

УДК 578.832

П.Г. АЛЕКСЮК, И.А. ЗАЙЦЕВА, А.С. ТУРМАГАМБЕТОВА, М.С. АЛЕКСЮК, Н.С. СОКОЛОВА, А.П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, В.Э. БЕРЕЗИН

СКРИНИНГ СУММАРНЫХ ФИТОКОМПЛЕКСОВ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ РОДОВ DIANTHUS, STELLARIA, ERVUM, ALNUS И BETULA НА НАЛИЧИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы

Аннотация

Проводилось изучение антивирусной активности 15 фитокомплексов, полученных из казахстанских растений родов *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* и *Betula*. Определение антивирусной активности осуществляли при одновременном инокулировании в куриные эмбрионы исследуемых препаратов в диапазоне доз от 0,0025 до 0,25 мг на куриный эмбрион и вируса гриппа птиц (штамм А/FPV/Rostock/34 (H7N1) в количестве 100 ЭИД₅₀). В результате проведенных испытаний 15-ти суммарных фитокомплексов, выделенных из казахстанских растений родов *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* и *Betula*, установлено, что наибольшей антивирусной активностью обладают фитокомплексы АВ10 и АВ13, полученные из растений *Alnus incana* и *Betula alba*.

На протяжении всей истории человечества борьба с инфекционными заболеваниями и их профилактика представляла и продолжает представлять собой глобальную социальную и экономическую проблему. Так, по данным ВОЗ каждый год от инфекционных заболеваний страдает около 2 млрд. человек, экономический ущерб от утраты трудоспособности населения и лечения самого заболевания составляет миллиарды долларов.

Эйфория середины XX века по поводу успешной борьбы с инфекционными заболеваниями и полной ликвидации части из них оказалась преждевременной. Лишь одну болезнь - натуральную оспу - можно считать условно ликвидированной, поскольку, несмотря на двадцатилетний срок отсутствия ее официальной регистрации, вирус оспы сохраняется в ряде лабораторий, а прослойка неиммунных людей весьма значительна и постоянно возрастает [2]. Кроме того, единичные случаи оспы до сих пор регистрируются в странах Африки, а возможность перехода мутированного вируса оспы от обезьян к людям может нести риск новой вспышки заболевания [3].

В последнее время увеличивается число новых, ранее неизвестных инфекций. Так, если в 50-х годах насчитывалось около тысячи разновидностей инфекционных болезней, то в настоящее время их более 1200, причём среди них такие тяжёлые заболевания как СПИД, болезнь Лайма, легионеллез и др. [4]. Всё это в значительной степени повышает актуальность исследований, связанных с поиском и получением новых лекарственных средств для лечения и профилактики инфекционных заболеваний вообще и вирусных инфекций, в частности.

В последние годы для лечения многих инфекционных заболеваний, в том числе вирусных, все чаще используют лекарственные препараты, созданные на основе природных соединений растительного происхождения. Успехи химии растительных веществ, фармакологии и медицины позволили значительно углубить наши знания о целебном действии многих видов растений [5].

Флора Казахстана включает большое количество видов, отнесенных к лекарственным растениям. Кроме того, благодаря наличию различных географических зон произрастания, включая экстремальные (пустыня, высокогорье и т.д.), растительность Казахстана богата видами растений, содержащих уникальные по биологической активности соединения. Изучение подобных соединений и создание на их основе высоко активных противовирусных препаратов, является весьма перспективным направлением для лечения и профилактики вирусных инфекций [6].

В настоящей статье представлены данные по скринингу суммарных фитокомплексов, полученных из казахстанских растений родов *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* и *Betula* на наличие антивирусной активности.

Материалы и методы

Вирусы и вирусные антигены. В работе использовали вирус гриппа, штамм: A/FPV/Rostock/34 (H7N1).

Вирус выращивали в аллантоисной полости 9-10 дневных куриных эмбрионов. Титр вируса в аллантоисной жидкости составлял 10⁷-10⁹ ИД₅₀/мл.

