

## კამელინის თაფლის ექსტრაქტის ანტივირუსული ეფექტი SARS-CoV-2-ის წინააღმდეგ

ლილია კალედიენე [Lilija Kalediene] [1], მარიანა ბაზი [Mariana Baz] [2], აურა ლიუბავიკიუტე [Aura Liubaviciute] [3,4], ჯინი ბიზიულევიჩიენი [Gene Biziuleviciene] [4], ინგრიდა გრაბაუსკიტე [Ingrida Grabauskyte] [5], რუტა ბიელიასკიენი [Ruta Bieliauskiene] [6], პაულიუს ჯოვაისას [Paulius Jovaisas] [6], ნიდას ჯურჯონასი [Nidas Jurjonas] [7] \*

[1] ვილნიუსის უნივერსიტეტის სიცოცხლის მეცნიერებების ცენტრის მიკრობიოლოგიისა და ბიოტექნოლოგიის დეპარტამენტი, ლიეტუვა.

[2] ინფექციური დაავადებების კვლევითი ცენტრი, ქვებეკ-ლავალის უნივერსიტეტის CHU, ქალაქი ქვებეკი, QC, კანადა

[3] ფარმაციის ცენტრი, ბიოსამედიცინო მეცნიერებების ინსტიტუტი, მედიცინის ფაკულტეტი, ვილნიუსის უნივერსიტეტი, ლიეტუვა.

[4] ინოვაციური მედიცინის სახელმწიფო კვლევითი ინსტიტუტის ბიომოდულების დეპარტამენტი, ვილნიუსი, ლიეტუვა.

[5] ლიეტუვის ჯანდაცვის მეცნიერებების უნივერსიტეტის ფიზიკის, მათემატიკისა და ბიოფიზიკის დეპარტამენტი, კაუნასი, ლიეტუვა.

[6] UAB "Silicio Biotechnologijos", ვილნიუსი, ლიეტუვა.

[7] UAB "Guruma", კაუნასი, ლიეტუვა.

### აბსტრაქტი

ამ კვლევის მიზანია, შეაფასოს „კამელინის“ თაფლის ექსტრაქტის პოტენციური ანტივირუსული ეფექტები მძიმე მწვავე რესპირატორული სინდრომის კორონავირუს 2-ის (SARS-CoV-2) წინააღმდეგ. ჩვილი ზაზუნას თირკმლის უჯრედოვანი ფენა 21 (BHK-21), ძვლის ტვინიდან წარმოქმნილი ჰემატოპოეზური ლეროვანი უჯრედები (HSCs), და ელენთის უჯრედები გამოყენებულ იქნა კამელინის ციტოტოქსიკურობის შეფასებისთვის. იზოლირების პროცედურების შემდეგ, უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობა შეფასდა ტრიპანის ლურჯი საღებავის გამორეცხვით მიკროსკოპის ქვეშ, ჰემოციტომეტრის გამოყენებით. ინ-ვიტრო უჯრედის ზრდის სიჩქარე განისაზღვრა Kit 8 უჯრედის თვლის (CCK-8) ანალიზით. უჯრედები დაითესა ზრდის ნიადაგზე კამელინის სხვადასხვა კონცენტრაციით (35 მკგ, 50 მკგ, 70 მკგ, 100 მკგ, 150 მკგ, და 200 მკგ). აბსორბაცია 450 ნმ-ზე განისაზღვრა მრავლობითი წამკითხველის მეშვეობით. ანტივირუსული ეფექტი შეფასდა ფოლაქოვანი რედუქციის ანალიზით, პრეპარატის SARS-CoV-2-ის მიმართ მგრძობელობის დასადგენად. შერჩეული კომპონენტების სერიული განზავება პრე-ინკუბირებული იყო 40-დან 100-მდე SARS-CoV-2-

ის ფოლაქის წარმომქმნელი ერთეულებით (PFUs). შემდეგ დაემატა კამელინისა და SARS-CoV-2-ის პრე-ინკუბირებული ნარევი შერწყმად Vero E6 უჯრედებს, მას შემდეგ, რაც მოხდა ინკუბირებული უჯრედების დაფიქსირება და შეღებვა და PFU-ების რაოდენობის დათვლა ინვერსიული მიკროსკოპის ქვეშ და გაკეთდა ანტივირუსული კონცენტრაციების ლოგარითმული გრაფიკები. ჩვენმა კვლევამ აჩვენა, რომ კამელინი არაა ციტოტოქსიკური, აქვს უჯრედების პროლიფერაციაზე მასტიმულირებელი ზემოქმედება, და SARS-CoV-2-ის წინააღმდეგ მაინჰიბირებელი ეფექტი EC50-ით (ნახევრად მაქსიმალური ეფექტური კონცენტრაცია) 85.7 მკგ/მლ-დან 192.4 მკგ/მლ-მდე, პროდუქტის კონცენტრაციისა და ვირუსული ფოლაქის მიხედვით თითოეულ უჯრედში.

