

УДК 578.832

М.С. Алексюк*, А. С. Турмагамбетова, И. А. Зайцева,
Н.С. Соколова, П.Г. Алексюк, А. П. Богоявленский, В. Э. Березин
РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Республика Казахстан, г. Алматы
*E-mail: virprot@mail.ru

Скрининг растений Иле-Балхашского региона на наличие противовирусных свойств

Богатое разнообразие флоры Иле-Балхашского региона позволяет рассчитывать на наличие в растениях широкого спектра биологически активных соединений. В данной работе проведен скрининг на наличие противовирусной активности 15 растительных препаратов, выделенных из разных экологических групп. Показано, что препараты ИБ2, ИБ12, ИБ13, ИБ15 относящиеся к группам мезо-, ксеромезо- и ксерофитов в дозе 1 мг на кг были способны подавлять репродукцию вируса более, чем на 75%. При этом установлено, что вирулицидная активность препаратов ИБ13, ИБ15 и ИБ2 сопоставима с вирулицидной активностью коммерческих препаратов гевиран и амизон, а препарат ИБ12 сопоставим по вирулицидной активности с коммерческими препаратами на основе спиртосодержащих растворов.

Ключевые слова: противовирусная активность, вирулицидная активность, растительные препараты, фитокомплексы, вирус гриппа.

M.S. Alexyuk, A.S. Turmagambetova, I.A. Zaitseva, N.S. Sokolova, P.G. Alexyuk,
A.P. Bogoyavlenskiy, V.E. Berezin

Screening plants of the Ile-Balkhash region to the presence of the antiviral properties

A rich variety of flora Ile-Balkhash region can expect to the presence of a wide range biologically active compounds of plants. This paper presents a screening for antiviral activity of 15 herbal preparations isolated from various environmental groups. It is shown that preparations IB2, IB12, IB13, IB15 from meso-, xeromeso and xerophytes in dose 1 mg per kg were able to inhibit virus replication by more than 75%. It was found that the virucidal activity of preparations IB13, IB15 and IB2 comparable to commercial preparations geviran and amizon and preparation IB12 is comparable for virucidal activity with commercial preparations based on alcohol-containing solutions.

Keywords: antiviral activity, virucidal activity, herbal preparations, phytocomplex influenza virus.

М.С. Алексюк, А. С. Турмагамбетова, И. А. Зайцева, Н.С. Соколова,
П.Г. Алексюк, А. П. Богоявленский, В. Э. Березин

Иле-Балқаш аймағындағы өсімдіктердің вирусқа қарсы тұру қасиетіне скрининг жүргізу

Флораның әртүрлілігіне бай Иле-Балхаш аймағы өсімдіктердегі биологиялық белсенді қосылыстардың спектрі ауқымдылығына дәлел болады. Бұл жұмыста әртүрлі экологиялық топтан бөлінген 15 өсімдік препараттарының вирусқа қарсы белсенділігіне скрининг жүргізілген. Мезо-, ксеромезо-, және ксерофиттер тобына жататын ИБ2, ИБ12, ИБ13, ИБ15 препараттары 1мг/кг қолданғанда вирус репродукциясын 75% аса төмендететіні анықталған. Сонымен қатар ИБ13, ИБ15 және ИБ2 препараттарының вирулицидті белсенділігін коммерциялық гевиран және амизонмен салыстыруға, ал ИБ12 коммерциялық негізі құрамында спирті бар ерітінді препараттардың вирулицидті белсенділігімен салыстыруға болады.

Түйін сөздер: вирусқа қарсы тұру белсенділік, вирулицидті белсенділік, өсімдік препараттары, фитожиынтық, тұмау вирусы.

