

На правах рукописи

Филиппова Екатерина Игоревна

**Противовирусные свойства экстрактов и фенольных соединений
культивируемых и дикорастущих растений
Юго-Западной Сибири**

1.5.10 – вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Мазуркова Наталья Алексеевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: Извекова Ирина Яковлевна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры инфекционных болезней педиатрического факультета ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

Шаршов Кирилл Александрович, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов ФГБУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Научно-исследовательский институт вирусологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита состоится «27» мая 2022 г. в 9:00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. +7(383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Непомнящих Татьяна Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Инфекционные болезни, в том числе и новые, составляют угрозу для человечества, поскольку являются причиной трети общего ежегодного количества смертей в мире [Яковлев, 2017]. Среди огромного количества возбудителей инфекционных болезней особое место принадлежит вирусам. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) объявила 21 век столетием вирусов [Яковлев, 2017].

Грипп и острые инфекции верхних дыхательных путей среди всех инфекционных болезней имеют наибольшее влияние на состояние здоровья населения земного шара. Кроме того, они занимают первое место среди причин временной потери работоспособности [Пономарев, Яковлев, 2017].

Инфекция, вызываемая вирусами простого герпеса (ВПГ), также в настоящее время занимает одно из лидирующих мест среди вирусных заболеваний человека. Согласно статистике ВОЗ, в последние годы заражение ВПГ составляет 75,0–95,0 % населения Земли, при этом 35,8 % всех заболеваний вирусной этиологии вызваны вирусами герпеса. Смертность от герпеса занимает второе место в мире после гриппа (0,01–0,2 %), а от диссеминированных форм болезни, вызванной ВПГ, составляет 15,8 %. В России число госпитализированных больных с диагнозом ВПГ ежегодно превышает 2,5 млн. человек, а трудовые потери исчисляются более 40 млрд. руб. в год [Самгин, Халдин, 2002].

Сегодня реальна угроза биотерроризма с использованием высокопатогенных вирусов, в том числе и возбудителей ортопоксвирусных инфекций. После глобальной ликвидации натуральной оспы и отмены вакцинации против нее в 1980 году в мире сложилась опасная ситуация в связи с отсутствием у более половины населения планеты иммунитета против ортопоксвирусных инфекций.

Для борьбы с вирусными инфекциями наряду с вакцинами, а также иммуномодулирующими, патогенетическими, общеукрепляющими и симптоматическими препаратами крайне важную роль играют этиотропные лекарственные средства, каждое из которых действует на определенный этап репродукции вирусов.

В настоящее время медицина располагает сравнительно небольшим количеством средств специфической противовирусной терапии. Многие из применяемых в практике здравоохранения противовирусных препаратов имеют ряд существенных недостатков, среди них такие, как высокая нефротоксичность, низкая биодоступность, быстрое развитие устойчивости штаммов вирусов к препаратам [Liu et al., 2011; Галегов и др., 2012].

Все это обуславливает необходимость создания более эффективных противовирусных препаратов, в том числе и на основе биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения.

В связи с этим поиски новых природных источников БАВ, обладающих противовирусной активностью, как и расширение уже существующей базы фармакопейных лекарственных растений, в настоящее время по-прежнему актуальны.

Многообразие БАВ растений определяет широту спектра их действия на организм человека в комплексной терапии различных заболеваний, а преимущества соединений природного происхождения перед их синтетическими аналогами в современной медицинской практике общеизвестны: препараты природного происхождения по сравнению с синтетическими лекарственными средствами обладают мягким терапевтическим действием и низкой токсичностью, вследствие чего могут применяться в течение длительного времени [Vahabpour-Roudsari, Shamsi-Shahrabadi, Monavari, 2007].

Степень разработанности. До настоящего времени были проведены исследования противовирусной активности экстрактов и отдельных БАВ высших растений. Объектами изучения являлись препараты, полученные разными методами извлечения БАВ, а также отдельные вещества и их комбинации, относящиеся к разным классам химических соединений [Бычкова и др., 2010; Lin et al., 2010; Zandi et al., 2012; Nhiem et al., 2014; Juranovic et al., 2015; Kim et al., 2020; Langeder et al., 2020].

Активности препаратов растительного происхождения изучалась в отношении ВГ, ВПГ, ВИЧ, поксвирусов, вирусов гепатита, коронавирусов, энтеровирусов, ЦМВ и др. в экспериментах *in vitro*, *in ovo*, *in vivo* [Chiang et al., 2005; Wu et al., 2007; Churin, Masnaia, Sherstoboev, Shilova, 2008; Смирнов и др., 2009; Квон и др., 2010; Рублева, 2012; Dhawan et al., 2012]. Экспериментально были подтверждены противоопухолевые, антимикробные, противовоспалительные, иммуномодулирующие, антиоксидантные свойства растительных экстрактов или выделенных из них активных компонентов [Латыпова и др., 2009; Dhawan, 2012; Arora, Rani, Sharma, 2013; Pathania et al., 2013; Jin, Zhao, Huang, Shang 2014; Sharifi-Rad, Hoseini-Alfatemi, Sharifi-Rad, Iriti, 2014; Sharifi-Rad et al., 2015]. Тем не менее, основная масса исследовательских работ по этой теме проводится за рубежом. Противовирусные свойства подавляющего большинства растений, произрастающих на территории Западной Сибири, с целью создания противовирусных препаратов, ранее не были изучены.

Цель исследования. Изучить основные характеристики противовирусной активности экстрактов и фенольных соединений растений, культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительное исследование противовирусной активности экстрактов, полученных разными способами извлечения биологически активных веществ из растений, культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири, в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1.
2. Определить эффективность растительных экстрактов, проявивших противовирусную активность *in vitro*, на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции у аутбредных мышей популяции ICR.
3. Определить ингибирующие свойства образца, полученного на основе суммы флавонолов из надземных органов манжетки обыкновенной, и образцов, полученных из её подземных частей и состоящих в основном из катехинов и лейкоантоцианов, в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK и в отношении вирусов простого герпеса и ортопоксвирусов в культуре клеток Vero.
4. Исследовать предполагаемые механизмы действия образцов, полученных из манжетки обыкновенной, на вирус гриппа в системе *in vitro*.
5. Изучить токсические и протективные свойства образцов из манжетки обыкновенной в экспериментах на аутбредных мышах популяции ICR в отношении вируса гриппа А субтипов Н3N2 и Н5N1.
6. Определить противовирусную активность экстракта культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера в отношении вируса гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1 *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна работы. Впервые проведен масштабный скрининг противовирусных свойств экстрактов из культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири растений в их максимально переносимых для культуры клеток MDCK концентрациях (0,005 – 4,0 мг/мл), позволяющий выявить перспективные виды для создания фитопрепаратов, обладающих противогриппозной активностью.

Впервые установлено, что образцы, полученные из надземных органов и корней манжетки обыкновенной, содержащие сумму флавонолов или катехинов и лейкоантоцианов, обладают противовирусной активностью в отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK, а также вируса простого герпеса 1 и 2 типов и ортопоксвирусов (вируса осповакцины и оспы мышей) в культуре клеток Vero.

Впервые доказано противовирусное действие образцов, полученных из надземных органов и корней манжетки обыкновенной, при экспериментальной гриппозной инфекции у аутбредных мышей популяции ICR.

В экспериментах на аутбредных мышях ICR, зараженных вирусом гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 в дозе 10 ЛД₅₀, впервые определены 50 %-е (ЭД₅₀) и 100 %-е эффективные дозы (ЭД₁₀₀) образца из корней манжетки обыкновенной.

Впервые установлено, что образец, полученный из корней манжетки обыкновенной и состоящий из катехинов и лейкоантоцианов, в экспериментах *in vitro* в отношении вируса гриппа А/H5N1 ингибировал адсорбционную способность вируса и снижал количество вирусной РНК, но не обладал вирулицидным действием и не подавлял нейраминидазную активность вируса.

Впервые обнаружена противовирусная активность экстракта культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера в отношении вируса гриппа А субтипов H3N2 и H5N1 *in vitro* и *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость данной работы заключается в том, что получены новые данные о противовирусной активности экстрактов и компонентов, выделенных из 83 видов растений, культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири, которые существенно дополняют научные знания о растительных источниках противовирусных веществ.

Практическая значимость данной работы заключается в том, что установлены новые растительные источники веществ, обладающие выраженной противогриппозной активностью, которые могут быть использованы в качестве сырьевой базы для разработки отечественных противовирусных препаратов.

Результаты работы защищены 2 патентами РФ:

Противовирусное средство на основе суммы флавоноидов из *Alchemilla vulgaris* L.: пат. 2580304 Рос. Федерация: МПК А61К 36/73 В01Д 11/02 А61Р 31/12 А61Р 31/14 А61Р 31/16 А61Р 31/20 А61Р 31/22/ Н.А. Мазуркова, Т.А. Кукушкина, Е.И. Филиппова, Ж.Б. Ибрагимова; заявитель и патентообладатель Гос. научн. Центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2015106729/15; заявл. 26.02.15; опубл. 10.04.16, бюл. №10. – 15 с: ил.