Для получения экстрактов использовали корни, стебли и семена растений, относящихся к родам *Dianthus*, *Stellaria* семейства *Caryophyllaceae* и *Ervum* семейства *Leguminosae*; *Alnus* и *Betula* семейства *Betulaceae*.

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике с применением 1% взвеси куриных эритроцитов или эритроцитов морской свинки [7].

Концентрацию вирусного белка определяли по методу Bradford с окрашиванием Кумасси G-250. Оптическую плотность определяли при длине волны 595 нм [8].

Вирусингибирующие свойства соединений изучали в экспериментах с ортомиксовирусами на куриных эмбрионах. Антивирусную активность фитопрепаратов определяли методом «скрининг-тест», рассчитанным на нейтрализацию вируса в количестве 100 ЭИД₅₀ заданными концентрациями исследуемых образцов. Критерием противовирусного действия считали достоверное отличие между титрами вируса в обработанном и контрольном (плацебо) образцами. При этом, как правило, учитывалось только полное подавление инфекционности вируса.

Результаты и обсуждения

Из растений родов *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* и *Betula* получено 15 фитокомплексов (таблица 1).

Таблица 1- Содержание основных компонентов в суммарных фитопрепаратах родов *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* и *Betula*

Вид растения Наименование фитокомплекса с содержанием основных компонентов, %

гидрофобные соединения амфифильные соединения водорастворимые
низкомолекулярные соединения

Dianthuscaryophyllus	AB1(72%)	AB2 (86%)	AB3 (81%)
Stellariamedia	AB4 (79%)	AB5 (92%)	AB6 (77%)
Ervum lens	AB7(84%)	-	AB8(76%)
Alnusincana	AB9(75%)	AB10(85%)	AB11(75%)
Betula alba(почки)	AB12 (73%)	AB13 (86%)	AB14(78%)
Betula alba(листья)	-	-	AB15(79%)

Скрининг на наличие антивирусной активности полученных фитокомплексов проводили на модели вируса гриппа птиц (штамм A/FPV/Rostock/34 (H7N1).

Определение антивирусной активности осуществляли при одновременном инокулировании в куриные эмбрионы исследуемых фитокомплексов и вируса в количестве 100 ЭИД₅₀. Эмбрионы инкубировали 24 часа при 37 °С. Вирусингибирующую активность фитокомплексов оценивали по достоверному отличию между титрами вируса в обработанных образцах и контроле (плацебо).

Антивирусная активность препаратов была исследована в диапазоне доз от 0,0025 мг до 0,25 мг на куриный эмбрион.

В результате проведенных экспериментов установлено, что суммарные фитокомплексы АВ1, АВ2, АВ5, АВ9 не обладают способностью подавлять репродукцию вируса гриппа в исследуемом диапазоне доз (рисунок 1).

Примечание – по оси ординат - вирусингибирующая активность в процентах, по оси абсцисс - фитокомплексы

Рисунок 1 - Вирусингибирующая активность суммарных фитопрепаратов, выделенных из казахстанских растений родов *Dianthus*, *Stellaria*, *Hedysarum*, *Alhagi*, *Ervum*, *Alnus* и *Betula*, при обработке вируса гриппа птиц A/FPV/Rostock/34 полученными фитопрепаратами в различных концентрациях

Ингибирующая активность препаратов АВ6, АВ7 и АВ8 в тех же дозах не превышает 20 - 40% подавления репродукции вирусов. Препараты АВ3, АВ4, АВ11, АВ12, АВ14 и АВ15 полностью подавляет репродукцию вируса только в дозе препарата 0,25 мг/эмбрион (максимальная доза в исследованном диапазоне разведений). В дозах 0,0025 и 0,025 мг/эмбрион подавление инфекционной активности вируса варьировало от 20 до 80 %. Способностью на 100% подавлять репродукцию вируса в дозах от 0,0025 до 0,25 мг на куриный эмбрион обладают препараты АВ10 и АВ13.

