

1 – Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), 363559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН (ЦСБС СО РАН), 630090, Россия, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

1 – State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia

2 – Central Siberian Botanical Garden SB RAS, 101, Zolotodolinskaya str., Novosibirsk, 630090, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: mazurkova@vector.nsc.ru
Тел.: 8 (383) 363 47 00 доб. 22 20

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*ALCHEMILLA VULGARIS* L.)

Н.А. Мазуркова^{1*}, Т.А. Кукушкина², Г.И. Высокina²,
Ж.Б. Ибрагимова¹, И.Е. Лобанова², Е.И. Филиппова¹,
О.Ю. Мазурков¹, Е.В. Макаревич¹, Л.Н. Шишкина¹, А.П. Агафонов¹

Резюме. В статье представлены сведения о распространении, применении в народной медицине, химическом составе растительного сырья, фармакологическом изучении манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), а также результаты изучения в культуре клеток Vero токсических и антивирусных свойств водных растворов сухого этанольного извлечения из надземной части и этилацетатного извлечения из корней манжетки обыкновенной, произрастающей в Западной Сибири, в отношении вируса простого герпеса. Показано, что экстракты, полученные как из надземной части, так и из корней растения, обладают *in vitro* антивирусной активностью в отношении вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов.

Ключевые слова: экстракты манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), противовирусная активность, вирус простого герпеса.

STUDY OF ANTIHERPETIC ACTIVITY OF LADY'S MANTLE (*ALCHEMILLA VULGARIS* L.) EXTRACTS

N.A. Mazurkova¹, T.A. Kukushkina², G.I. Vysochina², Z.B. Ibragimova¹, I.E. Lobanova², E.I. Filippova¹, O.Yu. Mazurkov¹, E.V. Makarevich¹, L.N. Shishkina¹, A.P. Agafonov¹

Abstract. The article presents information on the distribution, on the use in traditional medicine, the chemical composition of plant material, pharmacological study of lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.), as well as the results of a study in culture Vero cell toxicity and antiviral properties of aqueous solutions of dry ethanol extract of the aerial parts and the ethyl acetate extract of the roots of lady's mantle, growing in Western Siberia, in respect of the herpes simplex virus. It is shown that the extracts derived from both aerial parts and roots of plants have on the Vero cell culture antiviral activity against herpes simplex virus of 1 and 2-type.

Keywords: extracts of lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.), antiviral activity, herpes simplex virus.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время инфекция, вызываемая вирусами герпеса 1 и 2 типов (рисунок 1), занимает одно из лидирующих мест среди вирусных заболеваний человека. Согласно опубликованным 28 января 2015 г. в журнале PLOS ONE первым глобальным оценкам ВОЗ распространенности вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1), этим вирусом инфицированы более 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет, или 67% населения [1]. Кроме того, по оценке ВОЗ, сделанной в январе 2015 г., 417 млн человек в возрасте 15–49 лет имели инфекцию ВПГ-2, вызывающую генитальный герпес [2, 3]. Ежегодно, согласно расчетам, вирусом ВПГ-2 заражаются около 20 млн человек [2, 3].

Для лечения герпетической инфекции используют иммуномодуляторы, патогенетические и симптоматические средства, а также химиопрепараты, действующие непосредственно на вирусы [4]. Противови-

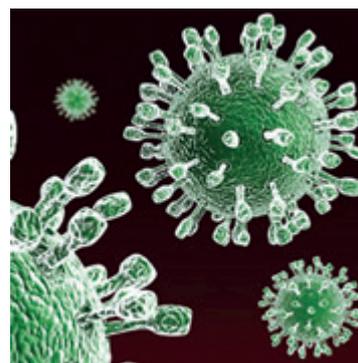


Рисунок 1. Вирус простого герпеса

русные препараты, применяемые в настоящее время против герпеса, имеют синтетическое (ацикловир, зовиракс, лавомакс, валтрекс, фамвир, иммунорикс) [4, 5] или растительное происхождение (гипорамин, панавир, аллизарин, госсипол, хелепин) [6–11]. Согласно международным стандартам лечения герпесвирусных инфекций препаратами выбора являются ацикловир,

валтрекс и фамвир, которые селективно ингибируют герпесвирусную ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, нарушая тем самым репликацию ДНК вируса [4, 5]. Однако для этих химических препаратов характерны быстрое появление резистентных к ним штаммов ВПГ, низкая биодоступность, а также высокая нефротоксичность. Все это обуславливает необходимость создания более эффективных препаратов против герпеса, в том числе и на основе биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения.

Противогерпетические препараты растительного происхождения по сравнению с химическими соединениями являются практически нетоксичными [6, 8, 10]. Среди последних известны препараты с разными механизмами действия на вирус. Так, гипорамин, представляющий собой экстракт на основе полифенольного комплекса, полученный из листьев облепихи крушиновидной [6], и панавир – экстракт побегов паслена клубневидного, содержащий гексозные гликозиды, блокируют синтез вирусной ДНК [7]. Алпизарин – экстракт копеечника альпийского и экстракт копеечника желтоватого, содержащий γ -ксантоновый С-гликозид мангиферин, препятствует проникновению вируса внутрь клетки [8]. Госсипол – экстракт семян и корней хлопчатника лохматого, представляющий собой природный полифенол, имеет как прямое инактивирующее воздействие на вирусы, взаимодействуя с оболочечными белками вирусных частиц, так и опосредованное, через механизмы индукции интерферонов [9]. Хелепин представляет собой экстракт леспедецы двуцветной, содержащий природную сумму флавоноидов, проявляет вирулицидную активность при местном применении [10].