Противовирусное средство на основе экстракта культуры «бородатых корней» (“hairy roots”) селитрянки Шобера (*Nitraria schoberi* L.): пат. 2615376 Рос. Федерация: МПК А61К 36/77 В01Д 11/02 А61Р 31/12/ Н.А. Мазуркова, Е.И. Филиппова, М.А. Проценко [и др.]; заявители и патентообладатели Гос. научн. Центр вирусол. и биотехнол. «Вектор», Рос. акад. наук Сиб. отд-ние, Центр. сиб. ботан. сад. - № 2016110990; заявл. 24.03.16; опубл. 04.04.17, бюл. №10. – 17 с: ил.

Методология и методы исследования. С целью выявления растительных экстрактов, обладающих наиболее выраженной противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А/H3N2 и А/H5N1, нами была использована структурированная методология, которая заключается в логически обоснованной, последовательной оценке ингибирующего действия 122 экстрактов, полученных из 83 видов растений, сначала в экспериментах на культуре клеток, а затем на модельных

животных. Кроме того, на основании проведенного исследования противогриппозной активности растительных экстрактов *in vitro* и *in vivo* нами была выбрана манжетка обыкновенная, из сырья которой были выделены флавоноиды и смесь катехинов с лейкоантоцианами. Далее противовирусная активность полученных образцов была изучена в отношении вируса гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1, вируса простого герпеса 1 и 2 типов и ортопоксвирусов (вируса осповакцины и оспы мышей).

Растительные экстракты получали методами водного и этанольного извлечений. Образцы на основе суммы флавонолов и смеси катехинов с лейкоантоцианами выделяли из растительного сырья манжетки обыкновенной в лаборатории фитохимии ЦСБС СО РАН. В исследованиях были использованы культуральные, токсикологические, вирусологические, молекулярно-биологические, электронно-микроскопические, физико-химические и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Водные экстракты растений монарды дудчатой и шалфея лекарственного и этанольные экстракты растений манжетки обыкновенной, репейника волосистого, гравилата речного, спиреи средней, спиреи иволистной, спиреи пушистой, спиреи зверобоелистной, спиреи даурской, спиреи березолистной, дербенника лозного, вероники Крылова, монарды дудчатой, шалфея лекарственного подавляют в культуре клеток MDCK инфекционность вируса гриппа А субтипов Н3N2 и Н5N1 более чем на 2,2 lg.

2. Этанольные экстракты репейника волосистого, гравилата речного, спиреи иволистной, полыни горькой, полыни обыкновенной, иссопа лекарственного при их двукратном пероральном в течение 5 суток введении в суточной дозе 25 мкг/г массы мыши вызывают увеличение доли выживших и средней продолжительности жизни аутбредных мышей ICR, инфицированных вирусом гриппа А/Н5N1. При этом применение этанольных экстрактов спиреи иволистной и полыни горькой у мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Н3N2, также приводит к достоверному увеличению этих показателей выживаемости по сравнению с контролем.

3. Этилацетатные экстракты, полученные из корней, и этанольные из надземной части манжетки обыкновенной, проявляют противовирусную активность в отношении вируса гриппа А субтипов Н3N2 и Н5N1, вируса простого герпеса 1 и 2 типов и ортопоксвирусов (осповакцины и оспы мышей) *in vitro*. При этом, в отношении вируса гриппа А/Н5N1 образец из корней этого растения ингибирует адсорбционную способность, снижает количество вирусной РНК и вновь продуцируемых вирусных частиц.

4. При пероральном введении экспериментальные препараты, полученные из корней и надземной части манжетки обыкновенной, вызывают уменьшение доли погибших, увеличение средней продолжительности жизни и снижение продукции вируса в легких аутбредных мышей ICR, зараженных вирусом гриппа А субтипов Н3N2 и Н5N1, по сравнению с соответствующими инфицированными контрольными группами животных, не получавших препараты.

5. Этанольный экстракт из культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера ингибирует продукцию вируса гриппа А субтипов Н3N2 и Н5N1 в клетках MDCK, а также при пероральном введении вызывает увеличение доли выживших и средней продолжительности жизни аутбредных мышей ICR, инфицированных данными субтипами вируса гриппа.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы определяется использованием методов, адекватных целям и задачам исследования, а также методов статистической обработки полученных результатов.

По материалам диссертации опубликовано 12 статей в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертаций, и получено 2 патента РФ.

Результаты работы были представлены на 15 российских и международных конференциях, в том числе: XXI Международной конференции и дискуссионном научном клубе «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, Украина, 2013 г.); VI Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2014 г.); III Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных учёных «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» (Новосибирск, 2014 г.); II научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века» (Москва, ВИЛАР, 2014 г.); II Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, 2015 г.); IX Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар-Москва, 2015 г.); VII Российской (итоговой) научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2016» (Новосибирск, 2016 г.); III Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, 2016 г.); Международной конференции, посвященной 70-летию Центрального сибирского ботанического сада (Новосибирск, 2016 г.); Международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине», посвященной 85-летию ВИЛАР (Москва, 2016 г.); The 3rd international symposium on Eurasian biodiversity «SEAB-2017» (Minsk, Belarus, 2017 г.); IV (XII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2018 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2018 г.); VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, 2019 г.), International Conferences «Plant Diversity: Status, Trends, Conservation Concept» (Новосибирск, 2020) по итогам которых опубликовано 17 тезисов.

Личный вклад автора в диссертационную работу. Основные результаты исследований, представленные в диссертации, получены лично автором. Автор самостоятельно получил образцы из растительного сырья, выполнил исследования активности образцов в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов в культурах клеток и на лабораторных животных, провел анализ и интерпретацию полученных результатов. Получение полифенольных препаратов из манжетки обыкновенной и получение культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера выполнено в ЦСБС СО РАН. Исследование образцов методом электронной микроскопии проведено в ИХБФМ СО РАН. Статистический анализ выполнен автором лично. Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю д.б.н. Мазурковой Н.А. за помощь, оказанную при планировании и организации экспериментов, а также при обсуждении и анализе результатов данной диссертационной работы. Автор также благодарит заведующую отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций д.б.н. Шишкину Л.Н., а также сотрудников отдела: Макаревич Е.В., Проценко М.А., Коптеву Е.А., Скарнович М.О., Бормотова Н.И., инженеров и лаборантов, участвующих вместе с автором во всех экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Глубокую признательность и благодарность автор выражает сотрудникам ЦСБС СО РАН: д.б.н., профессору Высочиной Г.И., Кукушкиной Т.А., к.б.н. Лобановой И.Е., д.б.н. Новиковой Т.И. и к.б.н.

Железниченко Т.В. за сбор, подготовку и предоставление растительного сырья для исследования; главному научному сотруднику ИХБФМ СО РАН д.б.н., профессору Рябчиковой Е.И. за проведение электронно-микроскопических исследований; сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора к.б.н. Терновому В.А. за проведение полуколичественного RT-PCR анализа и Святченко С.В. за помощь в проведении исследований по изучению нейраминидазной активности образцов.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 186 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 177 источников, в т.ч. 57 отечественных и 120 зарубежных авторов. Работа содержит 32 таблицы, 24 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительное сырье и образцы. Материалом для получения и изучения водных и этанольных экстрактов служило растительное сырье высших растений 84 видов 48 родов из 15 ботанических семейств, собранное в фазу цветения на территории Западной Сибири и охарактеризованное сотрудниками лаборатории фитохимии ЦСБС СО РАН под руководством профессора Высочиной Г.И.

В работе были использованы образцы на основе суммы флавоноидов, полученные из надземных - № 7 и подземных - № 5 и № 6 частей манжетки обыкновенной Кукушкиной Т.А. в лаборатории фитохимии ЦСБС СО РАН. Препараты № 5 и № 6, выделенные из манжетки, собранной в разных ценопопуляциях Горного Алтая, представляют собой порошок розоватого цвета, состоящий в основном из катехинов и лейкоантоцианов ($70,0 \pm 3,5$ %). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в препарате № 5 идентифицированы (+)-катехин и галловая кислота, а в препарате № 6 – (+)-катехин. В препарате № 6 содержание (+)-катехинов больше в 10 раз по сравнению с препаратом № 5. Препарат № 7 – это порошок желто-зеленого цвета, состоящий из суммы флавоноидов ($71,0 \pm 3,6$ %), из которых идентифицированы рутин, авикулярин, кверцетин, кемпферол и (-)-катехин [Кукушкина и др., 1999].

В экспериментах использовали культуру «бородатых корней» селитрянки Шобера (*Nitraria schoberi* L.), полученную *in vitro* в лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН под руководством д.б.н. Новиковой Т.И. [Zheleznichenko et al., 2018].