Выводы

Таким образом, по результатам испытаний установлено, что из 15 суммарных фитокомплексов, выделенных из казахстанских растений родов *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* и *Betula*, максимальной антивирусной активностью в дозах 0,0025, 0,025 и 0,25 мг/эмбрион обладают фитокомплексы АВ10 и АВ13, содержащие амфифильные соединения, полученные из растений *Alnus incana* и *Betula alba*, соответственно. Данные растительные препараты являются весьма перспективными для дальнейшего изучения и создания на их основе отечественных, недорогих и эффективных лекарственных средств для лечения и профилактики вирусных инфекций.

Литература:

1. The World Health Report 2010//<http://www.who.int/whr/2010/en/>

2. Рахимов Б.Б. Инфекционные болезни для всех. – М.: «Здоровье», 2008. – 51 с.
3. William H Schneider. Smallpox in Africa during Colonial Rule // *Med Hist.* – 2009. – Vol. 53, №2. – P. 193–227.
4. RinoRappuoli, Twenty-first century vaccines // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2011. – Vol. 366. – P. 2756–2758.
5. Alcami A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors.//*Nat. Rev. Immunol.*- 2003.- Vol.3, №1.- P.36-50
6. Chen C.C., Ron Y. New strategies for immune-mediated anti-viral drug and vaccine development.// *Curr. Pharm. Des.* - 2006.- Vol.12, №11.- P.1391-401
7. Закстельская Л.Я., Шендерович С.Ф. Метод удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации из диагностических и постинфекционных сывороток // *Вопросы вирусологии.*-1979.- №5.- С. 560-561.
8. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal.Biochem.* -1976. -Vol.72, №1. -P. 248-254.

UDC 578.832

P.G. ALEXYUK, I.A. ZAITSEVA, A.S. TURMAGAMBETOVA, ALEXYUK M.S., N.S. SOKOLOVA, A.P. BOGOYAVLENSKYI, V.E. BEREZIN

SCREENING OF THE TOTAL PHYTOCOMPLEXES OBTAINED FROM PLANTS OF DIANTHUS, STELLARIA, ERVUM, ALNUS AND BETULA GENERA TO THE PRESENCE OF ANTIVIRUS ACTIVITY

SNE “Institute of microbiology and virology” SK MES RK, Almaty, Kazakhstan

Summary

It was studied the antiviral activity of 15 phytocomplexes derived from Kazakhstani plant of *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* and *Betula* genera. Determination of antiviral activity was effected at the same time to inoculate chicken embryos studied preparations in doses ranging from 0.0025 to 0.25 mg and avian influenza virus (strain A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in the amount of 100 EID₅₀ per embryo. As a result the tests of 15 total phytocomplexes isolated from Kazakhstani plants of *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* and *Betula* genera, it was found that phytocomplexes AB10 and AB13 derived from plants *Alnus incana* and *Betula alba* possess the highest antiviral activity.

Throughout human history, the fight against infectious diseases and their prevention represented and continues to be a global social and economic problem. So according to the WHO each year from infectious disease affects about 2 billion people, the economic damage from the loss of earning capacity of the population and the treatment of the disease itself is billions of dollars. The euphoria of the mid-twentieth century about the successful fight against infectious diseases, and the complete elimination of some of them turned out to be premature. Only smallpox can be considered conditionally liquidated because, although for twenty years of its lack of official registration, the smallpox virus persists in a number of laboratories, and a strata of non-immune people is very high and is increasing. [2] In addition, single cases of smallpox are still registered in the countries of Africa, and the possibility of transition of mutant smallpox virus from monkeys to humans can be risk of a new disease outbreak [3].

In recent years, the number of new, previously unknown infections increase. Thus, in the 50s, there were about a thousand varieties of infectious diseases, but at the present time their more than 1200, and among them there are such serious diseases as AIDS, Lyme disease, legionellosis, etc. [4]. All of this greatly increase the relevance of studies related to the searching and obtaining of new preparations for the treatment and prevention of infectious diseases in general, and in particular viral infections.

