari H, Takemoto M, Daikoku T, Murayama T. An in silico-designed flavone derivative, 6-fluoro-4'-hydroxy-3',5'-dimetoxyflavone, has a greater anti-human cytomegalovirus effect than ganciclovir in infected cells. *Antiviral Res*. 2018 Jun;154:10-16. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.03.006
23. Tuli H, Sood S, Pundir A, Choudhary D, Dhama K, Kaur G, Seth P, Vashishth A, Kumar P. Molecular Docking studies of Apigenin, Kaempferol, and Quercetin as potential target against spike receptor protein of SARS COV. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences.* 2022;10(1):144-9. https://doi.org/10.18006/2022.10(1).144.149
24. Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, Joseph BV, Alessa FM, Al-Mssallem MQ. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules*. 2022;27(9):2901. Published 2022 May 2. doi:10.3390/molecules27092901
25. Boufissiou A, Abdalla M, Sharaf M, Al-Resayes SI, Imededdine K, Alam M, Yagi S, Azam M, Yousfi M. *In-silico* investigation of phenolic compounds from leaves of *Phillyrea angustifolia* L. as a potential inhibitor against the SARS-CoV-2 main protease ($M^{pro}$ PDB ID:5R83) using a virtual screening method. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2022 May;26(3):101473. doi: 10.1016/j.jscs.2022.101473
26. Farhat A, Ben Hlima H, Khemakhem B, Ben Halima Y, Michaud P, Abdelkafi S, Fendri I. Apigenin analogues as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: In-silico screening approach. *Bioengineered*. 2022 Feb;13(2):3350-3361. doi: 10.1080/21655979.2022.2027181
27. Wang L, Song J, Liu A, Xiao B, Li S, Wen Z, Lu Y, Du G. Research progress of the antiviral bioactivities of natural flavonoids. *Nat Prod Bioprospecting*. 2020;10(5):271-83. doi:10.1007/s13659-020-00257-x
28. Shahrajabian MH, Sun W, Cheng Q. The importance of flavonoids and phytochemicals of medicinal plants with antiviral activities. *Mini Rev Org Chem*. 2021;18. doi:10.2174/1570178618666210707161025

29. Döring K, Langeder J, Duwe S, Tahir A, Grienke U, Rollinger JM, Schmidtke M. Insights into the direct anti-influenza virus mode of action of Rhodiola rosea. *Phytomedicine*. 2022 Feb;96:153895. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153895
30. Yazawa K, Kurokawa M, Obuchi M, Li Y, Yamada R, Sadanari H, Matsubara K, Watanabe K, Koketsu M, Tuchida Y, Murayama T. Anti-influenza virus activity of tricin, 4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone. *Antivir Chem Chemother*. 2011 Aug 23;22(1):1-11. doi: 10.3851/IMP1782
31. Li WF, Wang X, Wang TH, Ding YL, Wang MX, Tao JL, Yuan B. Application Potential of Luteolin in the Treatment of Viral Pneumonia. *Journal of Food Biochemistry*. 2023;2023(4):1-20.
32. Yan H, Ma L, Wang H, Wu S, Huang H, Gu Z, Jiang J, Li Y. Luteolin decreases the yield of influenza A virus in vitro by interfering with the coat protein I complex expression. *J Nat Med*. 2019 Jun;73(3):487-496. doi: 10.1007/s11418-019-01287-7
33. Shorobi FM, Nisa FY, Saha S, Chowdhury MAH, Srisuphanunt M, Hossain KH, Rahman MA. Quercetin: A Functional Food-Flavonoid Incredibly Attenuates Emerging and Re-Emerging Viral Infections through Immunomodulatory Actions. *Molecules*. 2023 Jan 17;28(3):938. doi: 10.3390/molecules28030938
34. Saakre M, Mathew D, Ravisankar V. Perspectives on plant flavonoid quercetin-based drugs for novel SARS-CoV-2. *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*. 2021;10(1):21. doi: 10.1186/s43088-021-00107-w. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33782651; PMCID: PMC7989718.
35. Dehghani F, Sezavar Seyedi Jandaghi SH, Janani L, Sarebanhassanabadi M, Emamat H, Vafa M. Effects of quercetin supplementation on inflammatory factors and quality of life in post-myocardial infarction patients: A double blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Phytother Res*. 2021 Apr;35(4):2085-2098. doi: 10.1002/ptr.6955
36. Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, Yang J. Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*. 2015 Dec 25;8(1):6. doi: 10.3390/v8010006

