

УДК [616.831-002-022:578.833]-085.281.322:582.26/27

Н.В. Крылова¹, Г.Н. Леонова¹, А.М. Попов², А.А. Артюков², О.С. Майстровская¹, Э.П. Козловская²

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА РОЗМАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ИЗ *ZOSTERA ASIATICA*, В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Ключевые слова: розмариновая кислота, лютеолин, противовирусная активность, клещевой энцефалит.

На экспериментальных моделях клещевого энцефалита *in vivo* и *in vitro* изучен комплексный препарат розмариновой кислоты из *Zostera asiatica*, созданный на основе растительного полифенольного соединения розмариновой кислоты и биофлавоноидов (лютеолина, апигенина и др.). Показано, что препарат при пероральном применении (наиболее эффективном способе его введения), повышает выживаемость мышей, инфицированных высокопатогенным штаммом вируса клещевого энцефалита, и увеличивает продолжительность их жизни. Он не вызывает деструкции культуры клеток почек эмбриона свиньи и подавляет инфекционную активность вируса.

До настоящего времени лечение клещевого энцефалита (КЭ), как и других вирусных инфекций, представляет собой сложную и до конца не решенную проблему. Низкая эффективность и высокая токсичность противовирусных препаратов, применяемых при лечении КЭ, не оставляют сомнения в актуальности поиска новых более эффективных и малотоксичных соединений, обладающих антивирусной активностью. Попытки использовать иммуномодуляторы для предупреждения и лечения вирусных заболеваний имеют длительную историю, так как постоянным спутником вирусных инфекций являются вторичные иммунодефициты, требующие адекватной коррекции [1, 3].

В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН постоянно ведется поиск и разработка технологий производства биополимеров из морских гидробионтов, обладающих широким спектром биологического действия. В последние годы был выделен комплекс низкомолекулярных полифенольных соединений из морской травы *Zostera asiatica* «Люромарин», содержащий розмариновую кислоту и биофлавоноиды (лютеолин, апигенин и др.).

Ранее установлено, что розмариновая кислота — растительный полифенол из *Melissa officinalis* и биофлавоноид лютеолин, входящий в состав многих растений, являются биологически активными веществами с разносторонним спектром действия [5, 9, 13]. Эти препараты обладают активностью в отношении вирусов герпеса, гриппа, кори и болезни Ньюкасла [6, 7]. Исследования J. Ghosh et al. [8], выполненные на экспериментальной модели мышей, инфицированных вирусом японского энцефалита, показали, что розмариновая кислота обладает высокой проти-

вовирусной активностью. Кроме того, установлено, что розмариновая кислота и лютеолин характеризуются выраженной противовоспалительной и антиоксидантной активностью [10, 12], их противоаллергическое действие было исследовано N. Osakabe et al. [11] и H. Ueda et al. [13]. С учетом важной роли иммунной системы в противоинфекционной защите, развитии воспалительных, аллергических и иммунодефицитных заболеваний становится очевидным и ее участие в реализации эффектов вышеуказанных препаратов, включая их иммуномодулирующую и противовирусную активность.

Целью настоящего исследования явился анализ противовирусной активности комплексного препарата розмариновой кислоты, выделенной из *Z. asiatica*, в сравнении с коммерческими препаратами розмариновой кислоты и лютеолина в отношении вируса КЭ на экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro*.

Материал и методы. Использовали вирус КЭ дальневосточного субтипа, штамм Р-73, выделенный из мозга человека, умершего от очаговой формы этой инфекции. Неинбредные мыши-самцы массой 14–16 г содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Экспериментальные исследования проведены с разрешения комитета по биомедицинской этике НИИЭМ СО РАМН.

В работе использовали однодневный монослой перевиваемой культуры клеток почек эмбриона свиньи. Клетки культивировали в 24-луночных пластиковых панелях с использованием среды 199 и RPMI (в равных соотношениях) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров и 100 ЕД/мл гентамицина. В эксперименте для клеточной культуры использовали поддерживающую среду с 1% сыворотки и гентамицином.

Исследованы 3 вида препаратов: «Люромарин» — комплексный препарат розмариновой кислоты, выделенный из *Z. asiatica* (РКз), содержащий 90–95% розмариновой кислоты и 5–10% биофлавоноидов, а также коммерческие препараты — розмариновая кислота (РКк) и флавоноид лютеолин производства фирмы Sigma (США).

Мышей инфицировали вирусом КЭ однократно подкожно в дозе 10 ЛД₅₀/0,1 мл (исходный инфекционный титр вируса 6,0 lg ЛД₅₀/0,1 мл). Препараты РКз и РКк в дозах 12,5, 25, 50 и 100 мг/кг вводили

Крылова Наталья Владимировна — канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории клещевого энцефалита НИИЭМ СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-26-04; e-mail: krylovanatalya@gmail.com.

интраперитонеально или перорально через 1 час после заражения вирусом и в дальнейшем на протяжении 7 дней дважды в сутки. В качестве контролей послужили группа неинфицированных мышей, получавших испытуемые препараты, а также группа инфицированных вирусом КЭ мышей, не получавших препаратов. В группах было по 10 животных (опыты повторялись трижды). Наблюдали за животными 21 день, рассчитывая показатели летальности. Эффективность препаратов оценивали по выживаемости, защите и по средней продолжительности жизни (СПЖ) мышей.