## შესავალი

ამჟამად მიმდინარე პანდემიამ აჩვენა, რომ არსებობს უზარმაზარი მოთხოვნა COVID-19-ის წინააღმდეგ ყველა შესაძლო მკურნალობისა და პრევენციის მიდგომის მიმართ, არსებული ბუნებრივი პროდუქტების ჩათვლით. სხვადასხვა ორგანული კომპონენტი, ფუტკრის თაფლის, პროპოლისის, სამეფო ჟელეს, კურკუმას, რესვერატროლის ჩათვლით, ფართოდ შეისწავლება და გამოიყენება, როგორც პოტენციური სამკურნალო ვარიანტი, სხვადასხვა ინფექციის წინააღმდეგ [1]. ბოლო წლების განმავლობაში, თანამედროვე მედიცინის კრიტიკის მიუხედავად, თაფლი დიდ ყურადღებას იქცევს მისი თერაპიული თვისებების ფართო დიაპაზონის გამო, ანტიმიკრობული, ანთების საწინააღმდეგო და ანტივირუსული აქტივობის ჩათვლით [2, 3]. მკვლევარებმა აღწერეს სხვადასხვა ფიტოქიმიური ფაქტორების, როგორებიცაა წყალბადის ზეჟანგი, აქროლვადი ორგანული მჟავები, ლისოზიმი, გლიკოზას ოქსიდაზა, კატალაზა, როგორც ეფექტური ანტიბაქტერიული ფაქტორები [4]. ფუტკრის ცვილი, ყვავილის მტვერი და პროპოლისის მნიშვნელოვან ქიმიურ კომპონენტებს წარმოადგენენ, რომლებიც თაფლს ანტიმიკრობულ თვისებებს ანიჭებენ [5, 6]. თაფლი შეიცავს ოლიგოსაქარიდებს მცირე რაოდენობით, რათა მოხდინოს ისეთი სხვადასხვა მიკრობების ზრდის ინჰიბირება, როგორებიცაა ნაწლავის ბაქტერიები [7]. თაფლის, პროპოლისისა და სამეფო ჟელეს ფენოლური კომპონენტები, ფლავანოიდების ჩათვლით მიეკუთვნება ბიოლოგიურად აქტიურ მოლეკულებს, რომლებიც ახდენენ ანტიმიკრობული ეფექტების დემონსტრირებას [8, 9]. ეს ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორები თაფლს უნიკალურ თვისებებს ანიჭებს. განსაზღვრულია, რომ თაფლი ახდენს ჭრილობის ინფექციების ელიმინირებას, ახდენს ნაწიბურის წარმოქმნის მინიმუმამდე დაყვანას, ამცირებს ანთებას, ახდენს ანგიოგენეზის და ეპითელიუმის ზრდის სტიმულირებას [10]. თაფლის ანთების საწინააღმდეგო აქტივობამ აჩვენა ციტოკინების ექსპრესიის ინჰიბირება [11]. ცნობილია, რომ თაფლს შეუძლია გააუმჯობესოს T და B ლიმფოციტების პროლიფერაცია, მოახდინოს ფაგოციტოზის სტიმულირება, და დაარეგულიროს მონოციტებიდან ისეთი ციტოკინების წარმოქმნა, როგორებიცაა სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორი (TNF), ინტერლეიკინ 1 ბეტა (IL-1 $\beta$ ), და IL-6 [12]. განისაზღვრა, რომ თაფლი და მისი რამდენიმე კომპონენტი ახდენს კოლინჯის სიმსივნის უჯრედების ამონაფენის უჯრედული ციკლის ბლოკირებას, G0/G1 ფაზაში [13, 14].

ინ-ვიტრო კვლევებმა აჩვენა თაფლის ანტივირუსული აქტივობა ვირუსების სხვადასხვა ტიპების მიმართ [15-17]. თაფლის ანტივირუსული ეფექტი უკავშირდება მის სხვადასხვა ინგრედიენტს, კერძოდ, სპილენძს, რომელიც წარმოადგენს თაფლის კვალის ელემენტს, რომელიც ახდენს ვირუსების ინაქტივირებას. ფენოლურის კომპონენტები, როგორებიცაა ფლავანოიდები, ასკორბინის მჟავა ან წყალბადის ზეჟანგი, იწვევს ვირუსული ზრდის ინჰიბირებას, ვირუსული ტრანსკრიპციის, ტრანსლაციისა და რეპლიკაციის შეწყვეტის გზით [1], [18], [19]. თაფლის შესაძლო ქმედებისთვის ნათელის მოსაფენად, Watanabe et al.-ის კვლევაში გამოყენებულ იქნა ფოლაქების ინჰიბირების ანალიზები [20]. მოგვახსენეს, რომ მანუკას [Manuka] თაფლის ეფექტურობა ამცირებდა გრიპის ვირუსის რეპლიკაციას ( $EC_{50} = 3.6 \pm 1.2$  მგ/მლ), რომელიც უკავშირდება მის ანტივირუსულ ეფექტებს. მანუკას თაფლის 3.13 მგ/მლ-ში, ზანამივირის ან ოსელტამივირის  $EC_{50}$  შემცირდა 1/1000-მდე, მათი ერთჯერადად გამოყენებისთვის. შედეგებმა აჩვენა, რომ თაფლს აქვს ძლიერი ინჰიბიტორული აქტივობა გრიპის ვირუსის წინააღმდეგ და აჩვენა შესაძლო სამკურნალო ღირებულება, რომელიც მას შეიძლება ჰქონდეს.