Перечисленные выше растительные препараты при низкой токсичности имеют разную клиническую эффективность: от невысокой до сравнимой с активностью ацикловира. Вместе с тем разработка новых эффективных препаратов на основе манжетки обыкновенной может оказаться весьма перспективной для борьбы с герпесом. 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 биологически активных веществ растений определяет широту спектра их действия на организм человека в комплексной терапии различных заболеваний. Основой для современной отечественной фармации служат исследования лекарственных растений народной медицины. При введении таких растений в медицинскую практику в первую очередь проводится комплекс исследований, устанавливающих их видовую принадлежность и границы вида [12]. Это особенно актуально для рода *Alchemilla* L. (Rosaceae Juss.), как одного из таксонов, к систематике которого до сих пор не найдено рационального подхода. Большинство слагающих его рас возникло в ходе сложных гибридизационных процессов в прошлом, сопровождающихся

резким повышением плоидности, нарушением полового процесса и переходом к апомиксису, изучение которого у манжеток имеет не только общебиологическое теоретическое значение, но и практическую направленность [13]. На основе результатов фармакогностического, ресурсоведческого изучения и анализа геномов для медицинского применения рекомендованы 13 видов этого рода [12]. Один из них – *Alchemilla vulgaris* L. (= *A. xanthochlora* ROTHM., 1937), манжетка обыкновенная [14], – является сборным видом, включающим в себя от 5 до 40 апогамных форм (мелких видов) рода (рисунок 2). Этот факт отмечается многими исследователями [12, 13, 15–18].



Рисунок 2. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.)

Распространение

В мире насчитывается не менее 350 видов рода *Alchemilla* L. (преимущественно апомиктических рас) в областях умеренного и холодного климата Евразии, Северной Америки и в горах тропиков (Африка). В Восточной Европе основными центрами формообразования и эндемизма манжетки были Карпаты, Крым, отчасти субарктические районы Скандинавии, но особенно Урал и Приуралье. В ряде случаев рассматривается влияние кавказского центра [19]. На территории бывшего СССР встречается 260 видов рода *Alchemilla* [20]. Манжетка обычно встречается во всех областях Средней России, в Средней и Центральной Сибири, Кемеровской области, Алтайском крае. Встречается на лугах, в степях, на полянах, в светлых лесах, на выгонах, у дорог, на лесосеках, опушках, среди кустарников [15, 21, 22].

Применение в народной медицине

Alchemilla vulgaris L. – манжетка обыкновенная, или манжетка желто-зеленая, является кормовым и лекарственным растением. Спектр биологической активности манжетки чрезвычайно широк: в народной медицине стран Западной Европы, как и в народной отечественной медицине, манжетка обыкновенная

применяется в качестве вяжущего, отхаркивающего, диуретического, гемостатического, ранозаживляющего и улучшающего обмен веществ средства, также она эффективна при эпилепсии, энтеритах, диабете, дисменорее, кожных заболеваниях. Сок, настой листьев используются наружно при опухолях, ранах, заболеваниях глаз [23]. Сообщается также об использовании манжетки обыкновенной при несварении желудка, вздутии и вялом кишечнике, катаре верхних дыхательных путей, туберкулезе легких, при поносах [24]. Считается, что манжетка эффективна при отеках и диабете, при гинекологических заболеваниях, чирьях, насморке и носовых кровотечениях [25, 26]. И это далеко не полный перечень возможного использования манжетки. Данных народной медицины о противовирусных свойствах манжетки обыкновенной нами не обнаружено.

Химический состав растительного сырья манжетки обыкновенной

Экспериментально доказано, что основным действующим началом *Alchemilla vulgaris* L. является полифенольный комплекс и в первую очередь флавоноиды [27, 28]. В надземных органах манжетки обыкновенной в разное время и разными исследователями были обнаружены флавонолы: кверцетин [27], астрагалин [27, 29, 30], рутин [29, 30], гиперозид [29], кемпферол [27, 31], рамноглюкозид кемпферола [31], изокверцитрин [27, 30] и кверцетин-3-О-Д-арабинофуранозид (авикулярин) [30]. Т.А. Кукушкина с соавт. [27] обнаружили не установленный гликозид кверцетина, который, по их мнению, является основным компонентом флавоноидного комплекса надземной части. D. Fraisse [32] в качестве основного компонента рассматривает кверцетин-3-арабинопиранозид, тогда как В.М. Баева и С.А. Сасов [33] утверждают, что основной компонент – это рутин, и он составляет 50% и более от суммы флавоноидов. Немногочисленные данные свидетельствуют, что в подземных органах манжетки были найдены катехины и лейкоантоцианы [27, 34, 35]. Кроме флавоноидов, в надземной части манжетки обыкновенной были обнаружены кумарины и фенолкарбоновые кислоты, в спиртовом извлечении присутствовали дубильные вещества [36, 37]. В водном извлечении травы манжетки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) установлено наличие агримонина [12]. В настое травы было определено содержание флавоноидов (рутина, кверцетина, гиперозида, лютеолина), фенолкарбоновых кислот (кофейной, хлорогеновой) и некоторых других фенольных соединений (арбутина, галловой кислоты), витаминов (аскорбиновой кислоты, рибофлавина), а также присутствие азотистых оснований нуклеиновых кислот [38]. Кроме того, в траве и настое манжетки автором было найдено 18 аминокислот, в том числе 7 незаменимых (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин),

установлено содержание некоторых эссенциальных и условно эссенциальных макро- и микроэлементов, а также присутствие ксилозы, глюкозы и галактозы в составе полисахаридного комплекса. В настое определено высокое содержание пролина и оксализина, а в траве – аспарагиновой и глютаминовой кислот, глицина, валина и лизина. Столь разнообразные сведения о химическом составе манжетки обыкновенной еще раз подчеркивают важность проблемы точной стандартизации лекарственного сырья и фармацевтических форм на его основе, тем более что состав флавоноидов манжетки обыкновенной из различных точек ареала ее распространения различается.

