

© ЁРШИК О.А., БУЗУК Г.Н., 2015

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ САБЕЛЬНИКА БОЛОТНОГО И ТУИ ЗАПАДНОЙ

ЁРШИК О.А., БУЗУК Г.Н.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Оптимизированы условия оценки жизнеспособности клеток почки быка с помощью теста с 3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолом (МТТ). Исследована противовирусная активность проантоцианидинов сабельника болотного, туи западной, а также выделенной и очищенной суммы проантоцианидинов. Установлено, что проантоцианидины обладают противовирусной активностью *in vitro* по «профилактической» и «лечебной» схеме. Положительное действие проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного и шишек туи западной выявлено в тесте восстановления клетками МТТ, что указывает на клеточный механизм противовирусного эффекта, выражающийся в усилении резистентности клеток к цитопатическому действию вируса. Таким образом, основной группой биологически активных веществ, благодаря которой корневища с корнями сабельника болотного и шишки туи западной обладают противовирусной активностью, являются проантоцианидины.

При воздействии на клетки извлечений корневищ с корнями сабельника болотного, проантоцианидинов, шишек туи западной в области низких и высоких разведений вируса наблюдали статистически значимое ($P < 0,05$) увеличение оптической плотности по сравнению с контролем, что указывает на их противовирусную активность по «профилактической» схеме.

В области низких разведений вируса наблюдают статистически значимое ($P < 0,05$) увеличение оптической плотности при воздействии на клетки извлечений корневищ с корнями сабельника болотного, проантоцианидинов, шишек туи западной, что указывает на их противовирусную активность по «лечебной» схеме.

Ключевые слова: сабельник болотный, туя западная, проантоцианидины, МТТ, противовирусная активность.

Abstract.

The conditions for assessing the viability of bovine kidney cells using the test with 3,4,5-dimethylthiazole-2-yl-2,5-diphenyltetrazole (MTT) have been optimized. The antiviral activity of proanthocyanidins of *Comarum palustre* L., *Thuja occidentalis* L. and the derived and purified amounts of proanthocyanidins has been investigated. Proanthocyanidins have been found to possess the antiviral activity *in vitro* according to preventive and curative scheme. The positive effect of proanthocyanidins of the rhizomes and roots of *Comarum palustre* L. and cones of *Thuja occidentalis* L. has been determined in the test of MTT cells recovery which indicates the cellular mechanism of the antiviral effect expressed in the strengthening of cells resistance to the cytopathic effect of the virus. Thus, the main group of biologically active substances due to which the rhizomes with roots of *Comarum palustre* L. and cones of *Thuja occidentalis* L. possess antiviral activity are proanthocyanidins.

Under the influence of extracts of the rhizomes and roots of *Comarum palustre* L., proanthocyanidins and cones of *Thuja occidentalis* L. on the cells in the zone of the low and high dilutions of the virus the statistically significant ($P < 0,05$) increase of the optical density in comparison with the control was observed, which indicates their antiviral activity according to the «prophylactic» scheme.

In the zone of low dilutions of the virus the statistically significant ($P < 0,05$) increase of the optical density is observed under the influence of extracts of the rhizomes and roots of *Comarum palustre* L., proanthocyanidins and cones of *Thuja occidentalis* L. which indicates their antiviral activity according to the «therapeutic» scheme.

Key words: *Comarum palustre* L., *Thuja occidentalis* L., proanthocyanidins, MTT, antiviral activity.

Проантоцианидины – группа биологически активных веществ, обладающая широким

спектром фармакологической активности: антиоксидантной [1, 2], цитопротекторной [3],

гастро- и кардиопротекторной [4], противовоспалительной, противосклеротической [5], а также значительной противовоспалительной [6, 7, 8], в том числе влияющей на метаболизм хондроцитов и экспрессию циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) и циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) [7].

Цель работы – доказать противовирусное действие проантоцианидинов, выделенных из доступного растительного сырья.

Материалы и методы

Исследование проводили на культуре клеток почки быка, полученной в Научно-исследовательском институте вирусологии им. Д.И. Ивановского, и вирусе везикулярного стоматита.