რვა ყვავილისგან მიღებული სხვადასხვა თაფლი გაანალიზდა მათი ანტი-აივ-1 აქტივობასთან მიმართებაში, ასევე, მათი ლიმფოციტების პროლიფერაციის მიმართ ეფექტებზე. თაფლის რვა განსხვავებული სახის თაფლის ანტი-აივ-1 აქტივობა შესრულდა რაოდენობრივი პოლიმერაზულ ჯაჭვრული რეაქციის (PCR) მეშვეობით. კვლევამ აჩვენა, რომ თაფლის მონოფლორულ (მცენარის ერთი სახეობის) სახეობას აქვს ანტი-აივ-1 აქტივობა, მცენარის წყაროსა და მცენარეულ ბიომასაში მეთილგლიოქსალის რაოდენობის მიხედვით [21]. Abedi et al.-ის კვლევამ [22] მოგვაწოდა გარკვეული მტკიცებულება თაფლის და მისი კომპონენტების პოტენციური ეფექტების შესახებ კორონავირუსის წინააღმდეგ, მათი შესაძლებლობის გამო, დაარეგულირონ ვირუსის მიკრობა და შესვლა მასპინძელ უჯრედში და რნმ-ის რეპლიკაცია. თაფლს და მის კომპონენტებს ასევე შეუძლიათ დაარეგულირონ უჯრედული სიგნალირების გზები, ოქსიდაციური სტრესის, ანთებისა და აპოპტოზის ჩათვლით. ანტივირუსული აქტივობის ერთ-ერთი მექანიზმია იმ ვირუსული პროტეინების ინჰიბირება, რომლებიც საჭიროა მასპინძელ უჯრედებზე მისაკრობად და შესაღწევად [23]. მითითებულია, რომ თაფლს შეუძლია გავლენა იქონიოს დისულფიდურ ბმებზე ჰემაგლუტინინის ცილის HA რეცეპტორებზე, რომლებიც ხელს უშლის გრიპის ვირუსის მიკრობას მასპინძელი უჯრედის ზედაპირზე. კორონავირუსის სპაიკის ცილა მიეკუთვნება ცილების იმავე კლასის ოჯახს [24]. მოხსენებულია, რომ [25,26] თაფლის ისეთ კომპონენტებს, როგორებიცაა კვერცეტინი, ქრისინი, კაემპფეროლი, გალანგინი, და კოფეინის მჟავა, აქვთ ანტივირუსული აქტივობა COVID-19-ის წინააღმდეგ, ძლიერი შემზოქველი აფინურობის გზით, ძირითად პროტეაზასთან და ვირუსულ რეპლიკაციასთან მიმართებაში. თაფლის ძირითადი კომპონენტები, როგორებიცაა კაემპფეროლი, გალანგინი და კოფეინის მჟავა ახდენენ ვირუსის ადსორბციის, ინვაზიისა და რეპლიკაციის ინჰიბირებას. ქრისინს შეუძლია ვირუსს მასპინძელ უჯრედებში შეღწევის და ვირუსის რეპლიკაციის ინჰიბირებას. გუერცერინს შეუძლია ვირუსის დაფარვის, ინვაზიისა და რეპლიკაციის ინჰიბირება [27-29]. თაფლის პოტენციური ფარმაკოლოგიური ეფექტის ბოლოდროინდელი კვლევები და მიმოხილვითი სტატია [30] აჩვენებენ, რომ თაფლს თაფლს და მის ძირითად კომპონენტებს

აქვთ პოტენციური ეფექტები კორონავირუსული ინფექციის, მათ შორის COVID-19-ის პრევენციასა და მკურნალობაში.

მიუხედავად იმისა, რომ თაფლის ანტიმიკრობული აქტივობები კარგადაა შესწავლილი მრავალი ბაქტერიისა და სოკოს წინააღმდეგ [31] [32], მისი ანტივირუსული აქტივობები ჯერ კიდევ საჭიროებენ გაფართოებულ კვლევებს, რომ იგი შეიძლება გამოყენებულ იქნას სხვადასხვა ვირუსული ინფექციების პრევენციასა და მკურნალობაში. ეს კვლევა მიზნად ისახავს კამელინის თაფლის ექსტრაქტის ანტივირუსული ეფექტების შეფასებისთვის, მძიმე მწვავე რესპირატორული სინდრომის კორონავირუსის 2 (SARS-CoV-2) წინააღმდეგ.

#### მასალები და მეთოდები

კომერციული პროდუქტის - კამელინის ამპულები, რომლებიც მიღებულია სს „სილიკონ ბიოტექნოლოგიის“ მხრიდან, დამზადებულია შერჩეული თაფლის ექსტრაქტისგან. ამპულის შიგთავსი შედგება 35% კამელინისა და 65% საინექციო წყლისგან. კამელინი შეიცავს კეტონებს, ეთერებს, ბიოორგანულ მჟავებს, ფენოლებს, ალდეჰიდებს და ფურფუროლს. ციტოტოქსიკურობისა და ანტივირუსული ანალიზებისთვის, კამელინი განზავდა საბოლოო კონცენტრაციისთვის 10 მკგ/მლ-დან 2500 მკგ/მლ-მდე.

#### ექსპერიმენტული ცხოველები

ექვსი კვირის ასაკის BALB/c თაგვები (n=3) გამოყვანილ და განთავსებულ იქნა გამსოაყვან დაწესებულებაში სახელმწიფო კვლევითი ინსტიტუტის ინოვაციური მედიცინის ცენტრში (ლიეტუვა). ყველა პროცედურა ჩატარდა ევროკავშირის ინსტიტუციური გაიდლაინების მიხედვით და დამტკიცდა ლიეტუვის ლაბორატორიული ცხოველების გამოყენების ეთიკის კომიტეტის მიერ, სახელმწიფო ვეტერინარული სერვისის N G2-124 მიერ (2019.07.11). ცხოველები იმყოფებოდნენ კონტროლირებული ტემპერატურის მქონე გარემოში ( $23 \pm 1$  °C). საკვები და სასმელი მიეწოდებოდათ შეზღუდვების გარეშე.

