

# Изучение противовирусных и иммуномодулирующих свойств водорастворимой субстанции, выделенной из пятилистника кустарникового (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz)

А. Н. Евстропов, Л. Г. Бутова, О. Р. Грек, Л. Н. Захарова

Кафедра микробиологии, иммунологии и вирусологии Новосибирского государственного медицинского университета, г. Новосибирск

В настоящее время достигнут ряд успехов в лечении и профилактике многих вирусных инфекций. Однако, существуют сложности в профилактике заболеваний, не контролируемых вакцинами и не подлежащих активному мониторингу. Так, например, Коксаки-вирусы широко распространены в человеческой популяции и способны вызывать патологические состояния, варьирующие от бессимптомно протекающих форм до смертельного менингита и энцефалита. Общеизвестна роль вирусов Коксаки в патологии сердечно-сосудистой системы, доказано их участие в развитии инсулин-зависимого сахарного диабета и других заболеваний человека. Наибольшая чувствительность к Коксаки-вирусной инфекции отмечается у детей. Существует также высокий риск патологии плода и новорожденных даже при бессимптомной персистенции вирусов у беременных [5, 6, 7].

При условии, что потенциальные профилактические антивирусные средства либо довольно токсичны, либо их активность невысока, могут представлять интерес вещества растительного происхождения, как относительно малотоксичные и обладающие широким спектром биологической активности. Наше внимание привлек пятилистник кустарниковый (*Pentaphylloides fruticosa* (L.) O. Schwarz), широко распространенный в Западной Сибири, на Алтае, Дальнем Востоке и Северном Кавказе. Субстанции, экстрагированные из пятилистника кустарникового, обладают тонизирующей, спазмолитической, гепатопротекторной, радиопротекторной, антиаллергической, антимикробной, противовоспалительной, антидисбиотической активностью [1]. Однако его противовирусные и иммуномодулирующие свойства изучены недостаточно.

Цель исследования — экспериментальное обоснование возможности применения водора-

створимого комплекса, экстрагированного из пятилистника кустарникового, для профилактики экзогенной постнатальной Коксаки В-вирусной инфекции.

## Материалы и методы исследования

Изучаемая субстанция экстрагирована из пятилистника кустарникового *Pentaphylloides fruticosa* (L.) в лаборатории фитохимии Центрального Сибирского Ботанического Сада СО РАН [3].

Противовирусная активность экстракта исследовалась в отношении вируса Коксаки В3, штамм Nancy, титр = 5,5 ТЦД<sub>50/0,1</sub> мл, в культуре клеток (КК) Нер-2 в методике с предварительной обработкой клеток субстанцией в течение 24 часов и последующим внесением вируса. Критерием эффективности служил химиотерапевтический индекс (ХТИ), являющийся отношением максимальной переносимой дозы к минимальной ингибирующей дозе (ИД<sub>50</sub>), а также снижение инфекционного титра вируса на 1,5 lg и более [2, 9].

Для изучения профилактического действия водорастворимого комплекса экстракт вводился самкам за 5–7 дней перед окотом внутривентрикулярно в дозе 40 мг/кг/сут. Новорожденные 1–2 суточные мыши обоего пола, массой 1–1,5 г, линии BALB/c инфицировались однократно инъекционно в область бурого жира 100 ЛД<sub>50/0,05</sub> мл вируса Коксаки В3.

Интерферониндуцирующая активность экстракта оценивалась по содержанию сывороточного интерферона через 6, 12, 24, 48, 72 часа после внутривентрикулярного введения вещества разнополым беспородным мышам массой 18–20 г. За единицу противовирусной активности интерферона принималась величина, обратная его конечному разведению, при котором наблюдается защита 50% клеток от 100 ТЦД<sub>50</sub> вируса энцефаломиокардита мышей в КК L-929.

Иммуномодулирующая активность экстракта пятилистника кустарникового определялась по изменению количества антителообразующих клеток селезенки, а также путем индуктирования реакции гиперчувствительности замедленного типа. Для исследований использованы мыши-самцы гибриды  $F_1/C57BL/6 \times DBA/2/$  и  $F_1/CBA \times C57BL/6/$ , 2-3 месячного возраста, весом 18-20 г, разведения экспериментально-биологической клиники животных ИКИ СО РАМН.

Забой животных производился под эфирным наркозом.

Обработка данных выполнялась с использованием пакета программ Statistica 5,0 for Windows 95 (Start Soft USA).

