

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол №_____засідання кафедри

від “___”_____2023 р.

**ВПЛИВ РЯДУ СПОЛУК ПОХІДНИХ ІЗОФЛАВОНОЇДІВ НА
ПОКАЗНИКИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ АНТИВІРУСНОЇ
РЕЗИСТЕНТНОСТІ IN VITRO**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Дубової Ірини Василівни

Науковий керівник від кафедри
Доцент, к.б.н., О.М. Андрійчук

Робота виконана в Інституті мікробіології та вірусології імені
Д.К.Заболотного НАН України під керівництвом с.н.с. відділу проблем
інтерферону і імуномодуляторів, старшого дослідника, к.б.н., Н.М. Жолобак

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

NF-κB	–	клітинний транскрипційний фактор
HSV-1	–	вірус простого герпесу
АФК	–	активні форми кисню
ІФН	–	інтерферон
РТК	–	протеїн-тирозинкіназа
VVC	–	вірус везикулярного стоматиту
DI	–	дефектна інтерферуюча частинка

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	2
Вступ.....	5
РОЗДІЛ 1	7
1.1 Загальна характеристика ізофлавоноїдів	7
1.1.1. Історія відкриття флавоноїдів.....	7
1.1.2 Будова та класифікація флавоноїдів.....	8
1.1.3. Ізофлавоноїди та їх біологічні властивості	10
1.1.4. Флавоноїди в медицині	11
1.1.5. Антивірусні властивості ізофлавоноїдів	13
1.2. Неспецифічна антивірусна імунна відповідь.....	16
1.2.1. Роль інтерферону в неспецифічній антивірусній відповіді	18
1.3 Вірус везикулярного стоматиту.....	20
1.3.1. Репродукція вірусу везикулярного стоматиту	20
РОЗДІЛ 2	22
2.1. Матеріали та обладнання, використані у роботі	22
2.2 Методи, які використано при проведенні дослідження	22
2.3. Підготовка культури клітин до експерименту.....	23
2.4 Пасажування вірусу	24
2.5. Титрування ізофлавоноїдів та DMSO	25
2.6. Приготування розчину референс препарату інтерферону-α.....	26
2.7. Обробка клітин розчинами ізофлавоноїдів.....	26
2.8. Визначення наявності антивірусної активності у кондиціонованому клітинами МА-104 середовищі через 24 год після контакту з досліджуваними сполуками.....	27
2.9. Безпека при роботі з вірусним матеріалом	28

	4
2.10. Інфікування клітин ВВС	28
2.11. МТТ-тест.....	29
2.12. Тест з кристалічним фіолетовим	29
2.13. Визначення антивірусної активності.....	30
2.14. Статистична обробка отриманих результатів.....	31
РОЗДІЛ 3	33
3.1. Візуальна оцінка стану клітин	33
3.2. Показники метаболічної активації клітин МА-104 за умови їх 24 год контакту з рядом сполук ізофлавоноїдів	33
3.3. Антивірусні властивості ізофлавоноїдів	47
3.4. Інтерферон-індукуюча активність сполук ізофлавоноїдного ряду.	49
3.5. Обговорення результатів	52
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	57

Вступ

В останні роки багато уваги приділяється пошуку нових підходів до лікування вірусних інфекцій людини. Одним з потенційно ефективних підходів є використання природних рослинних сполук - ізофлавоноїдів. Актуальність досліджень ізофлавоноїдів у сфері медицини ще більш зросла в умовах пандемії COVID-19, коли світова спільнота шукає нові способи боротьби з цією небезпечною хворобою.

Ізофлавоноїди - це клас природних рослинних сполук, які містяться в сої, чорному агрусі, червоній чорниці та інших рослинах. В дієтичних або інших рослинних джерелах виявлено понад 5000 різних природних флавоноїдів. Вважають, що саме їх присутність у рослинних лікарських засобах, що застосовуються в народній медицині, забезпечує користь від їх прийому. Ці сполуки відомі своїми антиоксидантними, протизапальними та противірусними властивостями.

Ізофлавонони та споріднені до них флавоноїдні сполуки виявляють антивірусні властивості *in vitro* та *in vivo* проти широкого спектру патогенних вірусів. Вони можуть впливати на різні етапи життєвого циклу вірусів, від прикріплення до клітин до реплікації вірусної РНК. Внаслідок цього, ізофлавоноїди можуть мати потенційну користь у боротьбі з вірусними інфекціями.

В умовах сучасного світу, пандемій дуже важливим не тільки виготовлення вакцин, а й пошук ліків. Саме тому в рамках цих умов пошук речовин природнього походження які мають антивірусні властивості є першочерговим завданням.

Метою нашої роботи було провести скринінгові дослідження в ряду хімічно синтезованих аналогів природніх сполук ізофлавоноїдів для виявлення антивірусних властивостей в системі *in vitro* за профілактичною схемою та перевірити їхній вплив на показники антивірусної резистентності.

В нашій роботі ми використовували хімічно синтезовані аналоги речовин природнього походження задля стандартизації отриманих результатів.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика ізофлавоноїдів

1.1.1. Історія відкриття флавоноїдів

Флавоноїди є групою біологічно активних сполук фенольної природи із загальною формулою C₆-C₃-C₆. Їхня назва походить від лат. *flavus* – жовтий, оскільки перші виділені флавоноїди мали жовте забарвлення.

Флавоноїди відомі як рослинні пігменти більше двох століть. Історія вивчення флавоноїдів розпочалася у 1814 році, коли Шевроле виділив з кори дуба кристалічну речовину – кверцетин. У 1854 р. Ріганд встановив глікозидну природу цієї речовини, назвавши його аглікон кверцитрином. Однак інтерес до флавоноїдів суттєво зріс після того, як угорський біохімік Сент-Дерді в 1936 році виявив, що флавоноїди, виділені зі шкірки лимона, можуть сприяти зміцненню ламких стінок кровоносних судин. Він припустив, що ця сполука належить до вітамінів, і запропонував йому назву «вітамін Р». Назву «вітамін Р» до 1950-х років використовували для позначення ряду флавоноїдів, пізніше було запропоновано назву – біофлавоноїди [1].

Додатковим поштовхом до вивчення флавоноїдів стало відкриття французького парадоксу на основі спостережень за жителями середземноморських країн. Парадокс був сформульований французькими епідеміологами у 80-х роках минулого століття та полягає в тому, що, вживаючи багато жирної та смаженої їжі, що є фактором ризику раннього розвитку атеросклерозу, ця популяція має дуже малий відсоток захворюваності та смертності від серцево-судинних захворювань. Вважається, що саме флавоноїди, що містяться у червоному вині (ресвератрол, наприклад), яке вони досить регулярно споживають, забезпечують такий захист жителям узбережжя Середземного моря [2].

Нова хвиля інтересу до флавоноїдів почалася в 1990-х роках, що було пов'язано з відкриттям антиоксидантних властивостей флавоноїдів та їх здатності нейтралізувати вільні радикали [3].

1.1.2 Будова та класифікація флавоноїдів

Серед флавоноїдів є як водорозчинні, так і ліпофільні сполуки, забарвлені переважно в жовтий, оранжевий і червоний колір. Деякі класи флавоноїдів – антоціани і аурони – це рослинні пігменти, що визначають забарвлення квіток і плодів рослин. Відомо понад 8 000 флавоноїдів.

Молекула флавоноїда складається з двох фенільних залишків (кільця А та В), з'єднаних між собою пірановою або пірольною гетероциклічною групою (кільце С). Ці кільця можна розглядати як похідні фенілпропаноїдів [4]. Флавоноїди мають різне положення фенольних радикалів у пропановому фрагменті. Залежно від положення фенольного радикала В флавоноїди ділять на три основні підгрупи:

I підгрупа — власне флавоноїди, або справжні флавоноїди, або еуфлавоноїди,

II підгрупа — ізофлавоноїди,

III підгрупа — неофлавоноїди.

Справжні флавоноїди мають фенільний радикал біля С₂. Це найпоширеніша група. За ступенем окислення пропанового фрагмента і розміром гетероциклу справжні флавоноїди також поділяють на 10 класів.

Ізофлавоноїди мають фенольний радикал біля С₃. Класифікація ізофлавоноїдів ґрунтується на ступені окислення пропанового фрагмента та природі гетероциклу.

Неофлавоноїди мають фенольний радикал біля С₄. Серед неофлавоноїдів виділяють такі підкласи: флавани, флавони, халкони. В результаті заміщення позиції С-4 замість γ -пірону в групі виникають сполуки з гетероциклом α -пірону.

Залежно від наявності або відсутності карбоксильної групи С4, подвійного зв'язку С2-С3, кількості та положення гідроксильних груп, флавоноїди ділять на підкласи [5].

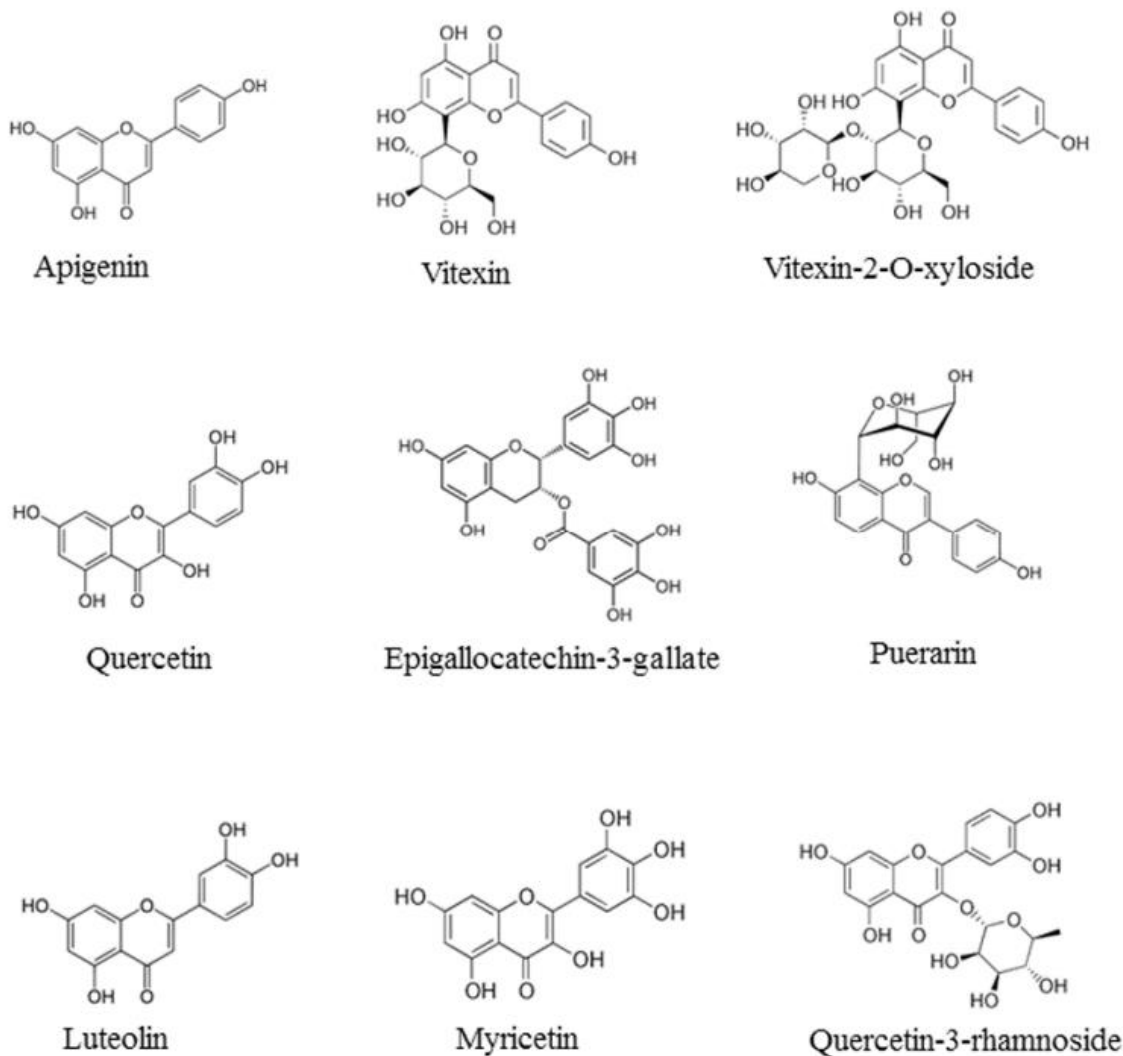


Рис.1.1 Будова деяких флавоноїдів [5]

Флавоноїди рідко зустрічаються у вільному стані. Більшість із них перебувають у формі глікозидів. Вуглеводні залишки представлені D-глюкозою, D-галактозою, D-ксилозою, L-рамнозою, L-арабінозою, D-глюкуроною та D-галактуроною кислотами, тощо.

Більшість флавоноїдних глікозидів є O-глікозидами. Зустрічаються також C- та C-O-глікозиди. Залежно кількості і розміщення вуглеводних

залишків у молекулі розрізняють монозиди, біозиди, тріозиди, диглікозиди та інші.

1.1.3. Ізофлавоноїди та їх біологічні властивості

Найбільш багаті на флавоноїди рослини родин бобових, гречаних, айстрових та розових (трояндових, *Rosaceae*). Флавоноїди накопичуються переважно в квітках, листках, менше – у стеблах, кореневищах, коренях. Їх вміст коливається від 0,1% до 20% (наприклад, у бруньках *Sophora japonica*) і змінюється залежно від фази вегетації рослин. Ізофлавоноїди переважно накопичуються в підземних органах і насінні. Серед флавоноїдів саме клас ізофлавоноїдів багатий на сполуки, які виявляють суттєву біологічну активність. Ізофлавоноїди діляться на прості та конденсовані. До простих ізофлавоноїдів відносяться ізофлавани, ізофлаволи, ізофлаволини, ізохалкони; до конденсованих – куместани, птерокарпани, ротеноїди та інші.