#### უჯრედების მომზადება

ჩვილი ზაზუნას თირკმლის უჯრედის ფენა 21 (BHK-21) მოპოვებულ იქნა ვილნიუსის უნივერსიტეტის სიცოცხლის მეცნიერებების ცენტრში (ლიეტუვა). მშობლის BHK-21 უჯრედები დაითესა გლუკოზის მაღალი შემცველობის მქონე დულბეკოს მოდიფიცირებულ არწივის ნიადაგში (DMEM) (4.5 გრ/ლ) (Life Technologies, აშშ), რომელსაც ემატებოდა 10%-იანი FBS (Lonza, შვეიცარია) და 1% ანტიბიოტიკები (პენიცილინი და სტრეპტომიცინი 10.000 ერთ. (Lonza, შვეიცარია). კულტურები იმყოფებოდნენ 37 °C-ზე და 5%-იან CO<sub>2</sub> ატმოსფეროში. უჯრედის მონოფენა გაბნეული იყო 0.25%-იანი ტრიფსინ-EDTA-ს (Lonza, შვეიცარია) ნარევის გამოყენებით.

ძვლის ტვინიდან ამოღებული ჰემატოპოეტური ღეროვანი უჯრედები (HSCs) იზოლირდა მორწყული BALB/c თაგვების ბარძაყის და ტიბიას ძვლებში, როგორც მანამდე აღწერილი იყო Juppeteri et al.-ის მიერ [33], ზოგიერთი მოდიფიკაციით. ელენთის უჯრედები იზოლირდა მსუბუქად ქსოვილის წნევით დისოცირებით, PBS-ის გამოყენებით და შემდეგ გადატანილ იქნა 70 მკმ სტერილურ უჯრედის შემღებავში. შეგროვებული HSCs და ელენთის უჯრედების

სუსპენზიები გაირეცხა PBS-ით და შემდეგ მოხდა მისი ფრაქციებად დაყოფა, სიმკვრივის გრადიენტში, M ლიმფოციტების (Cedarlane, აშშ) ნიადაგზე, მწარმოებლის რეკომენდაციების მიხედვით. იზოლირებული HSCs და ელენთის უჯრედები სამჯერ გაირეცხა როსველის პარკის მემორიალური ინსტიტუტის RPMI-1640 ნიადაგზე, რომელიც შეიცავდა 10% FBS (Lonza, შვეიცარია), და 1% ანტიბიოტიკებს (პენიცილინი და სტრეპტომიცინი 10.000 ერთ. (Lonza, შვეიცარია), ცენტრიფუგირდა 10 წუთის განმავლობაში 300 × გ, რესუსპენსირდა და დაითვალა. იზოლირების პროცედურების შემდეგ, უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობა შეფასდა ტრიპანის ლურჯი საღებავის (0.4%, w/v) გამორეცხვით, Nikon ECLIPSE 50i (Nikon, იაპონია) მიკროსკოპის ქვეშ, ჰემოციტომეტრის გამოყენებით.

#### კამელინის ციტოტოქსიკურობის ანალიზი

ინ-ვიტრო უჯრედების ზრდის სიჩქარე განხორციელდა უჯრედების დათვლის Kit-8 (CCK-8) ანალიზის გამოყენებით (Dojindo Laboratories, იაპონია), მწარმოებლის რეკომენდაციების მიხედვით. ორი x 105 BHK-21, HSCs, და 5 x 105 ელენთის უჯრედები დაითესა ზრდის ნიადაგზე, 96-ჭისებრ თევზზე და 72 საათის განმავლობაში ინკუბირდა კონტროლით და კამელინის სხვადასხვა კონცენტრაციით (35 მკგ, 50 მკგ, 70 მკგ, 100 მკგ, 150 მკგ, და 200 მკგ), 37 °C-ზე, 5% CO<sub>2</sub> ატმოსფეროში. 450 ნმ-ის აბსორბირება განისაზღვრა მრავლობითი წამკითხველი Sunrise-ის მეშეობით (Tecan, ავსტრია). კამელინით ნამკურნალევი უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა შედარდა საკონტროლო უჯრედებს (არანამკურნალევს) და DMSO-ით ნამკურნალევს (დადებითი კონტროლი). ყველა ანალიზი ჩატარდა სამ განსხვავებულ ექსპერიმენტში.

#### SARS-CoV-2-ის ფოლაქის შემცირების ანალიზი

კომპონენტი შეფასდა ფოლაქის შემცირების ანალიზით, წამლის SARS-CoV-2/Quebec City/21697/2020-ის წინააღმდეგ მიმართ მგრძობელობის განსასაზღვრად. შერჩეული კომპონენტები შეფასდა ფოლაქის შემცირების ანალიზით, ფენოტიპური მეთოდის ოქროს სტანდარტით, წამლის SARS-CoV-2-ის წინააღმდეგ მიმართ მგრძობელობის განსასაზღვრად. მოკლედ რომ ითქვას, შერწყმული Vero E6 უჯრედები დაითესა 1 × 10<sup>5</sup> უჯრედი/ჭა, 6 ჭისებრ თევზზე. შერჩეული კომპონენტების სერიული განზავება პრე-ინკუბირდა 40-დან 100-მდე SARS-CoV-2-ის ფირფიტის მაფორმირებელ ერთეულში (PFUs) 60 წთ-ის განმავლობაში 37 °C-ზე, 5% CO<sub>2</sub> ატმოსფეროში. კომპონენტისა და SARS-CoV-2-ის პრე-ინკუბირებული ნარევი შემდეგ დაემატა შერწყმულ Vero E6 უჯრედებს და ინკუბირდა 60 წუთის განმავლობაში 37 °C-ზე, 5% CO<sub>2</sub> ატმოსფეროში. შემდეგ, ნათესი მასალა მოშორდა და ინფიცირებული უჯრედები ინკუბირდა სამი დღის განმავლობაში (კომპონენტის გარეშე), მინიმალურ ესენციურ ნიადაგზე (MEM) (Merck, გერმანია), 2% ხარის ფეტალური შრატით (Thermo Fisher Scientific, აშშ), რომელიც შეიცავდა 0.6% ზღვის ფოლაქის აგაროზას (Lonza, შვეიცარია). უჯრედები დაფიქსირდა და შეიღება და PFUs-ის რაოდენობა დაითვალა ინვერსიული მიკროსკოპის ქვეშ და შედგა ანტივირუსული კონცენტრაციების ლოგარითმული გრაფიკი. შემდეგ მოხდა EC50-ის მაჩვენებლების გამოთვლა. ამის პარალელურად, შეფასდა ანტივირუსული პრეპარატები ფავიპირავირი და რემდესივირი ფოლაქის შემცირების