Фармацевтические нормативы

В Германии, Франции, Болгарии и Швейцарии *Alchemilla vulgaris* L. является лекарственным фармакопейным растением [39–41]. В России этот вид не является официальным, так как отсутствует нормативная документация на лекарственное сырье и методы стандартизации количественной и качественной оценки содержания основных действующих веществ. С середины прошлого века изучение манжетки стало предметом пристального внимания официальной отечественной медицины. И уже в начале нынешнего столетия был разработан проект фармакопейной статьи (ФС) «*Alchemillae herba* – манжетки трава», регламентирующей качество сырья манжетки на основе *Alchemilla vulgaris* L. как производящего растения для заготовки сырья «*Alchemillae herba*» [18]. Кроме того, разработан проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) «*Extractum herbae Alchemillae siccum*» – «Экстракт травы манжетки сухой» и составлена технологическая схема получения экстракта травы манжетки сухой [18]. Разработаны характеристики подлинности и показатели качества для травы манжетки и нормы качества для настоя травы манжетки [38]. Манжетка обыкновенная рекомендована также в качестве лекарственного растительного сырья, проявляющего гемореологические свойства [37, 42]. Оформлен проект временной фармакопейной статьи (ВФС) в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 [37]. Оценку качества травы манжетки обыкновенной предложено проводить по содержанию флавоноидов в пересчете на цинарозид (лютеолин-7-гликозид) [28, 36]. При изучении взаимосвязи между вариативностью химического состава БАВ, полифенолов и аминокислот с величиной внутривидовой и внутривидовой изменчивости видов рода манжетка в качестве химических маркеров для стандартизации лекарственного сырья были предложены рутин, гиперозид, галловая и кофейная кислоты, агримонин, пролин и оксализин. По результатам изучения безопасности настоев травы манжетки отнесен к малотоксичным препаратам (пятой категории токсичности) [12]. Не оказывал токсического действия и агримонин (10 г/кг), выделенный из травы манжетки [43].

Из надземной и подземной частей манжетки обыкновенной в лаборатории фитохимии Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН) были выделены два биологически активных препарата и получены патенты на способ получения Р-витаминного препарата и способ получения Р-витаминного средства [44, 45]. Показано, что надземная и подземная части растений могут использоваться для получения малотоксичных биологически активных препаратов с высокой Р-витаминной активностью, превышающей таковую у общеизвестного Р-активного препарата «Рутин» [27, 44, 45].

Фармакологическое изучение манжетки обыкновенной

Благодаря широкому спектру биологической активности манжетка обыкновенная является потенциально перспективным объектом изучения официальной медициной. Различные свойства лекарственного сырья манжетки активно изучались сотрудниками ЦСБС СО РАН, Новосибирского государственного медицинского университета и Института клинической и экспериментальной лимфологии [44–47]. В результате исследований, как было указано выше, созданы два препарата с Р-витаминной активностью [44, 45]. Полифенольный препарат из подземных органов манжетки обладает по сравнению с рутином более широким спектром биологического действия на организм и эффективен более чем в четыре раза в 10-кратно меньшей дозе [44]. Биологически активные вещества этого препарата проявляют антигипоксические свойства и уменьшают (в эксперименте) степень некроза при инфаркте миокарда [47, 48]. Препарат из надземных органов манжетки обладает, наряду с капилляроукрепляющими, адаптогенными свойствами в экстремальных условиях (холод) [45]. Хорошая растворимость в воде позволяет расширить область применения препаратов [27, 44, 45]. Многими исследователями манжетка активно изучается в качестве сердечно-сосудистого средства, обладающего лимфотропным, гиполипидемическим, антиишемическим и гемореологическим действием [18, 37, 38, 42, 48, 49]. Полифенольный комплекс из манжетки обыкновенной обладает гораздо большей степенью биологической активности в сравнении с препаратом контроля «Детралекс» [50]. Курсовое введение экстракта манжетки обыкновенной в условиях сердечно-сосудистой патологии (ишемия головного мозга, инфаркт миокарда, артериальная гипертензия) ограничивает процессы дегградации эритроцитов, способствует ограничению процессов перекисного окисления липидов и препятствует накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [37, 51, 52]. В эксперименте экстракт надземной части обладает антиоксидантными свойствами [53]. Выявлена гипогликемическая, иммунокорректирующая актив-

ность настоя и сухого экстракта травы манжетки, что позволяет рассматривать ее как сырьё для получения новых антидиабетических средств и иммунокорректоров растительного происхождения [18]. Получены данные об адаптогенном действии полифенолов манжетки и противогипоксическом эффекте при коррекции повреждений (ишемии) печени [49, 54]. Трава манжетки рассматривается также в качестве перспективного растительного сырья для применения в онкологии [38]. Агримонин и сумма полифенолов из травы манжетки снижают общетоксическое действие циклофосамида, а сумма полифенолов, кроме того, обладает определенной цитотоксической и антиоксической активностью. Настой травы манжетки также обладает противоопухолевой, антиметастатической, цитотоксической и антиоксической активностью [18, 38, 43]. Однако несмотря на столь широкий спектр биологической активности манжетки обыкновенной, сведений о ее противовирусной активности в отношении ВПГ в доступной литературе не обнаружено.

Поиск новых веществ с противовирусной активностью в отношении ВПГ на основе природных соединений растений, относящихся к разным классам химических соединений, по-прежнему актуален. В современной медицинской практике существуют препараты противогерпетического действия (флакозид, аллизарин, хелепин, гипорамин, госсипол и другие), основой для которых послужили вещества полифенольной и флавоноидной природы растений. Богатый химический состав сырья манжетки, основу которого составляют флавоноиды и растительные полифенолы, может служить основанием для исследований противогерпетических свойств растительного сырья этого вида.

Цель наших исследований состояла в изучении токсических и противовирусных свойств экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), произрастающей в Западной Сибири, в отношении вируса простого герпеса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты

В работе использовали водные растворы высушенного этилацетатного извлечения (экстракта) из корней манжетки обыкновенной (препараты № 5 и № 6) и этанольного извлечения из ее надземной части (препарат № 7), полученные по опубликованным методикам [45]. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) была собрана в фазу бутонизации – начала цветения на Семинском перевале Горного Алтая.