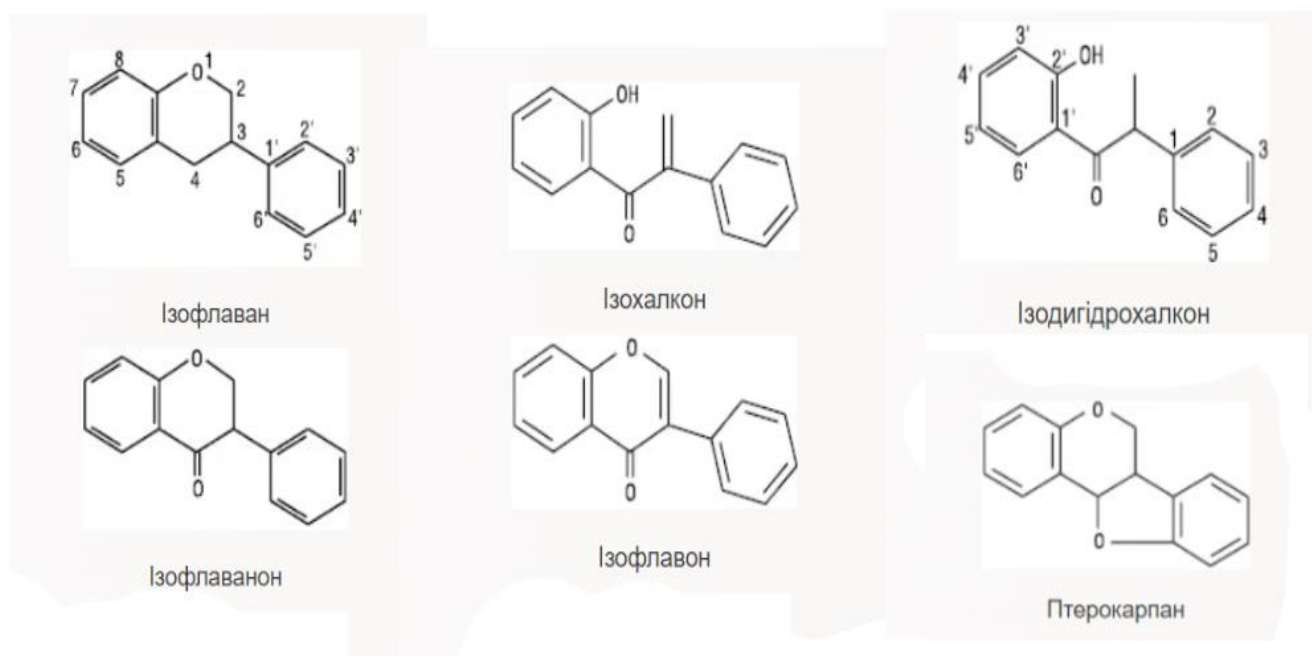


Рис.1.2. Будова деяких ізофлавоноїдів [6]

Ізофлавіони також відомі своїми протизапальними, антиоксидантними властивостями на рівні клітин, залучаючи ряд рецепторів і сигнальних шляхів, включаючи інгібування активації NF-κB та індукованих ферментів синтази оксиду азоту, що й зумовлює реалізацію їх антивірусних властивостей.

Деякі ізофлавіони мають незначну естрогенну дію, можуть зв'язуватися з клітинними естрогеновими рецепторами і нормалізувати гормональний баланс організму. Відомо про сприятливий вплив ізофлавіонових фітоестрогенів на репродуктивну функцію людини, зниження рівня холестерину в крові [7, 8].

Фітоестрогени – це природні нестероїдні фенольні рослинні сполуки, які за своєю молекулярною структурою та розміром нагадують естрогени хребетних. Їх можна розділити на дві основні групи: флавоноїди та нефлавоноїди [9]. До флавоноїдів належать ізофлавіони, куместани та пренілфлавоноїди. Ізофлавіони входять до числа найбільш естрогенних сполук. Основним джерелом ізофлавіонів є бобові з родини *Fabaceae*, а саме – соя (*Glycine max*) як джерело даїдзетину, геністеїну та гліцетеїну та червона конюшина (*Trifolium pratense*), як джерело формонетину та біоханіну А [10]. Вони знаходяться у вигляді глікозидів з низькою естрогенною активністю порівняно з їх деглікозильованою формою, яку також називають агліконом. Ці сполуки, після перорального прийому, метаболічно гідролізуються кишковою мікрофлорою до своїх агліконів, які потенційно й опосередковують естрогенний стимул [11].

1.1.4. Флавоноїди в медицині

Флавоноїди містять у своїй молекулі реакційно здатні фенольні радикали та карбонільні групи. Завдяки цьому вони беруть участь у різних обмінних процесах, що визначає їх біологічну активність. До найважливіших

видів фармакологічної дії флавоноїдів належать:

- Р-вітамінна дія, зумовлена позитивним впливом на стан капілярних судин, підвищується їх опірність, еластичність і пропускну здатність;
- діуретична дія, яка властива як чистим флавоноїдам, так і лікарській рослинній сировині;
- кардіотонічна та гіпотензивна активність;
- спазмолітична (впливає, насамперед, на гладку мускулатуру кровоносних судин);
- антиоксидантна та протирадіаційна.

Флавоноїди діють на травний тракт, печінку, матку, виявляють противиразковий, ранозагоювальний, протипухлинний ефект, тощо. Фармакологічна дія флавоноїдів залежить від класу, до якого вони належать. Для ізофлавонів характерна естрогенна, для катехинів – в'яжуча та протизапальна дія на слизові оболонки; флавоноли викликають спазмолітичний, гіпотензивний, бактерицидний ефект. Як спазмолітики діють також халкони, флаванони (ліквіритин), флавоноли (кверцетин, рутин), флавоноли (апігенін). Помірну протипухлинну дію виявляють лейкоантоціанідини – пеларгонідин, дельфінідин, ціанідин. Фунгіцидна та антимікробна активність показана для- антоціанів, які здатні інгібувати біосинтез афлатоксинів. Так, антоціани плодів чорниці застосовували при лікуванні мікробних інфекцій, діареї та при інших захворюваннях [12].

Ізофлавоноїди активують експресію генів через стимуляцію рецепторів, що активуються проліфератором пероксисом (α , γ), модулюють метаболізм вуглеводів, регулюють гіперглікемію, викликають дисліпідемію, зменшують резистентність до інсуліну та модифікують диференціацію адипоцитів і тканинний метаболізм. Крім того, було виявлено, що ці природні сполуки послаблюють окислювальний стрес через окислювальний сигнальний каскад і запальний механізм. Отже, передбачалося, що ізофлавоноїди здатні запобігти та сповільнити прогресування довгострокових ускладнень цукрового діабету, включаючи серцево-судинні захворювання, нефропатію,

нейропатію та ретинопатію [13].

Флавоноїди перешкоджають окисленню ендогенного вітаміну Е, пригнічують процеси внутрішньоклітинного перекисного окислення ліпідів, запобігають окислювальному пошкодженню нуклеїнових кислот і перешкоджають розвитку канцерогенезу. Що стосується раку, наукові дані свідчать про те, що ізофлавоноїди можуть бути корисними для зниження ризику захворіти на деякі види раку, такі як рак молочної залози та рак ендометрію. Вони знижують ризик серцево-судинних захворювань завдяки своїй здатності запобігати окисленню холестерину (ліпопротеїнів низької щільності) і розвитку атеросклеротичного ураження стінок кровоносних судин, а також пригнічувати агрегацію тромбоцитів. Їх антиоксидантні властивості мають більш широкий спектр, на відміну від таких потужних антиоксидантів, як вітаміни С і Е, селен і цинк. Флавоноїди також мають антиалергічну та протизапальну дію (пригнічують утворення та вивільнення факторів запалення), значну антивірусну активність, уповільнюючи розмноження та активність вірусів. Кверцетин має найвищу антивірусну активність проти вірусів герпесу, парагрипу та ряду інших. Флавоноїди здатні утворювати хелатні комплекси з іонами металів і зв'язувати вільні радикали. Вони впливають на процеси метаболізму і виведення чужорідних речовин, які є канцерогенами і мутагенами [14, 15].

Щодо використання в якості імуномодуючої кормової добавки, було показано, що додавання соєвих ізофлавоноїдів покращує імунологічний статус свиней та забезпечує деяке покращення показників росту при певних захворюваннях, включаючи вірус репродуктивного та респіраторного синдрому свиней [16].

1.1.5. Антивірусні властивості ізофлавоноїдів

Безумовно, найбільш вивченим серед виділених соєвих ізофлавоноїдів,

який реалізує антивірусну дію, є геністеїн. Так, було показано, що він пригнічує інфекційність вірусів з оболонкою, або без оболонки, а також одноланцюгових, або дволанцюгових РНК або ДНК-вірусів [17]. Було показано, що в широкому спектрі концентрацій (від фізіологічних до надфізіологічних: 3,7–370,0 мкМ) флавоноїди, включаючи геністеїн знижують інфекційність різних вірусів, що вражають людей і тварин, включаючи аденовірус, вірус простого герпесу, вірус імунодефіциту людини, вірус репродуктивного та респіраторного вірусу та ротавірус. Механізм, за допомогою яких геністеїн зменшує запальну відповідь, може бути пов'язаний з пригніченням як активації ядерного фактору транскрипції-кВ (NF-кВ), так і секреції хемокіну-8 через зниження активності каспази-3 або ряду протеїн-тирозинкіназ. Ця протизапальна властивість ізофлавонів може бути критичною у відповіді клітини-господаря на вірусну інфекцію [18, 19].

Флавоноїдів та ізофлавонів, які мають потенційні антивірусні властивості багато. До них належать флаваноли (кверцетин, кемпферол та 3-метилкемпферол), флавони (лютеолін та 5,6,7-триметоксифлавонон), ізофлавоноли [3(2*H*)-ізофлавоноли] та ізофлавоноли (торванол А та ірізолідон). Такі сполуки містяться у фруктах, овочах, рослинах і корі дерев. Кверцетин інгібував аденовірусну та коронавірусну інфекцію у дозі 0,2 мМ та 83 мкМ відповідно [20]. Кемпферол і 3-метилкемпферол знижували титр HSV-1 і поліовірусу у концентраціях 0,4 мМ і <10 мкМ відповідно [21]. Лютеолін був ефективним проти коронавірусу в дозі 11 мкМ, тоді як 5,6,7-триметоксифлавонон інгібував репродукцію HSV-1, ВІЛ та поліовірусу у дозах від 10 мкМ до 0,1 мМ. Ізофлавоноли торванол А та ірізолідон були ефективними проти вірусу HSV-1 та поліомавірусу людини-2 відповідно у концентраціях від 7,5 до 11 мкМ [22]. Крім того, сім флавоноїдів, виділених із рослин родин *Anacardiaceae* та *Clusiaceae*, інгібували репродукцію вірусів грипу А та В, HSV-1, HSV-2 та кору *in vitro*. Нарешті, 3 (2*H*)-ізофлавонон інгібував інфекцію поліовірусу 2 типу в концентрації 20 мкМ. У недавньому дослідженні було встановлено, що порядок дії флавоноїдів щодо інгібування

нейрамінідазної активності вірусу грипу наступний: аурони>флавоно(ол)ени>ізофлавонони>флаванони(ол)ени та флаван(ол)ени [23].

Враховуючи різноманітність зареєстрованих ефектів ізофлавононів на численні віруси та їх клітини-мішені, антивірусну активність, ймовірно, пояснюється комбінацією кількох ефектів, що впливають як на вірусну частку, так і на клітину-хазяїна. Огляд сучасної літератури свідчить, що ізофлавонони впливають на зв'язування вірусу з клітинними мембранами, проникнення в клітину, реплікацію та трансляцію вірусного білка всередині клітини-хазяїна, а також утворення певних глікопротеїнових комплексів оболонки вірусу. На рівні клітини-хазяїна ізофлавонони можуть впливати на індукцію певних факторів транскрипції та секрецію цитокінів. Більшість з цих ефектів пояснюється зниженням активності РТК. Пригнічення активності РТК зменшувало проникнення аденовірусу та вірусу SV40 у клітини-хазяї. Запропоновані механізми включали реорганізацію цитоскелету, яка може включати блокування індукованих вірусом змін актину та рекрутування динаміну II до мембрано-зв'язаних вірусних часток. Пригнічення активності РТК на пізніх стадіях вірусної інфекції призводило до зниження фосфорилювання поліпептидів HSV-1 і глікопротеїну E вірусу герпесу великої рогатої худоби-1, що, у свою чергу, зменшило загальну реплікацію вірусу. У присутності 50 мкМ геністеїну зниження реплікації вірусу HSV-1 було пов'язано не зі зменшенням адсорбції вірусу на клітинах, а швидше, через значне зниження фосфорилювання залишків тирозину в специфічних вірусних поліпептидах ICP-6, ICP-19 та ICP-26 на пізній стадії інфекції HSV-1, без видимої цитотоксичності для клітин Vero [24,25, 26].

Хоча біологічні властивості флавоноїдів добре вивчені, механізми дії, що лежать в основі їх антивірусних властивостей, остаточно не з'ясовані. Сучасні результати свідчать, що флавоноїди справляють комбінований вплив як на вірус, так і на клітину-хазяїна. Ізофлавонони впливають на зв'язування вірусу з чутливою клітиною, проникнення, реплікацію, трансляцію вірусного білка та утворення певних глікопротеїнових комплексів оболонки вірусу.

Ізофлавіони також впливають на різноманітні процеси передачі сигналів клітини-хазяїна, включаючи індукцію факторів транскрипції генів і секрецію цитокінів [27, 28, 29]. Ефективність ізофлавіонів та споріднених флавоноїдів щодо інфекційності вірусів у біопробах *in vitro* залежить від дози, частоти введення та комбінації використовуваних ізофлавіонів[30].

1.2. Неспецифічна антивірусна імунна відповідь

Імунна система – це складна мережа клітин, тканин і молекул, яка захищає організм від інфекцій. Імунна система здатна розпізнавати та реагувати на широкий спектр патогенів, включаючи віруси. Антивірусна відповідь – це складний процес, в якому беруть участь різні компоненти імунної системи. Неспецифічна антивірусна відповідь є першою лінією захисту від вірусних інфекцій і має вирішальне значення для обмеження поширення вірусу до моменту активації більш специфічної адаптивної імунної відповіді.

Неспецифічна протівірусна відповідь – це складний процес, в якому беруть участь різні компоненти імунної системи, включаючи систему комплементу, цитокіни, клітини крові, активні форми кисню та інтерферон.

Система комплементу – це група білків, які працюють разом для ідентифікації та знищення патогенних мікроорганізмів, включаючи віруси. Система комплементу може знищувати віруси, утворюючи пори в їхній мембрані або безпосередньо вбиваючи інфіковані клітини. Система комплементу також може активувати інші компоненти імунної системи, такі як фагоцити та природні клітини-кілери.

Клітини крові, включаючи нейтрофіли, моноцити і лімфоцити, є важливими компонентами імунної системи, які відіграють роль у неспецифічній антивірусній відповіді. Нейтрофіли – це перші клітини, які реагують на інфекцію і відповідають за фагоцитоз та продукцію активних

форм кисню. Моноцити диференціюються в макрофаги, які є фагоцитуючими клітинами, здатними знищувати віруси та інфіковані клітини. Лімфоцити, включаючи природні кілери та цитотоксичні Т-лімфоцити, відповідають за безпосереднє знищення інфікованих клітин.