### Результаты исследования

Установлено, что, обладая низкой токсичностью, максимальная переносимая доза (МПД) 1500 мкг/мл, полифенольный комплекс предотвращал 50% гибели клеток в ИД<sub>50</sub> 31,25 мкг/мл при ХТИ = 48. Изучение дозозависимого снижения инфекционного титра вируса в КК показало, что его значения начинают снижаться с дозы 15,6 мкг/мл, а эффективное снижение уровня репродукции вируса наблюдалось при использовании дозы 62,5 мкг/мл и выше.

Полученные результаты *in vitro* послужили основанием для проведения эксперимента на животных.

Изучение острой токсичности выявили значение максимальной переносимой дозы водного экстракта пятилистника кустарникового для новорожденных мышей — 307,5 ± 8,23 мг/кг, у взрослых животных — 540 ± 6,34 мг/кг.

При изучении влияния субстанции на постнатальную инфекцию было показано, что значения выживаемости, средней продолжительности жизни, а также динамика массы тела животных были достоверно выше в опытной по сравнению с контрольной инфицированной группой (табл. 1)

Таблица 1. Показатели выживаемости и средней продолжительности жизни

Группы животных	Выживаемость, %	СПЖ, (сутки)
Опытная	72,14 ± 1,89*	11,96 ± 5,04*
Контрольная инфицированная	4,22 ± 5,79	5,00 ± 2,64
Контрольная интактная	94,25 ± 6,51	14,20 ± 3,03

Примечание: \* — достоверные различия с контрольной инфицированной группой при  $P \leq 0,05$ .

Вирусологические исследования тканей органов выявили значительные отличия содержания вируса в головном мозге, сердце, печени животных изучаемых групп. В тканях головного мозга (рисунок) содержания вируса на 3 сутки эксперимента не отличалось в опытной и контрольной группе мышей и составило 4,25 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub>. Пик накопления вируса приходится на 5 сутки, но значительно различается, составляя в контрольной группе 6,5 lg, а в опытной — 4,5 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub>. Далее содержания вируса в органе снижается до 5,25 lg в контрольной инфицированной и до 4,25 lg в опытной группах на 7 сутки; до 4,0 lg и 1,75 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub> соответственно на 10 сутки. На 15 сутки эксперимента в тканях головного мозга вирус обнаружить не удалось у животных опытной группы, тогда как у мышей контрольной группы он продолжал выделяться в титре равном 2,0 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub>.

В тканях печени на 3 сутки опыта отмечены следующие показатели содержания Коксаки В3 вируса: в опытной группе — 3,5 lg, а в контрольной — 4,75 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub>. Пик накопления вируса в тканях органа приходится в обеих группах на 5 сутки, но титр его составляет в опытной группе 4,0 lg, тогда как в группе контрольной он достигал 6,75 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub>. В последующие дни содержание вируса в тканях печени снижалось и принимало значения в опытной и контрольной группах соответственно на 7 сутки — 3,25 и 6,0 lg, на 10 — 4,25 lg и 1,5 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub>. На 15 сутки эксперимента вирус в тканях органа опытной группы мышей продолжал определяться в низком титре — 0,75 lg, тогда как в контрольной группе он был на 2,5 lg ТЦД<sub>50/0,1 мл</sub> выше.

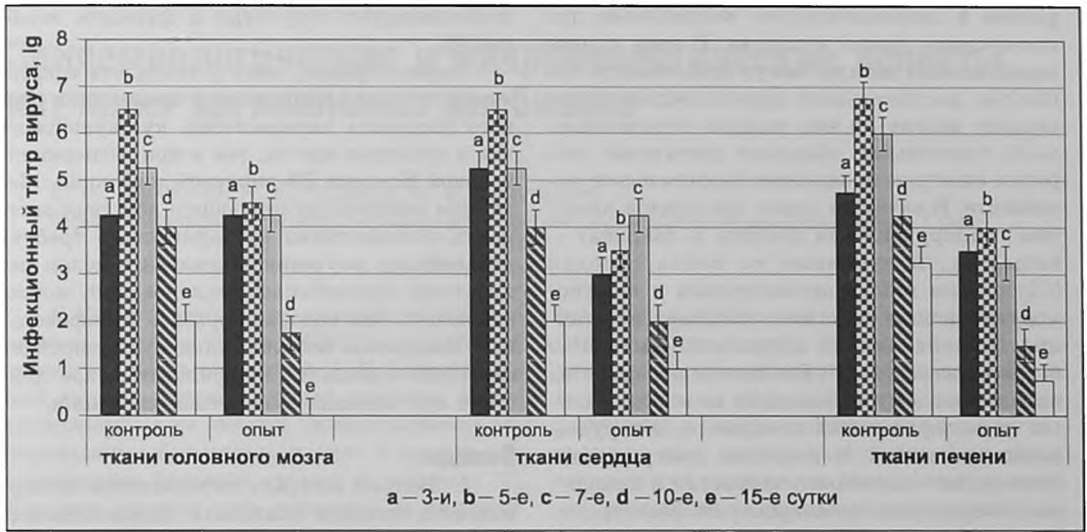
В тканях сердца инфекционный титр вируса в опытной и контрольной группах значительно различался уже на 3 сутки эксперимента и имел значения 3,0 lg и 5,25 lg. Пик накопления Коксаки В3 вируса в органе контрольной группы животных приходился на