Противовирусную активность оценивали с помощью теста с 3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолом (МТТ). Методика основана на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать МТТ-реагент в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. После перевода формазана в раствор его количество определяли фотометрическим методом. Этот тест отражает способность различных агентов защищать клетку от воздействия на нее вируса. МТТ тест обладает хорошей воспроизводимостью, точностью и правильностью, легко воспроизводим в условиях любой культуральной лаборатории [9, 10, 11].

Изучали влияние проантоцианидинсодержащих растений и выделенной, и очищенной суммы проантоцианидинов на устойчивость культуры клеток почки быка к вирусу везикулярного стоматита.

Материалы исследования: корневища с корнями сабельника болотного и шишки туи западной, заготовленные в 2013 г. на опытном участке в г.п. Улановичи.

Культивирование клеток осуществляли в монослое в матрасах объемом 75 мл в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 1,5 г/л бикарбоната натрия, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C во влажной атмосфере с 5% углекислого газа.

В качестве поддерживающей среды использовали ту же среду, но с 5% эмбриональной телячьей сывороткой.

Снятие клеток с матраса осуществляли с

помощью раствора трипсин-этилендиаминетрауксусной кислоты.

Цифровые данные, полученные в результате экспериментов, обрабатывали статистически с помощью программы STATISTICA 6.0.

Для доказательства противовирусной активности получали извлечения из корневищ с корнями сабельника болотного и шишек туи западной. Для этого лекарственное растительное сырье измельчали до размера частиц 500 мкм. Около 0,5 г измельченного сырья помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 20 мл 70% спирта этилового, закрывали пробкой, взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу с пробкой взвешивали и доводили до первоначальной массы 70% спиртом этиловым. Содержимое колбы центрифугировали в течение 10–15 мин со скоростью 2000–3000 об/мин и собирали надосадочную жидкость. Полученное спиртовое извлечение упаривали досуха, затем растворяли в 5 мл воды очищенной с добавлением 250 мкл диметилсульфоксида. Полученные водные извлечения разбавляли в 20 раз.

Проантоцианидины выделяли из корневищ с корнями сабельника болотного. Для этого около 0,5 г корневищ с корнями сабельника болотного, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром пор 500 мкм, экстрагировали 20 мл 70% спирта этилового на кипящей водяной бане в течение 20 минут. Готовое извлечение охлаждали и центрифугировали со скоростью 1000 об/мин в течение 15 минут. Колонку, содержащую 500 мг сорбента Sephadex (LN20100 с диаметром пор 25–100 μ), предварительно кондиционировали 96% спиртом этиловым, затем через нее пропускали 20 мл полученного извлечения, элюировали 96% спиртом этиловым со скоростью 1 мл/мин, полученный элюат собирали. Элюирование проводили до тех пор, пока при 280 нм значение оптической плотности новых порций элюата не будет постоянной. В качестве раствора сравнения при спектрофотометрии использовали воду очищенную. Затем элюировали фракцию проантоцианидинов 70% ацетоном водным. Полученный раствор выпаривали, остаток растворяли в 5 мл воды очищенной с добавлением 250 мкл диме-

тилсульфоксида. Водное извлечение разбавляли в 20 раз.

Оценивали токсичность изучаемых объектов и максимально переносимую дозу. Под максимально переносимой концентрацией препарата подразумевают дозу в 2 раза меньшую дозы, которая вызывает изменение жизнеспособности клеток.

Для этого в лунки планшета, содержащие по 40000 клеток почки быка в 4 повторностях, вносили по 100 мкл десятикратных разведений изучаемых объектов в поддерживающей среде. Цитопатическое действие оценивали визуально через 1-3 суток. Максимально переносимая доза в пересчете на проантоцианидины составляла:

корневища с корнями сабельника болотного — 98,7 мкг/мл;

шишки туи западной — 204,9 мкг/мл;

сумма проантоцианидинов — 0,4 мкг/мл.

Данные концентрации использовали для оценки противовирусной активности в «профилактической» и «лечебной» схемах.

Оценку противовирусной активности в «профилактической» схеме определяли следующим образом.

