

УДК 582.284.5; 615.281; 578.832

ЭКСТРАКТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ИНГИБИРУЮТ РАЗМНОЖЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА А В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK

Макаревич Е.В., Филиппова Е.И.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Кольцово, Новосибирская область, Россия, e-mail: makarevich@vector.nsc.ru

С целью выявления перспективных лекарственных средств было проведено исследование токсичности и противовирусной активности водных и этанольных экстрактов из высших растений (*Radices Hedysari theini*, копеечник чайный и *Herba Astragali dasyanti*, астрагал шерстистоцветковый) на перевиваемой линии клеток MDCK. Важно, что лекарственное растительное сырье является наиболее дешевым и доступным источником получения лекарственных средств. Установлено, что исследованные образцы водных и этанольных экстрактов копеечника чайного и астрагала шерстистоцветкового малотоксичны на культуре клеток MDCK. Изучение противовирусной активности экстрактов из этих растений на культуре клеток MDCK в профилактической схеме показало, что исследованные образцы подавляют размножение вируса гриппа А на 1,5–2,8 lg. Наибольшую противовирусную активность проявил этанольный экстракт из копеечника чайного.

Ключевые слова: высшие растения, токсичность, водные и этанольные экстракты, культура клеток MDCK, противовирусная активность.

EXTRACTS OF THE PHYTOGENESIS INHIBIT REPRODUCTION OF INFLUENZA A FOR CELL CULTURE MDCK

Makarevich E. V., Filippova E. I.

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia, e-mail: makarevich@vector.nsc.ru

In order to identification perspective medicines were investigated with respect to their toxicity and antiviral activity of water and etanolny extracts from the highest plants (*Radices Hedysari theini*, *Herba Astragali dasyanti*) for cell culture MDCK. It's very important that medicinal plant raw materials is the cheapest and available source of receiving medicines. All investigated specimens plant extracts were low-toxicity for cell culture MDCK. It was shown that water and etanolny extracts from the highest plants inhibited reproduction influenza A about 1,5–2,8 lg in preventive scheme for cell culture MDCK. The largest antiviral activity was showed etanolny extract from the plant *Herba Astragali dasyanti*.

Key words: the highest plants, toxicity, water extracts, etanolny extracts, cell culture MDCK, antiviral activity.

Введение

Использование растений в качестве лекарств пришло в наш век из глубокой древности и до сих пор играет значительную роль в арсенале лекарственных средств современной медицины. Это обусловлено некоторыми преимуществами препаратов фитотерапии по сравнению с синтетическими лекарствами.

Одним из основных преимуществ растительных лекарств является низкая частота побочных явлений. Интерес к фитотерапии вызван также изменением в современном мире возрастной структуры населения, а именно – увеличением лиц пожилого возраста, которые, как правило, страдают хроническими заболеваниями, требующими длительного применения лекарственных средств, и риск развития побочных явлений при этом должен быть минимальным. Особую роль фитотерапия занимает в педиатрической практике, так как лекарственные растения действуют мягче и реже дают нежелательные осложнения.

Низкую частоту побочных явлений можно объяснить тем, что растительное лекарство – это комплекс, включающий в себя биологически активные вещества (БАВ): протеины, микроэлементы, витамины, эфирные масла и многие другие, который, по существующему мнению, сформировавшись в живой клетке, имеет большее сходство с человеческим организмом, чем изолированное, химически чистое действующее вещество, в связи с чем, он легче усваивается и дает меньше побочных эффектов [5].

Очень велики возможности комплексного применения лекарственных средств растительного происхождения, так как лекарственные растения в своем большинстве совместимы между собой и другими лекарственными веществами, и при сочетании лекарственных растений часто проявляется синергизм их действия.

Необходимо отметить, что лекарственное растительное сырье является наиболее дешевым и доступным источником получения лекарственных средств [5].