37. Chang CC, You HL, Huang ST. Catechin inhibiting the H1N1 influenza virus associated with the regulation of autophagy. *J Chin Med Assoc*. 2020 Apr;83(4):386-393. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000289
38. Sun Y, Li C, Li Z, Shangguan A, Jiang J, Zeng W, Zhang S, He Q. Quercetin as an antiviral agent inhibits the Pseudorabies virus in vitro and in vivo. *Virus Res*. 2021 Nov;305:198556. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198556
39. Bachmetov L, Gal-Tanamy M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman-Galam T, Sathiyamoorthy P, Golan-Goldhirsh A, Benhar I, Tur-Kaspa R, Zemel R. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J Viral Hepat*. 2012 Feb;19(2):e81-8. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01507.x
40. Choi HJ, Kim JH, Lee CH, Ahn YJ, Song JH, Baek SH, Kwon DH. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Res*. 2009 Jan;81(1):77-81. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.10.002
41. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J*. 2015 May;204(2):134-43. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.02.017
42. Veckenstedt A, Pusztai R. Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice. *Antiviral Res*. 1981 Nov;1(4):249-61. doi: 10.1016/0166-3542(81)90015-2. PMID: 6176184.
43. Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, Wang Q, Nanua S, Hershenson MB, Sajjan US. Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo. *Antiviral Res*. 2012 Jun;94(3):258-71. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.03.005
44. Galochkina AV, Anikin VB, Babkin VA, Ostrouhova LA, Zarubaev VV. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from Larix sibirica, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis. *Arch Virol*. 2016 Apr;161(4):929-38. doi: 10.1007/s00705-016-2749-3
45. Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virol J*. 2011 Dec 28;8:560. doi: 10.1186/1743-422X-8-560

46. Qiu X, Kroeker A, He S, Kozak R, Audet J, Mbikay M, Chrétien M. Prophylactic Efficacy of Quercetin 3-β-O-d-Glucoside against Ebola Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Aug 22;60(9):5182-8. doi: 10.1128/AAC.00307-16
47. Zhang X, Chen S, Li X, Zhang L, Ren L. Flavonoids as Potential Antiviral Agents for Porcine Viruses. *Pharmaceutics*. 2022 Aug 26;14(9):1793. doi: 10.3390/pharmaceutics14091793
48. Owona VBA, Galani BRT, Moundipa PF. *In Silico* Identification of Apigenin and Narcissin (Food-Flavonoids) as Potential Targets Against SARS-CoV-2 Viral Proteins: Comparison with the Effect of Remdesivir. *J Clin Anesth Pain Manag*. 2021;5(1):214-223. DOI: 10.36959/377/356
49. Murali M, Nair B, Vishnu VR, Aneesh TP, Nath LR. 2,4-Dihydroxycinnamic acid as spike ACE2 inhibitor and apigenin as RdRp inhibitor in Nimbamritadi Panchatiktam Kashayam against COVID-19: an *in silico* and *in vitro* approach. *Mol Divers*. 2023 Oct;27(5):2353-2363. doi: 10.1007/s11030-022-10552-z
50. Khandelwal N, Chander Y, Kumar R, Riyesh T, Dedar RK, Kumar M, Gulati BR, Sharma S, Tripathi BN, Barua S, Kumar N. Antiviral activity of Apigenin against buffalopox: Novel mechanistic insights and drug-resistance considerations. *Antiviral Res*. 2020 Sep;181:104870. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104870
51. 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 Jul;167:78-82. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.008
52. Xu X, Miao J, Shao Q, Gao Y, Hong L. Apigenin suppresses influenza A virus-induced RIG-I activation and viral replication. *J Med Virol*. 2020 Dec;92(12):3057-3066. doi: 10.1002/jmv.26403
53. Abid R, Ghazanfar S, Farid A, Sulaman SM, Idrees M, Amen RA, Muzammal M, Shahzad MK, Mohamed MO, Khaled AA, et al. Pharmacological Properties of 4′, 5, 7-Trihydroxyflavone (Apigenin) and Its Impact on Cell Signaling Pathways. *Molecules*. 2022; 27(13):4304. https://doi.org/10.3390/molecules27134304

54. Qian S, Fan W, Qian P, Zhang D, Wei Y, Chen H, Li X. Apigenin restricts FMDV infection and inhibits viral IRES driven translational activity. *Viruses*. 2015 Mar 31;7(4):1613-26. doi: 10.3390/v7041613
55. Wu CC, Fang CY, Cheng YJ, Hsu HY, Chou SP, Huang SY, Tsai CH, Chen JY. Inhibition of Epstein-Barr virus reactivation by the flavonoid apigenin. *J Biomed Sci.* 2017 Jan 5;24(1):2. doi: 10.1186/s12929-016-0313-9
56. Mottaghipisheh J, Taghrir H, Boveiri Dehsheikh A, Zomorodian K, Irajie C, Mahmoodi Sourestani M, Iraji A. Linarin, a Glycosylated Flavonoid, with Potential Therapeutic Attributes: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals*. 2021; 14(11):1104. https://doi.org/10.3390/ph14111104
57. Chen Y, Zeng L, Yang J, Wang Y, Yao F, Wu Y, Wang D, Hu Y, Liu J. Anti-DHAV-1 reproduction and immuno-regulatory effects of a flavonoid prescription on duck virus hepatitis. *Pharm Biol*. 2017 Dec;55(1):1545-1552. doi: 10.1080/13880209.2017.1309554
58. Liang W, He L, Ning P, Lin J, Li H, Lin Z, Kang K, Zhang Y. (+)-Catechin inhibition of transmissible gastroenteritis coronavirus in swine testicular cells is involved its antioxidation. *Res Vet Sci*. 2015 Dec;103:28-33. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.09.009
59. Imanishi N, Tuji Y, Katada Y, Maruhashi M, Konosu S, Mantani N, Terasawa K, Ochiai H. Additional inhibitory effect of tea extract on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Microbiol Immunol*. 2002;46(7):491-4. doi: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02724.x
60. You HL, Huang CC, Chen CJ, Chang CC, Liao PL, Huang ST. Anti-pandemic influenza A (H1N1) virus potential of catechin and gallic acid. *J Chin Med Assoc.* 2018 May;81(5):458-468. doi: 10.1016/j.jcma.2017.11.007
61. Roschek B Jr, Fink RC, McMichael MD, Li D, Alberte RS. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry*. 2009 Jul;70(10):1255-61. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.06.003
62. Isaacs CE, Wen GY, Xu W, Jia JH, Rohan L, Corbo C, Di Maggio V, Jenkins EC Jr, Hillier S. Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes

simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Mar;52(3):962-70. doi: 10.1128/AAC.00825-07

63. Tao P. [The inhibitory effects of catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and DNA polymerases]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*. 1992 Oct;14(5):334-8. Chinese. PMID: 1284389
64. Wu YH. Naturally derived anti-hepatitis B virus agents and their mechanism of action. *World J Gastroenterol.* 2016 Jan 7;22(1):188-204. doi: 10.3748/wjg.v22.i1.188
65. He W, Li LX, Liao QJ, Liu CL, Chen XL. Epigallocatechin gallate inhibits HBV DNA synthesis in a viral replication - inducible cell line. *World J Gastroenterol*. 2011 Mar 21;17(11):1507-14. doi: 10.3748/wjg.v17.i11.1507
66. Carneiro BM, Batista MN, Braga ACS, Nogueira ML, Rahal P. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*. 2016 Sep;496:215-218. doi: 10.1016/j.virol.2016.06.012
67. Devi KP, Kiruthiga PV, Pandian SK. Emerging role of flavonoids in inhibition of NF-κB-mediated signaling pathway: A review. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci*. 2009; *3*(1), 31-45.
68. Rajaram P, Chandra P, Ticku S, Pallavi BK, Rudresh KB, Mansabdar P. Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. *Indian J Dent Res*. 2017 Nov-Dec;28(6):687-694. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_534_16
69. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2014 Mar 17;25(3):282-303. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.025
70. Cruz da Silva E, Dontenwill M, Choulier L, Lehmann M. Role of Integrins in Resistance to Therapies Targeting Growth Factor Receptors in Cancer. *Cancers.* 2019; 11(5):692. https://doi.org/10.3390/cancers11050692
71. Roskoski R Jr. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* 2014 Sep;87:42-59. doi: 10.1016/j.phrs.2014.06.001

72. Diao J, Pantua H, Ngu H, Komuves L, Diehl L, Schaefer G, Kapadia SB. Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. *J Virol*. 2012 Oct;86(20):10935-49. doi: 10.1128/JVI.00750-12
73. Li W, Xu C, Hao C, Zhang Y, Wang Z, Wang S, Wang W. Inhibition of herpes simplex virus by myricetin through targeting viral gD protein and cellular EGFR/PI3K/Akt pathway. *Antiviral Res*. 2020 May;177:104714. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104714
74. Liang Y, Zhang T, Zhang J. Natural tyrosine kinase inhibitors acting on the epidermal growth factor receptor: Their relevance for cancer therapy. *Pharmacol Res*. 2020 Nov;161:105164. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105164
75. Fridrich D, Teller N, Esselen M, Pahlke G, Marko D. Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Jul;52(7):815-22. doi: 10.1002/mnfr.200800026
76. Sepay N, Mondal R, Al-Muhanna MK, Saha D. Identification of natural flavonoids as novel EGFR inhibitors using DFT, molecular docking, and molecular dynamics. *New Journal of Chemistry*. 2022;46(20), 9735-9744.
77. Igloi Z, Kazlauskas A, Saksela K, Macdonald A, Mankouri J, Harris M. Hepatitis C virus NS5A protein blocks epidermal growth factor receptor degradation via a proline motif- dependent interaction. *J Gen Virol*. 2015 Aug;96(8):2133-2144. doi: 10.1099/vir.0.000145
78. Liu J, Zhang W, Jing H, Popovich DG. Bog bilberry (Vaccinium uliginosum L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability. *J Food Sci*. 2010 Apr;75(3):H103-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01546.x
79. Nagaya T, Okuyama S, Ogata F, Maruoka Y, Knapp DW, Karagiannis SN, Fazekas-Singer J, Choyke PL, LeBlanc AK, Jensen-Jarolim E, Kobayashi H. Near infrared photoimmunotherapy targeting bladder cancer with a canine anti-

epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody. *Oncotarget*. 2018 Apr 10;9(27):19026-19038. doi: 10.18632/oncotarget.24876

