

Zn ve Se'yi kompleksleştiren hümitik maddeler tarafından SARS üzerindeki inhibitör etkilerin in vitro tayini CoV-2 virüs replikasyonu

Bernadett Pályi^{1*}, Zoltán Kis^{1,2*}, Polett Hajdrik³, Noémi Kovács^{3,4}, Daniel S. Veres³, Krisztián Szigeti³, Imre kemanci³, Tibor Kovacs⁵, Ralf Bergmann^{3,6}, Máthé Domokos^{3,5,7} **

Soyut

Hümitik maddeler iyi bilinen insan besin takviyesi maddeleridir ve hayvan yemi katkı maddeleri olarak da performans artırıcı önemli roller oynarlar. Onlarca yıldır hümitik maddelerin içeriğinin de farklı virüslere karşı güçlü antiviral etkiler taşıdığı kanıtlanmıştır. Burada, bir besin takviyesi malzemesi olarak amaçlanan askorbik asit, Se- ve Zn²⁺ iyonları içeren hümitik bir maddenin antiviral aktivitesi, bir VeroE6 hücre hattında SARS-CoV-2 virüsü B1.1.7 Endişe Varyantı'na ("Alfa Varyantı") karşı araştırılmıştır. Sonuçlar, bu kombinasyonun amaçlanan aktif bileşenlerinin çok düşük bir konsantrasyon aralığında önemli bir in vitro antiviral etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Verilen kompozisyondaki hümitik maddeler, C vitamini ve Zn/Se iyonlarını pikomolar konsantrasyon aralıkları bile uygulanan SARS-CoV-2 virüs inhibisyon testinde yüzde elli viral replikasyon inhibisyonu elde etmek için yeterliydi.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, hümitik asit, fulvik asit, Zn-Se-askorbik asit kompleksi, antiviral aktivite, RT-PCR

*PB ve ZK eşit katkıda bulundu

** yazı şmaları n kime yöneltilmesi gerektiği

1 Ulusal Biyogüvenlik Laboratuvarı, Ulusal Halk Sağlığı Merkezi, Budapeşte, Macaristan

2 Mikrobiyoloji Bölümü, Semmelweis Üniversitesi, Budapeşte, Macaristan

3 Biyofizik ve Radyasyon Biyolojisi Bölümü, Semmelweis Üniversitesi, Budapeşte, Macaristan

4 CROmed Çeviri Araştırma Ltd., Budapeşte, Macaristan

5 Radyokimya ve Radyoekoloji Enstitüsü, Pannonia Üniversitesi, Veszprém, Macaristan

6 Helmholtz-Zentrum Dresden Rossendorf, Dresden, Almanya

7 Macaristan Moleküler Tıp Mükemmeliyet Merkezi, In Vivo Görüntüleme Gelişmiş Çekirdek Tesisi, Semmelweis Üniversitesi Site, Szeged, Macaristan

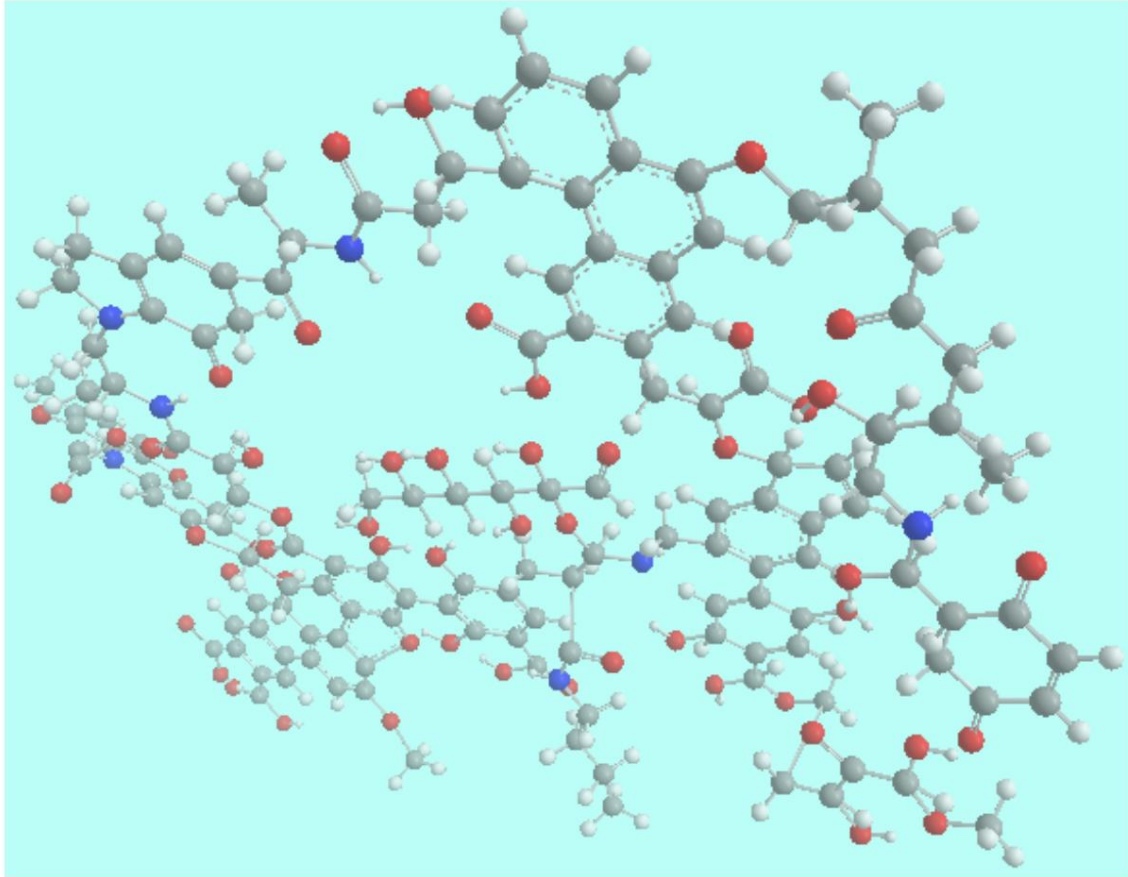
1. Giriş

Hümitik maddeler (HS), himatomelanik asit, hümitik asitler (HA), fulvik asit (FA), ulmik asit ve eser minerallerden oluşan insan besin takviyesi malzemelerinin yaygın olarak bilinen temel bileşenleridir. Ormanlarda ve turbada büyük miktarda H₂S üretilir. H₂S her yerde bulunur ve H₂S doğadaki en büyük karbon kaynaklarından biridir. HS