В качестве референс-препаратов служили коммерческие противовирусные препараты Тамифлю (Ф. Хоффманн - Ля Рош Лтд., Швейцария) и Римантадин (ОАО «Дальхимфарм», Россия) и Ацикловир (Обновление ПФК АО, Россия), а также субстанции озельтамивир карбоксилат (Sequoia Research Products Ltd., США) и занамивир (Sigma-Aldrich, США).

Клеточные культуры. В работе использовали перевиваемые культуры клеток MDCK (клетки почки собаки кокер-спаниеля) и Vero (клетки почки зеленой мартышки), полученные из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Животные. В работе использовали аутбредных мышей ICR, самцов и самок массой 14-16 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Содержание животных и все манипуляции с ними осуществляли в соответствии с протоколом исследований на лабораторных животных, одобренным биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, № ГНЦ ВБ «Вектор»/01-02.2018 от 26.02.2018 г.

Вирусы. В работе использовали ВГ птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и адаптированный к лабораторным мышам ВГ человека A/Aichi/2/68 (H3N2); вирусы осповакцины (ВОВ, штамм Л–ИВП) и оспы мышей – экстромелии (ВОМ, штамм К–1); а также вирусы простого герпеса 1-го (ВПГ-1, штамм VR-3) и 2-го (ВПГ-2, штамм MS) типов, полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Концентрацию вирусов гриппа и простого герпеса определяли путем титрования в клетках MDCK и Vero соответственно, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах 50 %-х тканевых цитопатических доз в мл (\lg ТЦД₅₀/мл), концентрацию ортопоксвирусов определяли путем титрования методом бляшек в клетках Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в мл (\lg БОЕ/мл) [Закс, 1976].

Получение экстрактов методами водного и этанольного извлечений. Водные экстракты получали путем нагревания сырья с водой при 95 °С в течение 1 ч с последующим высушиванием при 60 °С; этанольные экстракты получали методом четырехкратной ремацерации при 60 °С в течение 8 ч (соотношение сырья к экстрагенту (70 % этанол) составляло 1:50) [Проценко, Костина, 2015].

Определение цитотоксичности и противовирусной активности образцов *in vitro*. Цитотоксичность образцов в клетках MDCK и Vero оценивалась по наличию деструктивных изменений в монослоях с помощью инвертированного микроскопа, для каждого образца была определена максимально переносимая концентрация (МПК), равная концентрации, не оказывающей на клетки токсического действия, и 50 %-я токсическая концентрация (ТС₅₀), равная концентрации, вызывающей разрушение 50 % монослоя [Smee et al., 1996; Хабриев, 2005].

Противовирусную активность образцов в монослое клеток определяли по изменению инфекционности (титра) вируса в присутствии образцов по сравнению с контролем (без образцов). На основании титров вируса в опыте и контроле рассчитывали индексы нейтрализации (ИН) вируса под влиянием образца: $ИН = \frac{\text{Титр контроль}}{\text{Титр опыт}} (\lg)$ [Хабриев, 2005].

Для определения IC₅₀ образцов использовали ряд их концентраций, не превышающих МПК, и вирус с множественностью инфекции (MOI) клеток 0,01 ТЦД₅₀/кл., вызывающей гибель 100 % контрольного монослоя MDCK и Vero с вирусом без образца. После инкубирования клеток при температуре 37 °С в течение 2 - 4 сут определяли IC₅₀, то есть концентрацию, при которой сохраняется 50 % клеток в инфицированном монослое [Mahy, Kangro, 1996], по методу Спирмена-Кербера [Закс, 1976]. На основании полученных значений ТС₅₀ и IC₅₀, рассчитывали для экстрактов индекс селективности: $SI = \frac{ТС_{50} \text{ мкг/мл}}{IC_{50} \text{ мкг/мл}}$ [Хабриев, 2005].

Изучение цитопатогенного действия вируса гриппа на клетки MDCK в присутствии образцов манжетки обыкновенной методом электронной микроскопии. В монослой клеток MDCK в 6-луночных планшетах вносили ВГ А/Н5N1 с MOI 0,5 и 1,0 ТЦД₅₀/кл. и инкубировали в течение 45 мин, затем вирус удаляли и вносили среду RPMI-1640, содержащую образцы № 5 или № 7 манжетки обыкновенной в концентрациях 250 мкг/мл. В качестве контроля служили интактные клетки и клетки, зараженные ВГ, без образцов манжетки. Все клетки инкубировали в течение 16 ч при 37 °С, затем их снимали с подложки, центрифугировали, осадок клеток фиксировали 4 %-м параформальдегидом, постфиксировали 1 %-м раствором четырехокси осмия, обезвоживали по стандартной схеме и заливали в смесь эпон-арадит. Для электронно-микроскопического исследования клеток готовили ультратонкие срезы на ультратоме Ultracut (Leica, Германия), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца

и просматривали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония). Данное исследование проведено профессором ИХБФМ СО РАН Рябчиковой Е.И.

Определение противовирусной активности образцов *in vivo*. Каждый образец вводили перорально (п/о) 10-11 аутбредным мышам ICR массой 14-16 г по 200 мкл/мышь по лечебно-профилактической схеме: за 1 ч до и через 1 ч после интраназального (и/н) заражения мышей ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ или 25 ЛД₅₀ и затем в течение последующих 4-х дней два раза в день в суммарной суточной дозе 25 мкг/г массы мыши. В контрольной группе мышей в качестве плацебо по той же схеме вводили 200 мкл дистиллированной воды. За мышами наблюдали 16 сут после заражения (п/з) ВГ, регистрируя падеж. На основании полученных данных подсчитывали коэффициент защиты мышей от гибели (КЗ = % погибших мышей в контроле - % погибших мышей в опыте) и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в каждой группе [Smee et al., 2002]. Кроме того, различия показателей выживаемости животных оценивали с помощью кривых Каплана-Мейера по логранговому критерию [Реброва, 2006].

Метод определения параметров летальных доз. Для определения 50 %-ой летальной дозы (ЛД₅₀) суспензию образца № 5 манжетки обыкновенной вводили внутрижелудочно в дозах 2,22, 3,33, 5,00 и 7,50 г/кг массы мыши 6 самцам для каждой дозы. За мышами наблюдали 7 суток и регистрировали их гибель.

Оценка 50 и 100 %-х эффективных доз (ЭД₅₀ и ЭД₁₀₀) образца № 5 манжетки обыкновенной при инфицировании мышей вирусом гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1. Образец № 5 в каждой из 8 доз вводили п/о 6 мышам по 200 мкл/мышь за 1 ч до и через 1 ч после и/н заражения мышей ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ и затем в течение последующих 4-х дней два раза в день в суммарной суточной дозе 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 и 3,125 мкг/г массы мыши. За животными наблюдали в течение 16 сут п/з ВГ, ежедневно регистрируя число павших мышей. По проценту гибели инфицированных животных, получавших образец № 5, рассчитывали величину ЭД₅₀ и 95 %-й доверительный интервал (I₉₅) образца в отношении ВГ А/Н3N2 и А/Н5N1 по методу Спирмена-Кербера [Закс, 1976], рассчитывали соответствующие терапевтические индексы (ТИ), представляющие собой отношение ЛД₅₀ к ЭД₅₀, а также определяли минимальные ЭД₁₀₀ образца № 5 в отношении этих штаммов ВГ.

Определение титров ВГ в гомогенатах легких у инфицированных мышей при введении образцов манжетки обыкновенной. Через 3 и 6 сут после заражения мышей ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ и ежедневного п/о введения образцов в разовой дозе 12,5 мкг/г массы мыши в объеме 200 мкл (суточная доза составляла 25 мкг/г массы) за 1 ч до заражения (д.з.) и далее в течение 5 суток п.з. у 4-х эвтаназированных мышей из каждой группы определяли концентрацию ВГ (в lg ТЦД₅₀/мл) в 10 %-х гомогенатах легких методом титрования при внесении последовательных разведений образцов на монослой культуры клеток MDCK с последующим расчетом индекса подавления продукции вируса (ИППВ), который вычисляли по формуле: ИППВ = титр вируса в гомогенатах легких контрольной группы животных (lg) – титр вируса в гомогенатах легких опытной группы животных (lg) [Хабриев, 2005].

Изучение возможных механизмов противовирусного действия растительных образцов. Вирулицидную активность образцов оценивали после их экспозиции с ВГ (100 ТЦД₅₀) в течение 30 минут. Образец обладал вирулицидным действием в случае снижения титра вируса в его присутствии в 100 и более раз по сравнению с титром вируса в контроле.

Влияние образцов № 5 и № 7 манжетки обыкновенной на продукцию новых инфекционных вирионов ВГ оценивали по титрам вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), собранной через 8, 24 и 36 ч п.з. монослоя клеток MDCK ВГ при MOI 0,1 ТЦД₅₀/кл. В

качестве контроля служили инфицированные клетки, инкубированные в среде без растительных образцов.