Препараты № 5 и № 6, выделенные из подземных органов манжетки обыкновенной, собранной в разных ценопопуляциях Горного Алтая, представляют собой порошок розоватого цвета, состоящий в основном из

катехинов и лейкоантоцианов (70 %). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в препарате № 5 идентифицированы (+)-катехин и галловая кислота, а в препарате № 6 – (+)-катехин. В препарате № 6 содержание (+)-катехина больше в 10 раз по сравнению с препаратом № 5.

Препарат № 7 из надземных органов манжетки – это порошок желто-зеленого цвета, состоящий из суммы флавоноидов (71%), из которых идентифицированы рутин, авикулярин, кверцетин, кемпферол и (-)-катехин.

Клетки

Оценку токсических и противовирусных свойств экстрактов проводили в культуре клеток почки взрослой африканской зеленой мартышки (Vero), полученных из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Суспензию клеток с известной концентрацией разводили подогретой до температуры 37 °С средой DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с антибиотиками и 5% эмбриональной сывороткой (HyClone, США) до концентрации 1×10^5 кл./мл и по 100 мкл вносили в лунки 96-луночных планшетов. Планшеты с клетками помещали в термостат на 2–3 сут до образования монослоя при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности.

Вирусы

В работе использовали вирусы простого герпеса (ВПГ) 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» (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Вирусы нарабатывали в культуре клеток Vero в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия). Концентрацию вирусов в культуральной жидкости определяли путем титрования образцов в культуре клеток Vero, рассчитывали по методу Спирмена – Кербера, выражали в десятичных логарифмах 50%-х тканевых цитопатических доз в мл (lg ТЦД₅₀/мл) и представляли в виде $M \pm m (\pm I_{95})$ для 95%-го доверительного уровня (I₉₅) [55]. Концентрации ВПГ-1 и ВПГ-2 в использованных в работе образцах составляли $5,50 \pm 0,30$ (0,58) и $3,50 \pm 0,24$ (0,46) lg ТЦД₅₀/мл соответственно. Нарботанные и использованные в работе серии вирусов с указанными титрами хранили при температуре минус 70 °С. В качестве поддерживающей при культивировании клеток с ВПГ использовали питательную среду DMEM (ООО «БиолоТ», Россия), содержащую 2% эмбриональной сыворотки.

Определение максимально переносимой и 50 %-й токсической концентрации экстрактов *in vitro*

При определении токсических доз 10 мг каждого экстракта растворяли в 1 мл среды DMEM, затем разводили в 10 раз (до 1000 мкг/мл) и делали последо-

вательные разведения в 1,2 раза этой же средой (20 концентраций). После этого по 100 мкл разведений экстрактов вносили в соответствующие лунки планшета (по 4 лунки для каждой концентрации) и ставили в термостат на 4 сут при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности. Через 4 сут с помощью инвертированного микроскопа БИОЛАМ П2-1 (Россия) оценивали деструктивные изменения в монослое клеток Vero, инкубированных с разными концентрациями экстрактов. В качестве контроля использовали монослой культуры клеток Vero без экстрактов. Определяли максимально переносимую концентрацию (МПК), равную концентрации экстракта, не оказывающей на клетки токсического действия ни в одной из лунок, и 50%-ю токсическую концентрацию (ТС₅₀ в мкг/мл), равную концентрации вещества в среде, вызывающей разрушение 50% клеточного монослоя в лунках [56, 57], по методу Спирмена – Кербера [55].

Определение 50%-й ингибирующей (эффективной) концентрации экстрактов *in vitro*

В эксперименте использовали 12 концентраций экстрактов, начиная с МПК для клеток и далее последовательно уменьшая их концентрацию в 1,5 раза (препараты № 5 и № 6) или в 1,3 раза (препарат № 7), и одну множественность заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл. вируса простого герпеса, вызывающую гибель 100% контрольного клеточного монослоя с вирусом без экстрактов через 4 суток. Сначала на монослой клеток Vero в лунках 96-луночного планшета вносили по 50 мкл различных концентраций экстрактов (по 4 лунки для каждой концентрации) в поддерживающей среде DMEM, а потом вносили по 50 мкл ВПГ-1 (штамм VR-3) или ВПГ-2 (штамм MS) при множественности заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл. В контрольном клеточном монослое использовали 50 мкл питательной среды без экстрактов и 50 мкл среды, содержащей 0,01 ТЦД₅₀/кл. вируса ВПГ-1 или ВПГ-2. Планшеты с клетками культивировали при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности в течение 4 сут, после чего проводили учет результатов. Через 4 сут с помощью инвертированного микроскопа оценивали повреждение монослоя клеток Vero, культивированных с вирусом без экстрактов или в присутствии разных концентраций экстрактов, и регистрировали количество лунок с поврежденным и неповрежденным (целостным) клеточным монослоем. Затем для каждого экстракта по методу Спирмена – Кербера [55] определяли 50%-ю ингибирующую концентрацию (IC₅₀ в мкг/мл), то есть концентрацию вещества в среде, при которой сохраняется 50% клеток в инфицированном монослое [56, 57]. На основании полученных данных рассчитывали индекс селективности (SI) экстракта: $SI = TC_{50} \text{ мкг/мл} : IC_{50} \text{ мкг/мл}$ [57].

Изучение противовирусной активности экстрактов по индексу нейтрализации (ИН) вируса простого герпеса в культуре клеток Vero

В опытах по определению противовирусной активности препаратов из манжетки обыкновенной в отношении вируса простого герпеса готовили 8 десятикратных разведений (с 1-го по 8-е) культуральной вирусосодержащей жидкости (КВЖ) каждого типа вируса с использованием поддерживающей среды DMEM (ООО «БиолоТ», Россия).