toprakta mikroplar tarafından ayrıştırılan çürümüş bitkilerden kaynaklanır. Hümitik maddeler alkali ortamda çözünür, suda kısmen çözünür ve asidik ortamda çözünmez. Hümitik maddelerin tam bileşimi, kökenlerine ve ekstraksiyon teknolojisinin türüne göre farklılık gösterebilir. En önemli bileşenlerinden biri olan FA, polifenolik moleküler yapıları sayesinde suda çözünür (Şekil 1). Su molekülleri elektronik yapılarını nötr formda bile stabilize eder (Alvarez-Puebla et

al., 2006). Fulvik asit (FA), altı n yüzeylerde ve muhtemelen toprak mikro yapı ları nda da pH 5'te küçük agregatlar oluşturur. Bu agregatlar, yüzey destekli Raman spektroskopisi (SERS) göre elektrostatik kuvvetlerin neden olduğu pH 8'de fraktal benzeri bir yapı oluşturur (Alvarez-Puebla ve diğerleri, 2004). FA'nı n ortalama molar kütlesi, kökenine oldukça bağlıdır. Yerel FA genellikle farklı moleküllerin bir karışımıdır (Lieke ve diğerleri, 2021). Doğal FA'nı n (örn. Suwanee Nehri'nden kaynaklanan) moleküler ağırlığı, literatür ve Uluslararası Humik

Maddeler Topluluğu (IHSS) (Chon ve diğerleri, 2013; Chin ve diğerleri, 1994). Diğer önemli ve iyi çalışılmış bileşen olan HA, çok daha az çözünürlüğe sahip, daha büyük ve daha karmaşık bir yapıya sahiptir. HA'nı n moleküler ağırlığı, numunelerin kaynağına bağlı olarak 3160 ila 26400 Da arası nda değişmektedir (Asakawa ve diğerleri, 2008). Yapısal yapı taşı olan FA ve HA arası nda moleküler ağırlık farklılıkları nı n aksine anlamlı bir fark saptanmamıştır (Schellekens ve diğerleri, 2017; Stevenson, 1994; Sutton ve Sposito, 2005; Nebbioso ve Piccolo, 2013).



Şekil 1. HS'nin küçük, karakteristik bir parçası nı n 3 boyutlu moleküler yapı sı . Bu grafik, moleküler yapı ları nı NMR ve IR çalışmaları na dayalı olarak rastgele oluşturulan doğal humik maddelerin tipik yapısal öğelerini ve bağları nı içerir (Lag ve diğerleri, 2008). Gri, karbon; beyaz, hidrojen; mavi, nitrojen; kırmızı, oksijen atomları. (Grafikler ChemDraw Ultra ve Chem3D yazılımları tarafından oluşturulmuştur.)

H2S insan sağlığı nda binlerce yıldır kullanılmaktadır. Humik maddeler Hint Ayurveda tıbbi nde çok eski zamanlardan beri "shilajit" (Ghosal ve diğerleri, 1991; Ghosal ve diğerleri, 1995; Pant ve diğerleri, 2012; Mishra ve diğerleri, 2019) olarak iyi bilinen ilaçlardır. antik çağlardan kalma Avrupa çamur ve balneoterapisinde olduğu gibi (Kumar Gautam ve diğerleri, 2021). Shilajit esas olarak FA, HA ve iz mineraller içerir. Çok sayıda çalışmada, antiinflamatuar, antioksidan, antimutajenik, antiviral, ağrı metal şelatlayıcı, antitümör, proapoptotik ve fotokoruyucu özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Pant ve ark., 2012). Modern Batı klinik tıbbi nde terapötik ajanlar olarak humik maddeler hakkındaki ilk resmi bilimsel raporlar 1957'dedir.

Macaristan (Béres ve diğerleri, 1957; Béres ve diğerleri, 1958). Çin tıbbi literatürü, yaklaşık 3000 yıldan beri Geleneksel Çin Tıbbi nde önemli bir terapötik sıfır oluşturduğundan, humik maddelerin terapötik uygulamasıyla da doludur. Humik maddeler o zamandan beri klinik olarak denendi ve çok sayıda faydalı özellik kazandırdığı bulundu, örneğin insan vücudunu kan pıhtılaşması na veya fibrinolyze karşı koruyabilir ve iyonlaştırıcı radyasyonun etkilerini azaltabilir (Klöcking ve Björn, 2005).

Humik asitler (HA), iyi bir antioksidan aktiviteye ve serbest radikal süpürücü yeteneğe sahiptir (de Melo ve diğerleri, 2016).

Hüyük maddelerin çok az yan etkisi var gibi görünmektedir (hatta yalnızca özel olarak engellenmiş beslenme koşullarında olanlar) ve gıda ve yem takviyesi olarak uygulanabilirler (Murbach ve diğerleri, 2020). Ayrıca hüyük maddeler, örneğin bitki besinleri olarak geniş bir tarımsal ve çevresel kullanıma sahiptir (Mosa ve diğerleri, 2020). Günümüzde hüyük madde sadece bir insan besin takviyesi olmayıp, antibiyotik performans artırıcıları yerini alarak bile hayvanın büyüme performansını ve sağlığını iyileştirmek için çok sayıda yem katkı maddesinin temelini oluşturmaktadır (Szabo ve ark., 2017). Hüyük maddelerin ayrıca domuzlarda (Molnar, 2021) veya sıçanlarda (Li ve diğerleri, 2011) gastrointestinal ülser üzerinde etkileri vardır. HA midede ülserin yüzeyinde koruyucu bir film oluşturarak hücre yenilenmesine yardımcı olur (Molnar, 2021). Fulvik asit (FA) probiyotiklerle birleştiğinde fosfor ve metallerin sindirilebilirliğini artırır. Ayrıca, ikna edici derecede çok sayıda domuz üzerinde yürütülen bir çalışmada bağıştıklı kabiliyetini artırmıştır (Kunavue ve Lien, 2012). Besin takviyeleri olarak hüyük maddelerin mikro element ve eser element homeostazı üzerinde çok sayıda yararlı etkisi vardır, örneğin bir sıçan modelinde kanı tılandırdığı gibi demir ve manganez homeostazı (Szabo ve diğerleri, 2017) ve ayrıca bakır ve çinko homeostazı (Hullar ve diğerleri, 2018). Bazı HS bileşiklerinin hayvan çalışmalarında nöroprotektif etkilere sahip olduğu bulunmuştur, örneğin antosiyanin içeren altı n-FA kaplı nanopartiküller farelerde Alzheimer hastalığı belirtilerini önleyebilir (Kim ve diğerleri, 2017). FA'lar sadece tau proteinlerinin birleşimini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda orijinal tau katlanma durumunu da geri kazandırır (Cornejo ve diğerleri, 2011). Bazı yeni raporlar, çok sayıda hüyük asit bileşiminin, örneğin fulvik asitin (Gnananath ve diğerleri, 2020), aktif farmasötik bileşenlerin (API'ler) ilaç dağıtımını artırmak için farmasötik kullanımı için umut vaat eden adaylar olduğu sonucuna varmıştır (Jacob ve diğerleri, 2019). Hüyük maddelerin sağlığı üzerinde yalnızca ek etkileri yoktur, aynı zamanda bazı terapötik potansiyelleri de vardır (Schepetkin ve diğerleri, 2002). Fulvik asit, kronik enflamatuar hastalıklarda ve diyabette klinik olarak yararlı bir etkiye sahiptir (Winkler ve Ghosh, 2018). Tam HS fraksiyonu ayrıca kanı tılandıran anti-enflamatuar aktiviteye sahiptir (Vucskits ve diğerleri, 2010a; Vucskits ve diğerleri, 2010b; Van Rensburg, 2015).