Для оценки влияния образцов № 5 и № 7 манжетки обыкновенной на адсорбцию ВГ субтипов H5N1 и H3N2 на клетках MDCK исследовали возможность ингибирования гемагглютинации вирусов гриппа под действием этих образцов.

Действие образцов манжетки обыкновенной на синтез РНК ВГ А/H5N1 в инфицированных клетках MDCK было исследовано в лаборатории молекулярной эпидемиологии особо опасных инфекций методом полуколичественного RT-PCR анализа при участии к.б.н. Тернового В.А.

Образцы манжетки обыкновенной были исследованы на наличие способности ингибировать нейраминидазную активность ВГ А/H5N1 в лаборатории серодиагностики гриппа при участии Святченко С.В.

Статистическая обработка. Статистическую обработку и сравнение результатов проводили стандартными методами [Закс, 1976; Mahy, Kangro, 1996; Smee et al., 2002], используя пакет компьютерных программ «Statistica 6,0» [Халафян, 2010].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе были получены водные и этанольные экстракты из высших растений 84 видов 48 родов из 15 ботанических семейств, культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири, для оценки их противовирусных свойств.

Первоначально противовирусная активность растительных экстрактов в их максимально переносимых концентрациях (МПК разных экстрактов составляла от 0,005 до 4,0 мг/мл для культуры клеток MDCK) оценивалась по снижению инфекционности ВГ А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и А/Aichi/2/68 (H3N2) в данной культуре под их действием. Было показано, что противовирусную активность (снижение титра на 2,0 и более lg) в отношении ВГ А/H5N1 проявили 23,1 % этанольных и 33,3 % водных экстрактов, а в отношении ВГ А/H3N2 - 13,5 % этанольных и 22,2 % водных экстрактов. Выявлено, что большинство экстрактов, ингибирующих инфекционность ВГ в 100 и более раз, принадлежали к 3 семействам - розоцветные, губоцветные и бобовые.

Далее для активных экстрактов были определены TC_{50} и IC_{50} , а также рассчитаны $TI (SI) = TC_{50} / IC_{50}$. В данном исследовании наиболее активным в отношении обоих используемых штаммов ВГ был водный экстракт монарды дудчатой (14W), IC_{50} которого составляла 9,29 мкг/мл, а SI - 152,23 (табл. 1). В отношении ВГ А/H3N2 образцы 7W, 8W, 59W, 10W, 11W, 12W, 13E, 14W, 16W и 16E - группа экстрактов, имеющая среднее значение IC_{50} $11,4 \pm 3,6$ мкг/мл, меньшее, чем у других экстрактов, по одностороннему критерию, установленному Диксоном, при $p \leq 0,05$. Образцы 7E, 59E, 8E, 11E, 13W, 14E - группа экстрактов, имеющая среднее значение IC_{50} $28,9 \pm 9,1$ мкг/мл, большее, чем у выше указанной группы. Наименьшей активностью обладали образцы 10E, 12E, 15W, 15E, 17W и 17E со средним значением IC_{50} $282,7 \pm 147,9$ мкг/мл. В отношении ВГ А/H5N1 образцы 59W, 11E, 13W, 13E и 14W - группа экстрактов, имеющая среднее значение IC_{50} $9,0 \pm 3,0$ мкг/мл, меньшее, чем у других экстрактов, по одностороннему критерию, установленному Диксоном, при $p \leq 0,05$. Образцы 7W, 7E, 59E, 8W, 8E, 10W, 11W, 12W, 12E, 14E, 15E, 16W и 16E - группа экстрактов, имеющая среднее значение IC_{50} $28,4 \pm 15,5$ мкг/мл, большее, чем у выше указанной группы, но меньшее, чем в группе экстрактов (10E, 15W, 17W и 17E) с самой низкой активностью со средним значением IC_{50} $329,8 \pm 159,5$ мкг/мл.

Таблица 1 - Сравнение антивирусной активности растительных экстрактов по индексу селективности в отношении вируса гриппа

Наименование образца	Вегетативный орган	Шифр образца	ТС ₅₀ (мкг/мл), М (Xmin – Xmax), n=4	IC ₅₀ (мкг/мл), М (Xmin – Xmax) в отношении ВГ, n=4		SI = ТС ₅₀ / IC ₅₀ в отношении ВГ	
				H3N2	H5N1	H3N2	H5N1
Манжетка обыкновенная	н.ч.	7W	40,0 (27,0-59,2)	5,0 (3,4-7,4)	20,0 (13,5-29,6)	8,0	2,0
		7E	420,5 (299,4-590,5)	31,3 (21,1-46,3)	26,3 (18,7-36,9)	13,5	16,0
	к.	59W	47,6 (33,9-66,8)	10,0 (6,8-14,8)	5,0 (2,7-9,3)	4,5	9,5
		59E	200,0 (135,1-296,0)	35,4 (21,9-57,2)	25,0 (16,9-37,0)	5,7	8,0
Лабазник вязолистный	соцв.	8W	95,1 (67,7-133,6)	14,1 (8,7-22,9)	20,0 (13,5-29,6)	6,7	4,8
		8E	200,0 (135,1-296,0)	42,0 (29,9-59,0)	59,5 (35,4-99,9)	4,8	3,4
Спирея средняя	л.	10W	47,6 (33,9-66,8)	16,8 (12,0-23,6)	16,8 (10,0-28,3)	2,8	2,8
		10E	840,9 (598,7-1181,0)	210,2 (149,7-295,2)	250,0 (168,9-370,1)	4,0	3,4
Спирея иволистная	л.	11W	40,0 (27,0-59,2)	10,0 (6,8-14,8)	20,0 (13,5-29,6)	4,0	2,0
		11E	1414,2 (874,8-2286,2)	26,3 (14,6-47,3)	13,1 (9,4-18,5)	53,8	107,6
Репейничек волосистый	н.ч.	12W	47,6 (28,3-79,9)	16,8 (12,0-23,6)	20,0 (13,5-29,6)	2,8	2,4
		12E	840,9 (598,7-1181,0)	105,1 (74,8-147,6)	52,6 (37,4-73,8)	8,0	16,0
	к.	13W	40,0 (27,0-59,2)	20,0 (13,5-29,6)	10,0 (6,8-14,8)	2,0	4,0
		13E	840,9 (598,7-1181,0)	11,1 (6,8-17,9)	7,8 (5,3-11,6)	76,1	107,7
Монарда дудчатая	н.ч.	14W	1414,2 (874,8-2286,2)	9,3 (5,5-15,6)	9,3 (5,5-15,6)	152,2	152,2
		14E	1414,2 (874,8-2286,2)	18,6 (11,1-31,2)	15,6 (9,7-25,3)	76,1	90,5
Иссоп лекарственный	н.ч.	15W	1189,2 (846,7-1670,2)	210,2 (149,7-295,2)	420,5 (299,4-590,5)	5,7	2,8
		15E	1189,2 (846,7-1670,2)	500,0 (337,8-740,1)	52,6 (37,4-73,8)	2,4	22,6
Шалфей лекарственный	л.	16W	1414,2 (1414,2-1414,2)	9,3 (6,6-13,0)	22,1 (13,7-35,7)	152,2	64,0
		16E	840,9 (598,7-1181,0)	11,1 (6,8-17,9)	18,6 (13,2-26,1)	76,1	45,3
Чина весенняя	л.	17W	5045,4 (3592,4-7086,0)	250,0 (168,9-370,1)	148,7 (105,8-208,8)	20,2	33,9
		17E	1414,2 (1414,2-1414,2)	420,5 (299,4-590,5)	500,0 (337,8-740,1)	3,4	2,8

Примечания: ТС₅₀ – 50 %-я токсическая концентрация препарата; IC₅₀ – 50 %-я ингибирующая (эффективная) концентрация препарата; SI – индекс селективности препарата; М – среднее значение; n – количество лунок, для каждого разведения препарата при определении показателей ТС₅₀ и IC₅₀; ТС₅₀ и IC₅₀ с 95 %-ми доверительными границами (X_{min} – X_{max}) рассчитаны по методу Спирмена–Кербера; н.ч. – надземная часть; к. – корень или корневище; соцв. – соцветия; л. – листья; W – водный экстракт; E – этанольный экстракт.

Изучение токсичности и противовирусной активности растительных экстрактов в экспериментах на лабораторных мышах, инфицированных вирусом гриппа

В дальнейшей серии экспериментов на мышах аутбредной популяции ICR были проведены исследования токсичности и противовирусной активности растительных экстрактов, проявивших *in vitro* выраженную противогриппозную активность.