По 50 мкл разведений вируса вносили в лунки с монослоем клеток Vero (по 6 лунок на каждое разведение вируса). Затем в каждую лунку вносили по 50 мкл исследуемых препаратов в разных концентрациях, при этом концентрация каждого экстракта в среде культивирования клеток не превышала его МПК. В контрольные лунки с инфицированными клетками вносили по 50 мкл поддерживающей питательной среды DMEM. Клетки инкубировали 4 сут при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 4 сут в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали наличие вируса по цитопатическому действию на монослой клеток. На основании этого рассчитывали 50%-е инфицирующие дозы (ИД₅₀) вируса *in vitro* (титры вируса) в Ig ТЦД₅₀/мл в контроле (без препарата) и в опыте (с препаратом) по методу Спирмена – Кербера [55]. Противовирусное действие исследуемых экстрактов оценивали по уменьшению ИД₅₀ в опыте по сравнению с контролем. Для этого высчитывали индекс нейтрализации (ИН, в Ig) вируса под влиянием препарата: ИН = ИД₅₀ контроль – ИД₅₀ опыт (Ig).

Изучение эффективности действия экстракта на вирус простого герпеса в зависимости от времени его внесения в инфицированную культуру клеток Vero

Для определения эффективности действия растительного экстракта на вирус простого герпеса в зависимости от времени его внесения в инфицированную культуру клеток Vero экстракт № 6 вносили одновременно с инфицированием клеток вирусом в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл., а также через 1, 3, 6 и 24 ч после инфекции. Концентрация экстракта в среде культивирования инфицированных клеток была равна МПК. В качестве контроля использовали монослой клеток, в которые вносили питательную среду вместо экстракта в те же временные точки инфекции, что и в опыте. Затем через 72 ч после инфицирования в опытных и контрольных лунках определяли концентрацию вируса путем титрования образцов в культуре клеток Vero и индексы подавления продукции (ИПП) вируса под действием экстракта для каждого времени внесения экстракта.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку и сравнение данных проводили общепринятыми методами для биологических исследований по методу Спирмена – Кербера с оценкой достоверности отличий ($p=0,05$) для 95% доверительного уровня (I_{95}) [55].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка токсических концентраций экстрактов *in vitro*

На первом этапе исследований была проведена оценка токсического действия экстрактов, полученных из манжетки обыкновенной, на клеточную культуру Vero. Наибольшие токсические свойства из всех исследованных препаратов проявил образец № 7, полученный из надземной части растения, максимально переносимая концентрация (МПК) которого для этой клеточной культуры составила 30 мкг/мл. По сравнению с этим образцом экстракты, полученные из корней, оказались значительно менее токсичными (МПК для препаратов № 5 и № 6 составили 330 и 280 мкг/мл соответственно).

На клетках Vero были определены также 50%-е токсические концентрации (ТС₅₀), 50%-е ингибирующие концентрации (IC₅₀) и индексы селективности (SI) в отношении ВПГ для экстрактов № 5, № 6 и № 7 (таблица 1). Представленные в таблице 1 результаты свидетельствуют о том, что наиболее эффективным, судя по IC₅₀ и SI, является этилацетатное извлечение (экстракт) № 6 из корней манжетки обыкновенной.

Результаты исследования подавления инфекционности (ИД₅₀) вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа в культуре клеток Vero под влиянием препаратов из манжетки обыкновенной при их различных концентрациях в среде культивирования представлены в таблице 2. Было обнаружено, что все препараты, полученные как из корней, так и из надземных органов манжетки обыкновенной, оказывали противовирусный эффект в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2.

Так, индексы нейтрализации ВПГ-1 под действием препаратов № 5, № 6 и № 7 в их максимально переносимых концентрациях для клеток Vero составляли 3,00; 3,00 и 1,67 Ig, а ВПГ-2 соответственно – 2,17; 2,50 и 1,17 Ig (таблица 2). Как видно из таблицы 2, по данному критерию более выраженный противовирусный эффект проявляли препараты № 5 и № 6, полученные из корней манжетки обыкновенной, по сравнению с полученным из надземных органов растения препаратом № 7, при этом активность препаратов № 5 и № 6 была сравнима.

Современные требования к противовирусным препаратам включают специфичность и эффективность действия при минимальном повреждающем

Таблица 1.

Показатели токсичности и противовирусной активности экстрактов, полученных из различных органов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) в культуре клеток Vero

№ экстракта (извлечение)	Орган, из которого получен экстракт	TC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл) в отношении ВПГ		SI = TC ₅₀ : IC ₅₀ в отношении ВПГ	
			ВПГ-1	ВПГ-2	ВПГ-1	ВПГ-2
5 (этилацетатное)	Корни	660,69 (645,65–676,08) ^Λ	9,55 (9,12–10,00)	19,95 (18,62–21,34)	69,18	33,12
6 (этилацетатное)	Корни	524,81 (512,86–537,03) ^Λ	4,79 (4,57–5,01)	8,71 (8,13–9,33)	109,56	60,16
7 (этанольное)	Надземные органы	58,88 (56,23–61,66) ^Λ	4,57 (4,36–4,79)	11,48 (10,96–12,02)	12,88	5,12

Примечание: n=4 – число лунок с монослоем клеток при разных концентрациях препарата в среде культивирования; TC₅₀ – 50%-я токсическая концентрация, т.е. концентрация препарата, при которой разрушается 50% клеток в неинфицированном монослое; IC₅₀ – 50%-я ингибирующая концентрация, т.е. концентрация препарата, при которой сохраняется 50% клеток в инфицированном монослое; SI – индекс селективности препарата; TC₅₀ и IC₅₀ рассчитаны по методу Спирмена – Кербера; ^Λ – 95 %-е доверительные интервалы, рассчитаны по методу Спирмена – Кербера.