HS, onlarca yıldır antiviral ajanlar olarak bilinmektedir. Kısa süre önce, "Secomet V" markalı hüyük maddeler ve bitki özlerine dayalı bir içeceğin, örneğin anti-HIV, anti-poksvirüs ve anti-SARS aktiviteleri gibi geniş spektral antiviral özelliklere sahip olduğu rapor edildi (Kotwal ve diğerleri, 2005). Coxsackie virüsü A9 (Klöcking ve Sprössig, 1972), Herpes Simplex virüsü Tip I (Helbig ve diğerleri, 1997), İnfluenza virüsü A/WSN/1933 (H1N1) (Lu ve diğerleri, 2002) veya İnsan İmmün Yetmezlik virüsü-1 (HIV-1)-pozitif hastalarda bağıştıklı uyarıcıları olan hüyük maddeler (Jooné ve diğerleri, 2003) ve kene kaynaklı ensefalit virüsü enfeksiyonu (TBEV) (Orlov ve diğerleri, 2019). Çok yakın tarihten itibaren, yüksek kaliteli bir çalışma, hüyük maddeler bileşiklerinin HIV-1'e karşı yüksek antiviral aktiviteye sahip olduğunu bulmuştur (Zhernov ve diğerleri, 2021). Hüyük maddeler, koronaviral hastalıkların profilaksisinde ve tedavisinde faydalı etkiler sağlayabildikleri için prebiyotikler olarak da kabul edilebilirler (Tiwari ve ark.,

2020). Elli yıllık aşkın bir süredir hüyük maddelerin insan virüslerine karşı tartışması yüksek aktivitesi hakkındaki tarihsel kayıtlar ve bilimsel bilgiler göz önüne alındığında, yazarlar ticari olarak temin edilebilen bir besin takviyesi maddesinin olası antiviral aktivitesini (2020) araştırmaya çalıştılar. Araştırılan hüyük maddelerin farklı dilüsyonları kullanılarak in vitro kantitatif gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) bazlı viral replikasyon inhibisyon testi uygulandı.

Bu malzemede turba ekstraktı HS, Zn²⁺ iyonları, Se- iyonları ve askorbik asit ile zenginleştirilmiştir. Çok sayıda araştırma hem askorbik asit (Larenas-Linnemann ve diğerleri, 2020; Grant ve diğerleri, 2020), selenyum iyonu (Bae ve Kim, 2020; He ve diğerleri, 2021) hem de çinko iyonları (Larenas-Linnemann ve diğerleri) olduğunu doğrulamıştır (R., 2020; Quiles ve ark., 2020; te Velthuis ve ark., 2010) tek tek antiinflamatuar etkiye sahiptir ve COVID-19 enfeksiyonlarını semptomlarını azaltabilir. H₂S, metal iyonları şelatlar olarak etkili bir şekilde bağlar (Saar ve Weber, 1982; Kretzschmar ve Christl, 2001; Bertoli ve diğerleri, 2016), aromatik moleküller ve gruplar, örneğin piren veya Zn²⁺ iyonları, H₂S makromolekülleri içeren Se- iyonlar ve askorbik asit ile işlev görebilir yüksek yüzey/kütle oranları sayesinde ilaç moleküllerinin antiviral aktivitesini artıran (Chen ve Liang, 2020) nanoparçacıkbenzeri bir koloidal davranış (Jones ve Bryan, 1998).

2. Malzemeler ve Yöntemler

Test Makalesi (TA), ticari olarak üreticisinden (ZnSeC Humicin, Humic2000 Ltd, Budapeşte, Macaristan) toz veya çözelti halinde temin edilebilen ve ticari olarak yazarlar tarafından temin edilen bir besin takviyesi temel bileşendir.

Satın alma işleminden sonra, satın alınan TA bağımsız bir ticari test laboratuvarına (Balint Analitika Ltd.

Budapeşte) Codex Alimentarius Hungaricus'ta (Macar Gıda Kitabı) belirtildiği gibi standartlaştırılmış, kalite güvenceli ve sertifikalı analitik test yöntemleri kullanılarak içerik konsantrasyonlarını belirlemek için. Diğer tüm in vitro sitopatojenite ve antiviral aktivite testleri, Biyogüvenlik Seviyesi 3 (BSL-3) Ulusal Biyogüvenlik Laboratuvarında (Budapeşte, Macaristan) yapıldı.

2.1. Seyreltmelerin hazırlanması

TA solüsyonu, herhangi bir görünür opalesans veya sedimantasyon içermeyen koyu kahverengi, su kıvamında bir sıvı, imalatçı tarafından hazırlandı. Tüm nihai partikül tutarsızlıkları ortadan kaldırmak için 1300 rpm'de 5 dakika daha santrifüjlendi. TA solüsyonu orijinal olarak 100 mL damıtılmış suda çözölmüş 10g ZnSeC-Humisin tozu içeriyordu. Daha sonra süpernatant, 0.22 µm'lik bir membran filtreden steril olarak filtrelendi. Daha sonra, Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium (DMEM, Gibco/ThermoFisher, CA, ABD) hücre kültürü ortamı kullanılarak bu süzüntüden on kat seyreltilmiş bir stok hazırlandı; bu stok, enfekte olmayan bir VeroE6 hücresi üzerindeki nihai sitopatojenik etkileri incelemek için de uygulandı.

kültür. Antiviral testte test edilecek diğer numuneler de DMEM ile seyreltildi. Tüm numune dilüsyonları, bu filtrelenmiş 1:10 seyreltilmiş stok maddeden hazırlandı.

Bu şekilde ayrıca test edilen nihai seyreltmeler 100 kat, 500 kat, 1000 kat, 2000 kat, 5000 kat ve 7000 kat olmuştur.

2.2. Hücre kültürü

VeroE6 hücre çizgisi (ATCC® CRL-1586™), 50 U/ml penisilin ve 5 ile takviye edilmiş %10 m/m Fetal Sıçır Serum (FBS, Gibco/ThermoFisher, CA, ABD) ilavesiyle DMEM hücre kültürü ortamında tutuldu. ul/mL streptomisin. Bununla birlikte, hücrelerin plakalara tohumlanmasından sonraki çalışmalar, aşı üretimi için FBS'siz hücre ortamında da gerçekleştirildi (VP-SFM, Gibco/ThermoFisher, CA, ABD).