При изучении противовирусной активности образцов установлено, что защитный эффект (по доле выживших животных, инфицированных вирусом гриппа А/Н3N2), проявляли 2 этанольных экстракта, полученные на основе спиреи иволистной и полыни горькой (КЗ обоих экстрактов составил 70 %) (табл. 2). По другому критерию - средней продолжительности жизни (СПЖ) инфицированных мышей установлено, что достоверное увеличение СПЖ животных в опытных группах по сравнению с контролем (без препарата) наблюдалось при введении им экстрактов 7 растений: полыни горькой и обыкновенной, спиреи иволистной, иссопа лекарственного, монарды дудчатой, корней репейника волосистого и манжетки обыкновенной.

В аналогичных экспериментах с этими же экстрактами в отношении ВГ птиц А/Н5N1 установлено, что достоверный защитный эффект по КЗ проявили 2 группы экстрактов: для одной группы (экстракты репейника волосистого, гравилата речного и полыни обыкновенной) КЗ составил 50 %, для другой - (экстракты спиреи иволистной, иссопа лекарственного и полыни горькой) КЗ составил 70 % (табл. 2). СПЖ инфицированных мышей большинства опытных групп, получавших экстракты, была достоверно выше СПЖ мышей в контроле (без препарата).

Следует отметить, что п/о введение выше указанных растительных экстрактов незараженным мышам в тех же дозах и схемах, которые применяли для инфицированных животных, не приводило к изменению их внешнего вида, подвижности, потребления ими пищи и воды, а также к достоверному снижению их массы тела в течение 16 сут наблюдения по сравнению с интактными мышами.

Таким образом, изучение противовирусной активности водных и этанольных экстрактов из 83 видов дикорастущих и культивируемых на территории Западной Сибири растений позволило установить новые источники БАВ, обладающие выраженной противогриппозной активностью (монарда дудчатая, шалфей лекарственный, манжетка обыкновенная, репейник волосистый, гравилат речной, спирея иволистная, полынь горькая и обыкновенная, иссоп лекарственный).

Изучение противовирусной активности и механизма действия образцов, полученных из манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris*) разными способами

В дальнейшем из всех исследованных нами растений для более детального изучения была выбрана манжетка обыкновенная, водные и этанольные экстракты которой проявили противовирусную активность в отношении ВГ в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, манжетка обыкновенная благодаря широкому спектру биологической активности является потенциально перспективным объектом изучения официальной медициной [Кукушкина, Зыков, Обухова, 2003].

В связи с тем, что экспериментально доказано, что основным действующим началом манжетки является полифенольный комплекс и в первую очередь флавоноиды [Кукушкина, Зыков, Обухова, 2003; Denev et al., 2014], нами были исследованы препараты на основе суммы флавоноидов, полученные из надземной - препарат № 7 и подземной - № 5 и № 6 частей манжетки в лаборатории фитохимии ЦСБС СО РАН.

Таблица 2 - Противовирусная активность этанольных экстрактов высших растений, используемых по лечебно-профилактической схеме, в экспериментах на мышах, инфицированных вирусом гриппа в дозе 10 ЛД₅₀

Группы мышей, получавших экстракты растений и контрольный препарат (n=10)	Показатели выживаемости мышей, зараженных ВГ					
	A/Aichi/2/68 (H3N2)			A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)		
	Количество и % выживших	КЗ (в %)	СПЖ (сут) M±Sm	Количество и % выживших	КЗ (в %)	СПЖ (сут) M±Sm
Полынь горькая, н.ч.	8 (80)**	70	14,0±4,2*	8 (80)**	70	15,8±0,4*
Полынь обыкновенная, н.ч.	5 (50)	40	11,3±5,0*	6 (60)**	50	13,2±3,7*
Гравилат речной, н.ч.	1 (10)	0	8,1±2,9	6 (60)**	50	13,7±3,1*
Спирея иволистная, л.	8 (80)**	70	14,3±3,6*	8 (80)**	70	14,8±2,5*
Иссоп лекарственный, н.ч.	2 (20)	10	9,7±3,7*	8 (80)**	70	14,5±3,2*
Манжетка обыкновенная, н.ч.	2 (20)	10	8,2±4,1	4 (40)	30	11,0±4,4
Манжетка обыкновенная, к.	4 (40)	30	10,6±4,7*	5 (50)	40	12,8±3,4*
Монарда дудчатая, н.ч.	2 (20)	10	10,5±3,1*	5 (50)	40	12,0±3,3*
Репейничек волосистый, н.ч.	1 (10)	0	7,2±3,4	6 (60)**	50	13,1±3,8*
Репейничек волосистый, к.	5 (50)	40	13,1±3,1*	4 (40)	30	12,4±3,5*
Тамифлю	8 (80)**	70	14,5±3,2*	6 (60)**	50	13,3±3,5*
Контроль (без препарата)	1 (10)	-	7,0±3,4	1 (10)	-	8,8±3,0

Примечания: М – среднее значение, S_м – стандартное отклонение; КЗ (коэффициент защиты) = % гибели животных в контроле - % гибели животных в опыте; СПЖ - средняя продолжительность жизни (за максимальный срок жизни животных принимали 16 сут, т.е. эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели инфицированных мышей); n – число животных в опытных и контрольных группах; л. – листья; н.ч. - надземная часть; к. – корень или корневище; ** - отличие от контроля по критерию χ^2 при p≤0,05; * - отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни при p≤0,05.

В качестве образца сравнения с вышеприведенными препаратами манжетки мы использовали этанольный экстракт (7Е), полученный из надземной части этого растения без применения технологии концентрирования и очистки флавоноидных компонентов. Образец 7Е представляет собой экстракт коричневого цвета, в составе которого содержится не менее 21 соединения. Идентифицированы авикулярин, (+) – катехин, галловая, гентизиновая, феруловая кислоты и кумарин эскулетин. Суммарные количества катехинов, флавонолов и танинов в сухом этанольном экстракте 7Е манжетки составляют $0,15 \pm 0,02$, $5,85 \pm 0,09$ и $42,0 \pm 0,41$ % соответственно.

Исследование токсичности образцов манжетки в культуре клеток MDCK показало, что все экстракты малотоксичны для этих клеток, их МПК составили 0,25 мг/мл. Далее в этих концентрациях было показано, что продукция ВГ А/Н3N2 под действием образцов №№ 5, 6, 7 и 7Е снижалась на 3,55; 3,55; 4,05 и 4,50 lg, а продукция ВГ А/Н5N1 на 1,94; 1,89; 2,00 и 3,50 lg соответственно.

Затем противовирусная активность образцов из корней - № 5 и надземной части № 7 манжетки была исследована методом просвечивающей электронной микроскопии. В клетках культуры MDCK, зараженных ВГ А/Н5N1, через 16 ч п.з. наблюдались морфологические признаки репродукции вируса. Так, в ядрах и цитоплазме клеток присутствовали нуклеокапсиды вируса, отмечалось формирование дочерних вирусных частиц на плазматической мембране (рис. 1). Число клеток с морфологическими признаками размножения вируса было прямо пропорционально инфицирующей дозе.

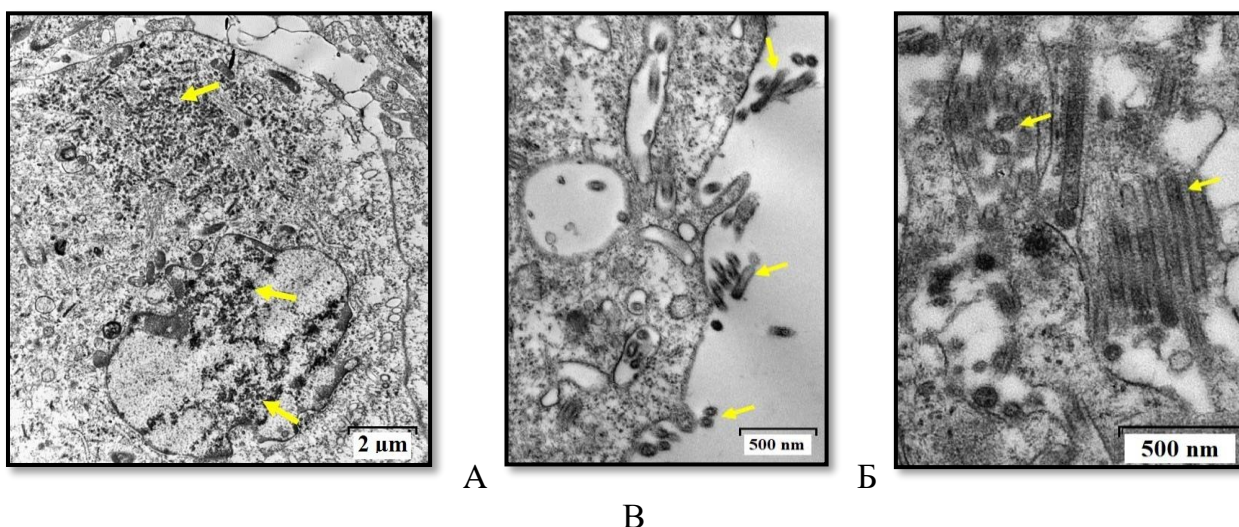


Рисунок 1 (А, Б, В) Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов культуры клеток MDCK, зараженных ВГ А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). А - клетка с выраженными признаками отека и нуклеокапсидами ВГ в ядре и цитоплазме (показаны стрелками); Б и В - дочерний ВГ А/Н5N1 в клетке (стрелками показаны вирионы на поперечном и продольном срезах). Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца.