Иле-Балхашский бассейн является одним из крупнейших озерных экосистем центрально-азиатского региона и представляет собой уникальный природный комплекс, представленный гаммофильными группировками, саксауловыми сообществами, эфемерово и злаково-разно-

травно-полынными сообществами, злаково-разнотравными группировками, галофильной, тугайной растительностью и уникальными туранговыми зарослями, а также прибрежно-пойменной, луговой, болотной и водной растительностью[1]. Все многообразие раститель-

ности Иле-Балхашского региона можно условно разделить на 8 экологических групп, объединяющих растительное многообразие региона: гидрофиты (водные растения, прикрепленные к почве и погруженные в воду только нижними своими частями), гигрофиты (растения, обитающие в местах с высокой влажностью воздуха и/или почвы), мезогигрофиты (растения, произрастающие в местах с периодически сильным увлажнением), гигромезофиты (виды периодически сверх сильного переувлажнения), мезофиты (виды, приспособленные к жизни в условиях среднего водоснабжения), мезоксерофиты (растения, приспособленные к условиям несколько менее чем средним по запасам влаги в почве, промежуточные между ксеромезофитами и эксерофитами), ксеромезофиты (растения, приспособленные к условиям с запасами влаги в почве несколько ниже среднего, сюда относят многие виды растений северных степей, сухих сосновых боров, песчаных местообитаний) и ксерофиты (типичная флора пустынь и полупустынь, обычны в песчаных дюнах) [2,3].

Целью настоящих исследований являлся скрининг экстрактов растений Иле-Балхашского региона, принадлежащих к разным экологическим группам, на наличие противовирусной активности.

Для получения экстрактов были отобраны растения, принадлежащие к различным экологическим группам (таблица 1).

Суммарные фитокомплексы были получены с помощью методов этилацетатной, спиртовой и водной экстракции растительного сырья [4-6].

Вирусы. В работе был использован вирус гриппа человека, штамм А/Алматы/8/98 (H3N2). Вирус выращивали в аллантоисной

полости 9-10 дневных куриных эмбрионов в течение 36 часов при 37 °С. Наличие вируса выявляли с помощью реакции гемагглютинирующей активности (РГА). РГА определяли по стандартной методике [7] с использованием 1% взвеси куриных эритроцитов.

Вирусингибирующую активность экстрактов изучали в экспериментах на куриных эмбрионах. Для определения противовирусной активности использовали метод «скрининг-тест», рассчитанный на подавление репликации 100 ЭИД₅₀ вируса заданными дозами препаратов. Критерием противовирусного действия являлась разница в титрах вируса до и после обработки.

Вирулицидную активность исследуемых препаратов определяли путем обработки вирусосодержащего материала химическими соединениями при 37 °С в течение 30 мин с последующим титрованием инфекционности обработанного материала. За реальное вирулицидное действие принимали разницу между титром вируса в пробе без экспозиции и его титром после. Если разница в титрах составляла 1,0 – 2,0 lg, то вещество считали обладающим умеренной или выраженной противовирусной активностью [8].

Инфекционный титр вирусов определяли по методу Reed и Muench [9].

Токсичность исследуемых материалов определяли путем инокуляции 0,2 мл препарата в хорион-аллантоисную полость куриных эмбрионов (эмбриотоксичность). Токсичность препаратов определяли по гибели куриных эмбрионов в течение 5 суток после инокуляции материалов.

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [10].

Таблица 1 – Список растений, выбранных для скрининга на наличие противовирусной активности

Растения	Шифр экстракта	Растение	Шифр экстракта
<i>Galatella (Asteraceae)</i>	ИБ1	<i>Potentilla (Rosaceae)</i>	ИБ9
<i>Halimodendron (Fabaceae)</i>	ИБ2	<i>Cyperus (Cyperaceae)</i>	ИБ10
<i>Butomus (Butomaceae)</i>	ИБ3	<i>Trifolium (Fabaceae)</i>	ИБ11
<i>Prunus (Rosaceae)</i>	ИБ4	<i>Gleditsia (Fabaceae)</i>	ИБ12
<i>Sagittaria (Alismataceae)</i>	ИБ5	<i>Equisetum (Equisetaceae)</i>	ИБ13
<i>Ceratophyllum (Ceratophyllaceae)</i>	ИБ6	<i>Ceratocephala (Ranunculaceae)</i>	ИБ14
<i>Phragmites (Poaceae)</i>	ИБ7	<i>Thalictrum (Ranunculaceae)</i>	ИБ15
<i>Carex (Cyperaceae)</i>	ИБ8		