İlk olarak, stok solüsyonunun in vitro sitopatojenitesi, büyüyen, enfekte olmamış VeroE6 hücreleri ile bir plakanın her bir kuyusuna 200 ul TA stok solüsyonu eklenerek ve ardından 48 saat boyunca inkübasyonla test edildi. Farklı TA dilüsyonları başına in vitro etki testleri için, her TA dilüsyonu, in vitro viral replikasyon tahlilinde enfekte olmuş hücrelerle 48 saat süreyle inkübe edildi. 2x10⁵ hücre/oyuk VeroE6 hücreleri, 96 oyuklu kültür plakalarında büyütüldü ve TA'nın listelenen çeşitli nihai seyreltileri plaka oyuklarına eklendi (bkz. 2.1).

2.3. In vitro viral replikasyon testi

Ocak 2021'de Macar numunelerinden izole edilen Ulusal Biyogüvenlik Laboratuvarında -80°C'de donmuş halde stoklanan SARS-CoV-2 virüsü B.1.1.7 Endişe Varyantı ("Alpha VOC"), VeroE6 hücrelerinde kültürlendi ve alikotlara bölündü, tahliller için kullanıldı.

Bundan önce plak oluşturan birim (PFU) ve %50 Doku Kültürü Enfektif Doz (TCID₅₀) miktarları belirlenmiş ve karşılaştırmalı gelen miktarlar belirtildiği gibi ayrılmıştır.

2.4. SARS-CoV-2 replikasyonunun inhibisyonu testi

Viral replikasyonu saptamak için, TA dilüsyonlarını nı n varlığında 48 saat kültürlenmiş VeroE6 hücrelerinin süpernatantlarını inceledik. Test, qRT-PCR ve QuantiNova Probe RT-PCR kiti (Qiagen, Düsseldorf, Almanya) ve LightCycler 480 Real-Time PCR Sistemi (Roche, Basel, İsviçre) kullanılarak yapıldı. RNA ekstraksiyonu, üreticinin talimatlarına göre Roche High Pure Viral RNA Kiti (Roche, Basel, İsviçre) kullanılarak yapıldı. Potansiyel PCR inhibitörlerini uzaklaştırmak için bir PerkinElmer Chemagic (PerkinElmer, ABD) otomatik ekstraksiyon aletiyle ek bir yıkama aşaması da (yıkama tamponu ile) dahil edildi.

Daha sonra SARS'ın N-(nükleoprotein) genini hedefledik. Roche Lightcycler 480 RNA Master ile CoV-2 virüsü Primerlerle birlikte Hidroliz Problemi (Roche Basel, İsviçre)

Lightcycler 2.0 (Roche) platformu kullanılarak kurum içinde geliştirilmiştir. RNA virüsü tespiti için primerler, daha önce Avrupa Yüksek Patogenik Ajanlar Araştırma Altyapısı (ERINHA) aracılığıyla ve onunla işbirliği içinde Biyogüvenlik Laboratuvarı (BSL-3'te) tarafından doğrulanmıştır.

Deneyde VeroE6 hücreleri, bir tek tabaka oluşana kadar 96 oyuklu plaka kullanılarak inkübe edildi. Test edilecek TA dilüsyonlarını nı n her biri askıya alındı (30 saniye vortekslenildi) ve ardından hemen pipetlendi. 100 TCID₅₀'ye karşılaştırmalı gelen SARS-CoV-2 virüs hacmini içeren çözeltiyeye aynı 200 ul TA hacmi (tüm seyreltmeler boyunca), virüs önleme/antiviral yeteneklerini saptamak için eklendi (aşağıya bakınız).

Sitotoksitesite deneyi için bir spektrofotometre (Omni hücre adezyon ölçüm spektrometresi, Cytosmart, Hollanda) kullanıldı. 96 oyuklu hücre kültürü platformunun tüm oyuklarında tek tabakalarla kaplanan yüzey ve şeffaf yüzey (virüs tarafından öldürülen hücrelerin yokluğunda ortaya çıkan plaklar) yüzde oranı belirlendi.

Tüm testler üç kopya halinde yapıldı. Bunlardan, viral inhibisyonun nispi parametreleri, TA içermeyen enfekte, işlenmemiş bir hücre kültüründeki viral etkiye kıyasla hesaplandı.

2.4.1. Test protokolü

Farklı deney grupları uygulandı: "virüs kontrol" grubu, virüs enfeksiyonunun etkilerini belirlemek için herhangi bir TA ile tedavi edilmemiş bir pozitif kontroldü. TA dilüsyonlarını nı n inhibe edici etkisi, bu grubun sonucuyla karşılaştırıldı.

Hücre kontrol grubu, sadece kültür aktivitesinin virüssüz hücreler üzerindeki etkisinin ölçüldüğü bir negatif kontroldü; grup ayrıca TA'lerden muaftı.

Kuyulara eklenen her TA dilüsyonu ile dilüsyon test grupları oluşturuldu ve aşağıdaki gibi virüs ile inkübe edildi.

Öncelikle etken maddeler 1:1 hacim oranında 100 TCID₅₀ SARS-CoV-2 virüs süspansiyonu ile karıştırıldı. İkinci enfeksiyon aşaması, TA'nın seyreltmeyle 1:1 hacim oranında karıştırılarak 100 TCID₅₀ (0.1 enfeksiyon çokluğu, MOI) SARS-CoV-2 virüs süspansiyonu uygulandı, bu karışım hücre kültürüne kondu ve daha sonra 37 °C'de %5 CO₂ atmosferinde FBS olmadan 2 saat inkübe edildi.

Enfeksiyon aşamasından sonra, enfeksiyöz virüs içeren karışım otomatik pipet ile uzaklaştırıldı. Bundan hemen sonra, VP-SFM ortamını nı n 1:1 karışımı ve TA'nın uygun DMEM ortamı seyreltmesi eşit 200 mikrolitre hacimlerde hücre kültürlerine ilave edildi. Bu aktif madde ile işlenmiş ortam ile inkübasyon 48 saat sürmüştür.

48 saat sonra TA içeren virüs içeren ortam hücrelerden çıkarıldı. Çıkarılan viral süpernatant, 16.000 g'de ultrasantrifüjlendi ve süpernatant ayrıca viral RNA içeriği için ölçüldü:

Süpernatant, daha önce bahsedildiği gibi N-jeni için viral RNA içeriğini belirlemek üzere PCR deneyine tabi tutuldu. Süpernatant RNA içerikleri, gen kopya sayıları için ölçüldü ve inhibe edici etkiyi hesaplamak için tedavi edilmemiş, inhibe edilmemiş SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücre kültürlerinde ölçülen kopya sayısı ile karşılaştırıldı.