воздействию на клетки макроорганизма. Известно, что критерием эффективности препарата является высокое значение его химиотерапевтического индекса или индекса селективности (SI), представляющего собой отношение 50%-й токсической концентрации препарата к его 50%-й эффективной концентрации.

В соответствии с этим критерием наиболее эффективным из всех исследованных образцов был препарат № 6, индекс селективности которого составлял 109,56 и 60,16 в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 соответственно (таблица 1).

В дальнейших экспериментах для экстракта № 6, обладающего наиболее выраженным противовирусным эффектом в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2, была исследована эффективность его действия в зависимости от времени его внесения в инфицированную культуру клеток Vero. Для этого растительный экстракт вносили в культуру клеток одновременно с инфицированием клеток вирусом простого герпеса, а также через 1, 3, 6 и 24 ч после инфекции.

Было показано, что достоверное ингибирование продукции ВПГ-1 и ВПГ-2 наблюдалось тогда, когда экстракт № 6 вносили одновременно с заражением клеток вирусами или через 1 ч после заражения (рисунки 3, а и б). Тогда как при добавлении экстракта № 6 манжетки обыкновенной в среду культивирования в период от 3 до 24 ч после инфицирования клеток подавления продукции вируса не происходило (рисунки 3, а и б). Это свидетельствует о том, что экстракт № 6 манжетки обыкновенной оказывает противовирусный эффект в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 на ранних стадиях инфекционного процесса в культуре клеток Vero (адсорбции, проникновения и «разведения» вируса).

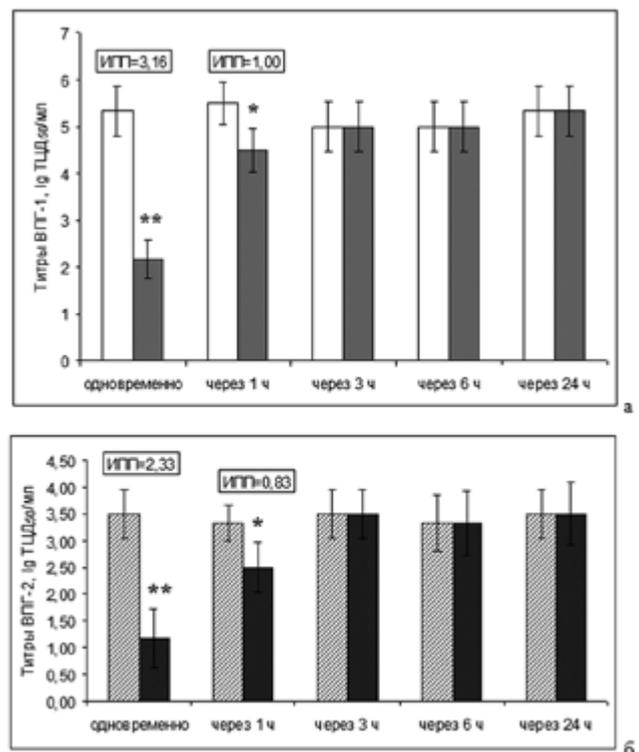


Рисунок 3. Продукция вируса (титры по оси ординат) простого герпеса 1-го (ВПГ-1, а) и 2-го (ВПГ-2, б) типа в контроле и при добавлении экстракта № 6 манжетки обыкновенной (опыт) в разное время после инфицирования культуры клеток Vero (по оси абсцисс).

Обозначения к рисунку:

- – контроль ВПГ-1,
- – опыт ВПГ-1,
- ▨ – контроль ВПГ-2,
- – опыт ВПГ-2,

ИПП – индекс подавления продукции вируса; * – отличие от контроля при p=0,05, ** – отличие от контроля при p≤0,01

Таблица 2.

Противовирусный эффект экстрактов, полученных из различных органов манжетки обыкновенной, в культуре клеток Vero в отношении вируса простого герпеса (ВПГ)

Тип и штамм ВПГ	№ экстракта	Концентрация экстракта (мкг/мл)	ID ₅₀ (в Ig TCD ₅₀ /мл, M±I ₉₅ , n=6)	ИН = ID ₅₀ контроль - ID ₅₀ опыт (lg)	
ВПГ 1-го типа (ВПГ-1), штамм VR-3	5	330	2,50±0,46*	3,00	
		165	2,50±0,46*	3,00	
		80	3,17±0,62*	2,33	
		40	3,50±0,62*	2,00	
		20	3,83±0,55*	1,67	
		10	4,83±0,55	0,67	
		5	5,50±0,46	0	
	6	280	2,50±0,46*	3,00	
		140	2,83±0,55*	2,67	
		80	3,50±0,58*	2,00	
		40	3,67±0,53*	1,83	
		20	3,83±0,55*	1,67	
		10	4,50±0,65*	1,00	
		5	5,17±0,62	0,33	
	7	30	3,83±0,55*	1,67	
		20	4,00±0,53*	1,50	
		10	4,83±0,55	0,67	
		5	5,33±0,53	0,17	
	Контроль (ВПГ-1)	-	-	5,50±0,58	-
ВПГ 2-го типа (ВПГ-2), штамм MS	5	330	1,33±0,52*	2,17	
		165	1,67±0,57*	1,83	
		80	2,33±0,57*	1,17	
		40	2,50±0,46*	1,00	
		20	3,17±0,55	0,33	
		10	3,33±0,53	0,17	
		6	280	1,00±0,44*	2,50
	140		1,50±0,00*	2,00	
	80		2,50±0,00*	1,00	
	40		2,67±0,53*	0,83	
	20		2,83±0,62	0,67	
	10		3,17±0,62	0,33	
	7	30	2,33±0,53*	1,17	
		20	2,83±0,62	0,67	
		10	3,33±0,53	0,17	
	Контроль (ВПГ-2)	-	-	3,50±0,46	-

Примечание: ИН – индекс нейтрализации; ID₅₀ – 50%-я инфицирующая доза, вычисленная по методу Спирмена – Кербера; M – среднее, I₉₅ – 95%-й доверительный уровень; n – число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса; * – достоверное отличие от соответствующего контроля (без экстракта) при p≤0,05.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены сухие экстракты методами этанольного извлечения из надземной части и этилацетатного извлечения из корней воздушно-сухой травы манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.), произрастающей в Западной Сибири.