ანალიზით, სტანდარტული პროტოკოლის გამოყენებით (ვაქცინის პრეპარატებით პრე-ინკუბაციის გარეშე), წამლის SARS-CoV-2-ის წინააღმდეგ მგრძობელობის განსასაზღვრად.

### სტატისტიკური ანალიზი

სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა Microsoft Excel და IBM SPSS სტატისტიკური პროგრამული უზრუნველყოფის 25-ე პაკეტის მეშვეობით. სპირმანის რანჟირების კორელაციები გამოყენებულ იქნა ცვლადებს შორის კავშირების გამოსათვლელად. p-მაჩვენებლის ალბათობის დონე < 0.05 მიჩნეულ იქნა სტატისტიკურად მნიშვნელოვნად.

### შედეგები

#### ციტოტოქსიკური ანალიზი

ციტოტოქსიკური ანალიზი არის უჯრედის სიკვდილსა და უჯრედის ზრდას შორის განსხვავების რაოდენობრივი განსაზღვრა და ჩვენს ექსპერიმენტში გამოყენებულ იქნა თაფლის პროდუქტის უჯრედის ზრდასა და პროლიფერაციაზე შესაძლო ეფექტის განსასაზღვრად. კამელინის თაფლის ექსტრაქტის თითოეული ამპილა შეიცავდა 2 მლ ქარვისფერ ხსნარს ინექციისთვის. აქტიური კომპონენტების შემადგენლობა იყო 0.035 გრ/მლ. კამელინის არც ერთ გატესტილ კონცენტრაციას (35 მკგ, 50 მკგ, 70 მკგ, 100 მკგ, 150 მკგ, და 200 მკგ) არ ჰქონია არასასურველი ციტოტოქსიკური ეფექტი (გრაფიკი 1ა, 1ბ, 1გ). კამელინის უფრო მაღალი კონცენტრაცია მნიშვნელოვნად ზრდიდა ჰემატოპოეტური ღეროვანი უჯრედების რაოდენობას. კონტროლთან შედარებით, HSCs-ის რაოდენობა მერყეობდა 114%-დან, როდესაც კამელინის კონცენტრაცია იყო 70 მკგ/მლ, 206%-მდე, როდესაც კონცენტრაცია აღწევდა 200 მკგ/მლ-ს. მსგავსი ტენდენციები ნანახი იყო უჯრედის ფენის BKH-21 ანალიზში (გრაფიკი 1ა, 1ბ). უჯრედების რაოდენობა იზრდებოდა 116%-დან 203%-მდე, როდესაც კონცენტრაციები იზრდებოდა 70 მკგ/მლ-დან 200 მკგ/მლ-მდე. კამელინის მასტიმულირებელი ეფექტი კიდევ უფრო შესამჩნევი იყო ელენთის უჯრედების ზრდისთვის. კამელინის 50 მკგ/მლ-ის კონცენტრაციიდან დაწყებული, ელენთის უჯრედების ზრდა იზრდებოდა და ექსპერიმენტის დასასრულს, ნამკურნალევი უჯრედების საშუალო რაოდენობა 3-ჯერადად უფრო მაღალი იყო საკონტროლოსთან შედარებით (გრაფიკი 1გ).

გრაფიკი 1. კამელინის თაფლის ექსტრაქტის სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა ჩვილი ზაზუნას თირკმლის უჯრედების ფენის 21 (BHK-21) (ა), ჰემატოპოეტური ღეროვანი უჯრედების (HSCs) (ბ), და ელენთის უჯრედების (c) ზრდაზე; შავი ჰორიზონტალური ხაზი - საკონტროლო OD-ის მაჩვენებელი.

#### SARS-CoV-2 ფოლაქის შემცირების ანალიზი

კამელინის თაფლის პროდუქტის SARS-CoV-2-ის მიმართ ანტივირუსული ეფექტის შესაფასებლად, განისაზღვრა მისი ნახევრად მაქსიმალური ეფექტური კონცენტრაცია (EC50). შერწყმული Vero E6 უჯრედები დაითესა 6-ჰიან თეფშებზე. კამელინის პრე-ინკუბირდა დაახლოებით SARS-CoV-2/Quebec City/21697/2020-ის 50–100 ფოლაქის მაფორმირებელ ერთეულზე (PFUs) 60 წუთის განმავლობაში და გამოყენებულ იქნა უჯრედების დასაინფიცირებლად. ინკუბაციის 3 დღის შემდეგ (კამელინის გარეშე) უჯრედები

დაფიქსირდა და შეიღება კრისტალური იისფერით. PFUs-ის რაოდენობა დაითვალა ინვერსიული მიკროსკოპის ქვეშ და აიგო ანტივირუსული კონცენტრაციების ლოგარითმული გრაფიკი, EC50-ის მოსაპოვებლად.