В лунки со сформированным монослоем клеток вносили по 100 мкл извлечений корневищ с корнями сабельника болотного (с концентрацией проантоцианидинов 98,7 мкг/мл), извлечений шишек туи западной (с концентрацией проантоцианидинов 204,9 мкг/мл) и раствора проантоцианидинов (с концентрацией 0,4 мкг/мл) в культуральной среде, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки. Выдерживали 1 час. Среду отбирали и отмывали клетки Дюльбеко-фосфатным солевым буфером. Вносили в лунки планшета с клеточным монослоем по 100 мкл десятикратных разведений вируса везикулярного стоматита. Причем в десятикратном разведении доза №3 вируса соответствует 100 тканевым цитопатическим инфекционным дозам. После инкубирования в течение 1 часа культуральную среду с несвязавшимся вирусом удаляли, монослой клеток промывали Дюльбеко-фосфатным солевым буфером и заливали свежей поддерживающей средой.

По такому же принципу оценивали противовирусную активность в «лечебной» схеме.

В лунки со сформированным монослоем клеток вносили по 100 мкл десятикратных

разведений вируса везикулярного стоматита. Причем в десятикратном разведении доза №3 вируса соответствует 100 тканевым цитопатическим инфекционным дозам. После инкубирования в течение 1 часа культуральную среду с несвязавшимся вирусом удаляли, монослой клеток промывали Дюльбеко-фосфатным солевым буфером и вносили в лунки планшета с клеточным монослоем по 100 мкл извлечений корневищ с корнями сабельника болотного (с концентрацией проантоцианидинов 98,7 мкг/мл), извлечений шишек туи западной (с концентрацией проантоцианидинов 204,9 мкг/мл) и раствора проантоцианидинов (с концентрацией 0,4 мкг/мл) в культуральной среде, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки. После инкубирования в течение 1 часа культуральную среду с несвязавшимся вирусом удаляли, монослой клеток промывали Дюльбеко-фосфатным солевым буфером и заливали свежей поддерживающей средой.

МТТ тест проводили через 24-48 часов, когда в монослое наблюдали видимые изменения.

Результаты и обсуждение

При воздействии на клетки извлечений корневищ с корнями сабельника болотного, проантоцианидинов (рис. 1), шишек туи западной (рис. 2) в области низких и высоких разведений вируса наблюдали статистически значимое ($P < 0,05$) увеличение оптической плотности по сравнению с контролем, что указывает на их противовирусную активность по «профилактической» схеме. На рисунках 1 и 2 разведение №5 – контроль жизнеспособности клеток (без добавления вируса).

В области низких разведений вируса наблюдают статистически значимое ($P < 0,05$) увеличение оптической плотности при воздействии на клетки извлечений корневищ с корнями сабельника болотного, проантоцианидинов (рис. 3), шишек туи западной (рис. 4), что указывает на их противовирусную активность по «лечебной» схеме. На рисунках 3 и 4 разведение №5 – контроль жизнеспособности клеток (без добавления вируса).

Противовирусная активность проявляется как при «профилактической», так и при «лечебной» схемах ведения. Положительное действие проантоцианидинов и проантоциа-

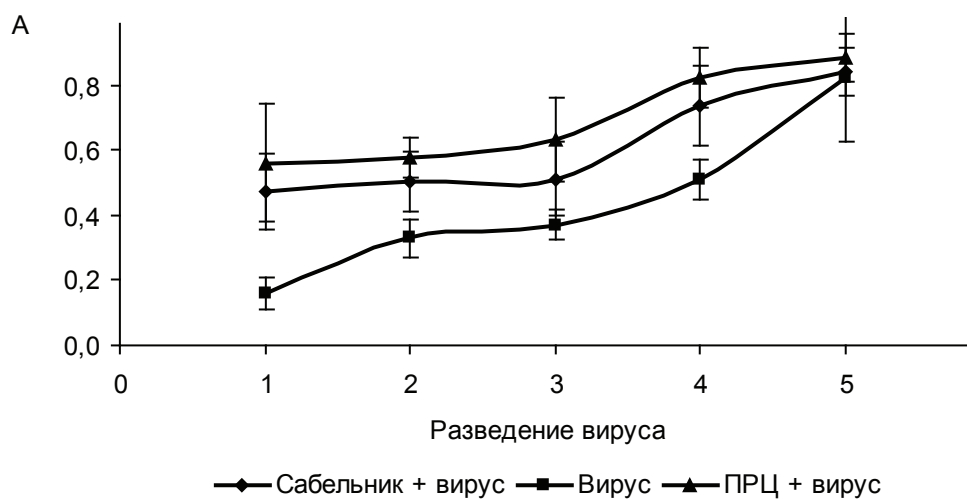


Рисунок 1 - Противовирусная активность корневищ с корнями сабельника болотного и проантоцианидинов, изученная по «профилактической» схеме.