В результате проведенных экспериментов из 15 растений, произрастающих в Иле-Балхашском регионе, получено 15 суммарных фитопрепаратов. Качественный анализ полученных фитокомплексов показал наличие двух основных групп соединений для каждого из растений: полифенольных комплексов и три-терпеновых соединений. Анализ гемолитических свойств суммарных препаратов показал, что два из них (ИБ4 и ИБ12) способны вызывать более 50% гемолиз куриных эритроцитов при концентрации 2,5%. Поэтому в дальнейших исследованиях проводилось исследование токсичности полученных фитокомп-

лексов в интервале доз от 0,004 до 200 мг/кг веса на модели куриных эмбрионов. Показано, что в указанном диапазоне доз ни один из исследованных препаратов не проявлял токсических свойств, поэтому в дальнейших исследованиях противовирусных доз использовался интервал от 1 до 100 мг/кг.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что в дозе 100 мг на кг веса препараты ИБ1, ИБ2, ИБ4, ИБ7, ИБ12, ИБ13, ИБ15 способны подавлять репродукцию вируса более, чем на 60%. Остальные препараты проявили слабовыраженные вирусингибирующие свойства (рисунок 1).

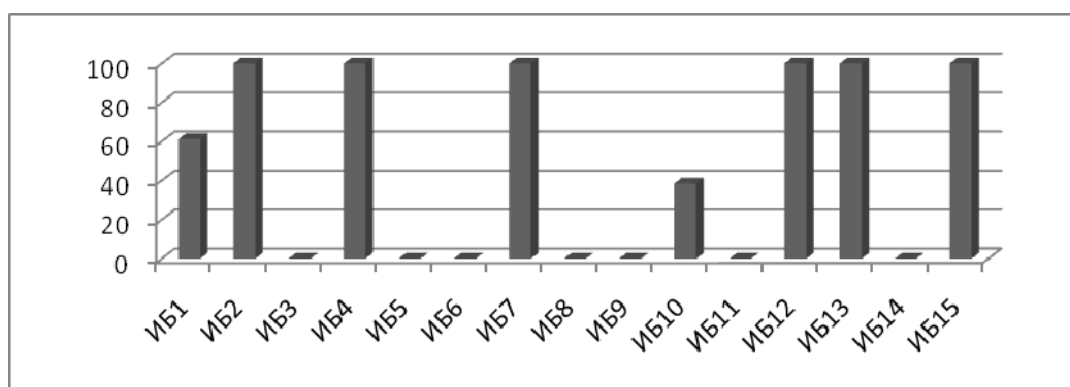


Рисунок 1 – Вирусингибирующая активность препаратов алкалоидного ряда, при обработке вируса гриппа А/Алматы/8/98 (H3N2) препаратами в дозе 100 мг на кг веса

Примечание: по оси ординат – процент подавления репродукции вируса, по оси абсцисс-препараты

Уменьшение дозы препарата до 1 мг на кг веса показало, что фитокомплексы ИБ1, ИБ3, ИБ5, ИБ6, ИБ8, ИБ9, ИБ10, ИБ11, ИБ14 не проявляли или обладали слабовыраженной вирусингибирующей активностью. Препараты

ИБ4 и ИБ7 подавляли репродукцию вируса до 40%. А препараты ИБ2, ИБ12, ИБ13, ИБ15 были способны подавлять репродукцию вируса более, чем на 75% (рисунок 2).