კამელინის თაფლის ექსტრაქტის კონცენტრაციებს 9.08 მკგ/მლ-დან 72.6 მკგ/მლ-მდე, უმნიშვნელო ეფექტი ჰქონდა ვირუსის ფოლაქის შემცირებაზე, როდესაც უჯრედები დაინფიცირდა 100 PFU-ით. ვირუსის ფოლაქების რაოდენობა შემცირდა 4.5–13.5 %-ით. უფრო მაღალმა კონცენტრაციამ 145.3 მკგ/მლ-ის ოდენობით შეამცირა ვირუსის ფოლაქების რაოდენობა 53.85%-მდე (გრაფიკი 2). EC50 იყო 192.4 მკგ/მლ.

როდესაც ვირუსის ინოკულატი შემცირდა 25–30 PFU-მდე, კამელინის კონცენტრაციებმა 9.08 მკგ/მლ-დან 36.3 მკგ/მლ-მდე შეამცირა ვირუსის ფოლაქების რიცხვი 30–33%-მდე (გრაფიკი 2). 72.6 მკგ/მლ კონცენტრაციიდან დაწყებული, ვირუსული ფოლაქების რაოდენობა მნიშვნელოვნად შემცირდა საკონტროლოსთან მიმართებაში. ამ ანალიზმა გამოავლინა, რომ კამელინის თაფლის ექსტრაქტის კონცენტრაციამ აჩვენა ინჰიბიციური აქტივობა EC50-ით 85.7 მკგ/მლ ოდენობით. დამატებითი ტესტი ჩატარდა კონცენტრატის პროდუქტის - კამელინის ტაბლეტების გამოყენებით, ინჰიბიციის პროფილის მსგავსობის დასადგენად. ვირუსის ფოლაქის რაოდენობას მსგავსი ეფექტი ჰქონდა კამელინის ტაბლეტის ინჰიბირებაზე. თუმცადა, კამელინის ტაბლეტის კონცენტრირებული ხსნარის განზავებას უფრო ძლიერი მაინჰიბირებელი ეფექტი ჰქონდა EC50-ზე  $116.27 \pm 73.39$  მკგ/მლ-ის ოდენობით, როდესაც ხდებოდა 100 PFU-ით ინფიცირება. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ კამელინის ექსტრაქტს მაინჰიბირებელი აქტივობა აქვს SARS-CoV-2-ის რეპლიკაციური ფაზის დასაწყისში.

შედარების სახით, ანტივირუსულ პრეპარატებს ფავიპირავირსა და რემდესივირს EC50 ჰქონდა, შესაბამისად, 15.71 მკგ/მლ-ის (100  $\mu$ M) და 0.616 მკგ/მლ-ის (1.16 $\mu$ M) ოდენობით. Wang et al.-მა [34] განსაზღვრა ფავიპირავირის აქტივობა ინ-ვიტრო SARS-CoV-2-ის წინააღმდეგ, თუმცა, იგი საჭიროებს უფრო მაღალ კონცენტრაციას რემდესივირთან შედარებით (EC50 = 61.80  $\mu$ M). აღსანიშნავია, რომ რემდესივირი პოტენციურად ბლოკავდა ვირუსით ინფიცირებას დაბალ მიკრომოლარულ კონცენტრაციებზე (EC50 = 0.77  $\mu$ M) [35].

გრაფიკი 2. კამელინის განსხვავებული კონცენტრაციების ეფექტი SARS-CoV-2 ფოლაქების შემცირებაზე VERO E6 უჯრედებში: ლურჯი ხაზი - ვირუსის საშუალო ფოლაქი თითოეულ ჭაში იყო 100 (სპირმანის რანჟირების კორელაციები ვირუსის ფოლაქებს შორის თითოეულ ჭაში და კონცენტრაციები  $r_{s1} = -1.000$ , და მნიშვნელოვანია 0.01 დონეზე (2-კუდიანი)); წითელი ხაზი - ვირუსის ფოლაქის საშუალო რაოდენობა თითოეულ ჭაში იყო 30 (სპირმანის რანჟირების კორელაციები ვირუსის ფოლაქებს შორის თითოეულ ჭაში და კონცენტრაციები  $r_{s2} = -0.952$ , და მნიშვნელოვანია 0.01 დონეზე (2-კუდიანი)); რუხი ხაზი - ნახევრად მაქსიმალური ეფექტური კონცენტრაცია (EC50).