Активні форми кисню (АФК) – це високодифузійні та хімічно активні молекули, що утворюються внаслідок відновлення молекулярним киснем таких видів, як пероксид водню, супероксидний аніон та гідроксильний радикал. Виробництво АФК є важливою частиною арсеналу хазяїна в боротьбі з мікроорганізмами та вірусами. Крім того, АФК відіграють важливу сигнальну роль у біологічних системах і можуть регулювати фенотип і функції імунних клітин. З'являється все більше доказів того, що внутрішньоклітинні АФК полегшують пошкодження або стрес клітин і сприяють активації вродженого імунітету. Активні форми кисню можуть пошкоджувати вірусні білки та нуклеїнові кислоти, а також активувати інші компоненти імунної системи, такі як фагоцити [31].

Цитокіни – це невеликі білкові молекули, які виділяються імунними клітинами і відіграють важливу роль у регуляції імунної відповіді. Деякі цитокіни, такі як інтерферон, мають антивірусні властивості і можуть пригнічувати реплікацію вірусів. Інші цитокіни, такі як інтерлейкіни та фактор некрозу пухлин, відіграють роль у запаленні та активації імунних клітин.

Інтерферон (ІФН) – це група цитокінів, які відіграють вирішальну роль у неспецифічній антивірусній імунній відповіді. Вони виробляються клітинами у відповідь на вірусну інфекцію і діють для пригнічення реплікації та поширення вірусів. ІФН може вироблятися різними клітинами, в тому числі інфікованими, і може індукувати стан антивірусної резистентності у сусідніх клітинах. Такий стан характеризується посиленням регуляції генів, залучених у антивірусній відповіді клітини, в тому числі тих, що беруть участь у деградації вірусної РНК і пригніченні синтезу вірусного білка. ІФН також може активувати імунні клітини, в тому числі природні клітини-кілери та

макрофаги, які можуть знищувати інфіковані клітини.

1.2.1. Роль інтерферону в неспецифічній антивірусній відповіді

ІФН є критично важливим компонентом неспецифічної антивірусної відповіді і відіграє певну роль як на ранній, так і на пізній фазах інфекційного процесу. Під час ранньої фази відповіді ІФН виробляється інфікованими клітинами і може індукувати стан антивірусної резистентності у сусідніх клітинах. Тобто може обмежити розповсюдження вірусу, забезпечуючи їх захист до формування імунною системою специфічної адаптивної відповіді.

Під час пізньої фази відповіді ІФН може активувати імунні клітини, в тому числі природні клітини-кілери та макрофаги, які можуть знищувати інфіковані клітини. ІФН також може активувати Т-лімфоцити, які можуть розпізнавати і вбивати клітини, інфіковані вірусом. Крім того, ІФН може посилити вироблення вірус-нейтралізуючих антитіл.

Існує три типи ІФН: тип I (включаючи ІФН-альфа і ІФН-бета), тип II (ІФН-гамма) і тип III (ІФН-лямбда). Кожен тип ІФН відіграє дещо іншу роль у протівірусній відповіді, але всі три типи можуть пригнічувати реплікацію вірусів та активувати імунні клітини.

ІФН I типу виробляються більшістю клітин у відповідь на вірусну інфекцію і діють локально, пригнічуючи реплікацію та поширення вірусу. ІФН I типу також активують природні клітини-кілери та макрофаги, які можуть допомогти очистити організм від вірусу. Доведено, що ІФН I типу важливі на ранніх стадіях вірусної інфекції, коли адаптивна імунна відповідь ще не активована.

ІФН II типу виробляється Т-клітинами та природними кілерами і відіграє важливу роль в активації імунних клітин та сприянні кліренсу

інфікованих клітин. ІФН II типу також посилює антигенпрезентуючу функцію дендритних клітин, що може сприяти запуску адаптивної імунної відповіді.

ІФН III типу виробляються епітеліальними клітинами і діють локально, пригнічуючи реплікацію та поширення вірусів. ІФН III типу важливі для слизових оболонок, де вони можуть допомогти запобігти проникненню вірусів в організм [32].

При вірусній інфекції інфіковані клітини виробляють і секретують ІФН. Потім ІФН зв'язуються зі специфічними рецепторами на поверхні сусідніх неінфікованих клітин, індуючи експресію сотень генів, які кодують антивірусні білки. Одним з таких білків є протеїнкіназа R (PKR), яка активується при зв'язуванні дволанцюгової РНК, що є характерною ознакою багатьох вірусних інфекцій. Після активації PKR може пригнічувати синтез вірусного білка, фосфорилуючи еукаріотичний фактор ініціації 2-альфа (eIF2-альфа), білок, необхідний для ініціації трансляції білка.

ІФН проявляють свою антивірусну дію через індукцію антивірусних білків, таких як, 2'-5' олігоаденілатсинтетаза (OAS) та білки Mx. Ці молекули активують РНКазу L, ендонуклеазу, яка розщеплює вірусні та клітинні РНК, що призводить до пригнічення реплікації вірусу та індукції апоптозу в інфікованих клітинах [33].

Окрім індукції антивірусних білків, ІФН також модулюють імунну відповідь, посилюючи експресію молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) на інфікованих клітинах. Молекули МНС представляють пептидні фрагменти вірусних білків, на поверхні інфікованих клітин, що сприяє їх розпізнаванню і знищенню вірусоспецифічними Т-клітинами. ІФН також можуть активувати природні клітини-кілери та макрофаги, які допомагають очистити організм від вірусу.

ІФН також мають імуномодулюючу дію на дендритні клітини і Т-клітини, що може впливати на адаптивну імунну відповідь. Наприклад, ІФН можуть посилювати антигенпрезентуючу функцію дендритних клітин, що

призводить до активації вірусоспецифічних Т-клітин. ІФН також можуть модулювати активність Т-клітин, сприяючи диференціюванню ефektorних Т-клітин і пригнічуючи диференціювання регуляторних Т-клітин [34].

Загалом, механізм дії ІФН під час неспецифічної антивірусної імунної відповіді включає індукцію антивірусних білків, модуляцію імунної відповіді та активацію імунних клітин.

1.3 Вірус везикулярного стоматиту

Вірус везикулярного стоматиту (ВВС) – негативно заряджений РНК-вімісний літичний вірус. У зв'язку з великою кількістю інформації про ВВС і через повідомлення про те, що інтактні віріони можуть зв'язуватися з продуктами головного комплексу гітосумісності в клітинах миші під час процесу брунькування [35], ВВС став чудовим інструментом для створення для вивчення моделей інфекційного процесу в умовах *in vivo* з метою дослідження відповіді системи імунітету.

У природі цей вірус викликає захворювання у великої рогатої худоби та коней і свиней. Він має особливе значення для фермерів у певних регіонах світу, де викликає інфекційні захворювання тварин, і клінічна картина яких ідентична такій, що викликається внаслідок інфікування вірусом ящуру[36].

1.3.1. Репродукція вірусу везикулярного стоматиту

Вірус везикулярного стоматиту (ВВС) є представником роду *Vesiculovirus* родини *Rhabdoviridae*. Генوم вірусу неінфекційна мінус-РНК – має довжину 11162 нуклеотиди і містить п'ять генів порядку 3' N-P-M-G-L 5', що кодують п'ять основних вірусних білків. Частина ВВС у формі кулі (160 нм на 80 нм) містить рибонуклеопротеїнове ядро (нуклеокапсид), що складається з геномної РНК, тісно пов'язаної з білком N, та РНК-полімерази, що складається з комплексу білків L і P, огорнутих плазматичною

мембраною клітини-господаря.

Після поглинання вірусної частинки чутливими клітинами нуклеокапсид і вірусна РНК-полімераза вивільняються в цитоплазму, і відбувається транскрипція вірусної мРНК. Градієнт транскрипції вірусної мРНК 3'-5' призводить до активної експресії білка N і послідовного зниження рівнів експресії генів білків P, M, G і L. Цей градієнт експресії генів забезпечує рівень білків вірусу у відповідному співвідношенні, що сприяє подальшій реплікації вірусного геному та збиранню зрілих вірусних часток вірусу. Реплікація вірусу в культурі клітин відбувається швидко: потомство вірусу можна виявити через 5-6 годин після зараження [37].

Однією з основних відмінностей між двома реакціями синтезу РНК, транскрипцією та реплікацією, які здійснюються ВВС, є те, що реплікація вимагає синтезу вірусного білка, тоді як транскрипція – ні. Матрицею для обох реакцій синтезу РНК є геномна мінус-РНК. Реплікацію РНК дефектних інтерферуючих часток ВВС було вивчено у неклітинній системі. Перехід від синтезу тільки дефектної інтерферуючої частинки (DI) лідерної РНК до реплікації повнорозмірної DI-РНК здійснювався в системі за допомогою новосинтезованих білків ВВС і відбувався за відсутності вірусу-помічника. Були синтезовані повнорозмірні DI-РНК як позитивної, так і негативної полярності. Крім того, продукти реплікації РНК зв'язували з нещодавно синтезованими вірусними білками з утворенням комплексів, які неможливо було відрізнити від автентичних нуклеокапсидів частинок DI [38].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали та обладнання, використані у роботі

Скринінг антивірусних властивостей ізофлавоноїдів проводили використовуючи перещеплювану культуру епітеліоцитів нирки ембріона макаки (МА-104) з музею Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ та як індикатор – вірус везикулярного стоматиту з колекції вірусів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, оцінюючи ступінь цитопатичної дії тест-вірусу (інфекційний титр ВВС – 3lgТЦД₅₀).

Інші матеріали: стокові розчини ізофлавоноїдів 10⁻⁴ Моль на DMSO, DMSO, стандартний зразок інтерферону WHO International Standard INTERFERON ALPHA 2b (Human rDNA derived) NIBSC code: 95/566 100000 МО/мл, середовище для вирощування клітин DMEM-F12 (Biowest), 0,02% розчин Версену, робочий розчин тетразолію (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ) 0,5%, розчин кристалічного фіолетового 4%, фізіологічний розчин, дезінфікуючий розчин Blanidas 300 (Бланідас);

В процесі виконання роботи використовували наступне обладнання: мікроскоп інвертований біокуляр Біолам, термостат сухоповітряний ТС-80, СО₂-інкубатор, фотометр з вертикальним променем LabSystem Multiskan.

Витратні матеріали: одноразовий пластиковий посуд – матраси та 96-лункові планшети з плоским дном для вирощування клітин, пробірки типу «Епендорф», наконечники для механічних дозаторів.

2.2 Методи, які використано при проведенні дослідження

Цитологічні (вирощування клітин, тести на метаболічну активність

клітин), вірусологічні (накопичення вірусу, титрування вірусу, підбір ефективною інфікуючою дози вірусу та інфікування культури клітин) , статистичні (обробка та аналіз отриманого масиву первинних значень).

2.3. Підготовка культури клітин до експерименту

Під час виконання роботи обов'язково дотримувались умов стерильності та правил особистого захисту (робота виконувалась у вірусологічному боксі з використанням засобів індивідуального захисту).

1) З матрацу з моношаром клітин MA-104 злили середовище у дезінфікуючий розчин та налили кілька мл розчину Версену, для того, щоб видалити залишки середовища, змити можливий клітинний детрит якщо він є, знову вилили у дезінфікуючий розчин.

2) Налили до клітин MA-104 5-7 мл розчину Версену, поставили в термостат на 3-5 хв. Періодично контролювали стан клітин під мікроскопом: вони мають округлитися та відокремитись одна від одної.

3) Обережно злили частину Версену, розчином що залишився за допомогою смплера змили клітини, які не відкріпились. Отримали каламутну суспензію клітин.

4) У флаконі змішали 9 мл середовища для вирощування клітин та 1 мл суспензії знятих клітин. Після чого ресуспендували.

5) Підготували планшет (планшет 1) для посадки клітин. Зробили всі необхідні позначки (дата, культура клітин тощо).

6) В кожен лунку планшета додали по 100 мкл клітинної суспензії, уникаючи утворення бульбашок повітря. Перед кожним додаванням ретельно ресуспендували клітинну суспензію.

7) Планшет інкубували в термостаті, $T = 37^{\circ}\text{C}$, 24 години.

2.4 Пасажування вірусу

Пасажування вірусу везикулярного стоматиту проводили на клітинах МА-104 в скляних флаконах об'ємом 200 мл.

- 1) В чистий стерильний флакон налили 1 мл суспензії клітин та 9 мл поживного середовища (обов'язково контролювали, щоб рідина не торкалася пробки після того як флакон перевернули на бік).
- 2) Інкубували флакон в термостаті, $T = 37^{\circ}\text{C}$ на 24 години.
- 3) Перевірили клітини на цілісність моношару під мікроскопом після чого видалили поживне середовище та внесли вірусомісну суспензію на підтримуючому поживному середовищі (містить 1-2% ембріональної сироватки телят, Sigma, США).
- 4) Залишили без освітлення при $T = 20^{\circ}\text{C}$ на 30 хв для адсорбції вірусу після чого поставили флакон в термостат, $T = 37^{\circ}\text{C}$ на 24 год.
- 5) Оцінили стан клітин під мікроскопом, візуально видно деструкцію клітин.
- 6) Злили вміст флакону в пластикову центрифужну пробірку та поставили в центрифугу, 15 000 об/хв на 20 хв.
- 7) Відібрали надосад в іншу пробірку та профільтрували його через бактеріальний фільтр 0,45 мкм (Sarsted, США).
- 8) В підготовлений 96-лунковий планшет зі сформованим моношаром клітин МА-104 внесли по 180 мкл безсироваткового середовища.
- 9) До останнього стовпчика додали 100 мкл середовища та підписали як контроль клітин.
- 10) В перший ряд, крім останньої лунки, внесли по 20 мкл відфільтрованого вірусу.
- 11) Провели десятикратні розведення шляхом переносу, починаючи з першого ряду в наступний по 20 мкл при цьому ретельно ресуспендували. З останнього ряду 20 мкл злили в дезінфікуючий розчин.
- 12) Поставили планшет в термостат, $T = 37^{\circ}\text{C}$ на 24 години.

13) Оцінили ступінь ЦПД методом чотирьох хрестів під мікроскопом.

14) Для подальшої роботи вибирали останнє розведення в якому було уражено 50% клітин, що відповідало «++» – ТЦД50.

2.5. Титрування ізофлавоноїдів та DMSO

В окремому чистому планшеті провели десятикратні розведення розчинів ізофлавоноїдів на фіз. розчині.

1) На планшеті поставили номери, які відповідали вибраним зразкам ізофлавоноїдів так, щоб для кожного номеру було по 4 лунки. В усі лунки додали по 180 мкл фізіологічного розчину.

2) В першу лунку кожного номеру внесли по 20 мкл відповідного 10^{-4} Моль розчину досліджуваних зразків ізофлавоноїдів на DMSO.