Таблица 2. Интерферониндуцирующая активность водного экстракта пятилистника кустарникового

Доза, мг/кг	Титр сывороточного интерферона в ИЕ <sub>50/мл</sub> часы				
	6	12	24	48	72
25,0	8	8	16	8	8
50,0	8	16	64*	8	8
100,0	8	32	160*	24	16
Контроль	4 - 8				

Примечание: \* - достоверные различия с контрольной группой при  $P_{01} < 0,05$ .

Рисунок. Применение водного экстракта пятилистника кустарникового для профилактики постнатальной экзогенной Коксаки ВЗ-вирусной инфекции



5 сутки и был на уровне 6,5 lg ТЦД<sub>50/0,1мл</sub>, после чего количество вируса постепенно снижается, составляя на 7 сутки — 5,25 lg, на 10 — 4,0 lg, на 15 — 2,0 lg ТЦД<sub>50/0,1мл</sub>. В опытной группе животных на 5 сутки опыта в тканях печени титр вируса был 3,5 lg, а пик накопления пришелся на 7 сутки и составил 4,25 lg, хотя и был ниже, чем у контрольной инфицированной группы. При этом к 10 суткам наблюдения произошло резкое падение содержания вируса в органе — до 2,0 lg. К концу эксперимента вирус выделялся из тканей сердца в низком титре — 1,0 lg ТЦД<sub>50/0,1мл</sub>.

Для лучшего понимания возможного механизма профилактического действия субстанции, выделенной из пятилистника кустарникового были изучены его интерферогенные и иммуномодулирующие свойства.

Выявлен прямой дозозависимый эффект интерферониндуцирующего влияния вещества (табл. 2).

Водный экстракт пятилистника кустарникового обладает способностью повышать антителообразующую активность селезенки мышей, иммунизированных тимус-зависимым антигеном — эритроцитами барана. Так, среднее количество антителообразующих клеток на селезенку в опытной группе составило  $147,35 \pm 27,7 \times 10^3$ , что достоверно отличалось от показателя контрольной группы —  $119,56 \pm 31,2 \times 10^3$ ; величина процентного соотношения опыт/контроль оказалась равной 123,24%.

Изучаемая субстанция оказалась способна стимулировать и клеточный иммунный ответ. При проведении реакции ГЗТ разница отека

стоп животных в опытной группе показала  $0,37 \pm 0,11$  мм, что достоверно отличает ее от разницы контрольной группы —  $0,29 \pm 0,08$  мм. Процентное отношение этой разницы — опыт/контроль составило 127,59 %.

## Обсуждение

В настоящей работе была показана способность водорастворимой субстанции пятилистника кустарникового снижать активность репродукции вируса и улучшать показатели динамики течения экзогенной постнатальной Коксаки ВЗ-вирусной инфекции. Результат, по видимому, можно объяснить возможностью трансплацентарной передачей комплексов биоактивных веществ, в том числе цитокинов, продукцию которых мог стимулировать полифенольный комплекс пятилистника кустарникового. Интерферон и другие цитокины способны повышать общий уровень реактивности организма и как результат обуславливать наиболее легкое течение вирусной инфекции.

Подходы к профилактике вирусных инфекций в настоящее время связаны с рядом трудностей, особенно в случаях неспецифической полиорганной симптоматики, обусловленной возможной репродукцией разных вирусов, а так же несвоевременной диагностикой заболеваний. Применение препаратов для профилактики вирусных инфекций определяется их способностью повышать защитные силы клетки или организма в целом за счет стабилизации клеточных мембран, органопротекторного, интерферогенного, иммуномодулирующего и других эффектов. Неоспоримые преимущества