დისკუსია

თაფლი ცნობილია მისი სამკურნალო სარგებლის გამო და ყურადღებას იქცევს, როგორც ბუნებრივი პრეპარატი. სამეცნიერო და კლინიკური ანგარიშების ზრდადი რაოდენობა

გვამცნობს, რომ თავლი გამოიყენება არა მხოლოდ სახლში მკურნალობისთვის, არამედ ჭრილობის შეხორცებისა და ქსოვილების აღდგენისთვის [36], [37], [38]. თავლის სასარგებლო ეფექტები ჭრილობის შეხორცებაზე, ძირითადად, უკავშირდება ანტიბაქტერიულ აქტივობას. შაქრის მაღალი შემცველობა, რომელიც იწვევს მაღალ ოსმოსურ წნევას და დაბალი pH იწვევს ბაქტერიის უჯრედის დეჰიდრატაციას და კედლის გარღვევას. კვლევები აჩვენებს, რომ თავლის ანტიმიკრობული აქტივობები უკავშირდება ჟანგბადის სახეობების (ROS) წყალბადის ზეჟანგის აქტივობას [39]. თავლის ანტიოქსიდანტური ეფექტი უკავშირდება მის ანთების საწინააღმდეგო და ჭრილობის შემახორცებელ აქტივობას [40]. თავლის ნიმუშებს შეუძლია წყალბადის ზეჟანგის გამოშვება, რომელიც წარმოიქმნება გლიკოზას ოქსიდაზას ფერმენტის მიერ და პასუხისმგებელია ანტიმიკრობულ ეფექტზე [39]. წყალბადის ზეჟანგის მავნე ოქსიდაციური ეფექტი ნანახია კანის უჯრედებში, თავლის პოლიფენოლური კომპონენტის გამო, რომელსაც შეუძლია ROS-ის საწინააღმდეგოდ იმოქმედოს. ზოგიერთმა მკვლევარმა აღნიშნა თავლის პოტენციალი, მოახდინოს ღეროვანი უჯრედების პროლიფერაცია, ჰემატოპოეზური ღეროვანი უჯრედების მიგრაციის სტიმულირება და ასევე, მოახდინოს შეხორცების პროცესის მედიაცია, ქსოვილებში სისხლის ნაკადის მომატების გზით. მეორე მხრივ, თავლმა გამოავლინა მაინვიზიბელი ეფექტები უჯრედების ზრდაზე, პროლიფერაციის უნარების შემცირების გზით, უჯრედების აპოპტოზის ინდუცირებით და უჯრედის ციკლის ინვიზიბირებით, დოზაზე დამოკიდებული ფორმით [41].

მრავალ შემთხვევაში, თავლი გამოიყენება ისე, როგორც არის. თუმცა, საჭიროების შემთხვევაში, თავლის აქტიური ინგრედიენტები, როგორებიცაა მცირე პეპტიდები, ამინომჟავები, პოლიფენოლები, შაქრები, ვიტამინები, შეიძლება ამოღებულ იქნას თავლიდან. კამელინი არის ორიგინალური თავლის ექსტრაქტი, რომელიც მიღებულია თავლის სპეციალური სახეობისგან, ექსტრაციის დაპატენტებული მეთოდით და წარმოადგენს შაქრების, ცილების, პოლიფენოლების, ვიტამინების, მინერალების და თავისუფალი ამინომჟავების ნარევეს. მონაცემები გვამცნობენ, რომ კამელინი არაა ციტოტოქსიკური, და აქვს ძლიერი მასტიმულირებელი ეფექტი უჯრედების პროლიფერაციაზე. ამ თვისების წყალობით, კამელინი სასარგებლოა ჭრილობის შეხორცების დროს ისევე, როგორც თავლის სხვა პროდუქტები. Bakradze et al.-ის კლინიკური კვლევის მონაცემები პარადენტის ანთებითი დაავადების შესახებ აჩვენებს, რომ კამელინს აქვს იმუნომასტიმულირებელი, ანთების საწინააღმდეგო მოქმედება, აქტივებს რეგენერაციის პროცესს და აქვს ტკივილგამაყუჩებელი ეფექტი. დაავადების სხვადასხვა ფორმის (გინგივიტი, პაროდონტიტი) მქონე 56 პაციენტი იყო კლინიკური ზედამხედველობის ქვეშ. კვლევის შედეგებმა დაადასტურა კამელინის გამოყენების კლინიკური შესაბამისობა გინგივიტის, პაროდონტიტის და პერიოდონტიტის დროს, კომბინირებული მკურნალობის დროს [42]. Chumburidze et al.-ის კვლევამ [43] აჩვენა კამელინის შესანიშნავი რეგენერაციული და შემახორცებელი ეფექტები დაზიანებულ ქსოვილებში. კამელინის თვისებები ინფექციებისა და სიმსივნეების სხვადასხვა სახეობების მკურნალობისას და კამელინის ფარმაკოკინეტიკა ვირთხის პლაზმაში აღწერილია ამ კვლევაში. კამელინის მინიმალური ინვიზიციური კონცენტრაცია (MIC) განისაზღვრა ზოგიერთი ბაქტერიული და სოკოვანი შტამების წინააღმდეგ, Maglakelidze et al.-ის კვლევაში [44]. კამელინს აქვს მძლავრი



მაინჰიბირებელი ქმედება (0,012-0,150 მკგ/მლ) სატესტო ბაქტერიების უმრავლესობის წინააღმდეგ, ინ-ვიტრო კვლევებში. კამელინმა გამოავლინა პოტენციური ინ-ვიტრო აქტივობები *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, და *Candida krusei* ფლუკონაზოლის მიმართ რეზისტენტულ შტამებში, MICs-ით, რომელზეც იზოლატების 90% ინჰიბირდა, შესაბამისად, 0.012 მკგ/მლ-ზე.