Интактные клетки, взятые в качестве образца сравнения, имели морфологию эпителиоидного типа, характерную для данной культуры. Признаков вирусной, микоплазменной или бактериальной контаминации отмечено не было (рис. 2 А).

Изучение ультратонких срезов клеток культуры MDCK, зараженных ВГ А/Н5N1 и обработанных препаратом манжетки № 5 в дозе 250 мкг/мл, не выявило морфологических признаков размножения вируса. Вирусные включения характерной морфологии отсутствовали и в ядре, и в цитоплазме, морфология основной доли клеток

не отличалась от наблюдаемой в образце интактной культуры (рис. 2 Б). Исследование ультратонких срезов клеток культуры MDCK, зараженных ВГ и обработанных препаратом манжетки № 7 в дозе 250 мкг/мл, выявило единичные клетки с морфологическими признаками размножения вируса (рис. 2 В). Число таких клеток было невелико, признаков формирования дочернего вируса не отмечено.

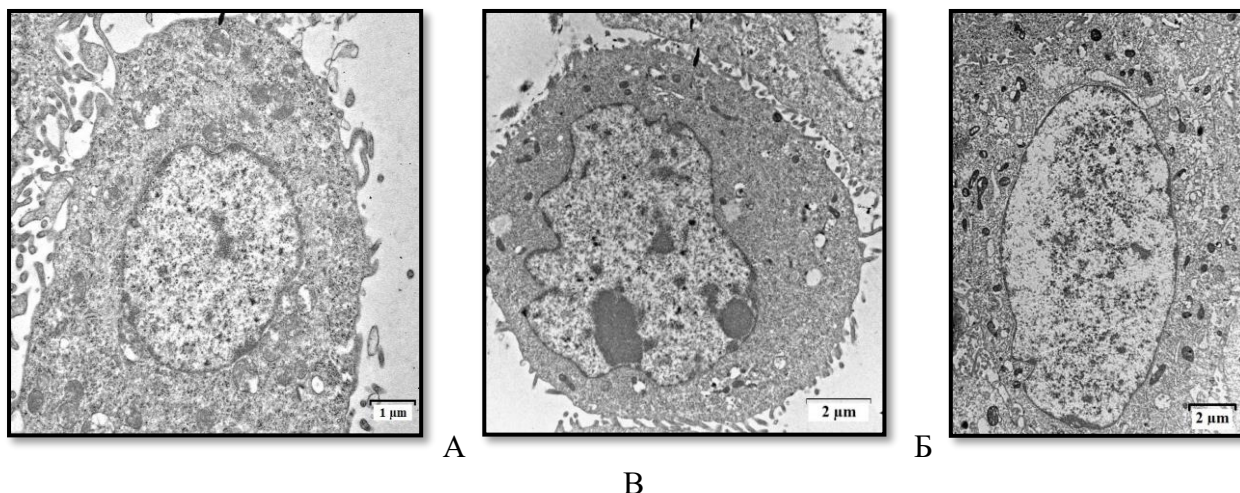


Рисунок 2 (А, Б, В) – Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов культуры клеток MDCK. А - интактная клетка; Б - клетка без морфологических признаков размножения ВГ и повреждения (16 ч после заражения и обработки препаратом манжетки обыкновенной № 5); В – клетка с морфологическими признаками размножения ВГ (16 ч после заражения и обработки препаратом манжетки № 7. Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца.

Таким образом, препараты манжетки № 5 и № 7 в дозе 250 мкг/мл оказали влияние на продукцию ВГ и привели к снижению деструктивных изменений в культуре клеток MDCK.

IC₅₀ образцов №№ 5, 6, 7 и 7Е в клетках MDCK составили 7,1; 12,3; 17,4 и 32,4 мкг/мл в отношении ВГ А/Н3N2, а в отношении ВГ А/Н5N1 - 4,7; 8,9; 14,1 и 21,4 мкг/мл соответственно.

Далее противовирусная активность экстрактов манжетки оценивалась в экспериментах на лабораторных мышах. Анализ кривых выживаемости Каплана-Мейера, представленных на рисунке 3, выявляет значимые отличия по логранговому критерию между контрольными группами мышей, инфицированных ВГ А субтипов Н5N1 и Н3N2, не получавших экстракты, и соответствующими опытными группами инфицированных мышей, получавших экстракты манжетки.

Выживаемость мышей, инфицированных ВГ А/Н3N2, при введении образца № 5 достоверно увеличивалась до 80 % ($p=0,0073$), тогда как при введении образцов № 7 и 7Е наблюдали тенденцию к увеличению выживаемости соответственно до 50 % ($p=0,0539$) и 30 % ($p=0,0916$) относительно значения (20 %) в контрольной группе (рис. 3 А). При введении образцов манжетки № 5 и № 7 мышам, инфицированным ВГ А/Н5N1, также наблюдалось значимое повышение доли выживших животных до 64 % ($p=0,0027$) и 45 % ($p=0,0144$) соответственно, а при введении образца 7Е выживаемость возрастала до 27 % ($p=0,0658$) по сравнению с контрольной группой (0 %) (рис. 3 Б).

Figure 1 consists of two Kaplan-Meier survival plots. The y-axis for both plots is 'Доля выживших животных' (Percentage of surviving animals) ranging from 0% to 100%. The x-axis for both plots is 'Время после заражения (сут)' (Time after infection (days)) ranging from 0 to 16. The legend indicates three groups: control (black line), vaccinated (blue line), and vaccinated + treated (red line).

Left Plot (100% infection dose):

- Control (black):** Survival drops from 100% to 60% at day 4, to 50% at day 5, to 40% at day 6, to 20% at day 7, and remains at 20% until day 16.
- Vaccinated (blue):** Survival drops from 100% to 80% at day 6, to 70% at day 7, to 50% at day 8, and remains at 50% until day 16.
- Vaccinated + treated (red):** Survival drops from 100% to 90% at day 4, to 80% at day 10, and remains at 80% until day 16.

Right Plot (10% infection dose):

- Control (black):** Survival drops from 100% to 35% at day 6, to 28% at day 7, to 18% at day 9, and drops to 0% at day 10.
- Vaccinated (blue):** Survival drops from 100% to 45% at day 7, and remains at 45% until day 16.
- Vaccinated + treated (red):** Survival drops from 100% to 82% at day 6, to 63% at day 7, and remains at 63% until day 16.

В токсикологическом эксперименте было установлено, что однократное п/о введение экстракта № 5 в дозе 7,5 г/кг массы мыши приводило к гибели 100 % животных (6 из 6), введение дозы 5 г/кг вызывало гибель 50 % мышей (3 из 6), при введении доз 3,33 и 2,22 г/кг гибели мышей не наблюдалось. Следовательно, доза 5 г/кг является его ЛД₅₀ (табл. 3).

ЭД₅₀ препарата № 5 в отношении ВГ А/Н5N1 и А/Н3N2 составили 31,62 (18,20÷54,95) и 14,125 (7,943÷25,119) мкг/г массы мыши соответственно (табл. 3). Минимальные дозы препарата, вызывающие 100 %-ю защиту мышей (ЭД₁₀₀) от заражения ВГ в дозе 10 ЛД₅₀ А/Н5N1 и А/Н3N2 составили 200 и 100 мкг/г массы мыши соответственно. Терапевтические индексы (ТИ), представляющие собой отношение ЛД₅₀ к ЭД₅₀, составили 158,13 и 353,98 в отношении ВГ А субтипов Н5N1 и Н3N2 соответственно.

В следующей серии экспериментов были изучены предполагаемые механизмы действия образцов № 5 и № 7 манжетки обыкновенной на ВГ в культуре клеток MDCK. Нами было установлено, что в отношении ВГ А/Н5N1 данные образцы не оказывают вирулицидного действия и не ингибируют нейраминидазную активность вируса. В то же время образец манжетки № 5 проявляет активность торможения гемагглютинации ВГ с эритроцитами петуха. При этом полного ингибирования адсорбционной способности ВГ не наблюдалось ни при каких используемых концентрациях препарата.

Затем мы проверили действие препаратов № 5 и № 7 манжетки на синтез РНК ВГ А/Н5N1 в инфицированных клетках MDCK методом полуколичественного RT-PCR - анализа. Было обнаружено влияние образцов на синтез вирусной РНК, которое проявлялось в уменьшении количества РНК не менее чем в 2 раза относительно контроля под действием препарата № 5 при всех использованных концентрациях (62,5, 125, 250 и 500 мкг/мл), а под действием образца № 7 и Тамифлю только при концентрациях 250 и 500 мкг/мл соответственно. Результаты свидетельствуют о том, что образцы манжетки обыкновенной могут оказывать дополнительный ингибирующий эффект на синтез РНК (геномной и матричной) вируса гриппа.