3) Далі провели послідовне десятикратне розведення зразків шляхом переносу по 20 мкл, починаючи з першої лунки в другу і т.д. при цьому ретельно перемішуючи весь об'єм. З останньої лунки 20 мкл вилили в дезінфікуючий розчин. Для кожного зразка використовували новий накінецьник.

4) Отримали розведення ізофлавоноїдів від 10^{-5} до 10^{-8} Моль.

5) В чистий стріп в 4 лунки додали по 180 мкл фізрозчину.

6) В першу лунку додали 20 мкл DMSO.

7) Далі провели послідовне десятикратне розведення DMSO шляхом переносу по 20 мкл, починаючи з першої лунки в другу і т.д. при цьому ретельно перемішуючи весь об'єм. З останньої лунки 20 мкл вилили в дезінфікуючий розчин.

8) Отримали розведення DMSO від 10^{-1} до 10^{-4} Моль.

2.6. Приготування розчину референс препарату інтерферону- α

В окремому чистому планшеті провели розведення препарату ІФН- α .

- 1) 3 чистих епендорфи пронумерували від 1 до 3
- 2) В епендорф 1 додали 900 мкл поживного середовища, в епендорф 2 додали 990 мкл і в епендорф 3 – 750 мкл поживного середовища.
- 3) Далі в епендорф 1 додали 100 мкл референс препарату інтерферону- α та перенесли 10 мкл в епендорф 2, після чого перенесли 250 мкл епендорф 3. Після кожного додавання ретельно перемішували та змінювали накінецьник.
- 4) Таким чином отримали в останньому епендорфі (3) концентрацію інтерферону- α 25 МО/мл.

2.7. Обробка клітин розчинами ізофлавоноїдів

До планшету 1 зі сформованим моношаром клітин МА-104 (перевірили на цілісність моношару за допомогою мікроскопа) перенесли розведення ізофлавоноїдів для перевірки на токсичність.

- 1) Для цього спочатку швидким обережним рухом вилили в дезінфікуючий розчин середовище, на якому росли клітини.
- 2) На планшеті зробили відповідні позначки («Контроль клітин» та «Контроль DMSO» та пронумерували схему, за якою далі вносили відповідні ізофлавоноїди).
- 3) В лунки, які позначені як «Контроль клітин» (Кк) додали по 100 мкл середовища для клітин.
- 4) В лунки, які позначені як «Контроль DMSO» внесли по 90 мкл безсироваткового поживного середовища, далі починаючи від центру і до периферії додали по 10 мкл готових розведень DMSO (в середніх лунки – концентрація 10^{-1} Моль, а в крайніх - 10^{-4} Моль). Таким чином, при додаванні

DMSO було розведено ще на один порядок, і отримали кінцеву концентрацію в лунках від 10^{-2} до 10^{-5} Моль.

5) В усі інші лунки планшету додали по 90 мкл безсироваткового поживного середовища та відповідно схемі внесли по 10 мкл готових відповідних розведень ізофлавоноїдів таким чином, що концентрація ізофлавоноїдів зменшувалась від центру до периферії. При додаванні зразки було розведено ще на один порядок, і в лунках кінцева концентрація становила від 10^{-6} до 10^{-9} Моль.

б) Поставили планшет в термостат, $T = 37^{\circ}\text{C}$ на 24 години.

2.8. Визначення наявності антивірусної активності у кондиціонованому клітинами МА-104 середовищі через 24 год після контакту з досліджуваними сполуками.

До планшетів 2-3 зі сформованим моношаром клітин МА-104 (перевірили на цілісність моношару за допомогою мікроскопа) перенесли кондиціоноване клітинами МА-104 середовище з планшету 1 для визначення антивірусної активності інтерфероніндукуючу дію.

1) Для цього спочатку швидким обережним рухом вилили в дезінфікуючий розчин середовище, на якому росли клітини.

2) На планшетах зробили відповідні позначки («Контроль клітин», «Контроль вірусу» (Кв) та «Контроль ІФН» (Кіфн) та пронумерували схему, за якою далі вносили відповідні ізофлавоноїди).

3) В лунки, які позначені як «Контроль вірусу» (Кв) та «Контроль інтерферону» (Кіфн) додали по 100 мкл середовища для клітин.

4) Відповідно до схеми у перші лунки кожного зразка додали по 135 мкл, а в наступні по 100 мкл безсироваткового поживного середовища.

5) В кожну першу лунку відповідного зразка внесла по 65 мкл цього ж зразка з планшету 1.

6) Далі провели послідовне двократне розведення зразків шляхом переносу по 100 мкл, починаючи з першої лунки в другу і т.д. при цьому ретельно перемішуючи весь об'єм. З останньої лунки 100 мкл вилили в дезінфікуючий розчин. Для кожного зразка використовували новий накінецьник.

7) В першу лунку стовпчика, який позначений як «контроль інтерферону» (Кіфн) додали 100 мкл готового розведення інтерферону- α

8) Далі провели послідовне двократне розведення зразків шляхом переносу по 100 мкл, починаючи з першої лунки в другу і т.д. при цьому ретельно перемішуючи весь об'єм. З останньої лунки 100 мкл вилили в дезінфікуючий розчин.

9) Помістили в термостат, $T = 37^{\circ}\text{C}$ на 24 години

2.9 Безпека при роботі з вірусним матеріалом

Всі роботи проведено у відповідності до вимог щодо безпеки роботи з вірусним матеріалом: в боксовому приміщенні, за умови знезараження інфекційного матеріалу відразу ж після використання. Вірусомісний матеріал відразу після використання занурювали у в дезінфікуючий розчин гіпохлориту натрію та інкубували у ньому для повного знезараження протягом 24 годин.

2.10. Інфікування клітин ВВС

1) Обережним швидким рухом вилили вміст планшету 2 та 3 в дезінфікуючий розчин.

2) До лунок контролю клітин додали по 100 мкл безсироваткового середовища.

- 3) До всіх інших лунок додали по 100 мкл робочого розведення ВВС ($21gTЦД_{50}$). Останній стовпчик – лунки контролю вірусу.
- 4) Помістили в термостат, $T = 37^{\circ}C$ на 24 години.

2.11. МТТ-тест

МТТ-тест (або тест на 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід) - це метод оцінки життєздатності клітин за допомогою вимірювання активності мітохондріальних ферментів, які здатні відновити тетразолій до формагану. Даний тест дозволяє застосувати ефект впливу різних зовнішніх факторів на клітини, наприклад, такий як токсичність речовини.

Короткий виклад методики: після інкубації клітин зі зразками з плати видаляли середовище, вносили 0,5% розчин МТТ та інкубували протягом 2 годин при $T=37^{\circ}C$. Після інкубації видаляли розчин МТТ та додавали однаковий об'єм DMSO для розчинення кристалів формагану які утворилися. Через 15 хв провели вимірювання оптичне поглинання лунок вимірювали при довжині хвилі 492 нм. Всі проби аналізували у чотирьох повторностях.

2.13 Тест з кристалічним фіолетовим

Для визначення стану клітин після їх контакту зі зразками було використано тест, який дозволяє охарактеризувати ключові показники їх життєздатності. Це простий, неферментативний тест для швидкого аналізу кількості життєздатних адгезованих клітин [39, 40]. Кількість поглинутого барвника залежить від загального вмісту ДНК в культурі та дозволяє оцінити кількість життєздатних клітин. Застосування КФ-тесту дозволяє уникнути можливих хибних результатів у випадку безпосереднього впливу досліджуваних речовин на мітохондріальну активність. [41].

Тест полягав у визначенні оптичної густини лунок з клітинами після їх

обробки реагентом/барвником. Формула розрахунку кількості клітин за параметром, що визначали, була стандартною:

$$\text{ОГд} / \text{ОГк} \times 100\%,$$

де ОГк – оптична густина розчину у контрольних лунках;

ОГд – оптична густина розчину у дослідних лунках.

Оптичну густина контрольних і дослідних лунок вимірювали на спектрофотометрі з вертикальним променем Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Фінляндія) за довжини хвилі, що відповідає максимуму поглинання барвника.

Короткий виклад методики: після інкубації клітин зі зразками з плати видаляли середовище, вносили 0,5% розчин кристалічного фіолетового (Sigma-Aldrich, США) в 30% етанолі та фарбували клітини протягом 10 хв. при кімнатній температурі. Фарбник видаляли, а клітини старанно промивали водою для повного видалення надлишків незв'язаного кристалічного фіолетового, планшети висушували [42]. Оптичне поглинання лунок вимірювали при довжині хвилі 540 нм. Всі проби аналізували у чотирьох повторностях.

2.14. Визначення антивірусної активності

Антивірусну активність кондиціонованого клітинами МА-104 середовища через 24 год після контакту з досліджуваними сполуками було досліджено на моделі клітин МА-104 – вірус везикулярного стоматиту (ВВС,) за такою схемою: зразки контактували з клітинами протягом 24 годин до інфікування клітин ВВС.

При встановленні антивірусної активності досліджуваних зразків облік кількості живих клітин проводили після їх фарбування кристалічним-фіолетовим як описано вище [43].

Розрахунок відсотку живих клітин в експериментах проводили,

розраховуючи відсоток оптичної густини експериментальних лунок планшету відносно оптичної густини лунок з інтактними клітинами з врахуванням показника оптичної густини лунок контролю вірусу (прийнятого як 100 % летальність) за формулою:

$$A, \% = 100\% \times \frac{A_C - A_0}{A_{100} - A_0},$$

де:

$A, \%$ – відсоток оптичної густини лунки із концентрацією сполуки С;

A_C – оптична густина (показання спектрофотометра) лунки із концентрацією сполуки С;

A_0 – оптична густина (показання спектрофотометра) лунки із 100 %-ю загибеллю клітин;

A_{100} – оптична густина (показання спектрофотометра) лунки з інтактними клітинами.

2.15. Статистична обробка отриманих результатів.

Індекс метаболічної активації (ІМА), який є інтегральним показником впливу дослідженого ряду сполук ізофлавоноїдів на життєздатність культури клітин був розрахований за наступною формулою:

$$\text{ІМА} = \frac{\% \text{ метаболічної активності}}{\% \text{ адгезованих клітин}}$$

Дані досліджень та параметри, що визначались – CC_{50} та IC_{50} – статистично оброблені, результати представлені як медіана з міжквартильним діапазоном AUC: Me (LQ–UQ), де Me = медіана (50 % центиль), LQ = 25 % центиль, та UQ = 75 % центиль [44, 45]. Статистичні розрахунки проведені за допомогою програмного забезпечення

Stat Plus Pro 5.9.8. та STATISTICA v.10 (Система аналізу експериментальних даних, StatSoft, Inc. 2011).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Візуальна оцінка стану клітин

Первинним етапом будь-якого дослідження *in vitro* є контроль тест-культури клітин та основних компонентів системи: розчинників, інфекційного агента. Саме тому спочатку була проведена візуальна оцінка стану клітин МА-104 у контрольних лунках, що містили інтактні клітини, а також стану клітин, інфікованих ВВС (контроль вірусу) та клітин з різними концентраціями DMSO.

За нормальних умов культура клітин МА-104 утворює щільний моношар з типових епітеліоцитів овальної форми, із відносно великими темними ядрами

Через 24 години після інфікування клітин ВВС спостерігається зміна їх форми, руйнування клітин, деструкція моношару: у полі зору присутні поодинокі, деформовані, часто заокруглені клітини.

Під мікроскопом оцінка стану інтактних клітин з доданим DMSO була проведена для того, щоб перевірити його можливий токсичний вплив: візуально стан клітин в контрольних лунках з DMSO та ВВС відрізнявся. Тобто присутність DMSO в культуральному середовищі впливала на морфологічні характеристики клітин.

3.2. Показники метаболічної активації клітин МА-104 за умови їх 24 год контакту з рядом сполук ізофлавоноїдів

Тест на метаболічну активацію клітин включає аналіз їх метаболічної активності з врахуванням, відповідно загальної кількості адгезованих клітин у кожній лунці, що дозволяє інтегрально оцінити вплив досліджуваних

сполук на ключові показники життєздатності локальної популяції клітин. Первинні дані отримували, застосовуючи в одній модельній системі два тести: МТТ-тест та тест з кристалічним фіолетовим. У кожному тесті проводили фотоколориметричне вимірювання оптичної густини лунок та розраховували відсоток живих клітин в кожній лунці відносно контрольних інтактних клітин, прийнятих за 100%. На основі цих даних були побудовані наступні графіки.

Слід зазначити, що розчинником для отримання стокових концентрацій сполук був DMSO, який – навіть за візуального обліку у світловому мікроскопі – певним чином змінював морфологію клітин. Саме тому в рамках експериментального дослідження було проведено моніторинг його впливу на тестовані показники: метаболічну активність та загальну кількість адгезованих клітин у лунках, оброблених різними розведеннями DMSO – аналогічно до розведення тест-сполук. Оскільки DMSO присутній у відповідних розведеннях і у складі сполук, отримані показники представлено на кожному рисунку з метою надання можливості порівняння впливу складових компонентів тест-системи на стан клітин. Цікаво, що внесення тільки DMSO супроводжувалось суттєвим зниженням і метаболічної активності, і загальної кількості клітин у максимальній дослідженій концентрації. Зменшення такого впливу було прямо пропорційне дозі. У складі речовин токсичний ефект DMSO не був практично вираженим. Можливим поясненням виявленого ефекту може бути взаємодія DMSO безпосередньо з тест-сполуками, що певним чином супроводжується зменшенням ймовірності його взаємодії із мембраною клітин, і, як наслідок, впливу на їх морфологію та фізіологічний стан.