Изучены токсические свойства водных растворов экстрактов манжетки обыкновенной для перевиваемой культуры клеток Vero, определены их максимально переносимые и 50 %-е токсические концентрации.

Показано разными методами, что водные растворы экстрактов манжетки обыкновенной обладают в данной клеточной культуре противовирусным действием в отношении вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа.

Показано, что экстракт, полученный из корней растения, оказывал эффективное вирусингибирующее действие на начальных стадиях репродукции обоих штаммов ВПГ в клетках Vero.

Полученные экстракты манжетки обыкновенной перспективны для дальнейшего изучения *in vitro* и *in vivo* с целью создания лекарственных средств, обладающих противовирусным действием в отношении вируса простого герпеса.

ЛИТЕРАТУРА

1. K.J. Looker, A.S. Mag, M.T. May, K.M.E. Turner, P. Vickerman, S.L. Gottlieb, L.M. Newman. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012 // PLOS ONE. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0140765.
2. K.J. Looker, A.S. Mag, M.T. May, K.M.E. Turner, P. Vickerman, S.L. Gottlieb, L.M. Newman. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012 // PLOS ONE. Published: January 21, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0114989.
3. Вирус простого герпеса // ВОЗ. Информационный бюллетень. 2015. № 400.
4. В.А. Исаков, Е.И. Архипова, Д.В. Исаков. Герпесвирусные инфекции человека. – СПб. 2006. С. 12–150.
5. А.Е. Шульженко, И.Н. Зуйкова. Подходы к иммунотерапии рецидивирующего простого герпеса // Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. 2010. № 3. С. 10–15.
6. Л.В. Крепкова, В.В. Бортникова, А.А. Шкаренков, Ю.Б. Кузнецов. Токсикологическая оценка нового противовирусного препарата гипорамина // Разработка и внедрение новых методов и средств традиционной медицины. Науч. тр. Т. 2. – М. 2001. С. 191–192.

7. Панавир в лечении вирусных инфекций: монография / Под ред. акад. РАМН проф. В.И. Сергиенко. – М. 2005. 172 с.
8. С.А. Вичканова. Эффективность алпизарина при герпесвирусных заболеваниях у детей и взрослых // Практическая фитотерапия. 2000. № 1. С. 34–39.
9. Н.И. Барам, А.И. Исмаилов, Х.Л. Зияев, К.Ж. Режепов. Биологическая активность госсипола и его производных // Химия природн. соедин. 2004. № 3. С. 171–176.
10. С.А. Вичканова. Клинические исследования хеллепина – противовирусного средства из травы *Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag. // Химия, технология, медицина: Сб. науч. трудов, посвящ. 75-летию Всерос. н.-и. института лекар. и аром. растений. – М. 2006. С. 480–484.
11. В.В. Бортникова. Сравнительная токсикологическая характеристика и новые фармакологические свойства антимикробных и противовирусных препаратов растительного происхождения: автореф. дисс. ... к.биол.н. – Купава. 1988. 23 с.
12. В.М. Баева. Фармакогностическое изучение лекарственных растений с использованием молекулярно-биологических методов: автореф. дисс. ... д.фарм.н. – М. 2009. 48 с.
13. К.П. Глазунова. Апомиксис у восточноевропейских представителей рода *Alchemilla* L.: автореф. дисс. к.биол.н. – М. 1983. 24 с.
14. С.К. Черепанов. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Русское издание. – СПб.: Мир и семья, 1995. 992 с.
15. Флора Центральной Сибири. II Розоцветные – Астровые / Под ред. Л.И. Малышева и Г.А. Пешковой. – Новосибирск: Изд-во «Наука» Сибирское отделение, 1979. 1047 с.
16. И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. – М. 2003. 665 с.
17. О.В. Жукова. Популяционное исследование микровидов манжетки *Alchemilla vulgaris* L.s.l., Rosaceae: автореф. дис. ... к.биол.н. – Йошкар-Ола. 2008. 24 с.
18. Е.В. Зорина. Фармакогностическое изучение видов рода *Alchemilla* L. Пермского края: автореф. дис. ... к.биол.н. – Пермь. 2009. 24 с.
19. Флора Восточной Европы. Т.Х. Покрытосеменные. Двудольные / Под ред. Цвелева Н.Н. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии, 2001. 670 с.
20. Биология. Большой энциклопедический словарь / Гл. ред. М. Гиляров – М.: Большая Российская энциклопедия, 2001. 864 с.
21. М.Г. Попов. Флора Средней Сибири. Т. 1. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1957. 554 с.
22. Определитель растений Алтайского края / Отв. ред. д.б.н., проф. Красноборов И.М. – Н-ск. 2003. 634 с.
23. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Т. 3. Семейства Hydrangeaceae-Haloragaceae. – Л.: Наука, 1987. 326 с.
24. М.А. Носаль, И.М. Носаль. Лекарственные растения и способы их применения в народе. – Киев. 1959. 256 с.
25. Д. Йорданов, П. Николов, Асп. Бойчинов. Фитотерапия. 1970. – София. С. 91.
26. А. Брем. Жизнь растений. – М.: ЭКСМО, 2007.
27. Т.А. Кукушкина, А.А. Зыков, Л.А. Обухова. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы IIY Межд. съезда. Фитофарм. С-Петербург. 2003. С. 64–69.
28. Ж.С. Лесовая, Д.М. Писарев, О.О. Новиков, Т.А. Романова. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.s.l. // Научные ведомости Белгородского университета. Сер. Медицина. Фармация. 2010. № 22 (93). Вып. 12/2. С. 145–149.
29. K. Fuchs. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Prunus spinosa* L. und einiger Rosaceenarten. Dissertation. – Munchen. 1959.
30. M. D'Agostino, L. Dini, E. Ramundo and F. Senatore. Flavonoid glycosides of *Alchemilla vulgaris* L. // Phytoter. Res. 1998. № 12. P. 162–163.
31. В.А. Бандюкова. Распространение флавоноидов в некоторых семействах высших растений // Растит. рес. 1969. Т. 5. Вып. 4. С. 490–600.
32. D. Fraisse, A. Heitz, A. Carnat, A.P. Carnat, J.L. Lamaison. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora* // Fitoterapia. 2000. V. 71. № 4. P. 463–464.
33. В.М. Баева, С.А. Сасов. Современные аспекты изучения лекарственных растений // Научные труды. Т. XXXIV. – М. 1995. С. 242–244.
34. С.В. Теслов, Л.С. Макарова. О катехинах некоторых розоцветных Пермской области // Научные труды Пермск. фармац. ин-та. 1969. С. 217–223.