2.4.2 Sonuçları'nın matematiksel analizi

Hem inhibitör TA hem de işlenmemiş virüs kontrol oyukları için üçlü kopyalarda elde edilen viral N-jeni kopya sayıları girdi verileri olarak kullanıldı. Matematiksel veri analizinin amacı, viral N-jeni kopya sayılarının virüs kontrolünün %50'sine düştüğü inhibitör seyreltme seviyesini belirlemektir (%50 inhibitör seyreltme, Seyreltme50). Ardından, bu seyreltme değeri, %50 inhibitör "dozunu" hesaplamak için temel teşkil eder: her bileşen için molar konsantrasyon (ID50)

Kopya sayıları, kendi şirket içi geliştirdiğimiz algoritmayı ve Octave matematiksel ortamındaki yazılımları kullanan bir sigmoidal eğri için girdiydi.

Sigmoidal fonksiyon şu şekilde genelleştirildi (Denklem 1)

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-k(x-x_0)}}$$

burada

M, maksimum viral kopya sayısıdır (eklenen TA'nın sonsuz seyreltilmesinde, yani plaka kuyuları'nın yalnızca çok küçük TA içeriğiyle) a, M'nin %50'sinde TA'nın seyreltme değeridir (Dilüsyon50) b, ara ürünün türevidir bulaşma.

Daha sonra eğri uyumunu karakterize ettik ve a parametresinin değerini ve bunun %95 güven aralığını hesapladık. ID50 değerlerinin elde edilmesine yönelik bir başka adımlar olarak, aktif bileşen molar konsantrasyonları, bilinen bileşim, oyuk başına uygulanan hacim ve bileşenlerin molar kütleleri kullanılarak elde edilen Dilution50 değerinden belirlendi. Bu, TA inhibe edici etkisinin, farklı başka moleküllerin veya ekstraktlarının diğer in vitro inhibisyon sonuçları ile karşılaştırılmasına izin verir.

3. Sonuçlar ve tartışma

Viral replikasyon inhibisyon tahlilimizde iki ana bulgu rapor edilmiştir. SARS-CoV-2 virüsü B1.1.7 VOC, enfektif ajan olarak kullanıldı (bölüm 2.3).

(1) VeroE6 hücreleri üzerinde test edilen TA dilüsyonlarının hiçbirinde niteliksel veya niceliksel sitotoksosite gözlenmedi.

(2) Doza bağlı bir inhibisyon gösterildi.

Deney için kullanılan ticari kaynaklı "ZnSeC-Humicin" besin takviyesi maddesinin aktif bileşenleri ve konsantrasyonları Tablo 1'de özetlenmiştir. Orijinal H2S bileşenleri (%65,9 m/m FA ve %0,5 m/m HA), insanda önerilen günlük alım değerlerine göre yüksek C vitamini konsantrasyonu (yaklaşık 40 g/100g) ve daha düşük metal iyonları konsantrasyonu (60900 mg/kg Çinko-iyon ve 23.2 mg/kg Selenyum iyonu).

Tablo 1

Test edilen "ZnSeC-Humisin" toz besin takviyesi malzemesinin içerikleri.

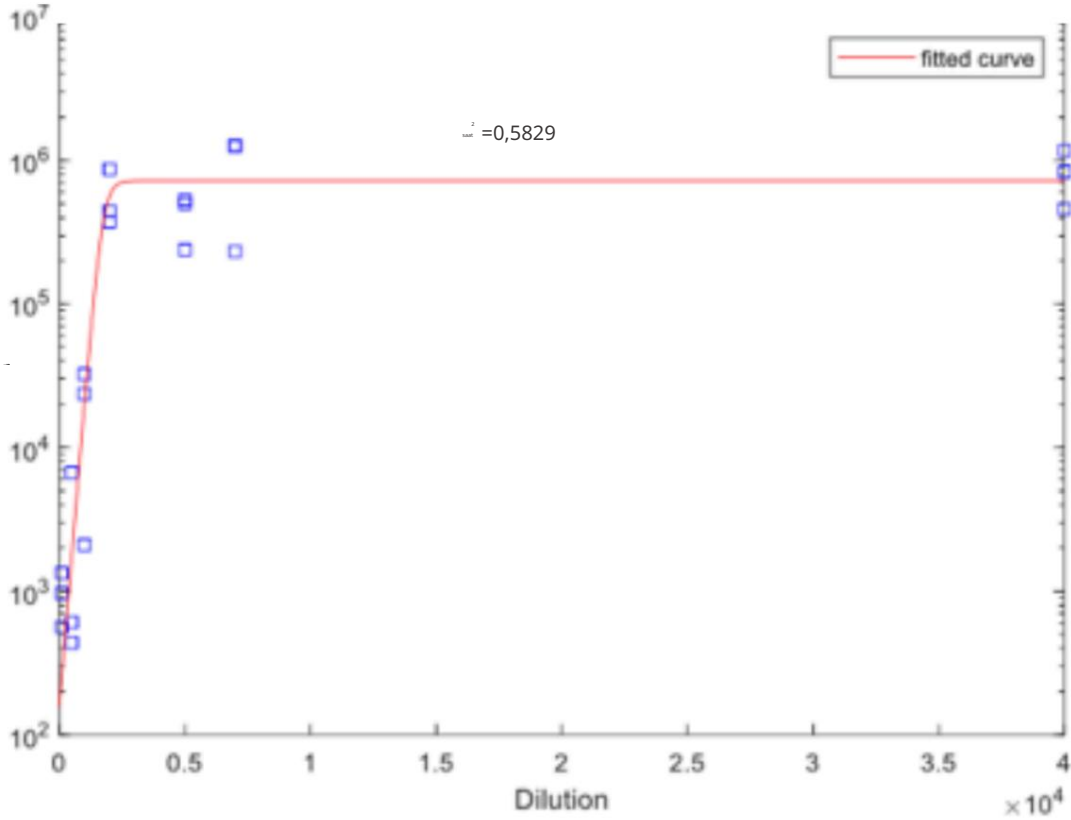
Bileşen	Konsantrasyon	Performans özellikleri	
		Daha düşük sınırı	ölçüm belirsizliği
Nem C	%8,5 m/m %0,01 m/m	±10,0	
Vitamini C	39,6 g/100 g	0,0001 g/100 g	±10.0
Hüyük			
Asit	%0,5 m/m %0,1 m/m	±10,0	
Fulvik asit	%65,9 m/m %0,1 m/m	±10,0	Zn ²⁺
	60900 mg/kg	0,5 mg/kg	±10,0 23,2 mg/
Se-	kg 0,01 mg/kg	±10,0	

Elde edilen dilüsyon değeri ve diğer inhibisyon eğrisi özellikler Tablo 2'de sunulmaktadır.

Tablo 2.