რამდენადაც ცნობილია, ჯერ არ იძებნება გამოქვეყნებული სამეცნიერო ან კლინიკური კვლევები თავლის SARS-CoV-2-ზე გავლენის შესახებ. ამ დრომდე, ოთხი რეგისტრირებული კლინიკური კვლევა ადგენდა თავლის და მისი აქტიური კომპონენტების ეფექტურობას COVID-19-ის მქონე პაციენტებში (NCT04323345, NCT04345549, NCT04347382, NCT04468139) [45]. რამდენიმე კვლევა ჩატარდა, რომლებიც ახდენდა მანუკას თავლის პოლიფენოლური კომპონენტების შემოჭველი აფინურობის პროგნოზირებას SARS-CoV-2-ის ვირუსულ ცილებთან. ამ კვლევების უმრავლესობა იკვლევდა პოლიფენოლების შესაძლო ანტივირუსულ ეფექტებს, SARS-CoV-2-ის ძირითადი პროტეინას (Mpro) პოტენციური შეზღუდვის საფუძველზე [28] [46]. Heba et al.-ის კვლევა [28] ახდენდა ფიჭის და პროპოლისის ექვსი კომპონენტის ბიოლოგიური აქტივობის სკრინინგს COVID-19-ის წინააღმდეგ. კვლევამ აჩვენა, რომ ოთხ კომპონენტს ჰქონდა ძლიერი შემოჭველი აფინურობა და შეიძლება მოახდინოს COVID-19-ის ვირუსის რეპლიკაციის ინჰიბირება. პოლიფენოლები წარმოადგენს ამ ბიოაქტიურ კომპონენტებს და ამჟამად არის მე-3 ფაზის კლინიკური კვლევის საგანი, COVID-19-ის მქონე პაციენტებში [46]. Watanabe et al.-ის კვლევის შედეგებმა [20] აჩვენეს, რომ თავლს და უფრო კონკრეტულად, მანუკას თავლს, აქვს მაინჰიბირებელი აქტივობა გრიპის ვირუსის წინააღმდეგ, რომელიც ახდენს პოტენციური სამკურნალო ღირებულების დემონსტრირებას. მანუკას თავლი ეფექტურად ახდენს გრიპის ვირუსის რეპლიკაციის ინჰიბირებას ( $EC_{50} = 3.6 \pm 1.2$  მგ/მლ). კამელინის მაინჰიბირებელ აქტივობასთან შედარებით, ეს კონცენტრაცია 10-20-ჯერ უფრო მაღალია.

სამეცნიერო კვლევების მიმოხილვის საფუძველზე, Hossain et al.-მა [30] მოახდინეს იმის შეჯამება, რომ თავლი შეიძლება სასარგებლო იყოს COVID-19-ის მქონე პაციენტებში, რამდენიმე ძირითადი მექანიზმის წყალობით; პირდაპირი ანტივირუსული თვისებები, მასპინძლის იმუნური სასიგნალო გზების რეგულირება/დაზუსტვა. და კომორბიდული მდგომარეობების განკურნება და/ან გაუმჯობესება. პრეპარატის გამოყენება რამდენიმე პრობლემას აწყდება, როგორებიცაა მრავლობითი ანტიბიოტიკორეზისტენტობა და შესაძლო გვერდითი ეფექტები. ეს გვაფიქრებინებს თერაპიული ალტერნატივების შესახებ, როგორიცაა თავლი და თავლის პროდუქტები.

## დასკვნები

კვლევამ აჩვენა, რომ კამელინის თავლის ექსტრაქტს არ აქვს ციტოტოქსიკური ეფექტი, არის უსაფრთხო და აჩვენა ანტივირუსული თვისებები SARS-CoV-2-ის წინააღმდეგ. თუმცა, კამელინის ეფექტის მოლეკულური კვლევები ვირუსის რეპლიკაციაზე ან იმუნურ სისტემაზე საჭიროებს უფრო სიღრმისეულ განხორციელებას მომავალში. უეჭველია, რომ კამელინი ისევე არ მუშაობს, როგორც სხვა საკვლევი პრეპარატები, რომლებიც ამჟამად გამოიყენება COVID 19-ის წინააღმდეგ, თუმცა, ამჟამად არსებული გადაუდებელი საჭიროების,

რომელიც გამოიწვია COVID-19 პანდემიამ და შეზღუდული თერაპიული ვარიანტების პირობებში, კამელინი წარმოადგენს პერსპექტიულ და შესაბამის თერაპიულ ვარიანტს, რომელიც უსაფრთხო, პერორალურად ადვილად გამოყენებად და უკვე ხელმისაწვდომ ბუნებრივ დანამატს წარმოადგენს.

ავტორების კონტრიბუცია

კონცეპტუალიზაცია, L.K.; მეთოდოლოგია, M.B., L.K., და G.B.; ფორმალური ანალიზი, I.G.; კვლევა, M.B და A.L.; დაწერა - ორიგინალური პროექტის მომზადება, L.K.; წერა - მიმოხილვა და რედაქტირება, M.B, A.L., N.J.; ვიზუალიზაცია, I.G.; შედამხედველობა, R.B.; ფონდების მოძიება, P.J. ყველა ავტორი გაეცნო და დაეთანხმა ხელნაწერის გამოქვეყნებულ ვერსიას.

მადლიერება

ექსპერიმენტებისთვის გამოყენებული მასალები მოწოდებულია სს „Silicon Biotechnology“-ის მიერ. ეს კვლევა დაფინანსებულია ლიეტუვას რესპუბლიკის მეცნიერების, ინოვაციისა და ტექნოლოგიის სააგენტოს (MITA) (გრანტის N 01.2.1-MITA-T-851-02-0248 to P.J.) და კანადის ჯანდაცვის კვლევის ინსტიტუტების მიერ (გრანტის N 170629 to M.B.).

ინტერესთა კონფლიქტი

ავტორებში არ არსებობს ინტერესთა კონფლიქტი.

გამოყენებული ლიტერატურა