35. L. Tuka, H. Popesku. Determination of tannins in the plants of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *A. vulgaris* L. // *Clujul med.* 1979. Vol. 52. № 1. P. 78–83.
36. В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина. Исследование химического состава надземной части манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.s.l. // *Химия растит. сырья.* 2000. № 2. С. 79–85.
37. В.Ю. Андреева. Влияние экстракта манжетки обыкновенной на морфофункциональные свойства эритроцитов при сердечно-сосудистой патологии: автореф. дис. ... к.биол.н. – Томск. 2001. 24 с.
38. И.И. Мурин. Фитохимическое и фармакологическое изучение травы манжетки: автореф. дис. ... к.фарм.н. – М. 2011. 24 с.
39. Pharmacopée Francaise. IX Edition. 5-e suppl. –Juillet. 1979.
40. F.Ch. Czgan, D. Frohne, Ch. Holtzel. *Teedrogen und Phytopharmaka* – Stuttgart. 1997. 668 p.
41. European Pharmacopoeia. 2008. Monograph S. 1387.
42. М.Б. Плотников, А.А. Колтунов, О.И. Алиев, Г.И. Калинкина, Т.П. Березовская. Действие экстракта *Alchemilla vulgaris* L. на реологические свойства крови при экспериментальном инфаркте миокарда // Тр. 1-ой Всерос. конф. по ботаническому ресурсоведению. – СПб. 1996. С. 221.
43. Патент RU 2429852. А61Р35 – Противоопухолевые средства; А61К31/70 – Углеводы; сахара; их производные (сорбит А61К 31/047) / С.А. Сасов, В.М. Баева, И.И. 2011.
44. Авт. свид. № 1073966. Способ получения Р-витаминного препарата / Г.Р. Азовцев, Е.Г. Изюмов, А.А. Зыков. 1983.
45. Патент РФ № 2128516. Способ получения Р-витаминного средства / Т.А. Кукушкина, Т.А. Жанаева, А.А. Зыков, Л.А. Обухова, В.Г. Селятитская. 1999.
46. Ю.И. Бородин, В.Г. Селятитская, Л.А. Обухова, Н.А. Пальчикова, С.В. Одинцов, Т.А. Кукушкина. Влияние полифенольных соединений манжетки обыкновенной на морфофункциональное состояние щитовидной железы крыс при действии низких температур // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1999. Т. 127. № 6. С. 697–699.
47. Ю.И. Бородин, В.А. Головнев, А.Б. Гончаров, А.А. Зыков, А.Д. Тюлюбаев. Сравнительная характеристика клеточного состава регионарных лимфатических узлов сердца при повторном экспериментальном метаболическом инфаркте миокарда в условиях его коррекции биофлавоноидами манжетки обыкновенной // *Бюллетень СО РАМН.* 2003. № 2 (108). С. 73–80.
48. А.А. Зыков, В.А. Головнев, О.М. Белкина. Изменение жирнокислотного состава крови и лимфы на фоне действия биофлавоноидами манжетки обыкновенной при инфаркте миокарда // *Бюллетень Сибирского отделения АМН СССР.* 2000. № 1. С. 63–64.
49. А.Р. Шевцов. Морфологические преобразования в селезенке крысы при синдроме длительного сдавления и в условиях коррекции биофлавоноидами манжетки обыкновенной: автореф. дис. ... к.мед.н. – Новосибирск. 2008. 24 с.
50. А.Б. Гончаров. Патоморфологические изменения в регионарных лимфатических узлах сердца при повторном метаболическом инфаркте миокарда и при его коррекции биофлавоноидами в эксперименте: автореф. дис. ... к.мед.н. – Новосибирск. 2002. 24 с.
51. С.Я. Жанаева. Изменения лизосом печени крыс при интоксикации гербицидом 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой и коррекции полифенольным комплексом из листьев манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.): автореф. дис. ... к.биол.н. – Новосибирск. 2000. 24 с.
- О.И. Алиев. Фармакологическая коррекция синдрома повышенной вязкости крови при сердечно-сосудистой патологии: автореф. дис. ... к.мед.н. – Томск. 2004. 48 с.
53. O.Oktyabrsky, G. Vysochina, N. Muzyka, Z. Samoilova, T. Kukushkina, G. Smirnova. Assesment of antioxidant acrivity of plant extracts using microbial test systems // *Journal of Applied Microbiology.* 2009. V. 106. P. 1175–1183.
54. Е.С. Лукьянова. Морфофункциональные изменения печени и почек в различные периоды синдрома длительного сдавления и на фоне применения ксенобиотиков: автореф. дис. ... д.мед.н. – Новосибирск. 2006. 48 с.
55. Л. Закс. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. 598 с.
56. *Virology Methods Manual* / Ed. by: Brian W.J. Mahy and Hillar O. – Kangro: Academic Press, 1996. 374 p.
57. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Хабриева Р.У. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.