80. Lee LT, Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Nair MP, Kanadaswam C, Lee MT. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.* 2002 May-Jun;22(3):1615-27
81. Marín V, Burgos V, Pérez R, Maria DA, Pardi P, Paz C. The Potential Role of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in Breast Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2023 Jun 27;24(13):10737. doi: 10.3390/ijms241310737
82. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:9926-30. doi: 10.1073/pnas.91.21.9926
83. Gao W, Guo L, Yang Y, Wang Y, Xia S, Gong H, et al. Dissecting the crosstalk between Nrf2 and NF-κB response pathways in drug-induced toxicity. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9:809952. doi: 10.3389/fcell.2021.809952
84. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules*. 2020;25(22):5474. doi: 10.3390/molecules25225474
85. Battino M, Giampieri F, Pistollato F, Sureda A, de Oliveira MR, Pittalà V, et al. Nrf2 as regulator of innate immunity: A molecular Swiss army knife! *Biotechnol Adv*. 2018;36(2):358-70. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.012
86. Gomez JC, Dang H, Martin JR, Doerschuk CM. Nrf2 modulates host defense during Streptococcus pneumoniae pneumonia in mice. *J Immunol*. 2016;197(7):2864-79. doi: 10.4049/jimmunol.1600043
87. Herengt A, Thyrsted J, Holm CK. NRF2 in viral infection. *Antioxidants.* 2021;10(9):1491. doi: 10.3390/antiox10091491
88. Lee J, Koh K, Kim YE, Ahn JH, Kim S. Upregulation of Nrf2 expression by human cytomegalovirus infection protects host cells from oxidative stress. *J Gen Virol*. 2013;94:1658–68. doi: 10.1099/vir.0.052142-0

89. Liu B, Fang M, He Z, Cui D, Jia S, Lin X, et al. Hepatitis B virus stimulates G6PD expression through HBx-mediated Nrf2 activation. *Cell Death Dis*. 2015; 6:e1980. doi: 10.1038/cddis.2015.322
90. Ramezani A, Nahad MP, Faghihloo E. The role of Nrf2 transcription factor in viral infection. *J Cell Biochem*. 2018;119: 6366–82. doi: 10.1002/jcb.26897
91. Olagnier D, Brandtoft AM, Gunderstofte C, Villadsen NL, Krapp C, Thielke AL, et al. Nrf2 negatively regulates STING indicating a link between antiviral sensing and metabolic reprogramming. *Nat Commun*. 2018; 9:3506. doi: 10.1038/s41467-018-05861-7
92. Gunderstofte C, Iversen MB, Peri S, Thielke A, Balachandran S, Holm CK, Olagnier D. Nrf2 negatively regulates type I interferon responses and increases susceptibility to herpes genital infection in mice. *Front Immunol*. 2019;10:2101. doi: 10.3389/fimmu.2019.02101
93. Cho HY, Imani F, Miller-DeGraff L, Walters D, Melendi GA, Yamamoto M, et al. Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:138–50. doi: 10.1164/rccm.200804-535OC
94. Shoji M, Arakaki Y, Esumi T, Kohnomi S, Yamamoto C, Suzuki Y, et al. Bakuchiol is a phenolic isoprenoid with novel enantiomer-selective anti-influenza A virus activity involving Nrf2 activation. *J Biol Chem*. 2015; 290: 28001–17. doi: 10.1074/jbc.M115.669465
95. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1–20. doi: 10.1155/2019/9372182
96. Suraweera TL, Rupasinghe HPV, Dellaire G, Xu Z. Regulation of Nrf2/ARE pathway by dietary flavonoids: a friend or foe for cancer management? *Antioxidants*. 2020; 9(10):973. https://doi.org/10.3390/antiox9100973
97. Montenegro-Landívar MF, Tapia-Quirós P, Vecino X, Reig M, Valderrama C, Granados M, Cortina JL, Saurina J. Polyphenols and their potential role to fight

viral diseases: An overview. *Sci Total Environ*. 2021 Dec 20;801:149719. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149719

98. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656
99. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol*. 2015 Mar;89(3):289-317. doi: 10.1007/s00204-014-1448-7
100. Elena-Real CA, Díaz-Quintana A, González-Arzola K, Velázquez-Campoy A, Orzáez M, López-Rivas A, Gil-Caballero S, De la Rosa MÁ, Díaz-Moreno I. Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14-3-3ε-dependent Apaf-1 inhibition. *Cell Death Dis*. 2018 Mar 6;9(3):365. doi: 10.1038/s41419-018-0408-1
101. Volpe E, Sambucci M, Battistini L, Borsellino G. Fas-Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2016 Sep 27;7:382. doi: 10.3389/fimmu.2016.00382
102. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020 Feb;43(1):1-18. doi: 10.1007/s13402-019-00489-1
103. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Sep 21;5(1):209. doi: 10.1038/s41392-020-00312-6
104. Cheung CHA, Chang YC, Lin TY, Cheng SM, Leung E. Anti-apoptotic proteins in the autophagic world: an update on functions of XIAP, Survivin, and BRUCE. *J Biomed Sci*. 2020 Feb 5;27(1):31. doi: 10.1186/s12929-020-0627-5
105. Guo H, Koehler HS, Dix RD, Mocarski ES. Programmed Cell Death-Dependent Host Defense in Ocular Herpes Simplex Virus Infection. *Front Microbiol*. 2022 Apr 8;13:869064. doi: 10.3389/fmicb.2022.869064

106. Muscolino E, Castiglioni C, Brixel R, Frascaroli G, Brune W. Species-Specific Inhibition of Necroptosis by HCMV UL36. *Viruses*. 2021; 13(11):2134. https://doi.org/10.3390/v13112134
107. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, Yu M, Lin J, Cui Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(6):1960. https://doi.org/10.3390/ijms21061960
108. Lai L, Shin GY, Qiu H. The Role of Cell Cycle Regulators in Cell Survival—Dual Functions of Cyclin-Dependent Kinase 20 and $p21^{Cip1/Waf1}$. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(22):8504. https://doi.org/10.3390/ijms21228504
109. Suzich JB, Cliffe AR. Strength in diversity: Understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation. *Virology*. 2018 Sep;522:81-91. doi: 10.1016/j.virol.2018.07.011
110. Zhou L, Ng DS, Yam JC, Chen LJ, Tham CC, Pang CP, Chu WK. Post-translational modifications on the retinoblastoma protein. *J Biomed Sci*. 2022 Jun 1;29(1):33. doi: 10.1186/s12929-022-00818-x
111. Łukasik P, Załuski M, Gutowska I. Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development–Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(6):2935. https://doi.org/10.3390/ijms22062935
112. Li X, Zhang Z, Wang Z, Gutiérrez-Castrellón P, Shi H. Cell deaths: Involvement in the pathogenesis and intervention therapy of COVID-19. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Jun 13;7(1):186. doi: 10.1038/s41392-022-01043-6
113. Šudomová M, Berchová-Bímová K, Mazurakova A, Šamec D, Kubatka P, Hassan STS. Flavonoids Target Human Herpesviruses That Infect the Nervous System: Mechanisms of Action and Therapeutic Insights. *Viruses*. 2022; 14(3):592. https://doi.org/10.3390/v14030592
114. Zhao X, Chen Y, Zhang W, Zhang H, Hu Y, Yang F, Zhang Y, Song X. Dihydromyricetin Inhibits Pseudorabies Virus Multiplication In Vitro by

Regulating NF-κB Signaling Pathway and Apoptosis. *Veterinary Sciences*. 2023; 10(2):111. https://doi.org/10.3390/vetsci10020111

115. Alvarez De Lauro AE, Pelaez MA, Marquez AB, Wagner MS, Scolaro LA, García CC, Damonte EB, Sepúlveda CS. Effects of the Natural Flavonoid Quercetin on Arenavirus Junín Infection. *Viruses*. 2023; 15(8):1741. https://doi.org/10.3390/v15081741
116. Про захист тварин від жорстокого поводження, Закон України № 3447-IV [Інтернет], 21 лют. 2006 (Україна). https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text
117. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Інтернет]. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011. https://doi.org/10.17226/12910
118. Adams RL. Cell culture for biochemists (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology). 2-ге вид. Amsterdam. New York. Oxford: Elsevier Science & Technology; 1990. 364 с.
119. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. 6-те вид. Hoboken, N.J: Wiley-Blackwell; 2010. 732 с.
120. Дзюблик ІВ, Трохименко ОП, Соловйов СО. Культура клітин у медичній вірусології. Київ; 2015. 144 с.
121. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
122. Щербінська АМ, Дяченко НС, Рибалко СЛ, Носач ЛМ. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Київ: Авіцена; 2001. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів; с. 371-95.
123. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiology*. 1938;27(3):493-7. Доступно на: https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
124. Мареннікова СС, Мацевич ГР, Чекунова ЕВ. Розробка та практичне використання нових експериментальних моделей різних форм герпетичної інфекції. *Питання вірусології*. 1986; 1: 59-65.

125. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. Rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991 p. Jun 3;139(2):271-9. doi: 10.1016/0022-1759(91)90198-o
126. Ho M, Enders JF. An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures. *Proc National Acad Sci*. 1 берез. 1959;45(3):385-9. https://doi.org/10.1073/pnas.45.3.385
127. Piestrzeniewicz M, Studzian K, Wilmańska D, Płucienniczak G, Gniazdowski M. Effect of DNA-interacting drugs on phage T7 RNA polymerase. *Acta Biochim Pol*. 31 берез. 1998;45(1):127-32. https://doi.org/10.18388/abp.1998_4295
128. Palchykovska LG, Vasylchenko OV, Platonov MO, Starosyla DB, Porva JI, Rymar SJ, Atamaniuk VP, Samijlenko SP, Rybalko SL. Antiviral properties of herbal flavonoids – inhibitors of the DNA and RNA synthesis. *Biopolym Cell*. 20 берез. 2013;29(2):150-6. https://doi.org/10.7124/bc.000813
129. Sirover MA. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Aug;1810(8):741-51. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.010
130. Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*. 2011 Feb;23(2):317-23. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.08.003
131. Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Aug;39(8):674-9. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x
132. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One*. 2015 Nov 10;10(11):e0141853. doi: 10.1371/journal.pone.0141853
133. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian

genotype) and B. canis DNA in canine blood samples. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4172-7. doi: 10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003

134. Costa SC, de Souza Freitas J, Carvalho FS, Pereira MJ, Cordeiro MD, da Fonseca AH, Gomes Jusi MM, Machado RZ, Munhoz AD. Frequency and factors associated of potential zoonotic pathogens (Borrelia spp., Rickettsia spp., Leishmania spp., and Anaplasma phagocytophilum) in equids in the state of Bahia, Brazil. *Parasites Amp Vectors*. 22 трав. 2021;14(1). Доступно на: https://doi.org/10.1186/s13071-021-04777-4
135. National Center for Biotechnology Information [Інтернет]. Home - Nucleotide - NCBI. Доступно на: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/
136. Generi Biotech [Інтернет]. Generi Biotech - Biotechnological company. Доступно на: http://www.generi-biotech.com/
137. Warren GL, Andrews CW, Capelli AM, et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J Med Chem.* 2006 Oct 5;49(20):5912-31. doi: 10.1021/jm050362n
138. McMartin C, Bohacek RS. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J Comput Aided Mol Des*. 1997 Jul;11(4):333-44. doi: 10.1023/a:1007907728892
139. Sudakov OO, Balinskyi OM, Platonov MO, Kovalskyy DB. Geometric filters for protein–ligand complexes based on phenomenological molecular models. *Biopolymers and Cell*. 20 верес. 2013;29(5):418-23. Доступно на: https://doi.org/10.7124/bc.000833
140. Yin W, Mao C, Luan X, et al. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. *Science*. 2020;368(6498):1499-1504. doi:10.1126/science.abc1560
141. Rosas-Lemus M, Minasov G, Shuvalova L, et al. High-resolution structures of the SARS-CoV-2 2'-*O*-methyltransferase reveal strategies for structure-based inhibitor design. *Sci Signal*. 2020;13(651):eabe1202. Published 2020 Sep 29. doi:10.1126/scisignal.abe1202

142. Su HX, Yao S, Zhao WF, et al. Anti-SARS-CoV-2 activities in vitro of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(9):1167-1177. doi:10.1038/s41401-020-0483-6
143. Abbate EA, Berger JM, Botchan MR. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev*. 2004;18(16):1981-1996. doi:10.1101/gad.1220104
144. Auster AS, Joshua-Tor L. The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J Biol Chem*. 2004;279(5):3733-3742. doi:10.1074/jbc.M311681200
145. Kim SS, Tam JK, Wang AF, Hegde RS. The structural basis of DNA target discrimination by papillomavirus E2 proteins. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31245-31254. doi:10.1074/jbc.M004541200
146. Лапач СН, Губенко АВ, Бабич ПН. Статистичні методи у медико-біологічних дослідженнях з використанням Excel. Київ:Моріон; 2001.
147. Toned A, Joubert A, Cromarty D. Limitation of the 3-(4,5-dimethylthizol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*. 2015;8(47):1-10.
148. De Logu A, Palchykovska LH, Kostina VH, Sanna A, Meleddu R, Chisu L, Alexeeva IV, Shved AD. Novel N-aryl- and N-heteryl phenazine-1-carboxamides as potential agents for the treatment of infections sustained by drug-resistant and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents*. Берез. 2009;33(3):223-9. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.016
149. Hansen JL, Long AM, Schultz SC. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure*. 1997 Aug 15;5(8):1109-22. doi: 10.1016/s0969-2126(97)00261-x
150. Delarue M, Poch O, Tordo N, Moras D, Argos P. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*. 1990 May;3(6):461-7. doi: 10.1093/protein/3.6.461
151. Tunitskaya VL, Kochetkov SN. Structural-functional analysis of bacteriophage T7 RNA polymerase. *Biochemistry (Mosc)*. 2002 Oct;67(10):1124-35. doi: 10.1023/a:1020911223250