Цитотоксические свойства исследуемых биополимеров изучали после воздействия их различных концентраций (1, 10, 100 и 1000 мкг/мл) на незараженную культуру клеток почек эмбриона свиньи. Результаты учитывали по появлению цитодеструктивных изменений культуры через 7 суток после внесения препаратов.

Для инфицирования клеток использовали цитопатогенный вирус КЭ штамм Р-73 (инфекционный титр – 10^7 ТЦИД₅₀/0,2 мл). Разные дозы биополимеров (1, 10, 100 и 1000 мкг/мл) соединяли с вирусосодержащим материалом (в соотношении 1:1) и инкубировали в течение 1 часа при 23–25°C. Затем клеточный монослой заражали смесью вируса с препаратом и оставляли на 1 час при 37°C, после чего инокулят сливали, добавляли поддерживающую среду и инкубировали в углекислотном инкубаторе 7 суток. Контролем являлись инфицированные клетки почек эмбриона свиньи, не обработанные препаратами. Опыты проводились трехкратно, вирусингибирующее действие биополимеров оценивали по разнице титров вируса в контрольных и опытных образцах культуры.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ GeoStat и Biostatistics 4.03. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным, если вероятность их тождества была меньше 5% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. При оценке протективного действия установлено, что РКз оказывала дозозависимое защитное действие и увеличивала среднюю продолжительность жизни инфицированных животных. Наибольший эффект был зарегистрирован при интраперитонеальном применении в дозе 25 мг/кг и при пероральном – в дозе 50 мг/кг. Летальность мышей в контрольной группе к 21-му дню (срок наблюдения) составила $23,3 \pm 11,5\%$, СПЖ – $12,4 \pm 1,0$ дней. У инфицированных животных, получавших РКк, к концу срока наблюдения выживаемость была несколько выше, чем в контроле, и составила $43,3 \pm 5,8\%$, СПЖ – $14,8 \pm 1,1$ дней, протективный эффект по сравнению с контролем – 21,7%. В то же время среди мышей, получавших РКз, выживаемость и СПЖ были достоверно выше, чем в контроле, – $63,3 \pm 5,8\%$ и $16,3 \pm 0,9$ дней, протективный эффект – 40% (рис. 1).

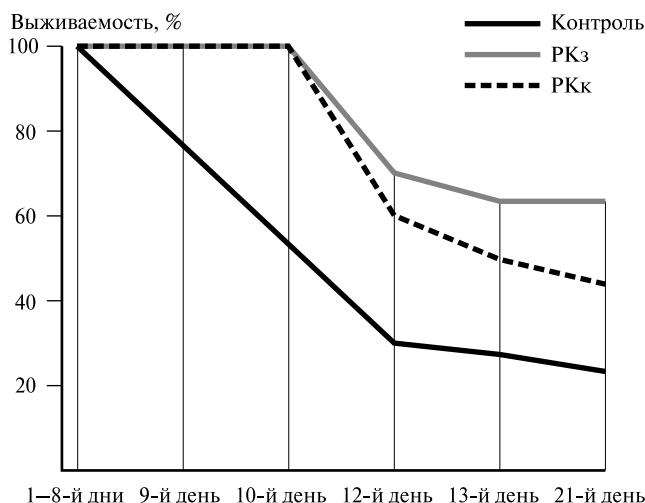


Рис. 1. Влияние перорального введения 50 мг/кг препаратов РКз и РКк на выживаемость животных, инфицированных вирусом КЭ.

На первом этапе исследований оценили цитотоксическое действие розмариновой кислоты из *Z. asiatica* и коммерческих препаратов (розмариновой кислоты и лютеолина) на культуру клеток. Установлено, что РКз и РКк в концентрациях от 1 до 1000 мкг/мл не обладали цитопатическим действием. В связи с тем, что лютеолин плохо растворим в воде, его предварительно растворяли в минимальном объеме спирта и готовили разведения необходимой концентрации на соответствующей питательной среде. Оценка цитотоксичности выявила, что лютеолин в максимальной концентрации (1000 мкг/мл) приводил к появлению зернистости в цитоплазме клеток, а меньшие его концентрации не оказывали токсического влияния.

В следующей серии экспериментов оценивали непосредственное действие вышеуказанных препаратов на вирус КЭ. Ранее рядом авторов было показано, что условная величина, позволяющая дифференцировать вирусингибирующие свойства препаратов, составляет $1,78 \lg$ [2, 4]. Вещества, оказывающие ингибирующее действие выше этой величины, являются эффективными в отношении вирусов.