Test Maddesinin SARS-CoV-2 Alfa VOC'ye karşı inhibisyon eğrisinin özellikleri

%95'te Parametre Uyum Değeri Güven aralığı		
M	7,23x10 ⁴ __	(51,52x 10 ⁴ , 94,95x10 ⁴) __
a	1739,98	(621,80, 2858,00)
b	4,84x10 ⁻³ __	(-14,12 x 10 ⁻³ , 23,80 x 10 ⁻³)



Şekil 2. Vero F6 hücre kültüründe ilgili SARS-CoV-2 virüsü B1.1.7 varyantı ("Alfa VOC") için Zn-Se-askorbik asit kompleksi (ZnSeCHS) ile karşılaştırılması. Grafik, logaritmik ölçekli bir dilüsyon eğrisi göstermektedir. X-ekseni 'Dilution x 10⁴' olarak etiketlenmiştir ve 0 ile 4 arasında değişmektedir. Y-ekseni logaritmik olarak 10² ile 10⁷ arasında değişmektedir. Mavi kareler, deneysel verileri temsil ederken, kırmızı çizgi 'fitted curve' olarak etiketlenmiştir. Grafikte R² = 0,5829 değeri belirtilmiştir.

Test sonuçları, Zn-Se-askorbik asit (ZnSeC-Humisin) ile birleştirilen hümitik maddelerin görünüşte SARS-COV-2 virüs replikasyonu üzerinde önemli bir engelleyici etki sergilediğini göstermektedir (Şekil 2). Bir sigmoidal eğri (kırmızı sürekli çizgi) takibi için test edilen Hümitik Madde malzemesinin ortalama inhibe edici doz (ID50) değerinin belirlenmesi için üçlü kopya numarası veri noktaları na (mavi kareler). Şekil 2, sigmoidal fonksiyonun yarı logaritmik ölçekli dönüşümünü göstermektedir. ZnSeC-Humisin stok solüsyonunun Seyreltme50 değerinin 2000 (1740) kat seyreltmeye yakını olduğu görülmüştür.

ID50 değerinde seyreltmede ZnSeC-Humisin bileşenlerinin molar konsantrasyonları genellikle 10⁻⁹ M (pM) konsantrasyon aralığı ndadır. Tozun ölçülen bağımlı nemi %8.5 m/m idi, dolayısıyla veriler tablodaki kuru ağırlığa göre düzeltilmiştir. Çok düşük, 70,80 pikomol/L konsantrasyonu FA ve benzer şekilde yine çok düşük, femtomolar (49,00-409,00 fM) HA konsantrasyonu, 610,00 pM askorbik asit, 251,00 pM Zn²⁺ ve 7,28 pM Se⁻ kopya sayısı nı yarı ya indirebilir ilgili SARS-CoV-2 virüsü B1.1.7 varyantı nı n ("Alfa VOC") (Tablo 3.)

Tablo 3.

Uygulanan 200 mikrolitre hacimlerde ölçülen, gözlemlenen ID50 etkisi 1740 kat seyreltme için hesaplanan API miktarları .

Aktif İlaç	API miktarı (mgs)	Molar kütle, Da	ID50'de oyuk başına hesaplanan molar konsantrasyon , pM 70.8
Bileşen (API) Adı			
Fulvik Asitler, Turba Menşeli	0,1137	2310	
Askorbik asit	0,0747	176.12	610
Humik Asitler, Turba Menşeli	0.0009	3160-26400	0,049-0,409
çinko(++) iyonları	0,0114	65,38	251
Selenyum(-) iyonları	0,0004	78,97	7,28

4. Sonuçlar

Bu kavram kanıtı çalışması, turba özü hümitik maddeler ve Zn/Se bazlı bir besin takviyesi olan Test Makalesinin SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve replikasyonu üzerinde ölçülebilir, doza bağımlı ve sağlam in vitro inhibitör etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

B Pályi ve diğerleri

Hüyük Asidin API molar kütlelerine göre normalize edildiğinde, yüz femtomolar aralı k görünürken, Selenyum için bir pikomolar aralı k, Fulvik Asitler için inhibisyon sabitleri ondalık pikomolar aralı kta, Askorbik Asit ve Çinko için ise yüz pikomolar aralı kta idi.

Hem fulvik asitlerin hem de Çinko iyonları nın HIV, grip ve koronavirüslere karşı güçlü ve doza bağlı antiviral etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır. Zn iyonları nın da bağlayabilen bir askorbik asit kompleksi ile FA'nın etkilerini güçlendirerek ve glutatyon peroksidaz için Selenyum kullanarak hücresel antioksidan koruma devrini artırarak, bu bileşenlerin sinerjistik bir etkisini varsayıyoruz. Ana antiviral / replikasyon önleyici etkiler muhtemelen FA ve Zn⁺⁺ iyonları tarafından uygulanmaktadır. Şu anda SARS-CoV-2'nin bağışıklık ve hatta dikkatli bazlı replikasyonu hakkında çok sayıda rapor olduğundan, bu kavram kanıtlanmamış hipotezi, peroral uygulamaların klinik öncesi hayvan modellerinde ve klinik deneylerde daha fazla test edilmelidir. Bu in vitro sonuçlar hiçbir şekilde terapötik amaçlı insan klinik uygulanabilirliğinin doğrudan bir işareti değildir, ancak kombinasyon halinde kullanılan kanıtlanmış in vitro antiviral aktiviteye sahip materyallerin etkileri hakkında daha fazla araştırma yapmamız için bizi yönlendirir.

Pikomolar konsantrasyon aralıkları ayrıca daha ileri in vivo çalışmaları nın yapılmaması gerektiğini gösterir. Bu değerler hemen hemen tüm diğer mevcut antiviral moleküllerin in vitro inhibisyon değerlerinden en az bir büyüklük daha düşüktür.

teşekkürler

Bu çalışma, Semmelweis Üniversitesi Terapötik Gelişim tematik programı çerçevesinde Macaristan İnsan Kaynakları Yüksek Öğretim Kurumsal Mükemmellik Programı tarafından desteklenmiştir, Avrupa Birliği'nin Horizon 2020 araştırma ve yenilik programı 739593 numaralı hibe sözleşmesi kapsamında; HCEMM, AB Programı tarafından desteklenen: H2020-EU.4.a. Bu çalışma kısımlen Macaristan Ulusal Araştırma, Geliştirme ve İnovasyon Ofisi'nin (2020-4.1.1-TKP2020 finansman planı ve Geleceğe Yatırım 2020.1.16-Jövö- kapsamında) finans edilebilir Tematik Mükemmellik Programı (TKP-BIOImaging) hibeleriyle de finanse edildi. 2021-00013).