152. Palchykovska LG, Vasylchenko OV, Platonov MO, Kostina VG, Babkina MM, Tarasov OA, Starosyla DB, Samijlenko SP, Rybalko SL, Deriabin OM, Hovorun DM. Evaluation of antibacterial and antiviral activity of N-arylamides of 9-methyl and 9-methoxyphenazine-1-carboxylic acids – inhibitors of the phage T7 model transctiption. *Biopolym Cell*. 20 листоп. 2012;28(6):477-85. https://doi.org/10.7124/bc.00013a
153. Liesveld JL, Abboud CN, Lu C, McNair C, Menon A, Smith A, Rosell K, Rapoport AP. Flavonoid effects on normal and leukemic cells. *Leuk Res*. 2003 Jun;27(6):517-27. doi: 10.1016/s0145-2126(02)00265-5
154. Faderl S, Estrov Z. Commentary: effect of flavonoids on normal and leukemic cells. *Leuk Res*. 2003;27(6):471-473. doi:10.1016/s0145-2126(02)00276-x
155. De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(4):307-320. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.10.010
156. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(7):838-849. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001
157. Sosa HM, Sosa YJ, Phansalkar S, Stieglitz KA. Structural Analysis of Flavonoid/Drug Target Complexes: Natural Products as Lead Compounds for Drug Development. *Nat Prod Chem Amp Res*. 2017;05(02). Доступно на: https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000254
158. Грищенко ОВ, Бобрицька ВВ. Фітоселективна терапія - метод вибору лікування мастопатії у поєднанні з передменструальним синдромом. *Репродуктивна ендокринологія*. 2020;5(55):79-89. Доступно на: https://doi.org/10.18370/2309-4117.2020.55.79-89
159. Тарасенко ЛВ, Сініцин ПВ, Полякова ЛІ, Лимарєва АА, Галкін ОЮ, Гавриленко ДМ, Боброва ТЮ, Резніков ОГ. Дослідження антиестрогенної активності фітопрепарату Тазалок. *Фармакологія та лікар. токсикологія*. 2011;6:30-4.

160. Demir S, Atayoglu AT, Galeotti F, Garzarella EU, Zaccaria V, Volpi N, Karagoz A, Sahin F. Antiviral activity of different extracts of standardized propolis preparations against HSV. *Antivir Ther*. 2020;25(7):353-363. doi: 10.3851/IMP3383
161. Mattana CM, Cangiano MA, Alcaráz LE, Sosa A, Escobar F, Sabini C, Sabini L, Laciar AL. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of Acacia aroma leaf extracts. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:380850. doi: 10.1155/2014/380850
162. Wagstaff AJ, Faulds D, Goa KL. Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1994;47(1):153-205. doi:10.2165/00003495-199447010-00009
163. Xie Y, Guo X, Hu T, Wei D, Ma X, Wu J, Huang B, Shen J. Significant Inhibition of Porcine Epidemic Diarrhea Virus In Vitro by Remdesivir, Its Parent Nucleoside and β-D-$N^4$-hydroxycytidine. *Virol Sin*. 2021 Oct;36(5):997-1005. doi: 10.1007/s12250-021-00362-2
164. Nguyen TT, Woo HJ, Kang HK, Nguyen VD, Kim YM, Kim DW, Ahn SA, Xia Y, Kim D. Flavonoid-mediated inhibition of SARS coronavirus 3C-like protease expressed in Pichia pastoris. *Biotechnol Lett*. 2012 May;34(5):831-8. doi: 10.1007/s10529-011-0845-8
165. Theisen LL, Erdelmeier CA, Spoden GA, Boukhallouk F, Sausy A, Florin L, Muller CP. Tannins from Hamamelis virginiana bark extract: characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. *PLoS One*. 2014 Jan 31;9(1):e88062
166. Musarra-Pizzo M, Pennisi R, Ben-Amor I, Smeriglio A, Mandalari G, Sciortino MT. *In Vitro* Anti-HSV-1 Activity of Polyphenol-Rich Extracts and Pure Polyphenol Compounds Derived from Pistachios Kernels (*Pistacia vera L.*). *Plants* (Basel). 2020;9(2):267. doi:10.3390/plants9020267
167. Karimi A, Mohammadi-Kamalabadi M, Rafieian-Kopaei M, Amjad L, Salimzadeh L. Determination of antioxidant activity, phenolic contents and antiviral potential of methanol extract of Euphorbia spinidens Bornm

(Euphorbiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2016; 15 (4): 759-764. DOI: 10.4314/tjpr.v15i4.13