In recent years, for the treatment of many infectious diseases, including viral infections, increasingly used preparations that are based on natural substances of plant origin. Advances of Plant Chemistry, pharmacology and medicine have greatly deepened of our knowledge about the curative action of many plant species [5].

Flora of Kazakhstan includes a large number of species classified as medicinal plants. In addition, thanks to the different geographical areas of growth, including extremes (desert, highlands, etc.), Kazakhstan is rich in vegetation species of plants containing unique compound with the biological activity. The study of such compounds and their creation from highly active antiviral preparations is a very promising area for the treatment and prevention of viral infections. [6]

The data on the screening of total phytocomplexes obtained from Kazakhstania plants of *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* and *Betula* genera on the presence of antiviral activity is presents in this study.

Materials and Methods

Viruses and viral antigens. Used influenza virus strain: A/FPV/Rostock/34 (H7N1).

The virus was grown in the allantoic cavity of 10 day chick embryos. The titer of virus in the allantoic fluid was ID50/ml 107-109.

To obtain extracts used roots, stems and seeds of plants belonging to the *Dianthus* and *Stellaria* genera of Caryophyllaceae family, *Ervum* of Leguminosae family; *Alnus* and *Betula* of Betullaceae family.

Hemagglutinating virus activity was determined by standard methods using a 0,75% suspension of chicken erythrocytes or guinea pig erythrocytes. [7]

Viral protein concentration was determined by the Bradford method with Coomassie G-250 staining. Absorbance was measured at 595 nm [8].

The virus inhibiting properties of the compounds was studied in experiments with orthomyxoviruses in chicken embryos. The antiviral activity of phytopreparation were determined by "screening test", designed to neutralize of the virus in the amount of 100 EID50 specified concentrations of the samples. The criterion for the antiviral effect was considered significant difference between the titers of the virus in the treated and control (placebo) samples. Thus only complete suppression of virus infectivity was considered.

Results and discussion

15 phytocomplexes was obtained from plant of *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* and *Betula* genus (Table 1).

Table 1 - The main components of total preparations of *Dianthus*, *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* and *Betula* genera.

Plant species	Name of phytocomplex with the content of the main components,%			
	hydrophobic compounds	amphiphilic compounds	water-soluble	low molecular compounds
<i>Dianthus caryophyllus</i>	AB1(72%)	AB2 (86%)	AB3 (81%)	
<i>Stellaria media</i>	AB4 (79%)	AB5 (92%)	AB6 (77%)	
<i>Ervum lens</i>	AB7(84%)	-	AB8(76%)	
<i>Alnus incana</i>	AB9(75%)	AB10(85%)	AB11(75%)	
<i>Betula alba</i> (buds)	AB12 (73%)	AB13 (86%)	AB14(78%)	

Betula alba(leaves) - - AB15(79%)

Screening of obtained phytocomplexes to the presence of antiviral activity carried out on the model of avian influenza virus (strain A/FPV/Rostock/34 (H7N1)).

Determination of antiviral activity was done at the same time to inoculate to chicken embryos studied phytocomplexes and virus in the amount of 100 EID₅₀. Embryos were incubated for 24 hours at 37 °C. Virus inhibitory activity of phytocomplexes was evaluated by statistically significant difference between titers of virus in the treated samples and the control (placebo).

Antiviral activity of the preparations was tested in a dosage range of 0.0025 mg to 0.25 mg per chicken embryo.

As a result of the experiments it was found that the total phytocomplexes of AB1, AB2, AB5, AB9 not possess the ability to inhibit the influenza virus replication in the tested dose range (figure 1).