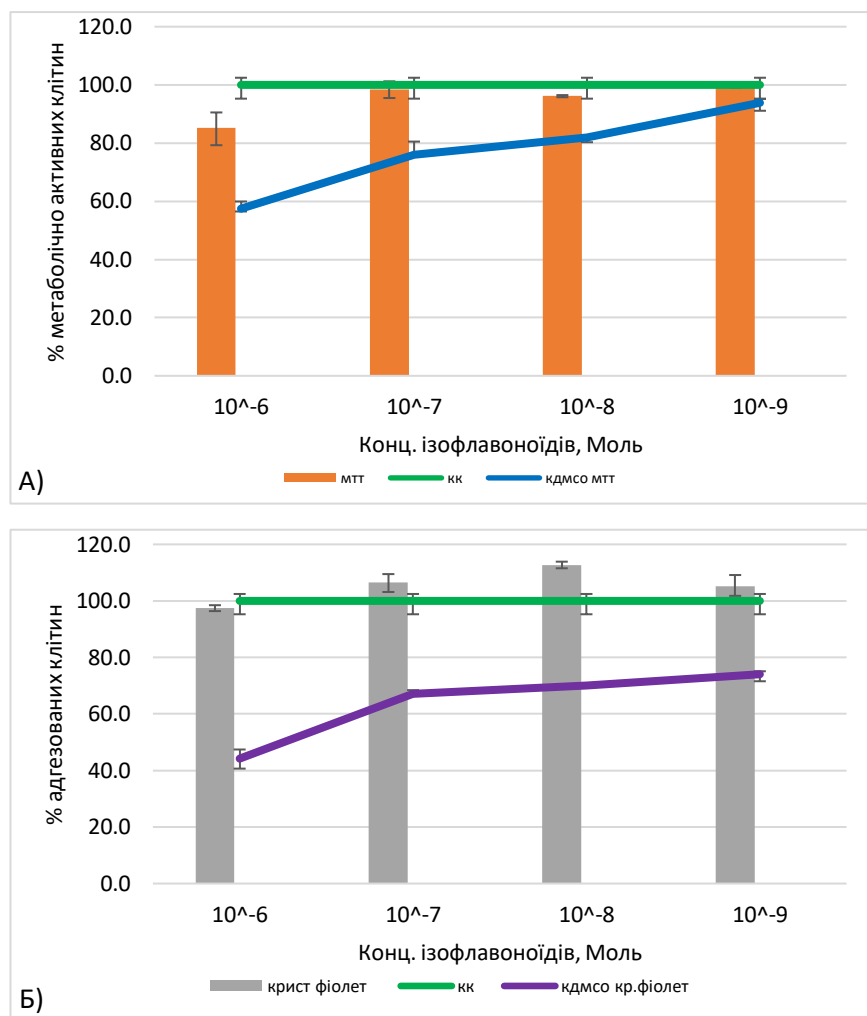


Рис.3.1. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 5: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

З даних графіків ми бачимо, що сполука № 5 в концентрації 10^{-6} М статистично значущо знижує метаболічну активність клітин майже на 20% при цьому не знижуючи їх загальну кількість. Наступні десятикратні зменшення концентрації суттєво не змінюють метаболічну активність клітин, тоді як їх загальна кількість за концентрації 10^{-8} М статистично значущо вища, ніж контрольних інтактних клітин. Загалом, сполука №5 не справляє значущого токсичного впливу в діапазоні досліджених концентрацій.

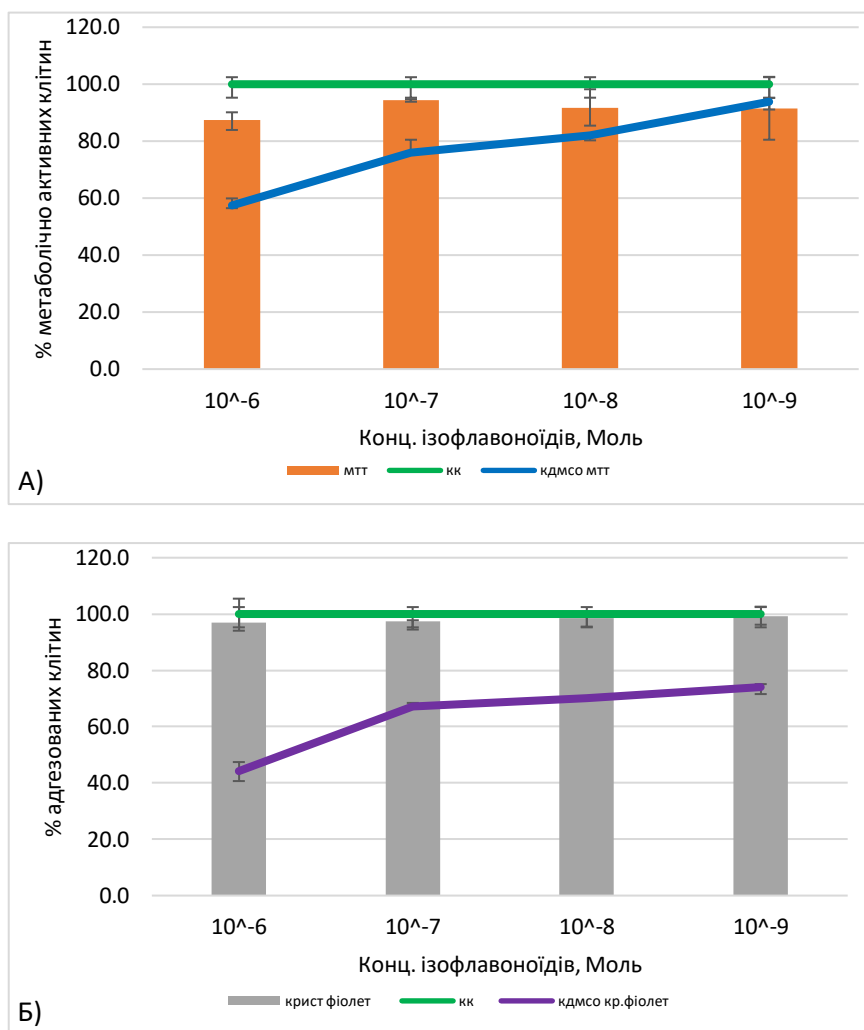


Рис.3.2. Відповідь клітин MA-104 на 24 год контакт зі сполукою № 7: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

Представлені на рис. 3.2 графіки дозволяють зробити висновок, що сполука № 7, як і сполука №5 в максимальній дослідженій концентрації статистично значущо знижує метаболічну активність клітин MA-104, тоді як в наступних десятикратних розведеннях зниження метаболічної активності клітин не є статистично значущим. Відсоток загальної кількості клітин в експериментальних лунках ніяким чином не відображає концентраційні зміни досліджуваної сполуки, знаходиться на рівні показників лунок з

інтактними клітинами. Загалом, реакція клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою №7 є мінімальною та свідчить про її нетоксичність.

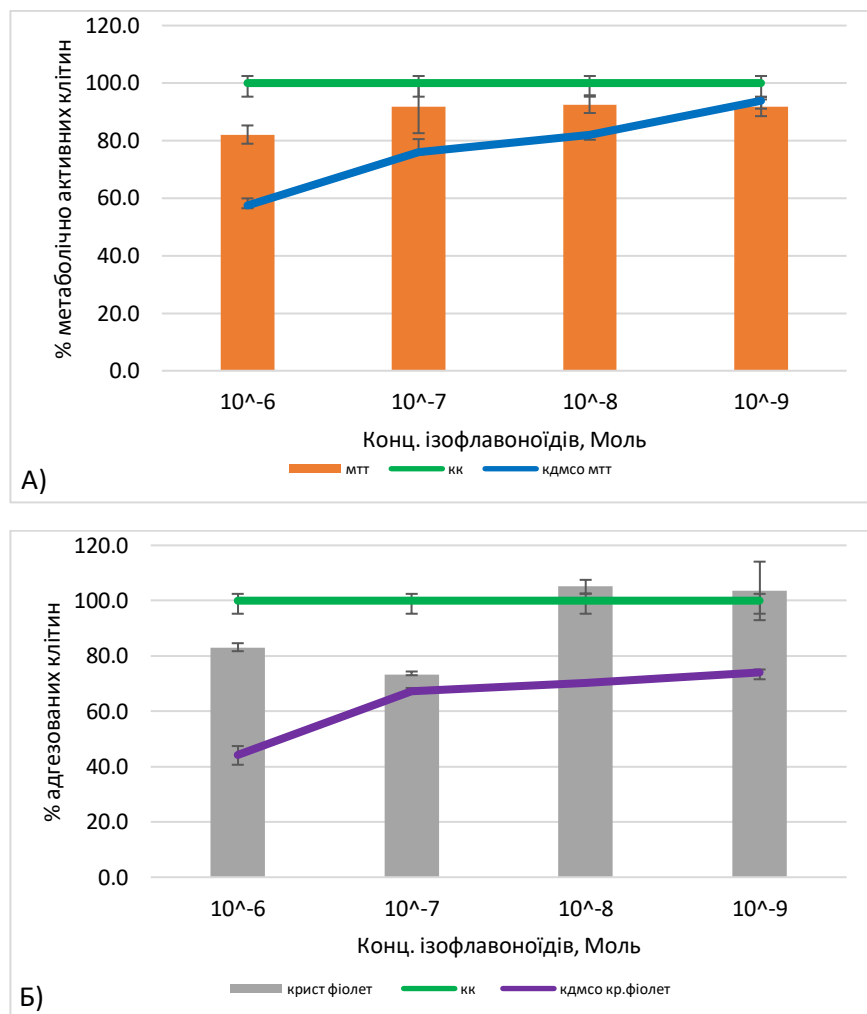


Рис.3.3. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 8: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

Як і у сполук №5 та №7, сполука № 8 тільки у максимальній дослідженій концентрації статистично значущо знижує метаболічну активацію клітин МА-104. Але, на відміну від них, за показником загальна кількість адгезованих клітин, статистично значущо (в межах 20%) зменшують їх кількість концентрації сполуки №8 – 10^{-6} та 10^{-7} М.

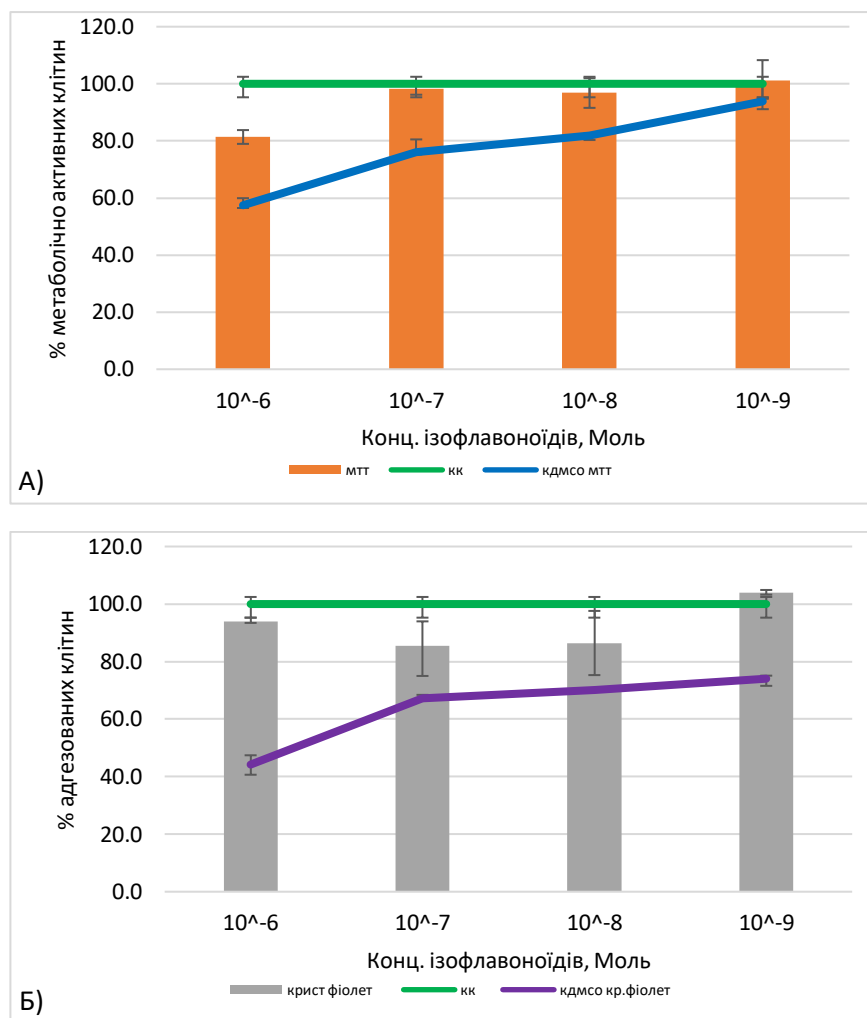


Рис.3.4. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 9: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

Сполука №9, як і розглянуті результати метаболічної активності попередніх сполук, статистично значущо пригнічує метаболічну активність клітин МА-104 у максимальній дослідженій концентрації, тоді як зменшення загальної кількості адгезованих клітин прослідковується за умови застосування сполуки №9 у концентрації на порядок меншій: 10^{-7} М. В концентрації 10^{-8} М зниження загальної кількості адгезованих клітин не є статистично значущим.

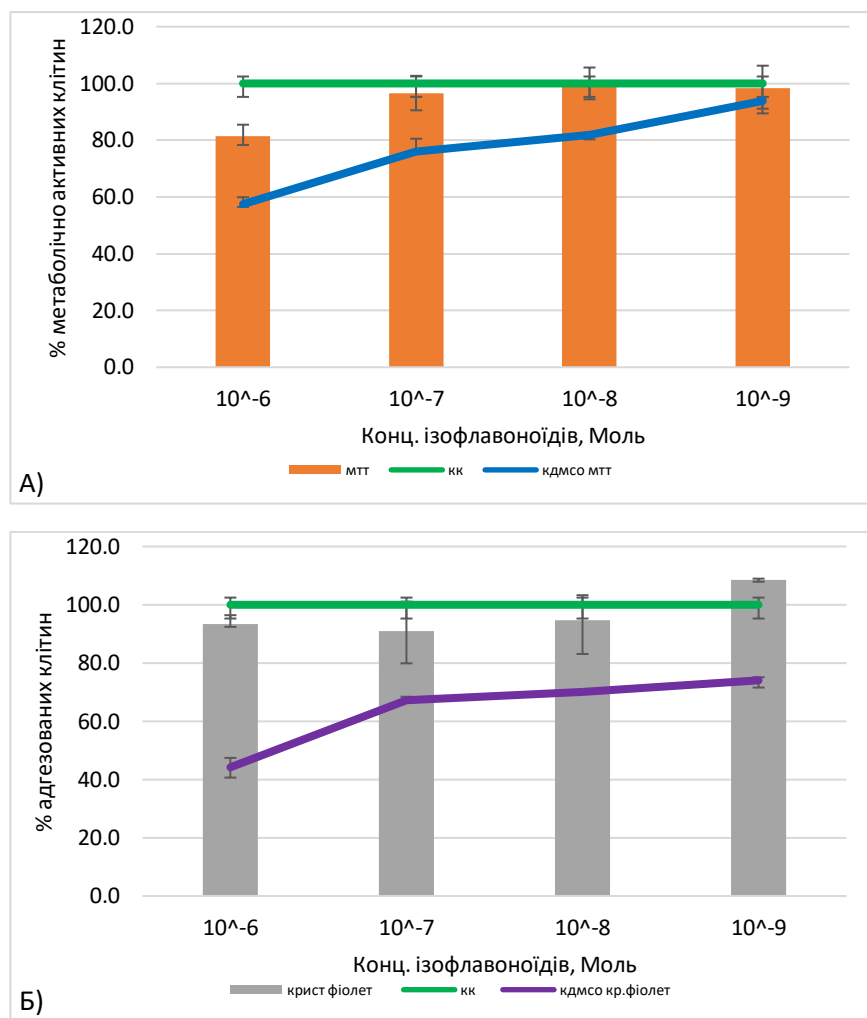


Рис.3.5. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 10: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих..