Кроме того, мы исследовали влияние препаратов № 5 и № 7 на продукцию ВГ А/Н5N1 в культуре клеток MDCK. При использовании МПК образцов (250 мкг/мл) наблюдалось практически полное ингибирование продукции ВГ (был достигнут нижний предел чувствительности используемого способа определения, который составил 0,5 lg ТЦД₅₀/мл). Данное ингибирование вирусной продукции наблюдается не только через 8 ч, но и в последующие сроки после заражения клеток (24 и 36 ч).

В отношении ортопоксвирусов (BOB и BOM) в культуре клеток Vero было установлено противовирусное действие для всех препаратов манжетки. Наибольшую активность проявил полученный из корней образец № 6, в котором преобладало содержание (+)-катехина. Инфекционность BOB и BOM под действием образца № 6 снижалась в клетках Vero на 3,45 и 4,05 lg соответственно.

Также в наших исследованиях установлена противовирусная активность образца № 6 в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 в культуре клеток Vero. IC₅₀ данного препарата в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 составили 4,8 и 8,7 мкг/мл соответственно.

В целом, установлено, что препараты, полученные из манжетки обыкновенной, обладают противовирусной активностью в отношении ВГ А в экспериментах на культуре клеток MDCK и на аутбредных мышях популяции ICR, а также в отношении ВПГ-1, ВПГ-2, BOB и BOM в культуре клеток Vero.

Изучение противовирусной активности экстракта культуры «бородатых корней» («hairy roots») селитрянки Шобера (*Nitraria schoberi*) в отношении вируса гриппа

Следующим объектом нашего исследования была селитрянка Шобера, обладающая широким спектром биологически активных веществ [Высочина и др., 2011; Sharifi-Rad et al., 2015]. Однако данный вид в природных условиях распространен ограниченно, а его интродукция затруднена из-за особенности его биологии, поэтому сбор лекарственного сырья для получения ценных метаболитов трудно осуществим. Данную проблему получения сырья в таких случаях можно решить с помощью современных генно-инженерных подходов в биотехнологии.

В лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН была создана культура «бородатых корней» селитрянки Шобера, способная продуцировать ценные метаболиты, большая часть которых была представлена соединениями катехиновой природы [Zheleznichenko et al., 2018]. Из культуры «бородатых корней» в дальнейшем нами был получен этанольный экстракт и исследованы его противовирусные свойства *in vitro* и *in vivo* в отношении ВГ. Установлено ингибирование инфекционности (титров) ВГ субтипов H5N1 и H3N2 под влиянием экстракта селитрянки Шобера в культуре клеток MDCK. Индексы нейтрализации (ИН) для ВГ А/H5N1 под действием экстракта и коммерческого противогриппозного препарата Тамифлю составляли 4,5 и 2,5 lg, тогда как для А/H3N2 - 2,67 и 2,17 lg соответственно.

Далее противовирусную активность экстракта селитрянки Шобера в сравнении с активностью Тамифлю оценивали в экспериментах на лабораторных мышах. Анализ кривых выживаемости Каплана-Мейера, представленных на рисунке 4, выявляет значимые отличия по логранговому критерию между группами мышей, инфицированных штаммами ВГ А/H5N1 и А/H3N2, получавших экстракт или Тамифлю, и соответствующими контрольными группами.

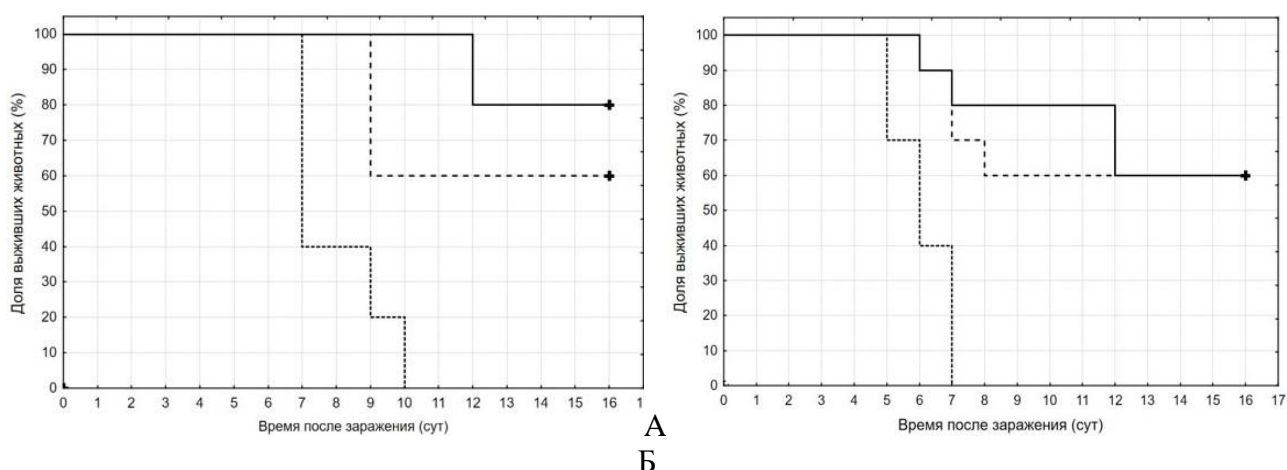


Рисунок 4 (А, Б) - Кривые выживаемости мышей, построенные по методу Каплана-Мейера, при заражении штаммами вируса гриппа А/H5N1 (А) и А/H3N2 (Б), в контрольных и опытных группах животных. - контроль ВГ; - - - Тамифлю; — - этанольный экстракт селитрянки Шобера. «+» - окончание срока наблюдения, то есть эмпирически установленное, гарантированное время прекращения гибели мышей, инфицированных ВГ.

Выживаемость мышей, инфицированных ВГ А/H5N1 при введении экстракта достоверно увеличивалась до 80 % ($p=0,00009$), а при введении Тамифлю – до 60 %

($p=0,002$), относительно значения (0 %) в контроле. При введении экстракта и Тамифлю мышам, инфицированным ВГ А/Н3N2, также наблюдалось значимое повышение показателей их выживаемости до 60 % ($p=0,002$) в обеих группах, тогда как в контроле выживаемость составляла 0 %.

Таким образом, новый биотехнологический растительный продукт, полученный из культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера, обладает выраженной противовирусной активностью в отношении ВГ А в культуре клеток MDCK и в экспериментах на мышах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлены результаты впервые проведенных исследований противовирусных свойств культивируемых и дикорастущих растений Юго-Западной Сибири. При изучении токсических свойств экстрактов растений в культуре клеток MDCK было показано, что МПК для них составляла от 0,005 до 4,0 мг/мл.

В результате скрининга противовирусного действия было выявлено, что высокую активность в отношении ВГ А/Н5N1 проявили 24 из 104 (23,1 %) этанольных и 6 из 18 (33,3 %) водных экстрактов, а в отношении ВГ А/Н3N2 - 14 (13,5 %) этанольных и 4 (22,2 %) водных. В отношении обоих штаммов ВГ высокоактивными оказались этанольные экстракты 13 видов растений (манжетки обыкновенной, репейника волосистого, гравилата речного, спиреи иволистной, спиреи средней, спиреи пушистой, спиреи зверобоелистной, спиреи даурской, спиреи березолистной, дербенника лозного, вероники Крылова, монарды дудчатой, шалфея лекарственного), принадлежащих к 8 родам и 4 семействам (розоцветные, бобовые, норичниковые и губоцветные) и водные экстракты 2-х видов растений (монарды дудчатой и шалфея лекарственного), принадлежащих к 2 родам семейства губоцветные. Данные экстракты подавляли инфекционность ВГ А субтипов Н3N2 и Н5N1 в 100 и более раз. Для экстрактов с высокой противогриппозной активностью в экспериментах *in vivo* изучена токсичность и противовирусная активность растительных образцов.

В культурах клеток MDCK и Vero изучены токсичность и противовирусная активность препаратов, полученных на основе суммы флавоноидов манжетки обыкновенной в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов, а именно ВГ А/Н3N2 и А/Н5N1, ВПГ-1 и ВПГ-2, а также ВОВ (штамм Л-ИВП) и ВОМ (штамм К-1). Исследуемые образцы оказались малотоксичными. Наиболее активным в отношении ВГ оказался препарат № 5, а в отношении ВПГ, ВОВ и ВОМ препарат № 6, оба препарата получены из корней растения и состоят преимущественно из катехинов и лейкоантоцианов.

В культуре клеток MDCK и на модели лабораторных животных показано противогриппозное действие этанольного экстракта, полученного из культуры «бородатых корней» селитрянки Шобера.