могут иметь препараты, эффективные в отношении многих вирусов и обладающие рядом других свойств, позволяющих сочетать этиотропное и патогенетическое направление при применении одного вещества. В этом случае значительный интерес могут представлять вещества растительного происхождения, поскольку многие из них являясь относительно мало токсичными, обладают достаточно широким спектром проявлений биологической активности. В качестве таких препаратов известны глицирризиновая кислота и лакринат — вещества, полученные из корня солодки (*Glycyrrhiza radix*), противовирусным и иммуномодулирующим действием обладает субстанция, выделенная из астрагала (*Astragalus membranaceus*) [4, 10]. Биологические свойства пятилистника кустарникового во многом зависят от полифенольных комплексов, обнаруживающихся в нем. В растении присутствуют флавонолы — агликоны: кверцетин и кемпферол; кверцитрин, изокверцитрин, изокверцитрин, цианидин, астрагалин, тернифлорин, трибулозид; катехин, (-) эпикатехин, (-) эпигаллокатехин, (-) галлокатехингаллат. В последние годы в составе пятилистника обнаружены два флавоноловых гликозида: 3-О- $\alpha$ -L-арабинопиранозид кверцетина и 3-О- $\beta$ -D-галактопиранозид кверцетина; и два ацилированных флавоноидных гликозида: тернифлоранн и трибулозид; флаван — 3-ол- (-) катехин. [1]. Механизм действия этих веществ может быть связан с их иммуотропным, интерферониндуцирующими а так же с антиок-

сидантными свойствами. Предотвращая окисление тканевых липидов, они препятствуют образованию токсичных липидных перекисей и стабилизируют структуру и функцию мембран [8].

Таким образом, была установлена эффективность профилактического применения водного экстракта пятилистника кустарникового как в культуре клеток, так и при экспериментальной Коксаки В3-вирусной инфекции. Механизм иммуномодулирующего действия экстракта пятилистника кустарникового требует дальнейшего изучения. Оценивая в целом результаты проведенных исследований, можно заключить, что водорастворимые полифенольные комплексы пятилистника кустарникового способны оказывать профилактическое действие при Коксаки В-вирусной инфекции.

## Выводы

1. Водный экстракт пятилистника кустарникового способен оказывать профилактическое действие при экспериментальной Коксаки В3-вирусной инфекции, улучшая показатели выживаемости, средней продолжительности жизни животных, снижая накопление вируса в тканях органов.

2. Водный экстракт пятилистника кустарникового обладает интерферонотропной и иммуномодулирующей активностью, индуцируя образование интерферона, увеличивая количество антителообразующих клеток в селезенке, усиливая реакцию гиперчувствительности у экспериментальных животных.

## Литература

1. Волхонская Т. А., Шкель Н. М., Триль В. М., Позднякова Т. А. Элементный состав растений *Pentaphylloides fruticosus* (L.) O. Schwarz различных экотипов, выращиваемых в Новосибирске // Растительные ресурсы. 2000. Т. 36. вып. 4. С. 67–73.
2. Галегов Г. А., Пушкарская Н. Л., Леонтьева Н. А. и др. Программа экспериментального химиотерапевтического изучения противовирусных (антигриппозных) препаратов и критерии их поэтапной оценки // Вопр. Вирусол. 1976. №4. С. 503–507.
3. Грек О. Р., Волхонская Т. А., Бутова Л. Г., Захарова Л. Н., Евстропов А. Н. Патент «Способ получения водорастворимого фитозектракта, обладающего противовирусной активностью». Заявка №2001131660, приоритет от 22.11.2001.
4. Плясунова О. А., Егоричева И. Н., Федюк Н. В., Покровский А. Г., Балтина Л. А., Муринов Ю. И., Толстиков Г. А. Изучение анти-ВИЧ-активности  $\beta$ -глицирризиновой кислоты // Вопр. вирусол. 1992. №5–6. С. 235–238.
5. Покровский В. И., Онищенко Г. Г., Черкасский Б. Л. Актуальные направления совершенствования профилактики инфекционных болезней // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2000. №1. С. 4–8.
6. Яворовская В. Е., Саратиков А. С. Коксаки-вирусная инфекция. Томск: ТГУ, 1974. 132 с.
7. Caplan N. L. Cardiac, pancreatic and liver abnormalities in a patient with Coxsackie B-infection // Am. J. Med. 1996. V. 101. №3. P. 325–326.
8. Hanaski Y., Ogawa S., Fukui T. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids // Free Radic Biol Med. 1994. V. 16. №6. С. 845–850.
9. Hu J. M., Hsiung G. D. Evaluation of new antiviral agents: 1. In vitro perspectives // Antiviral Res. 1989. V. 11. №5/6. P. 217–232.
10. Rui T., Yang YZ, Zhou TS. Effect of *Astragalus membranaceus* on electrophysiological activities of acute experimental Coxsackie B3 viral myocarditis in mice // Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1994. May. V. 14. №5. P. 292. №4. P. 262.