Як і за умови застосування усіх попередніх сполук, сполука №10 знижувала метаболічну активацію клітин у максимальній дослідженій концентрації. Наступні десятикратні розведення тест-сполуки не справляли будь-якого інгібуючого впливу на метаболічну активність клітин. Щодо впливу на загальну кількість адгезованих клітин, то статистично значущих відмінностей із показником контрольних клітин не виявлено, хоча тенденція до зниження показника спостерігається в діапазоні перших трьох

десятикратних розведень, а у мінімальній дослідженій концентрації збільшення загальної кількості адгезованих клітин є статистично значущим, хоча за абсолютними показниками – незначним: в межах 5-7%.

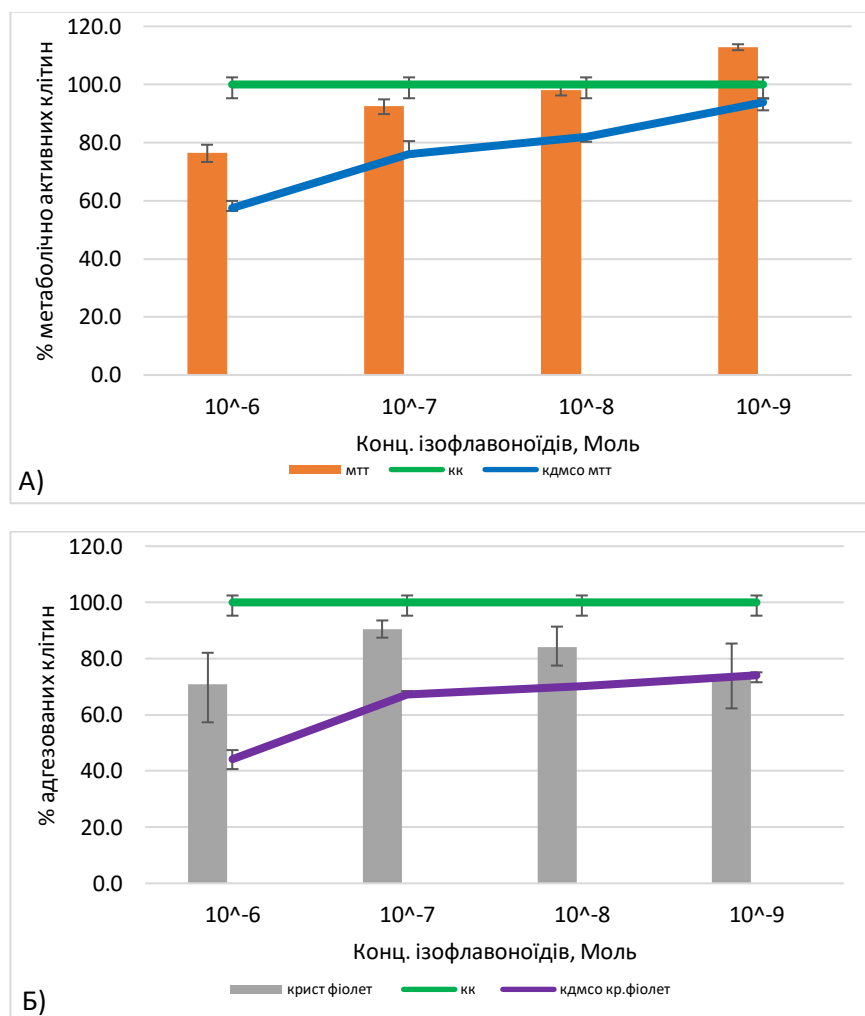


Рис.3.6. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 11: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

Сполука № 11 суттєво впливала на показники життєздатності клітин. З графіку видно лінійну залежність метаболічної активності від концентрації сполуки №11 – найнижчий показник за дії концентрації 10⁻⁶ М, а в

мінімальній дослідженій концентрації показана статистично значуща активація метаболічної активності клітин. Також ця сполука статистично значущо знижувала відсоток адгезованих клітин: в концентрації 10^{-6} М показано зменшення кількості клітин більше, ніж на 20%, в концентрації 10^{-7} М зменшення становило близько 10%, пригнічення загальної кількості адгезованих клітин показано і в наступних розведеннях. Загалом, якщо сполука №11 викликала лінійну концентраційно-залежну зміну метаболічної активності клітин, то зміна кількості адгезованих клітин не підпорядковувалась вказаній закономірності та була нижчою у всьому діапазоні досліджених концентрацій.

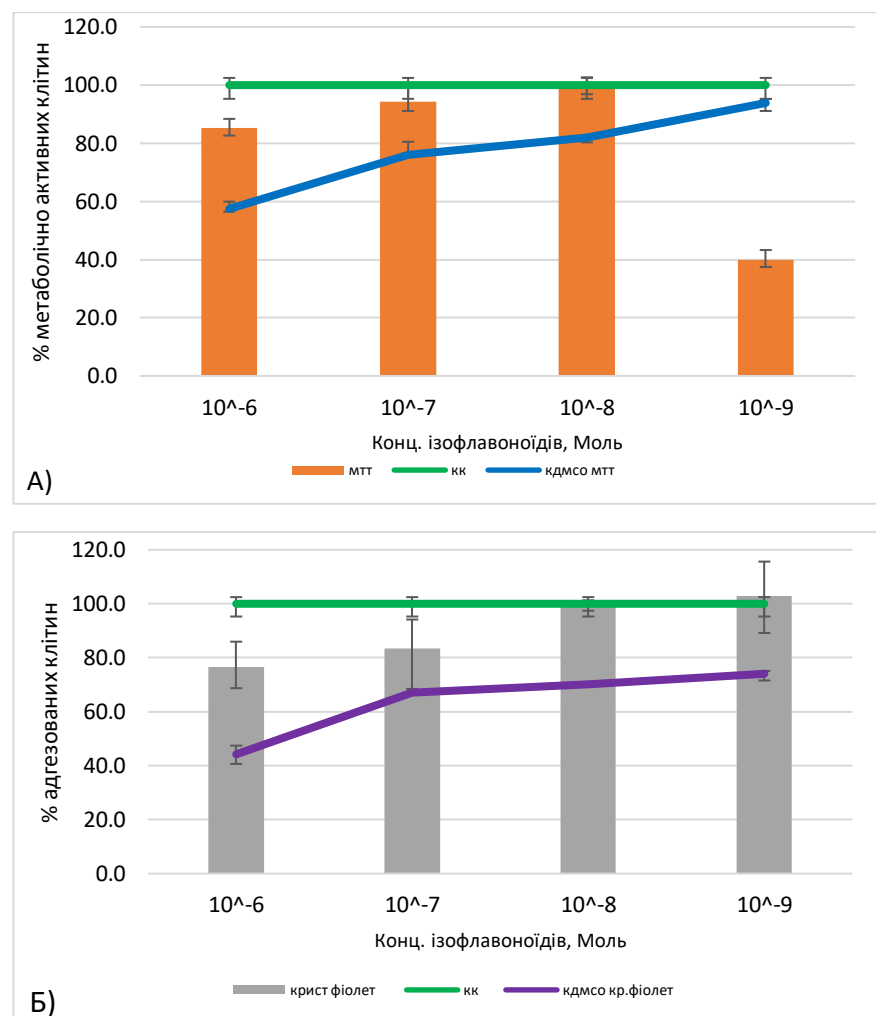


Рис.3.7. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 13: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток)

адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

З представлених графіків ми бачимо, що сполука № 13 ізофлавоноїдного ряду мала лінійний вплив на відсоток адгезованих клітин в лунках. При цьому дещо знижувала метаболічну активність клітин в концентрації 10^{-6} М, цей вплив зникав в наступних розведеннях, але в концентрації 10^{-9} М було пригнічення метаболічної активності більше ніж на 50%.

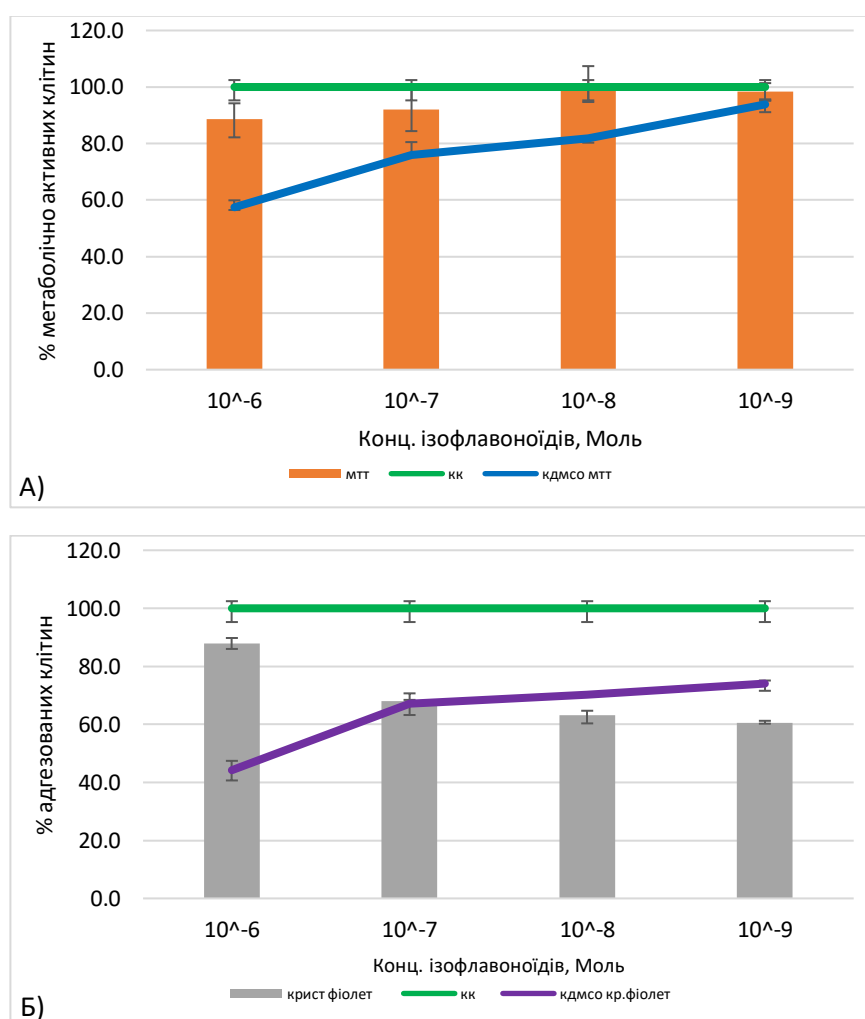


Рис.3.8. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 16: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

Сполука №16, як і попередньо описані сполуки, у максимальній дослідженій концентрації статистично значущо знижувала метаболічну активність клітин МА-104, хоча за числовими результатами отримані значення є незначними. З іншого боку, за тестом з кристалічним фіолетовим, зменшення кількості адгезованих клітин спостерігалось у зворотному порядку: в концентрації 10^{-6} М зниження загальної кількості адгезованих клітин становило 15% , тоді як в концентрації 10^{-9} М зниження становило 40%.

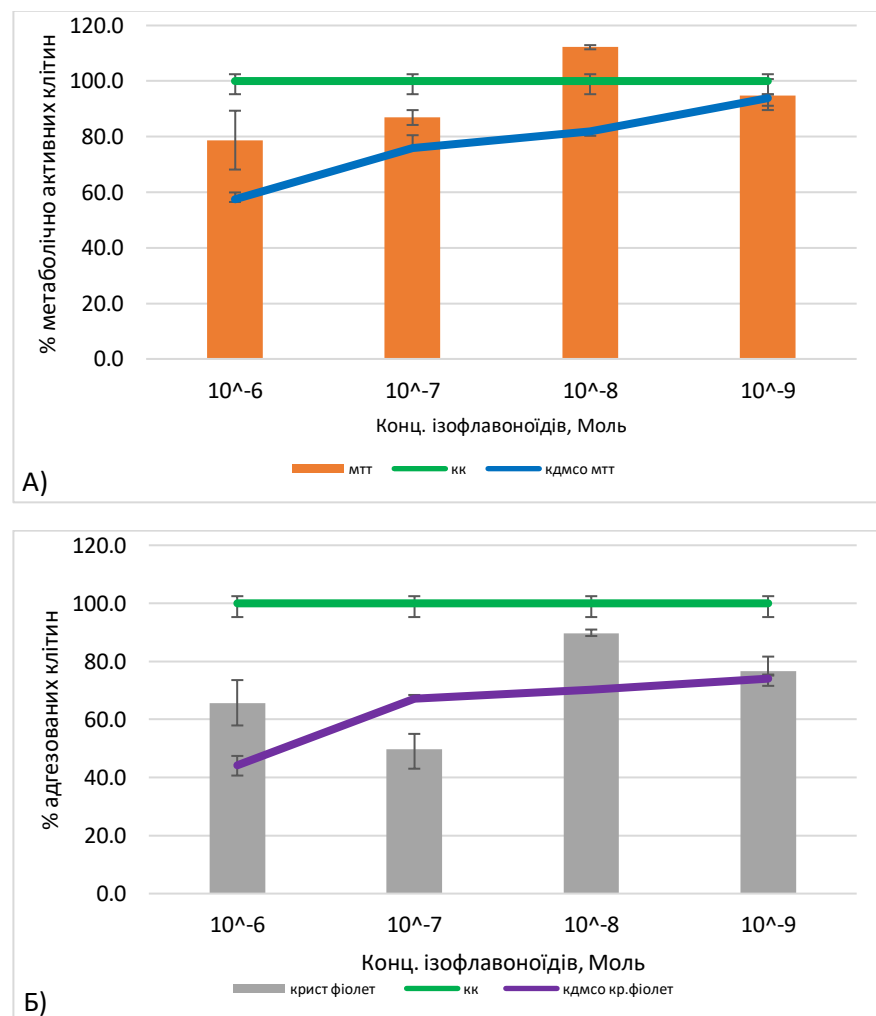


Рис.3.9. Відповідь клітин МА-104 на 24 год контакт зі сполукою № 18: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

З даних графіків видно, що сполука № 18 ізофлавоноїдного ряду в концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} М знайжує метаболічну активність клітин, при цьому підвищуючи її в коцентрації 10^{-8} М порівняно з контролем клітин. Щодо впливу на відсоток адгезованих клітин, то він суттєво нижче від контролю клітин, особливо в концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} М було пригнічення кількості живих клітин на 40 та 50% відповідно.