168. Peraza-Labrador A, Buitrago DM, Coy-Barrera E, Perdomo-Lara SJ. Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects of a Phenolic-Rich Extract from *Lycium barbarum* Fruits on Human Papillomavirus (HPV) 16-Positive Head Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2022; 27(11):3568. https://doi.org/10.3390/molecules27113568
169. Рибалко СЛ, Старосила ДБ, Завелевич МП. Сучасний стан хіміотерапії та профілактики грипу та ГРВІ в України. *Український медичний часопис*. 2018;1(123):1-4. DOI: 10.32471/umj.1680-3051.123.120916
170. Percaccio E, De Angelis M, Acquaviva A, Nicotra G, Ferrante C, Mazzanti G, Di Giacomo S, Nencioni L, Di Sotto A. ECHOPvir: A Mixture of Echinacea and Hop Extracts Endowed with Cytoprotective, Immunomodulatory and Antiviral Properties. *Nutrients*. 2023; 15(20):4380. https://doi.org/10.3390/nu15204380
171. Galicia-Moreno M, Lucano-Landeros S, Monroy-Ramirez HC, Silva-Gomez J, Gutierrez-Cuevas J, Santos A, Armendariz-Borunda J. Roles of Nrf2 in Liver Diseases: Molecular, Pharmacological, and Epigenetic Aspects. *Antioxidants*. 2020; 9(10):980. https://doi.org/10.3390/antiox9100980
172. Behzadi A, Imani S, Deravi N, Mohammad Taheri Z, Mohammadian F, Moraveji Z, Shavysi S, Mostafaloo M, Soleimani Hadidi F, Nanbakhsh S, Olangian-Tehrani S. Antiviral Potential of Melissa officinalis L.: A Literature Review. *Nutr Metab Insights*. 2023 Jan 12;16:11786388221146683. doi: 10.1177/11786388221146683

**ДОДАТОК А**

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**
Проректор з навчальної роботи
Національного технічного університету
України «Київський політехнічний
інститут імені Ігоря Сікорського»

Анатолій МЕЛЬНИЧЕНКО
«03» 03 2024 р.

**ДОВІДКА ПРО ВИКОРИСТАННЯ**

результатів дисертаційної роботи Архипової Марини Андріївни
«Вивчення молекулярних механізмів противірусної активності флавоноїдів»
в освітньому процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії
Національного технічного університету України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Ми, ті що нижче підписалися, комісія у складі: завідувач кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.т.н., доц. Бесараб О.Б., доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.б.н, с.н.с. Беспалова О.Я., доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.т.н, Луценко Т.М., склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Архипової Марини Андріївни «Вивчення молекулярних механізмів противірусної активності флавоноїдів» на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія у навчальному процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії, а саме: результати роботи враховано при розроблені навчальних програм (силабусів) та впроваджено з 2023/24 н.р. у викладання дисциплін «Основи медичної хімії та біофармації» (бакалаврський рівень вищої освіти) та «Біомолекулярна інженерія» (магістерський рівень вищої освіти) для здобувачів спеціальності 163 Біомедична інженерія.

Зав. каф. ТМБ, к.т.н., доц. Олександр БЕСАРАБ

Доц. каф. ТМБ, к.б.н., с.н.с. Олена БЕСПАЛОВА

Доц. каф. ТМБ, к.т.н., Тетяна ЛУЦЕНКО

**ДОДАТОК Б**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Заст. директора з наукової
роботи ДУ «ІЕІХ НАМНУ»

д.м.н._____М.Г. Люльчук

«29» 02 2024р.

**АКТ**
**впровадження науково-методичної розробки**

**Об'єкт впровадження:** впровадження нового методу молекулярно-генетичної індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней у наукових дослідженнях

**Джерело науково-технічної інформації:** Матеріали дисертаційного дослідження Архипової М.А. "Вивчення молекулярних механізмів противірусної активності флавоноїдів", які опубліковано у наступних виданнях:

1) Galkin A, Arkhypova M, Starosyla D, Deriabin O, Vasylchenko O, Rybalko S, Golembiovska, O. Antiviral activity of original flavonoids-containing phytopreparation against human alphaherpesvirus 2, hepatitis C surrogate virus and transmissible gastroenteritis coronavirus. Farmacia. 2023 Oct 26;71(5):991–1000.

2) Arkhypova M, Deriabin O, Trokhymchuk T, Starosyla D, Atamaniuk V, Zavelevich M, Vialykh Z, Rybalko S, Galkin A. The Influence of Flavonoid Compositions on Nrf2 Transcription Factor Expression in Case of Infections Triggered by Influenza A Virus and Transmissible Gastroenteritis Coronavirus. Innov Biosyst Bioeng. 2023Dec.15;7(4):48-56.

3) Дерябін О, Рибалко С, Деревянко С, Архипова М, Головко А. Розробка засобів молекулярно-генетичної індикації коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней. у: Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування; 27 квіт.-28 черв. 2023; Харків, Україна. Харків: ДБТУ; 2023. с. 82-5.

**Ким запропоновано, адреса, виконавці:** Лабораторія експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України", вул. М. Амосова, 5, Київ, Україна.
Дерябін О.М., Архипова М.А., Рибалко С.Л., Трохимчук Т.Ю.

**Де і коли впроваджено:** ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України"

Термін впровадження 2023-2024 рр
Ефективність впровадження: 100%
Зауваження, пропозиції: відсутні

**Відповідальний за впровадження:**
Завідувач ЛЕХВІ ДУ «ІЕІХ ім. Л.В. Громашевського»
д.м.н., проф.
С.Л. Рибалко