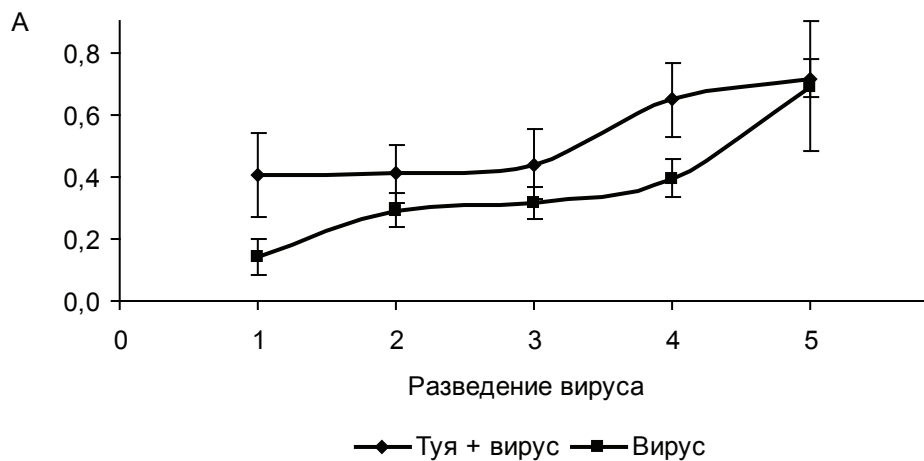


Рисунок 2 - Противовирусная активность шишек туи западной, изученная по «профилактической» схеме.

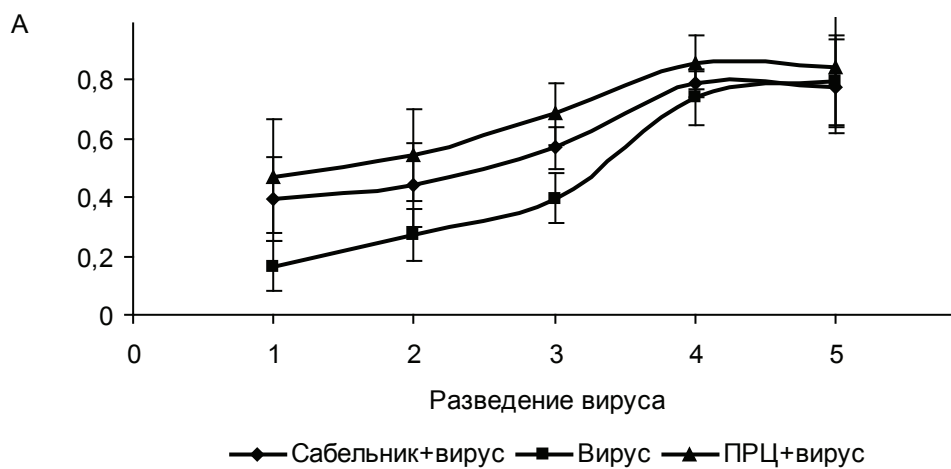


Рисунок 3 - Противовирусная активность корневищ с корнями сабельника болотного и проантоцианидинов, изученная по «лечебной» схеме.