Рис.3.10. Відповідь клітин МА-104 на 24 год. контакт зі сполукою № 20: А) метаболічна активність (відсоток) клітин, розрахована відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100% активних; Б) кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

Сполука № 20 в усіх перевірених концентраціях статистично значущо знижувала метаболічну активність клітин – до 20%, хоча концентраційно-залежне зниження вказаного ефекту теж прослідковувалось. Зниження метаболічної активності супроводжувалось статистично значущим зниженням і загальної кількості адгезованих клітин у всіх – за виключенням 10-8 М – концентраціях. Тобто можна розглядати сполуку №20 як таку, що справляє певний токсичний вплив на культуру інтактних клітин МА-104 у всьому діапазоні досліджених концентрацій, включаючи наномолярні.

Інтегральним показником впливу дослідженого ряду сполук ізофлавоноїдів на життєздатність культури клітин є їх індекс метаболічної активації (ІМА). Вказаний показник розраховували як описано у розділі 2, п.2.11. отримані результати представлено у табл. 3.1. З метою більш чіткого прослідкування взаємозв'язку між ІМА та цитодеструктивним ефектом наведено дані загальної кількості адгезованих клітин.

Таблиця 3.1.

ІМА та відсоток адгезованих клітин МА-104 через 24 год контакту з дослідженими сполуками ізофлавоноїдного ряду

Номер сполуки	Концентрація, М			
	10-6	10-7	10-8	10-9
5	0,9 / 106	0,9 / 113	0,9 / 106	0,9 / 97
7	0,9 / 99	1,0 / 90	1,0 / 97	0,9 / 97
8	0,9 / 104	0,9 / 105	1,2 / 73	1,0 / 83
9	1,0 / 104	1,1 / 85	1,2 / 81	0,9 / 94
10	0,9 / 110	1,1 / 94	1,1 / 89	0,9 / 93
11	1,1 / 71	1,0 / 92	1,2 / 85	1,8 / 64
13	1,2 / 71	1,1 / 83	1,1 / 90	0,4 / 110
16	1,0 / 88	1,5 / 62	1,2 / 87	1,6 / 61
18	1,2 / 64	1,9 / 45	1,3 / 88	1,2 / 77

20	0,9 / 82	1,3 / 70	1,0 / 94	1,2 / 78
κDMSO	1,3 / 50	1,1 / 67	1,2 / 70	1,3 / 73

Примітка. Дані представлено як ІМА, а через риску – відсоток адгезованих клітин. ІМА контрольних інтактних клітин становить 1,0, а кількість адгезованих інтактних клітин прийнята за 100%.

На основі вищевказаних даних, було розраховано індекс метаболічної активації клітин під впливом сполук ізофлавоноїдного ряду шляхом відношення відсотку метаболічної активності клітин до відсотку адгезованих клітин (табл.3.1).

Звідси можна зробити такі висновки:

- 1) Клітини з доданим ДМСО мають вищий індекс метаболічної активації порівнянно з контролем клітин.
- 2) сполука №5 має пригнічуючий вплив на показники неспецифічного антивірусного захисту в усіх вибраних концентраціях;
- 3) сполука №7 дещо знижує індекс метаболічної активації клітин в концентрації 10^{-6} та 10^{-9} М та не впливає в проміжних концентраціях;
- 4) сполука №8 проявляє позитивний вплив на індекс метаболічної активації клітин тільки в концентрації 10^{-8} М, в інших дещо знижує або не впливає на індекс.
- 5) сполука №9 або не впливає або підвищує індекс метаболічної активації клітин порівнянно з контролем клітин в усіх концентраціях крім 10^{-9} М – проявляє дещо пригнічуючий вплив.
- 6) сполука №10 дещо знижує індекс метаболічної активації клітин в концентрації 10^{-6} та 10^{-9} М та навпаки підвищує його в проміжних концентраціях;
- 7) сполука №11 загалом проявила позитивний вплив на показники неспецифічного антивірусного захисту в усіх вибраних концентраціях

- 8) сполука №13 мала прямопропорційну залежність впливу на індекс метаболічної активації клітин від концентрації речовини. При цьому в концентрації 10^{-9} М індекс знизився більше ніж в два рази.
- 9) сполука №16 суттєво впливає на індекс метаболічної активації клітин в концентраціях від 10^{-7} до 10^{-9} М підвищуючи його, при цьому в концентрації 10^{-6} М індекс залишається на рівні контролю клітин.
- 10) сполука №18 також підвищує індекс метаболічної активації клітин в усіх перевірених концентраціях, особливо високий вплив порівняно з контролем клітин проявила концентрація 10^{-7} М – $I=1,9$.
- 11) сполука №20 проявляє пригнічуючий ефект стосовно індексу метаболічної активації клітин в концентрації 10^{-6} М, який не тільки зникає в наступних концентраціях, а й навпаки з'являється стимулюючий ефект.

Отже, що найкраще на клітини впливають майже всі вибрані сполуки в концентраціях 10^{-7} та 10^{-8} М. Сполука №5 ізофлавоноїдного ряду мала негативний вплив на індекс метаболічної активації клітин в усіх концентраціях

3.3. Антивірусні властивості ізофлавоноїдів

Для отримання числових значень показника, що відображає здатність ряду сполук ізофлавоноїдів формувати у клітин стан антивірусної резистентності, проведене фотоколориметричне вимірювання оптичної густини лунок та розрахунок відсотку живих клітин в кожній лунці відносно контрольних інтактних клітин, прийнятих за 100%, та на основі цього побудовано наступні графіки.

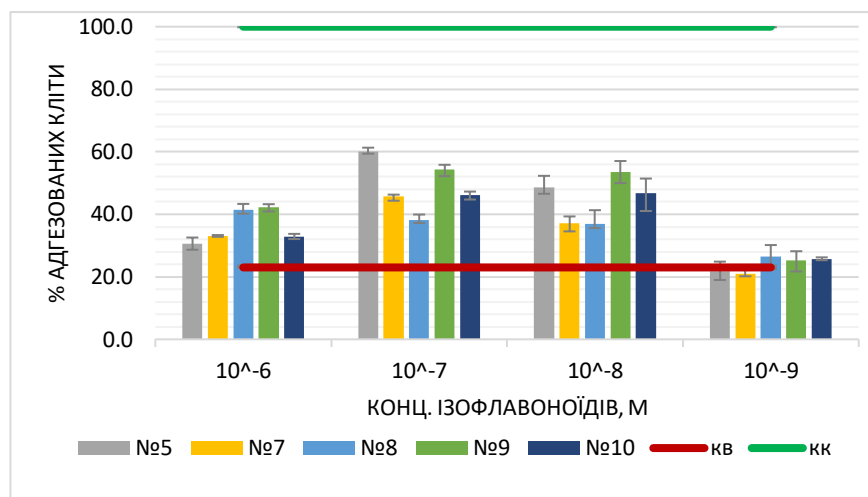


Рис.3.11. Життєздатність клітин МА-104 інфікованих ВВС, після їх попереднього 24 год контакту з різними концентраціями сполук ізофлавоноїдного ряду, кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

На графіках показано, що дані сполуки не мають дуже високого антивірусного ефекту, проте сполуки №5 та 9 в концентраціях 10^{-7} та 10^{-8} М проявили антивірусний захист більше 50% відносно контролю вірусу.

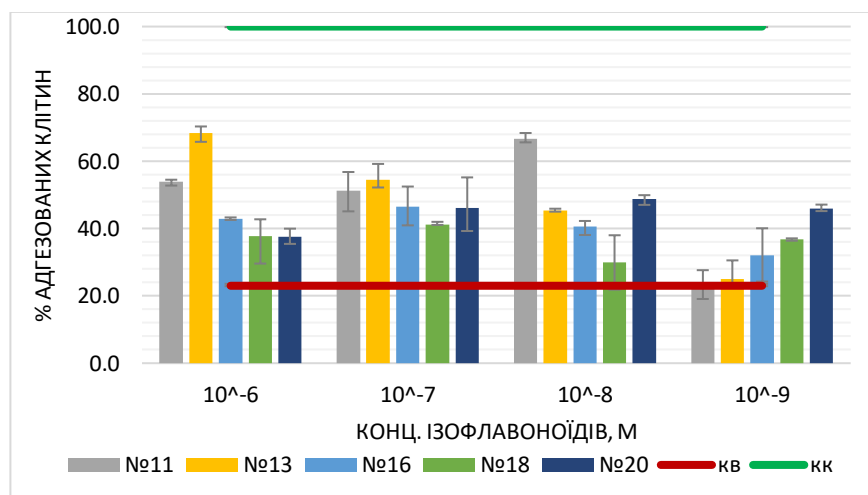


Рис.3.12. Життєздатність клітин МА-104 інфікованих ВВС, після їх попереднього 24 год контакту з різними концентраціями сполук ізофлавоноїдного ряду, кількість (відсоток) адгезованих клітин, розрахована відносно інтактних, прийнятих за 100% адгезованих.

Всі сполуки ізофлавоноїдного ряду з №11 по 20 мали антивірусний захист вище 50%. При цьому сполуки №13 захищала клітини МА-104 більше ніж на 60% відносно контролю вірусу.

3.4. Інтерферон-індукуюча активність сполук ізофлавоноїдного ряду

Наявність у середовищі культивування клітин речовин, здатних активувати їх неспецифічну реактивність, провокує клітини до секреції прозапальних цитокінів: ІФН I типу, фактору некрозу пухлин та ін. Взята у дослідження культура клітин МА-104 за походженням є епітеліальною, тобто здатною до продукції ІФН, насамперед ІФН- λ , який, як і ІФН I типу, характеризується здатністю забезпечувати формування у клітин стану антивірусної резистентності. Визначення присутності у кондиціонованому клітинами МА-104 середовищі речовин з ІФН-подібною активністю визначали як описано у розділі 2, п.2.8. Антивірусну активність кондиціонованого клітинами МА-104 середовища за умови їх 24 год контакту з відповідними розведеннями ряду сполук ізофлавоноїдів визначали в тій же ж модельній системі, яка була застосована для вивчення антивірусної активності власне досліджених сполук за профілактичною схемою. Отримані результати відсотку життєздатності клітин МА-104, оброблених різними концентраціями кондиціонованого середовища представлені у табл.3.3.

Таблиця 3.2.

**Життєздатність клітин МА-104, оброблених різними
концентраціями кондиціонованим клітинами МА-104 середовищем
протягом 24 год контакту з досліджуваними сполуками**

Номер сполуки		5				11			
Концентрація, М		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Кратність	1/3	10	22	53	81	70	49	60	44
розтитровки	1/6	36	24	64	74	44	65	20	26
кондиціонованого	1/12	71	58	89	78	17	51	66	46
середовища	1/24	68	85	58	65	17	91	39	60
Номер сполуки		7				13			
Концентрація, М		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Кратність	1/3	42	0	71	86	60	87	38	33
розтитровки	1/6	37	23	64	82	56	63	52	60
кондиціонованого	1/12	60	44	79	92	48	56	66	47
середовища	1/24	79	41	72	76	32	48	48	47
Номер сполуки		8				16			
Концентрація, М		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Кратність	1/3	76	20	71	91	62	87	63	94
розтитровки	1/6	29	18	87	91	81	96	45	68
кондиціонованого	1/12	108	97	74	85	80	102	55	68
середовища	1/24	81	63	69	79	59	66	52	66
Номер сполуки		9				18			
Концентрація, М		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Кратність	1/3	21	31	52	70	52	81	87	74
розтитровки	1/6	52	59	93	69	98	90	84	90
кондиціонованого	1/12	82	89	69	89	95	68	69	60
середовища	1/24	71	94	61	75	89	70	97	84
Номер сполуки		10				20			
Концентрація, М		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Кратність	1/3	34	29	93	96	84	63	86	63
розтитровки	1/6	83	80	68	115	78	78	67	83
кондиціонованого	1/12	74	109	91	112	71	99	70	54
середовища	1/24	100	102	87	70	72	86	64	57

Примітка. Результати представлено як відсоток живих адгезованих клітин в експериментальних лунках розрахованих відносно контрольних інтактних клітин, прийнятих за 100% живих та контрольних вірусінфікованих, прийнятих за 0% живих.

Оскільки титр ІФН визначається як величина, обернена до максимального розведення тест-зразка, що забезпечує виживаність 50% клітин моношару, в табл. 3.2. сірим виділено вказані діапазони на підставі яких зроблено висновок про титр ІФН у зразках. Слід зазначити, що паралельно із визначенням наявності ІФН у кондиціонованому клітинному середовищі визначали титр референс-препарату ІФН відносно якого визначали кількість ІФН у зразках. Отримані результати представлені у табл. 3.3.

Таблиця 3.3.

Титр та кількість ІФН в кондиціонованому клітинами МА-104 середовищі через 24 год контакту з різними концентраціями досліджуваних сполук

Концентрація сполук, М	Номер сполуки										Титр ІФН
	5	7	8	9	10	11	13	16	18	20	
10 ⁻⁶	>24	>24	>24	>24	>24	5	10	>24	>24	10	20
10 ⁻⁷	>24	>24	>24	>24	>24	>24	10	>24	>24	10	
10 ⁻⁸	>24	>24	>24	>24	>24	16	10	>24	>24	10	
10 ⁻⁹	>24	>24	>24	>24	>24	>24	10	>24	>24	10	
Кількість ІФН, МО/мл	192	192	192	192	192	96	80	192	192	80	250

Сполуки №13 та №20 мали найнижчий титр – 10, у речовини №11 титр змінювався в залежності від використаної концентрації та був найвищим у мінімальній вивченій – 10⁻⁹ М, у всіх інших сполук титр ІФН – вище 24 (максимальне досліджене розведення тестованого кондиціонованого середовища).

Таким чином, було перевірено ряд ізофлавоноїдних сполук на наявність антивірусного захисту в кондиціонованому клітинами МА-104 середовищі після 24 годинного контакту з цими сполуками за умови внесення до культури клітин МА-104 за 24 год до інфікування ВВС.

Загалом, слід відзначити, що 24 год контакт клітин МА-104 з дослідженим рядом сполук ізофлавоноїдів супроводжується їх продукцією у кондиціоноване середовище значущих кількостей ІФН. Найбільш ефективними були сполуки № 5, 7-10, 16 та 18. Виявлена певна цитотоксичність у мінімальних розведеннях отриманих зразків може свідчити як про присутність високих кількостей ІФН у складі кондиціонованого середовища, так і про можливість присутності у його складі ще одного прозапального цитокіну – фактору некрозу пухлин.