On the ordinate axis - is virus inhibitory activity, in percent, on the abscissa axis - is phytocomplexes

Figure 1 - The virus inhibitory activity of total phytopreparations extracted from of Kazakhstani plants of Dianthus, Stellaria, Hedysarum, Alhagi, Ervum, Alnus and Betula genera by the treatment of the avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 with phytopreparations at various concentrations

Inhibitory activity of the preparations AB6, AB7 and AB8 in the same doses not exceed 20 - 40% suppression of virus reproduction. Preparations AB3, AB4, AB11, AB12, AB14 and AB15 completely inhibited the virus reproduction at dose of 0.25 mg of the preparation per embryo (maximum dose in studied range dilutions). Inhibition of viral infectious activity ranged from 20 to 80% at doses of 0.025 and 0.0025 mg per embryo. Preparations AB10 and AB13 possessed the ability to suppress by 100% virus replication at doses ranging from 0.0025 to 0.25 mg per chicken embryo

Conclusions

Thus, the test results it was found that out of 15 total phytocomplexes isolated from the Kazakhstani plants of Dianthus, Stellaria, Ervum, Alnus and Betula genera, phytocomplexes AB10 and AB13, containing amphiphilic compounds obtained from plants of Alnus incana and Betula alba, respectively, possess maximal antiviral activity at doses of 0.0025, 0.025 and 0.25 mg / embryo. These preparations of plant origin are very promising for further study and to create, base of them, national, affordable and effective medicinal preparation for the treatment and prevention of viral infections.

References:

- 1 The World Health Report 2010//<http://www.who.int/whr/2010/en/>
- 2 Rakhimov B.B. Infectious diseases for all. - M.: "Health", 2008. - 51p (Russ).
- 3 William H Schneider. Smallpox in Africa during Colonial Rule // Med Hist. - 2009. - Vol. 53, №2. - P. 193-227.
- 4 Rino Rappuoli, Twenty-first century vaccines // Phil. Trans. R. Soc. B. - 2011. - Vol. 366. - P. 2756-2758.
- 5 Alcami A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors.// Nat. Rev. Immunol.- 2003.- Vol.3, №1.- P.36-50
- 6 Chen C.C., Ron Y. New strategies for immune-mediated anti-viral drug and vaccine development.// Curr. Pharm. Des. - 2006.- Vol.12, №11.- P.1391-401

7Zakstelskaya L.Y., Shenderovich S.F. The method of disposal of non-specific inhibitors of hemagglutination diagnostic and postinfectious serum // *Voprosy virusologii.*-1979. - № 5. - P. 560-561 (Russ).

8Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal.Biochem.* -1976. -Vol.72, №1. -P. 248-254.

П.Г. АЛЕКСЮК, И.А. ЗАЙЦЕВА, А.С. ТУРМАГАМБЕТОВА, М.С. АЛЕКСЮК, Н.С. СОКОЛОВА, А.П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, В.Э. БЕРЕЗИН

КӨПШІЛІК СКРИНИНГ ӨСІМДІК ФИТОЖИЫНТЫҚТАРЫНАН ДАЙЫНДАЛҒАН ӨСІМДІК ТҮРЛЕРІ DIANTHUS, STELLARIA, ERVUM, ALNUS ЖӘНЕ BETULA ВИРУСҚА ҚАРСЫ ПРЕПАРАТТАРҒА

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы қ. Қазақстан

Түйін

Қазақстандық *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* және *Betula* тұқымдастығына жататын өсімдіктерінен бөлініп алынған, барлық саны 15 фитокешеннің вирусқа қарсы белсенділігіне зерттеулер жүргізілді. Зерттелетін препараттардың вирусқа қарсы белсенділігін, дозасы 0,0025 тен 0,25 мг мөлшермен бір мезетте әр тауық эмбриондарына құс тұмауы вирусының А/FPV/Rostock/34 (H7N1) штамын 100 ЭИД50 мөлшерде қоса отырып іске асырылды. Жүргізілген сынақтар нәтижесі қазақстандық *Stellaria*, *Ervum*, *Alnus* және *Betula* тұқымдастығына жататын өсімдіктерінен бөлініп алынған 15 фитокешеннің вирусқа қарсы белсенділігі *Alnus incana* мен *Betula alba* өсімдіктерінен алынған АВ10 және АВ13 фитокешендерінде жоғары болды.