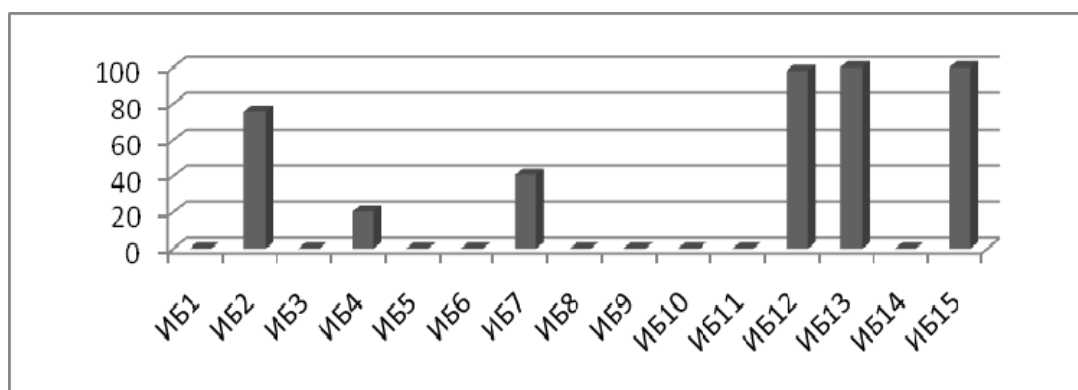


Рисунок 2 – Вирусингибирующая активность препаратов алкалоидного ряда, при обработке вируса гриппа А/Алматы/8/98 (H3N2) препаратами в дозе 1 мг на кг веса

Примечание: по оси ординат-процент подавления репродукции вируса, по оси абсцисс-препараты

В дальнейших исследованиях проводилось изучение вирулицидной активности растительных препаратов. Изучение вирулицидной активности противовирусных препаратов является одним из основных подходов к определению эффективности действия препаратов, обладающих антивирусной активностью. Снижение титра инфекционности вируса на 1,0 lg означает потерю 90% вируса, поэтому соединения способные понизить титр инфекционности вируса на один десятичный логарифм относятся к препаратам с выраженной антивирусной активностью, а препараты способные понизить инфекционность вируса более чем на 1,0 lg – с ярко выраженной активностью.

Способность природных соединений подавлять инфекционность вируса гриппа, штамм А/Алматы/8/98 (H3N2) исследовали в дозе 100 мг на кг веса (рисунок 3).

Показано, что препараты ИБ3, ИБ5, ИБ6, ИБ9, ИБ14, ИБ8, ИБ11 не влияли на инфекционную активность вируса гриппа. Препараты ИБ7 и ИБ10 подавляли инфекционный титр вируса не более, чем на 0,5 lg, что соответствует среднему уровню противовирусной активности исследуемых препаратов. Препараты ИБ13, ИБ15, ИБ4, ИБ2, ИБ1 и ИБ12 были способны подавлять титр инфекционности вируса гриппа от 0,75 до 4,5 lg, что соответствует ярковыраженным противовирусным свойствам.

Таким образом, установлено, что раститель-

ные экстракты ИБ2, ИБ12, ИБ13 и ИБ15, можно отнести к препаратам, обладающим выраженными антивирусными свойствами, т.к. они сочетают высокую вирусингибирующую активность с ярко-выраженными вирулицидными свойствами.

Было проведено изучение вирулицидной активности исследуемых препаратов в сравнении с коммерческими препаратами амизон и гевиран. Показано, что при анализе способности подавлять инфекционную активность вируса гриппа, штамм А/Алматы/8/98 (H3N2) препараты ИБ13, ИБ15 и ИБ2 по своей активности сопоставимы с коммерческими препаратами гевиран и амизон, а препарат ИБ12 сопоставим по активности с коммерческими вирулицидными препаратами на основе спиртосодержащих растворов (рисунок 4).