3.5. Обговорення результатів

Таким чином, було проведено скринінгове дослідження в ряду хімічно синтезованих аналогів природніх сполук ізофлавоноїдів для виявлення їх здатності впливати на стан неспецифічної активіруваної резистентності в умовах *in vitro* за профілактичною схемою та перевірити їхній вплив на показники активіруваної резистентності. В роботі було використано хімічно синтезовані похідні ізофлавоноїдів – речовин природнього походження. Робота з хімічно синтезованими сполуками дозволяє забезпечувати їх чітке дозування та уникнення впливу можливих сторонніх складових, що є у складі рослинної сировини, загалом – задля стандартизації отриманих результатів.

У попередніх дослідженнях на іншій модельній системі – культура клітин ST/BBC – було проведено скринінгове визначення активіруваної активності більш, ніж 20 сполук ізофлавоноїдного ряду за профілактичною схемою, включаючи взяті у дане дослідження сполуки, та було зроблено висновок, що сполуки №№ 5, 11, 16, 18 та 20 реалізують певний активірувальний ефект. Виходячи із отриманих результатів було висунуте припущення щодо їх можливої ефективності і за лікувальної схеми застосування. Але проведений експеримент на модельній системі МА-104/BBC не підтвердив вказане припущення: за лікувальної схеми

застосування (внесення сполук до клітин через 40 хв після їх інфікування ВВС) дані сполуки не забезпечували захист клітин від цитопатичної дії вірусу.

Перевіряючи вплив вибраних сполук ізофлавоноїдного ряду на показники метаболічної активації клітин було вивчено і вплив власне їх розчинника – DMSO, задля достовірності отриманих результатів впливу сполук. Внесення тільки DMSO супроводжувалось суттєвим зниженням і метаболічної активності, і загальної кількості клітин у максимальній дослідженій концентрації. Зменшення такого впливу було прямо пропорційне дозі. У складі речовин токсичний ефект DMSO практично не був вираженим. Можливим поясненням виявленого ефекту може бути взаємодія DMSO безпосередньо з тест-сполуками, що певним чином супроводжується зменшенням ймовірності його взаємодії із мембраною клітин, і, як наслідок, впливу на їх морфологію та фізіологічний стан.

Відомо, що вірусний інфекційний процес є дуже чутливим до змін метаболізму клітин організму, які підтримують життєдіяльність та реплікацію вірусу. І дегідрогенази відіграють у цьому процесі вірус-клітинної взаємодії важливу роль. Відомо, що дегідрогенази можуть впливати на метаболізм глюкози та жирів у клітинах хазяїна, що змінює енергозабезпечення вірус інфікованих клітин. Деякі дегідрогенази також можуть брати участь у синтезі нуклеотидів, які є будівельними блоками для реплікації вірусної РНК та ДНК. Крім того, дегідрогенази можуть відігравати певну роль у захисті клітин від стресу, спричиненого вірусною інфекцією. Наприклад, дегідрогеназа NADPH може забезпечити клітинний антиоксидантний захист від вільних радикалів, що продукуються під час інфекції [46].

Саме тому отримані результати вивчення метаболічної активності клітин під впливом сполук ізофлавоноїдного ряду з врахуванням загальної кількості адгезованих клітин та визначення інтегрального показника – ІМА дозволили виявити такі, які характеризувались високими значеннями ІМА у всіх

досліджених концентраціях – сполука 18, а також сполука 16. З іншого боку, сполука №5 знижувала показник ІМА в усіх досліджених концентраціях. Визначено, що оптимальними є концентрації сполук 10^{-7} та 10^{-8} М.

Отримані результати можна пояснити впливом досліджених сполук на активність внутрішньоклітинних метаболічних процесів (активацією клітинних дегідрогеназ і, насамперед, мітохондріальних), що є невід’ємною складовою неспецифічного антивірусного захисту.

Вивчення антивірусних властивостей сполук ізофлавоноїдного ряду за профілактичної схеми в модельній системі МА-104/VBC частково підтвердило отримані результати антивірусної активності в модельній системі – культура клітин ST/VBC.

Через те, що дані сполуки проявили антивірусний ефект за профілактичної схеми внесення до клітин, важливим було визначити вклад у вказаний результат факту можливої активації неспецифічної клітинної відповіді, зокрема – системи ІФН. Визначення ІФН-індукуючої властивості сполук проводили аналізуючи наявність ІФН у кондиціонованому клітинами МА-104 середовищі (тривалість контакту клітин зі сполуками – протягом 24 год). Зазвичай, в діагностичній лабораторній практиці найбільш поширеним методом визначення ІФН є метод ІФА, але для виявлення ІФН, продукованого клітинами нирки мавпи – МА-104 – відповідні тест системи є недоступними. Окрім того, найбільш показовим з точки зору виявлення біологічної активності ІФН є біологічний метод, в основу якого покладено здатність середовища, кондиціонованого клітинами МА-104 протягом 24 год контакту зі сполуками, формувати у інтактних клітин стан антивірусної резистентності. Показано, що під впливом усіх досліджених сполук в кондиціонованому середовищі присутній ІФН. Найменш активними серед досліджених сполук визначено сполуки №13, №20 (титр ІФН – 10), та сполука №11 – титр ІФН 12, тоді як у всіх інших сполуках титр ІФН вище 24 (граничне розведення тестованого середовища). Загалом, контакт клітин МА-104 з дослідженими сполуками ізофлавоноїдів протягом 24 годин

супроводжується продукцією значної кількості ІФН в середовище. Найбільш ефективними є сполуки №№ 5, 7, 8, 9, 10, 16 та 18.

Слід зазначити, що отримані результати ІФН-індукуючої активності та показника ІМА не є взаємопов'язаними. Сполука №5, яка характеризувалась ІМА, що був нижчим такого контрольних клітин та сполуки №№16 та, особливо, 18, які мали суттєво вищий ІМА, ніж у контрольних інтактних клітин, запускають екскрецію клітинами суттєвих кількостей ІФН. Цитотоксичність, виявлена у мінімальних розведеннях ряду отриманих зразків кондиціонованого середовища, може бути як свідченням наявності високих рівнів ІФН, так і про можливу присутність ще одного прозапального цитокіну – фактору некрозу пухлин.

Отже, завданням нашої роботи було вивчення впливу ряду сполук похідних ізофлавоноїдів на формування стану антивірусної резистентності у клітин, зокрема, активації неспецифічної ланки імунної відповіді. Отримані результати свідчать, що досить широкий спектр досліджених сполук похідних ізофлавоноїдів здатен активувати внутрішньоклітинні метаболічні процеси, викликати стан антивірусної резистентності у клітинах та стимулювати екскрецію ІФН. Тому, оскільки ці речовини проявили антивірусну активність в умовах *in vitro*, наступною задачею вивчення сполук такого ряду є дослідження їх антивірусної ефективності в умовах *in vivo*.

ВИСНОВКИ

1. Проведено скринінгове дослідження в ряду хімічно синтезованих аналогів природніх сполук ізофлавоноїдів з метою виявлення антивірусних властивостей в системі *in vitro* за профілактичною схемою та перевірено їх вплив на показники антивірусної резистентності.

2. Вперше показано, що розчинник сполук DMSO суттєво підвищує індекс метаболічної активації клітин, тоді як у складі розведень сполук такий ефект є статистично значущо нижчий, або взагалі відсутній.

3. Серед досліджених сполук ізофлавоноїдного ряду за умови профілактичного застосування виявлено антивірусні властивості у сполук №5, 9, та №11-20.

4. Показано, що оптимальними концентраціями сполук, які впливають на стабільність індекса метаболічної активації клітин, є 10^{-7} та 10^{-8} М. Сполуки №16 та 18 мають найвищий індекс метаболічної активації. Сполука №5 ізофлавоноїдного ряду мала негативний вплив на індекс метаболічної активації клітин в усіх концентраціях.

5. Біологічним способом визначено здатність сполук ізофлавоноїдного ряду - індукувати ІФН в умовах *in vitro*. Сполуки №13 та №20 мають титр ІФН 10, а сполука №11 - 12, тоді як у всіх інших сполуках титр перевищує 24, що відповідає 80, 96 та 192 МО/мл.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rusznyak S. P., Szent-Gyorgyi A. (1936). Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature*, 138, 27.
2. Constant J. (1997). Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Coronary Arteries Disease*, 10, 643-649.
3. Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 19-34.
4. Попова Л. Н., Сорина И. В., Крысин А. П. и др. (1997). Фенольные антиоксиданты и их использование: Сб. аналитических обзоров / СО РАН. ИОХ, ГПНТБ; науч.ред. к.х.н. В.С.Кобрин. Новосибирск, 68 с.
5. Barz W., Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H. (1975). *The Flavonoids*. New York: Acad. Press.
6. Flavonoids. (n.d.). Retrieved from.
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/408/flavonoidi>
7. Birt D., Hendrich S., Wang W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 90, 157-177.
8. Arai Y., Watanabe S., Kimura M. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *Journal of Nutrition*, 130, 2243-2250.
9. Committee on Toxicity Phytoestrogens and Health: COT Report. (accessed on 25 July 2008).
10. Dixon, R. A. (2003). Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. *Plant Physiology*, 131, 878-885.
11. Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., & Kašparovský, T. (2019). Isoflavones. *Molecules*, 24, 1076.
12. Norton, R. (1999). Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus favus* by anthocyanidins and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1230-1235

-
13. Ahmed, Q. U., Ali, A. H. M., Mukhtar, S., Alsharif, M. A., Parveen, H., Sabere, A. S. M., ... Alhassan, A. M. (2020). Medicinal Potential of Isoflavonoids: Polyphenols That May Cure Diabetes. *Molecules*, 25(23), 5491.
 14. Birt, D., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 157-177.
 15. Chen, L.-R., & Chen, K.-H. (2021). Utilization of Isoflavones in Soybeans for Women with Menopausal Syndrome: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3212.
 16. Smith, B. N., & Dilger, R. N. (2018). Immunomodulatory potential of dietary soybean-derived isoflavones and saponins in pigs. *Journal of Animal Science*, 96(4), 1288-1304.
 17. Andres, A., Donovan, S. M., & Kuhlenschmidt, M. S. (2009). Soy isoflavones and virus infections. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(8), 563-569.
 18. Sadowska-Krowicka, H., Mannick, E. E., Oliver, P. D., Sandoval, M., Zhang, X. J., Eloby-Childess, S., et al. (1998). Genistein and gut inflammation: role of nitric oxide. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 217, 351-357.
 19. Baxa, D. M., & Yoshimura, F. K. (2003). Genistein reduces NF-kappa B in T lymphoma cells via a caspase-mediated cleavage of I kappa B alpha. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1009-1018.
 20. Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., & Rouille, Y. (2005). Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 79, 10826-10829.
 21. Robin V., Irurzun A., Amoros M., Boustie J., Carrasco L. (2001). Antipoliavirus flavonoids from *Psiadia dentata*. *Antiviral Chem Chemother*, 12, 283-291.
 22. Kim S.Y., Kim D.H., Hyun J.W., Henson J.W., Kim H.S. (2006). Irisolidone, an isoflavone metabolite, represses JC virus gene expression via inhibition of Sp1

binding in human glial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 344, 3-8.

23. Liu A.L., Wang H.D., Lee S.M., Wang Y.T., Du G.H. (2008). Structure–activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg Med Chem*, 16, 7141-7147.

24. Pelkmans L., Puntener D., Helenius A. (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, 296, 535-539.

25. Evers D.L., Chao C.F., Wang X., Zhang Z., Huong S.M., Huang E.S. (2005). Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res*, 68, 124-134.

26. Kubo Y., Ishimoto A., Amanuma H. (2003). Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, suppresses the fusogenicity of Moloney murine leukemia virus envelope protein in XC cells. *Arch Virol*, 148, 1899-1914.

27. Li E., Stupack D.G., Brown S.L., Klemke R., Schlaepfer D.D., Nemerow G.R. (2000). Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry. *J Biol Chem*, 275, 14729-14735.

28. Hiang L.C., Chiang W., Liu M.C., Lin C.C. (2003). In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids *J Antimicrob Chemother*, 52, 194-198.

29. Lyu S.Y., Rhim J.Y., Park W.B. (2005). Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch Pharm Res*, 28, 1293-1301.

30. Aline Andresa , Sharon M. Donovan^{b,c}, Mark S. Kuhlenschmidt. (2009). Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 563–569.

31. Wang, W., Jin, Y., Zeng, N., Ruan, Q., & Qian, F. (2017). SOD2 Facilitates the Antiviral Innate Immune Response by Scavenging Reactive Oxygen Species. *Viral Immunology*, 30(8), 582–589.

32. Lowery, S. A., Sariol, A., & Perlman, S. (2021). Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. *Cell Host*

& *Microbe*, 29(7), 1052–1062.

33. Shao, X., Ma, J., Jia, S., Yang, L., Wang, W., & Jin, Z. (2017). Interleukin-35 Suppresses Antiviral Immune Response in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.

34. S. Pestka. (2007). Purification and Cloning of Interferon Alpha.

35. Hecht, T. T., & Summers, D. F. (1976). Interactions of vesicular stomatitis virus with murine cell surface antigens. *Journal of Virology*, 19, 833-845..

36. Liu, G., Cao, W., Salawudeen, A., Zhu, W., Emeterio, K., Safronetz, D., & Banadyga, L. (2021). Vesicular stomatitis virus: From agricultural pathogen to vaccine vector. *Pathogens*, 10(9), 1092.

37. Clarke, D. K., Nasar, F., Lee, M., Johnson, J. E., Wright, K., Calderon, P., ... Udem, S. A. (2006). Synergistic attenuation of vesicular stomatitis virus by combination of specific G gene truncations and N gene translocations. *Journal of Virology*, 81(4), 2056–2064.

38. Wertz, G. W. (2009). Replication of vesicular stomatitis virus defective interfering particle RNA in vitro: transition from synthesis of defective interfering leader RNA to synthesis of full-length defective interfering RNA. *Journal of Virology*, 83(5), 513-522.

39. Saotome, K., Morita, H., & Umeda, M. (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro*, 3(4), 317–321.

40. Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 251-258.

41. Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Bielawski, K., Dziubek, K., Miltyk, W., ... Filipczak, N. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS ONE*, 11(5), e0155772.

42. Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same

cells. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 251-258.

43. Holland, J. J., & McLaren, L. C. (1959). Improved method for staining cell monolayers for virus plaque counts. *Journal of Bacteriology*, 78(4), 596-597.

44. Порядок видачі дозволу на використання і впровадження у виробництво ЛЗ. (1996). *Фармакологічний вісник*, (1), 12-20.

45. Ван-дер-Варден, Б. (1960). *Математическая статистика*. М.: Изд-во иностр. лит., 93 с.

46. Sheppard, S., Santosa, E. K., Lau, C. M., Violante, S., Giovanelli, P., Kim, H., ... Sun, J. C. (2021). Lactate dehydrogenase A-dependent aerobic glycolysis promotes natural killer cell anti-viral and anti-tumor function. *Cell Reports*, 35(9), 109210.