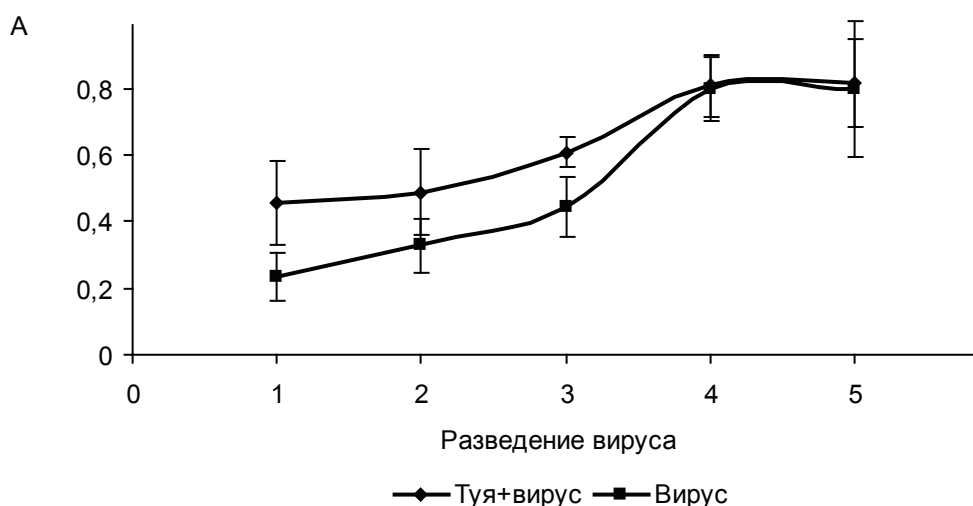


Рисунок 4 - Противовирусная активность шишек туи западной, изученная по «лечебной» схеме.

нидинсодержащих лекарственных растений (сабельника болотного, туи западной), выявленное в тесте восстановления клетками МТТ, усиливает резистентность клеток к цитопатогенному действию вируса. Данные растительные объекты эффективны как адаптогены *in vitro* в культуре клеток почки быка, зараженных вирусом везикулярного стоматита.

Заключение

Таким образом, основной группой биологически активных веществ, благодаря которой корневища с корнями сабельника болотного и шишки туи западной обладают противовирусной активностью, являются проантоцианидины.

Положительное действие извлечений из корневищ с корнями сабельника болотного и шишек туи западной, а также выделенной и очищенной суммы проантоцианидинов, выявленное в тесте восстановления клетками МТТ, указывает на клеточный механизм противовирусного эффекта, выражающийся в усилении резистентности клеток к цитопатическому действию вируса.

Выраженная противовирусная активность, отсутствие побочных эффектов позволяют говорить об эффективном и безопасном использовании извлечений из корневищ с корнями сабельника болотного и шишек туи западной в профилактике и лечении вирусных заболеваний.

Литература

1. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention / D. Bagchi [et al.] // *Toxicology*. – 2000 Aug. – Vol. 148, N 2/3. – P. 187-197.
2. Ёршик, О. А. Антиоксидантная активность сабельника болотного *Comarum palustre* L. / О. А. Ёршик, Г. Н. Бузук // *Вестник фармации*. – 2013. – № 3. – С. 81-85.
3. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds / D. Bagchi [et al.] // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2002 May. – Vol. 957. – P. 260-270.
4. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells / X. Ye [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 1999 Jun. – Vol. 196, N 1/2. – P. 99-108.
5. Sovak, M. Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review / M. Sovak // *J. Med. Food.* – 2001. – Vol. 4, N 2. – P. 93-105.
6. Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats / N. Garbacki [et al.] // *BMC Pharmacol.* – 2004 Oct. – Vol. 4. – P. 25.
7. Effects of prodelphinidins isolated from *Ribes nigrum* on chondrocyte metabolism and COX activity / N. Garbacki [et al.] // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 2002 Jun. – Vol. 365, N 6. – P. 434-441.
8. Ёршик, О. А. Изучение противовоспалительной активности проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного *Comarum palustre* L. / О. А. Ёршик, Г. Н. Бузук, Г. Д. Коробов // *Вестник ВГМУ*. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 151-158.

9. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности / В. С. Черепович [и др.] // Белорусский медицинский журнал. – 2006. – № 2. – С. 106-108.
10. Шпакова, А. П. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток / А. П. Шпакова, К. С. Павлова, Т. И. Булычева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 2. – С. 20-23.
11. Niks, M. Towards an optimized MTT assay / M. Niks, M. Otto // J. Immunol. Meth. – 1990 Jun. – Vol. 130, N 1. – P. 149-151.

Поступила 16.03.2015 г.

Принята в печать 03.04.2015 г.

Сведения об авторах:

Ёршик О.А. – к.ф.н., доцент кафедры фармакогнозии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Бузук Г.Н. – д.ф.н., заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра фармакогнозии с курсом ФПК и ПК. E-mail: slawavgm@mail.ru – Ёршик Ольга Александровна.