Referanslar

- Alvarez-Puebla AR n, Garrido JJ ve Aroca RF 2004
Yüzey Geliştirilmiş Titreşimsel Mikrospektroskopisi
Fulvik Asit Miselleri Analitik Kimya 76 7118- 25
- Alvarez-Puebla RA, Valenzuela-Calahorra C ve Garrido JJ 2006 Fulvik asit yapısal konformasyon ve agregasyon üzerine teorik çalışma. Bir moleküler modelleme yaklaşımı Sci Total Environ 358 243-54 Asakawa D, Kiyota T, Yanagi Y ve Fujitake N 2008 Optimization of Conditions for High-Performance

- Farklı Zeminlerin Boyut Dışı Şılama Kromatografisi
Humik Asitler Analitik Bilimler 24 607-13
- Bae M ve Kim H 2020 COVID-19'a karşı bağışıklık sisteminde C vitamini, D vitamini ve selenyumun rolü Moleküller 25 5346
- Béres T, Kabdebó S, Ferenc K, Nemeséri L, Szélsy A ve Visy L 1957 [Fulvik asitlerin karaciğer koruyucu işlevlerine özel önem verilerek terapötik uygulamaları üzerine çalışmalar. Macarca.] Magy Állatorv Lapja 12 351-2 Béres T, Király I, Bóna E, Lővei E ve Róbert S 1958 Tözeg fulvósavval szerzett terapiás tapaszlatok Orvosi Hetilap 17 567 Bertoli AC, Garcia JS, Trevisan MG, Ramalho TC ve Freitas MP 2016 Etkileşimler fulvat-metal (Zn(2) (+), Cu(2)(+) ve Fe(2)(+)): termodinamik, yapısal ve spektroskopik özelliklerin teorik olarak incelenmesi Biometals 29 275-85 Chen L ve Liang J 2020 Ortaya çıkan yeni antiviral terapötik ajanlar olarak fonksiyonel nanoparçacıklara genel bir bakış 8 Chon K, Cho J ve Shon HK 2013 Aljojenik organik maddenin, bakteriyel organik maddenin, hüyük asitlerin ve fulvik asitlerin gelişmiş karakterizasyonu Water Sci Technol 67 2228-35 Cornejo A, Jiménez JM, Caballero L, Melo F ve Maccioni RB 2011 Fulvik asit toplama engelleyicileri ve Alzheimer hastalığıyla ilişkili tau fibrillerinin parçalanmasını destekler Alzheimer hastalığı Dergisi 27 143-53
- de Melo BA, Motta FL ve Santana MH 2016 Hüyük asitler: Yeni teknolojik gelişmeler için yapısal özellikler ve çoklu işlevler Mater Sci Eng C Mater Biol Ek 62 967-74
- Ghosal S, Baumik S ve Chattopadhyay S 1995 Shilajit fare peritoneal makrofajlarındaki morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden oldu Fitoterapi Araştırma 9 194-8
- Ghosal S, Lal J, Singh SK, Goel RK, Jaiswal AK ve Bhattacharya SK 1991 Formülasyon ihtiyacı Shilajit, izole edilmiş aktif bileşenleri ile Fitoterapi araştırması 5 211-6
- Gnananath K, Nataraj KS, Rao BG, Kumar KP, Mahnashi MH, Anwer MK, Umar A, Iqbal Z ve Mirza MA 2020 Mevzuat gereklilikleri doğrultusunda fonksiyonel bir yardımcı madde olarak fulvik asidin araştırılması Res 187 109642 Hakkında
- Grant WB, Lahore H, McDonnell SL, Baggerly CA, Fransızca CB, Aliano JL ve Bhattoa HP 2020 Kanıt D Vitamini Takviyesi Riski Azaltabilir Grip ve COVID-19 Enfeksiyonları ve Ölümleri Besinler 12
- He L, Zhao J, Wang L, Liu Q, Fan Y, Li B, Yu YL, Chen C ve Li YF 2021 Savaşmak için nano-selenyum kullanma

- Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19)? Nano Bugün 36 101037
- Helbig B, Klockin R ve Wutzler P 1997 Hümik asit benzeri polimerlerin ve bunların o-difenolik başlangıç bileşiklerinin anti-herpes simpleks virüsü tip 1 aktivitesi Antiviral Kimya ve Kemoterapi 8 265-73
- Hullar I, Vucskits AV, Berta E, Andrasofszky E, Bersenyi A ve Szabo J 2018 Fulvik ve hümik asitlerin sıçanlarda bakır ve çinko homeostazı üzerindeki etkisi Acta Vet Hung 66 40-51
- Jacob KK, Kij PP ve NC 2019 Potansiyel Olarak Humik Maddeler Terapötik ve İlaç Dağıtım için Biyomateryaller System-a Review International Journal of Applied Eczacılık 1-4
- Jones MN ve Bryan ND 1998 Hümik maddelerin koloidal özellikleri Kolloid ve Arayüzdeki Gelişmeler Bilim 78 1-48
- Joone GK, Dekker J ve Jansen Van Rensburg CE 2003 İmmunostimülatör Özelliklerinin Araştırılması Oxihumate Journal of Natural Research C 58 263-7
- Kim MJ, Rehman SU, Amin FU ve Kim MO 2017 NF-KB /JNK/GSK3beta sinyal yolu Nanotıp 13 2533-44 Klöcking R aracıyla antosiyanın yüklü PEG-altı nanoparçacıkları nın Abeta1-42 kaynaklı nöroenflamasyon ve nörodejenerasyona karşı gelişmiş nörokoruması Björn H 2005 Tıbbi ve Farmasötik Uygulamalar için
- Biyopolimerler, (Weinheim WILEY VCH Verlag GmbH & C. KGaA.) s. 3-16.
- Klöcking R ve Sprössig M 1972 Antiviral özellikleri hümik asitler Deneyim 28 607-8
- Kotwal GJ, Kaczmarek JN, Leivers S, Ghebremariam YT, Kulkarni AP, Bauer G, De Beer C, Preiser W ve Mohamed AR 2005 Trifolium türünden toksik olmayan, asidik bir bitki ekstraktı nın Anti-HIV, anti-poksivirüs ve anti-SARS aktivitesi Secomet-V/anti-vac, yeni bir geniş spektrumlu antiviral Ann NY Acad Sci 1056 293 içerdiğini öne sürüyor -302
- Kretzschmar R ve Christl I 2001 Proton ve metal katyonun hümik maddelere kimyasal bileşim ve molekül büyüklüğü ile ilgili olarak bağlanması ÖZEL YAYIN-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 273 153-64 Kumar Gautam R, Navaratna D, Muthukumaran S, Singh A, Islamuddin and More N 2021: Intech Açık
- Kunavue N ve Lien TF 2012 Fulvik Asit ve Probiyotiklerin Domuzların Büyüme Ön Performansı, Besin Sindirilebilirliği, Kan Parametreleri ve Bağışıklığı Üzerine Etkileri.pdf> J. Anim.Sci. Av. 2 711-21 Lag J, Hadas A, Fairbridge RW,
- Munoz JCN, Pombal XP, Cortizas AM ve Almonds G 2008 Encyclopedia of Soil Science, ed W Chesworth (Dordrecht: Springer The Netherlands) pp 315-23
- Larenas-Linnemann D, Rodriguez-Perez N, Arias-Cruz A, Blandon-Vijil MV, Del Rio-Navarro BE, Estrada Cardona A, Gereda JE, Luna-Pech JA, Navarrete Rodriguez EM, Onuma-Takane E, Well-Beltran CF ve Rojo-Gutierrez MI 2020 COVID-19 zamanlarında virüse karşı doğuştan gelen bağışıklığı güçlendirme: Gerçekleri kurgulardan ayrılmaya çalışmak Dünya Alerjisi Organ J 13 100476
- Li YM, Li BC, Li P, Liu JZ, Cui JL ve Mei ZQ 2011 Na-FA'nın farelerde gastrointestinal hareket ve mide ülseri üzerindeki etkileri Zhong yao cai= Zhongyao cai= Çin tıbbi malzemeleri dergisi 34 1565-9
- Lieke T, Steinberg CEW, Pan B, Perminova IV, Meinelt T, Knopf K ve Kloas W 2021 Su katkı maddesi olarak fenol açığından zengin fulvik asit, su ürünleri yetiştiriciliğinde büyümeyi artırır, stresi azaltır ve balıkların bağışıklık sistemini uyarır Scientific Reports 11
- Lu FJ, Tseng SN, Li ML ve Shih SR 2002 Protokatekuik asitten türetilen sentetik hümat analogları nın in vitro anti influenza virüsü aktivitesi Virology Archives 147 273-84
- Mishra T, Dhaliwal HS, Singh K ve Singh N 2019 Shilajit (Mumya): Biyokimyanın Güncel Durumu, Terapötik ve Klinik Gelişmeler Güncel Beslenme ve Gıda Bilimi 15 104-20
- Molnar D 2021 Hümik asidin domuzlarda mide ülserleri üzerindeki yararlı etkileri International Pig Topics 34 9
- Mosa A, Taha A ve Elsaied M 2020 Hümik maddelerin tarımsal çevre uygulamaları: Kritik bir inceleme Mısır Toprak Bilimi Dergisi 0 0-
- Murbach TS, Glavits R, Endres JR, Clewell AE, Hirka G, Vertesi A, Beres E ve Pasics Szakonyine I 2020 Bir fulvik ve hümik asit preparatı nın toksikolojik değerlendirmesi Toxicol Rep 7 1242-54
- Nebbioso A ve Piccolo A 2013 Çözünmüş organik maddenin (DOM) moleküler karakterizasyonu: eleştirel bir inceleme Analitik ve Biyoanalitik Kimya 405 109-24
- Orlov AA, Zhrebker A, Eletskaia AA, Chernikov VS, Kozlovskaya LI, Zhernov YV, Kostyukovich Y, Palyulin VA, Nikolaev EN, Osolodkin DI ve Perminova IV 2019 Hümik maddelerin biyoaktif bileşenlerinin moleküler alanı nın ve uygulanabilir yapıları nın FTICR MS veri madenciliği ile incelenmesi ChEMBL veritabanı Bilimsel Raporlar 9
- Pant K, Singh B ve Thakur N 2012 Shilajit: A Humic Matter Kanseri için her derde deva Uluslararası Journal of Toksikolojik ve Farmakolojik Araştırma 4 17- 25
- Quiles JL, Rivas-Garcia L, Varela-Lopez A, Llopis J, Battino M ve Sanchez-Gonzalez C 2020 Gıdalardaki besinler ve diğer biyoaktif moleküllerin COVID-19'a karşı tedavide söyleyecek bir şeyleri var mı? Çevre Res 191 110053
- Saar RA ve Weber JH 1982 Fulvik asit: metal değiştirici iyon kimyası Çevre bilimi ve teknoloji 16 510A-7A
- Schellekens J, Buurman P, Kalbitz K, Zomeren AV, Vidal Torrado P, Cerli C ve Comans RNJ 2017 Zıttı Ortamlardan Gelen Humik Asitlerin ve Fulvik Asitlerin Moleküler Özellikleri Çevresel Bilim ve Teknoloji 51 1330-9

B Pályi ve diğerleri

Schepetkin I, Khlebnikov A ve Kwon BS 2002 Humus maddesinden türetilen ilaçlar: mumya ilacı na odaklanın Kalkınma Araştırması 57 140-59

Stevenson FJ 1994 Humus kimyası : oluşum, bileşim, reaksiyonlar: John Wiley & Sons)

Sutton R ve Sposito G 2005 Toprak hümik maddelerinde moleküler yapı : yeni görüş Çevre bilimi ve teknoloji 39 9009-15 Szabo J, Vucskits AV, Berta E, Andrasofszky E, Bersenyi A ve Hullar I 2017 Effect of fulvic and humic acid on iron ve sı çanlarda mangan homeostazı Acta Vet Hung 65 66-80 te Velthuis AJ, van den Worm SH, Sims AC, Baric RS, Snijder EJ ve van Hemert MJ 2010 Zn(2+), koronavirüs ve arterivirüs RNA polimeraz aktivitesini in vitro ve çinkoda inhibe eder iyonoforlar hücre kültüründe bu virüslerin replikasyonunu bloke eder PLoS Pathog 6 e1001176 Tiwari SK, Dicks LMT, Popov IV, Karaseva A, Ermakov AM, Suvorov A, Tagg JR, Weeks R ve Chikindas ML 2020 Probiyotikler Virüslere Karşı Savaşta: Neler Eksik? Resimden mi? Ön Mikrobiyol 11 1877

Van Rensburg CEJ 2015 Hümik Maddelerin Antienflamatuar Özellikleri: Küçük Bir İnceleme Fitoterapi Araştırma 29 791-5

Vucskits A, Hullár I, Bersenyi A, Andrásföszky E, Tuboly T ve Szabó J 2010a Effect of fulvic acid and humic acid. Bölüm 1. Ekonomik indeksler, immün uyarıcı etki Magyar Allatvorvosok Lapja 132 278-84 Vucskits AV, Hullár I, Bersényi A, Andrásföszky E, Kulcsár M ve Szabó J 2010b Fulvik ve hümik asitlerin sı çanlarda performans, bağışıklık tepkisi ve tiroid fonksiyonu üzerindeki etkisi Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 94 721-8 Winkler J ve Ghosh S 2018 Fulvik Asitin Kronik Enflamatuvar Hastalıklar ve Diyabette Terapötik Potansiyeli J Diabetes Res 2018 5391014 Zhernov YV, Konstantinov AI, Zhrebker A, Nikolaev E, Orlov A, Savinykh MI, Kornilaeva GV, Karamov EV ve Perminova IV 2021 Doğal hümik maddelerin ve shilajit malzemelerinin HIV-1'e karşı antiviral etkinliği: Yapı ilişkisi Environ Res 193 110312