В настоящее время в качестве лекарственного сырья широко используются высшие растения, среди которых особое внимание привлекают копеечник чайный и астрагал шерстистоцветковый. Так известно, что настой из астрагала шерстистоцветкового используется для лечения начальных форм гипертонической болезни, недостаточности кровообращения I и II степеней, а также при острых гломерулонефритах на ранней стадии болезни. Из этой травы получен экстракт в таблетках «Мукалтин», основным действующим веществом которого являются тритерпеновые сапонины, производные дазиантогена и флавоноидные гликозиды [2]. Другое растение, копеечник чайный или красный корень, содержит дубильные вещества, ксантон хедизарид, тритерпеновые сапонины, кумарины, флавоноиды, свободные аминокислоты и обладает противовоспалительным, сосудорасширяющим, антиоксидантным и общетонизирующим действием [1].

Целью данной работы было изучение в культуре клеток MDCK противогриппозных свойств водных и этанольных экстрактов, выделенных из высших растений копеечника чайного и астрагала шерстистоцветкового.

Материалы и методы

Экспериментальные образцы экстрактов. В работе использовали водные и этанольные экстракты из высших (*Radices Hedysari theini*, копеечник чайный и *Herba Astragali dasyanti*, астрагал шерстистоцветковый) растений, полученные под руководством профессора Трошковой Г. П. и сотрудников, как описано ранее [3].

Культура клеток. Для определения токсичности и противовирусной активности экстрактов использовали перевиваемую линию клеток почки собаки кокер-спаниеля MDCK, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клеточную суспензию разводили предварительно подогретой до температуры 37 °С средой RPMI-1640 (ООО

«БиолоТ», г. Санкт-Петербург), содержащей 10 % сыворотки крови плодов коровы (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург), до концентрации $1,0-1,5 \times 10^5$ клеток/мл и вносили по 100 мкл/лунку 96-луночного планшета. Затем планшеты с клетками помещали в термостат при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 100 % влажности на 2–3 сутки до образования клеточного монослоя.

Вирусы. В работе использовали штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и адаптированный к лабораторным мышам штамм вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из отдела «Коллекция микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и наработанные на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Инфекционный титр штаммов вируса гриппа выражали в ТЦД₅₀/мл (пятидесятипроцентная тканевая цитопатическая доза) [4].

Определение токсичности экстрактов in vitro. Для определения токсических концентраций образцы экстрактов из высших растений разводили в несколько раз (в 2, 5, 10, 100, 1000, 10000 раз) средой RPMI-1640, содержащей 5 % сыворотки крови плодов коровы, вносили в монослой клеток MDCK по 100 мкл/лунку планшета и помещали в термостат при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и 100 % влажности на двое суток. Через 2-е суток оценивали наличие или отсутствие токсического действия растительных экстрактов на монослой клеток MDCK с помощью инвертированного микроскопа [4].

Определение противовирусной активности экстрактов in vitro. В исследованиях по определению противовирусной активности экстрактов использовали их максимально переносимые концентрации (МПК). Готовили разведения вирусосодержащей жидкости от 1 до 8 с десятикратным шагом на среде RPMI-1640, содержащей 2 мкг/мл трипсина. Для определения противовирусной активности растительных экстрактов в профилактической схеме в монослой культуры клеток MDCK вносили образцы в объеме 50 мкл/лунку в максимально переносимой концентрации, после инкубирования клеток при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 1 ч вносили разведения вирусосодержащей жидкости в объеме 50 мкл/лунку и вновь инкубировали клетки в течение 2–3 суток при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. По окончании инкубирования клеток регистрировали цитопатическое действие вируса (ЦПД) в монослое клеток с помощью инвертированного микроскопа и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации (РГА) с 1 % эритроцитами петуха [4].

Результаты и обсуждение

Цитотоксическое действие экстрактов на клетки MDCK. Установлено, что 50 %-я цитотоксическая доза (ТС₅₀) экстрактов, полученных из высших растений, составляла от 0,05 до 1,0 мг/мл для разных образцов (таблица).