Таким образом, при скрининге экстрактов растений Иле-Балхашского региона и принадлежащих к разным экологическим группам установлено, что препараты ИБ2, ИБ12, ИБ13, ИБ15 относящиеся к группам мезо-, ксеромезо- и ксерофитам в дозе 1 мг на кг способны подавлять репродукцию вируса более, чем на 75%. Подобный факт может быть объясним наличием специальных вторичных метаболитов, участвующих в адаптационных процессах растения к неблагоприятным факторам окружающей среды.

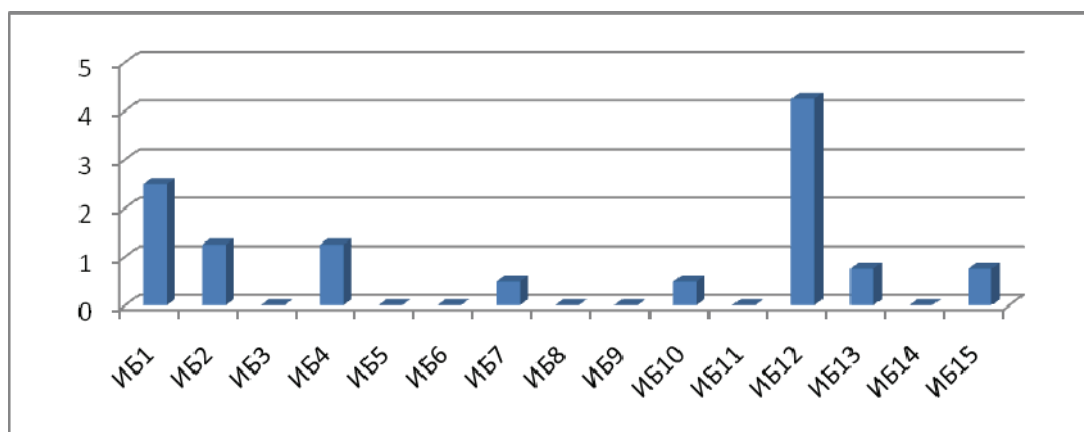


Рисунок 3 – Вирулицидная активность препаратов при обработке вируса гриппа А/Алматы/8/98 (H3N2) препаратами в дозе 100 мг на кг веса

Примечание: по оси ординат-снижение титра инфекционности вируса (lg), по оси абсцисс-препараты