ВЫВОДЫ

1. Исследована противовирусная активность экстрактов из 83 видов культивируемых и дикорастущих на территории Юго-Западной Сибири растений в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK. Установлено, что наиболее активные водные экстракты двух видов и этанольные экстракты 13 видов в максимально переносимых концентрациях подавляли инфекционность вируса гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1 на 2,2-5,5 lg.

2. Пероральное введение этанольных экстрактов репейника волосистого, гравилата речного, спиреи иволистной, полыни горькой, полыни обыкновенной,

иссопа лекарственного в суточной дозе 25 мкг/г массы аутбредным мышам ICR, инфицированным вирусом гриппа А/Н5N1, вызывало достоверное увеличение доли выживших и среднюю продолжительность жизни животных по сравнению с контрольной группой. При этом применение экстрактов спиреи иволистной и полыни горькой у мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Н3N2, также приводило к достоверному увеличению этих показателей выживаемости относительно контрольных значений.

3. Образцы, полученные из надземных органов и корней манжетки обыкновенной, обладали противовирусной активностью в отношении вируса простого герпеса 1 и 2 типов, осповакцины и оспы мышей в клетках Vero, а также в отношении вируса гриппа А субтипов Н3N2 и Н5N1 в клетках MDCK. Ингибирующее влияние данных растительных образцов на продукцию используемого вируса гриппа птиц А/Н5N1 в культуре клеток MDCK подтверждено методом просвечивающей электронной микроскопии.

4. В экспериментах *in vitro* установлено, что в отношении вируса гриппа А/Н5N1 образец, полученный из корней манжетки обыкновенной, ингибировал адсорбционную способность вируса и снижал количество вирусной РНК, но не обладал вирулицидным действием и не подавлял нейраминидазную активность вируса.

5. При пероральном введении образцов манжетки обыкновенной в дозе 25 мкг/г массы, аутбредным мышам ICR, инфицированным вирусом гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1, достоверно увеличивались доля выживших (до 45-80 %) и средняя продолжительность жизни животных относительно соответствующих показателей в контрольных группах.

6. В экспериментах на аутбредных мышях ICR, зараженных вирусом гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1, показано, что 50 %-е эффективные дозы (ЭД₅₀) образца из корней манжетки обыкновенной составили 14,13 и 31,62 мкг/г массы мыши соответственно, а минимальные дозы этого образца, вызывающие 100 %-ю защиту (ЭД₁₀₀) мышей, достигали 100 и 200 мкг/г массы животных соответственно.

7. Этанольный экстракт, полученный из культуры “бородатых корней” селитрянки Шобера, ингибировал в культуре клеток MDCK инфекционность вируса гриппа А субтипов Н3N2 и Н5N1 на 2,7 и 4,5 lg соответственно. При пероральном введении этого экстракта мышам, инфицированным вирусом гриппа А/Н3N2 и А/Н5N1, наблюдалось достоверное увеличение доли выживших (60 и 80 % соответственно) и средней продолжительности жизни животных относительно соответствующих показателей в контрольных группах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1) Макаревич Е.В. Экстракты растительного происхождения ингибируют размножение вируса гриппа а в культуре клеток MDCK/ Е.В. Макаревич, Е.И. Филиппова// Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4.

2) Высшие растения как основа для разработки противогриппозных препаратов/ Н.А. Мазуркова, Е.И. Филиппова, Е.В. Макаревич [и др.]// Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. - № 4. – С. 55-56.

3) Филиппова Е.И. Антивирусное действие растительных экстрактов в отношении вируса гриппа в экспериментах *in vitro* и *in vivo*/ Е.И. Филиппова, Е.В. Макаревич, В.А. Костикова// Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. - № 12. – С. 69-70.

4) Противовирусные свойства препарата на основе суммы флавоноидов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) в отношении вируса гриппа/ Е.И. Филиппова, Т.А. Кукушкина, И.Е. Лобанова [и др.]// Фундаментальные исследования. – 2015. - № 2 (часть 23). – С. 5139-5144.

5) Изучение противогерпетической активности экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.)/ Н.А. Мазуркова, Т.А. Кукушкина, Г.И. Высочина [и др.]// Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. - № 1 (14). – С. 118-127.

6) Противовирусные свойства дикорастущих и культивируемых растений Юго-Западной Сибири/ И.Е. Лобанова, Е.И. Филиппова, Г.И. Высочина, Н.А. Мазуркова// Растительный мир Азиатской России. – 2016. - № 2(22). - С. 64–72.

7) Филиппова Е.И. Противовирусная активность экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) в отношении ортопоксвирусов/ Е.И. Филиппова// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2017. - № 3. - С. 359-362.

8) *Nitraria schoberi* L. hairy root culture as a source of compounds with antiviral activity against influenza virus subtypes A(H5N1) and A(H3N2)/ Т. Zheleznichenko, E. Banaev, S. Asbaganov [et al.]// 3 Biotech. - 2018. - V. 8, № 6. – P. 260.

9) Виды рода *Alchemilla* L. (Rosaceae): химический состав, биологическая активность, использование в медицине (обзор)/ И.Е. Лобанова, Г.И. Высочина, Н.А. Мазуркова [и др.]// Химия растительного сырья. – 2019. - № 1. – С. 5-22.

10) Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, полученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей/ Н.А. Мазуркова, М.А. Проценко, Е.И. Филиппова [и др.]// Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. - Т. 8. - № 4. - С. 9-15.

11) Противогриппозная активность экстрактов растений семейства Lamiaceae/ М.А. Проценко, Н.А. Мазуркова, Е.И. Филиппова [и др.]// Химия растительного сырья. - 2021. - № 2. - С. 181–190.

12) Сравнительная оценка противовирусной активности экстрактов некоторых высших растений в отношении вируса гриппа А in vitro/ И.Е. Лобанова, Е.И. Филиппова, Т.А. Кукушкина [и др.]// Химия в интересах устойчивого развития. - 2021. - № 6. - С. 675-682.

Патенты

1) Противовирусное средство на основе суммы флавоноидов из *Alchemilla vulgaris* L.: пат. 2580304 Рос. Федерация: МПК А61К 36/73 В01Д 11/02 А61Р 31/12 А61Р 31/14 А61Р 31/16 А61Р 31/20 А61Р 31/22/ Н.А. Мазуркова, Т.А. Кукушкина, Е.И. Филиппова, Ж.Б. Ибрагимова; заявитель и патентообладатель Гос. научн. Центр вирусол. и биотехнол. «Вектор». - № 2015106729/15; заявл. 26.02.15; опубл. 10.04.16, бюл. №10. – 15 с: ил.

2) Противовирусное средство на основе экстракта культуры «бородатых корней» (“hairy roots”) селитрянки Шобера (*Nitraria schoberi* L.): пат. 2615376 Рос. Федерация: МПК А61К 36/77 В01Д 11/02 А61Р 31/12/ Н.А. Мазуркова, Е.И. Филиппова, М.А. Проценко [и др.]; заявители и патентообладатели Гос. научн. Центр вирусол. и биотехнол. «Вектор», Рос. акад. наук Сиб. отд-ние, Центр. сиб. ботан. сад. - № 2016110990; заявл. 24.03.16; опубл. 04.04.17, бюл. №10. – 17 с: ил.

Материалы конференций и тезисы докладов

По результатам диссертации опубликовано 17 тезисов докладов в сборниках научных трудов, материалах конференций и других изданиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАВ	- биологически активные вещества
БОЕ	- бляшкообразующая единица
ВАК	- Высшая аттестационная комиссия
ВГ	- вирус гриппа
ВИЧ	- вирус иммунодефицита человека
ВОВ	- вирус осповакцины
ВПГ	- вирус простого герпеса
ВСЖ	- вируссодержащая жидкость
д.з.	- до заражения
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИД ₅₀	- 50 %-я инфицирующая доза вируса
ИН	- индекс нейтрализации вируса
и/н	- интраназально
ИПП	- индекс подавления продукции вируса
ИХБФМ СО РАН	- Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
КЗ	- коэффициент защиты
ЛД ₅₀	- 50 %-я летальная доза
МПК	- максимально переносимая концентрация
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
п.з.	- после заражения
п/о	- перорально
РГА	- реакция гемагглютинации
РНК	- рибонуклеиновая кислота
СО РАН	- Сибирское отделение Российской академии наук
СПЖ	- средняя продолжительность жизни
ТЦД ₅₀	- 50 %-я тканевая цитопатическая доза вируса (доза вируса, вызывающая гибель монослоя клеток в 50 % случаев)
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»	- Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
ЦМВ	- цитомегаловирус
ЦПД	- цитопатическое действие
ЦСБС СО РАН	- Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук
ЦТД	- цитотоксическое действие
ЭД ₅₀ ; ЭД ₁₀₀	- 50 и 100 %-я эффективные дозы
Ig	- десятичный логарифм
МОИ	- множественность инфекции
RT-PCR	- полимеразная цепная реакция в реальном времени
SI	- индекс селективности
ТС ₅₀	- 50 %-я токсическая концентрация
ТИ	- терапевтический индекс