Таблица

Противовирусная активность водных и этанольных экстрактов высших растений в клетках MDCK, зараженных вирусом гриппа А (профилактическая схема)

Образец		Концентрация сухого вещества в экстракте, мг/мл	Токсичность для клеток MDCK (ТС ₅₀), мг/мл	Инфекционность вируса (титр) в клетках MDCK в lg ТЦД ₅₀ /мл (M±m, n=3)		Индекс нейтрализации (Титр _{контроль} - Титр _{опыт}), lg	
Наименование	№			A/Aichi/2/68*	A/chicken/Kurgan/05/2005 [®]	A/Aichi/2/68	A/chicken/Kurgan/05/2005
Herba Astragali dasyanti	21 W [▲]	5,0	0,05	4,3±0,5	6,3±1,1 [#]	0	1,5
Radices Hedysari theini	22 E [▼]	5,0	1,0	1,5±0,7 [#]	7,8±1,0	2,8	0

Примечание: M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего, * титр вируса A/ Aichi/2/68 в контроле составлял 4,3±0,5 lg ТЦД₅₀/мл; [®] титр вируса A/chicken/Kurgan/05/2005 в контроле составлял 7,8±1,0 lg ТЦД₅₀/мл; [#] отличие от титров в контроле по t-критерию Стьюдента при p≤0,05; n-число экспериментов; [▲] – водный экстракт [▼] – этанольный экстракт.

Изучение протективных свойств растительных экстрактов в отношении вируса гриппа А in vitro. Для оценки противовирусной активности растительных экстрактов в опытах in vitro использовали их нетоксические концентрации. Данные противовирусной активности экстрактов на клетках MDCK в отношении вируса гриппа А представлены в таблице. Как видно из таблицы, водный экстракт высшего растения астрагала шерстистоцветкового (*Herba Astragali dasyanti*) ингибирует размножение вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) (индекс нейтрализации (ИН) составляет 1,5 lg), но не подавляет размножение вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2). При этом этанольный экстракт, полученный из этого же растения, в экспериментах in vitro не подавляет репродукцию ни вируса гриппа птиц, ни вируса гриппа человека (данные не приведены).

Исследование водного и этанольного экстрактов другого представителя высших растений – копеечника чайного (*Radices Hedysari theini*) показало, что только его этанольный вариант проявляет противовирусную активность и только в отношении вируса гриппа человека субтипа А(H3N2) (ИН штамма A/Aichi/2/68 составляет 2,8 lg) (таблица). Водный же экстракт копеечника чайного сколь-нибудь заметной противогриппозной активности в отношении вирусов гриппа субтипов А/H5N1 и А/H3N2 не обнаруживают (данные не приведены). На основании полученных данных можно предположить, что для подавления

репродукции вирусов гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK необходимы разные биологически активные вещества (БАВ) или их композиции.

Заключение

Полученные результаты по противовирусной активности экстрактов высших растений копеечника чайного и астрагала шерстистоцветкового открывают возможность разработки новых противогриппозных препаратов на основе этого растительного сырья. При этом важно, что экстракты, обнаружившие противовирусную активность в отношении штаммов вируса гриппа человека и птиц, обладают низкой токсичностью для эукариотических клеток.

Детальное изучение химического состава, фармакологических свойств, а также доклинических и клинических испытаний БАВ (и/или композиций БАВ) из этих растений позволят разработать и внедрить в практику здравоохранения новые эффективные растительные препараты на их основе против вируса гриппа.

Список литературы

1. Всё для здоровья [Электронный ресурс] // сайт. – URL: <http://www.rodovoe.by>.
2. Живая природа [Электронный ресурс] // сайт. – URL: <http://www.kungrad.com>.
3. Костина Н. Е. Плодовые тела высших грибов – источники биологически активных веществ с противовирусной активностью // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 7.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / [под ред. Р. Ю. Хабриева]. – М.: Медицина, 2005. – 829 с.
5. Современные лекарственные препараты растительного происхождения [Электронный ресурс] // сайт. – URL: <http://www.xreferat.ru>.

Рецензенты:

Шишкина Л. Н., д.б.н., заведующая отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область.

Белявская Валентина Александровна, д.б.н., профессор, заведующая сектором отдела научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями особо опасных инфекций, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область.