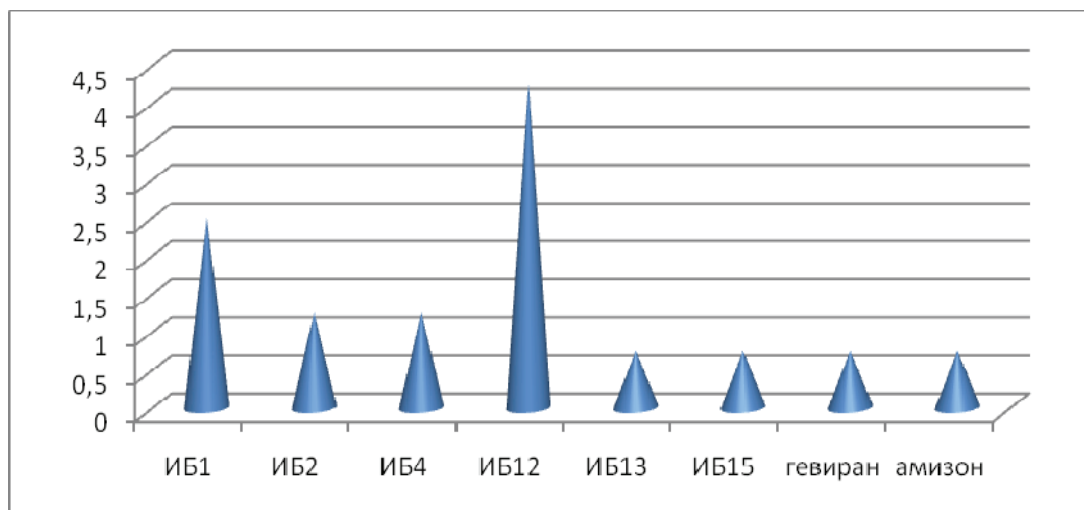


Рисунок 4 – Сравнение вирулицидной активности исследуемых растительных экстрактов с коммерческими препаратами при обработке вируса гриппа А/Алматы/8/98 (H3N2) препаратами в дозе 100 мг на кг веса

Примечание: по оси ординат-снижение титра инфекционности вируса (lg), по оси абсцисс-препараты

При изучении способности растительных препаратов подавлять инфекционную активность вируса гриппа, штамм А/Алматы/8/98 (H3N2) показано, что препараты ИБ13, ИБ15 и ИБ2 сопоставимы с коммерческими препара-

тами гевиран и амизон, а препарат ИБ12 сопоставим по активности с коммерческими вирулицидными препаратами на основе спирт-содержащих растворов.

Литература

- 1 Ботаническая география Казахстана и Средней Азии / под ред. Е.И. Рачковской, Е.А. Волковой, В.Н. Храмова. – СПб., 2003. – 424 с.
- 2 Красная книга Казахской ССР. Часть 2. Растения. – Алма-Ата: издательство «Наука» Казахской ССР, 1981. – 284 с.
- 3 Работнов Т.А. Фитоценология. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 292 с.
- 4 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Основы химии природных соединений. – Алматы: Казак Университеті, 2010. – 564 с.
- 5 Музычкина Р.К., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. – Алматы: Казак университеті, 2004. – 288 с.
- 6 Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Березин В.Э. Противовирусные препараты растительного происхождения // Фундаментальные исследования (Россия). – 2013. – №6 (часть 5). – С. 1141-1146
- 7 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus // Avian Dis. – 1970. – Vol. 14. – P.542-549.
- 8 Шнейдер М.А. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. – Минск: Наука, 1977. – С.150.
- 9 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer. J. Hyg., 1938, V.27, P.493-497.
- 10 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М., 1975. – С.295.

References

- 1 Botanicheskaja geografija Kazahstana i Srednej Azii. Pod red. E. I. Rachkovskoj, E. A. Volkovoj, V. N. Hramcova. 2003. SPb. 424 s. (Russ.)
- 2 Krasnaja kniga Kazahskoj SSR. Chast' 2. Rastenija. Alma-Ata: izdatel'stvo «Nauka» Kazahskoj SSR, 1981. 284 s. (Russ.)
- 3 Rabotnov T.A. Fitocenologija. M.: Izd-vo MGU, 1983. 292 s. (Russ.)

- 4 Muzychkina R.A., Korul'kin D.Ju., Abilov Zh.A. Osnovy himii prirodnyh soedinenij. Almaty: Қазақ Университеті, 2010. – 564 s. (Russ.)
- 5 Muzychkina R.K., Korul'kin D.Ju., Abilov Zh.A. Kachestvennyj i kolichestvennyj analiz osnovnyh grupp BAV v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i fitopreparatah. – Almaty: Қазақ Университеті, 2004. – 288 s. (Russ.)
- 6 Bogojavlenskij A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.Je. Protivovirusnye preparaty rastitel'nogo proishozhdenija. Fundamental'nye issledovanija (Rossija).-2013.- №6 (chast' 5).- S. 1141-1146 (Russ.)
- 7 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus. Avian Dis. – 1970. – Vol. 14. – P.542-549.
- 8 Shnejder M.A. Metodicheskie voprosy nauchnoj razrabotki protivovirusnyh sredstv, Minsk, Nauka, 1977, S.150.
- 9 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg., 1938, V.27, P.493-497.
- 10 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. Moskva, 1975, S.295 (Russ.)