Исследованные препараты в разной степени проявляли вирусингибирующую активность. Так, при экспозиции РКк титр вируса КЭ снижался на $2,33 \pm 0,58 \lg$ только при максимальной концентрации препарата (1000 мкг/мл), в меньших концентрациях РКк не оказывала вирусингибирующего действия. В то же время при экспозиции вируса со 1000 мкг/мл РКз его титр снижался на $3,0 \pm 0,29 \lg$, и в более низких концентрациях ингибирующее действие препарата было выше условной величины ($1,78 \lg$). Однако достоверные различия при сравнении РКз и РКк отмечались только при применении их в дозе 10 мкг/мл. Необходимо отметить, что другой коммерческий препарат – лютеолин – обладал наиболее выраженной способностью подавлять инфекционную активность: при концентрациях 100 и 10 мкг/мл наблюдалось снижение титра вируса на $4,33 \pm 1,04 \lg$, а при минимальной

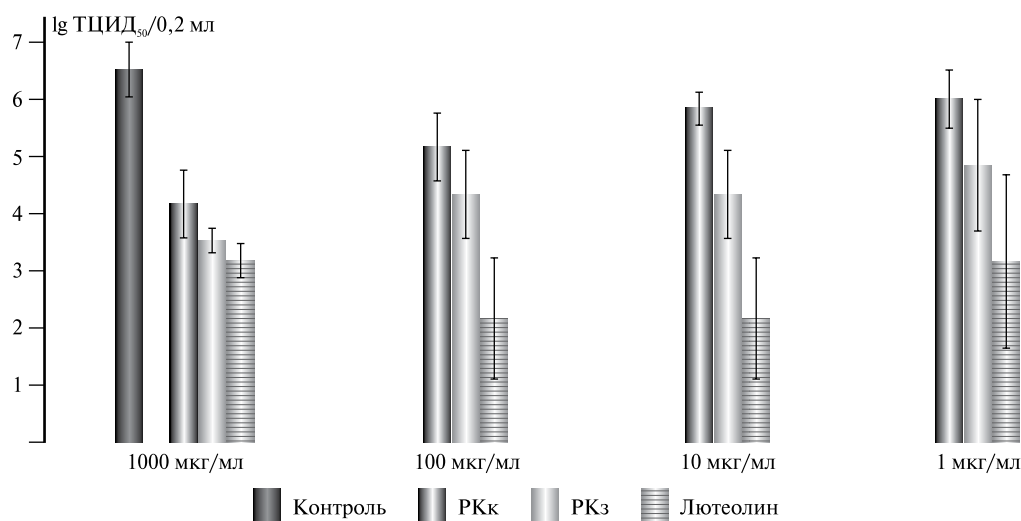


Рис. 2. Вирусингибирующее действие различных концентраций исследуемых препаратов.

концентрации (1 мкг/мл) — на $3,17 \pm 1,61$ Ig. При этом вирусингибирующее действие лутеолина было достоверно выше такового РКк практически во всех концентрациях, а по сравнению с РКз — лишь в дозах 100 и 10 мкг/мл (рис. 2).

Таким образом, на экспериментальной модели КЭ, показано, что розмариновая кислота из *Z. asiatica* при пероральном применении (наиболее эффективном способе введения препарата) увеличивает выживаемость животных и СПЖ. Кроме того, этот комплексный препарат по сравнению с розмариновой кислотой (Sigma, США) обладает более выраженным протективным и вирусингибирующим действием в отношении высокопатогенного штамма вируса КЭ и не вызывает цитодеструкцию культуры. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения комплекса розмариновой кислоты из *Z. asiatica*, обладающего антивирусной и потенциальной иммуномодулирующей активностью, для его возможного применения в качестве биологически активного препарата в терапии КЭ.

Литература

1. Беседнова Н.Н., Леонова Г.Н., Запорожец Т.С. Иммунокорректоры в комплексном лечении вирусных инфекций // ЖМЭИ. 2006. № 3, прил. С. 111–117.
2. Вотяков В.И., Чижов Н.Н., Тазулахова Э.Б. // Методические вопросы научной разработки противовирусных веществ. Минск, 1977. С. 10–14.
3. Еришов Ф.И. Использование иммуномодуляторов при вирусных инфекциях // Антибиотики и химиотерапия. 2003. № 6. С. 27–33.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, 2005. С. 532–558.
5. Debersac P., Vernevaux M.F., Amiot M.J., et al. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver // Food Chem. Toxicol. 2001. Vol. 39, No. 2. P. 109–117.
6. Dimitrova Z., Dimov B., Manolova N. et al. Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts // Acta Microbiol. Bulg. 1993. Vol. 29. P. 65–72.
7. Herrmann E.C., Kucera L.S. Antiviral substances in plants of the mint family (labiateae). II. Nontannin polyphenol of *Melissa*

officinalis // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1967. Vol. 124, No. 3. P. 869–874.

8. Ghosh J., Ghosh S., Saxena A., Basu A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis // Antimicrob. Agents Chemother. 2007. Vol. 51, No. 9. P. 3367–3370.
9. Van Kessel K.P., Kalter E.S., Verhoef J. Rosmarinic acid inhibits external oxidative effects of human polymorphonuclear granulocytes // Agents Actions. 1986. Vol. 17. P. 375–376.
10. Lee J., Jung E., Kim Y. et al. Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF-alpha-induced upregulation of CCL11 and CCR3 // Br. J. Pharmacol. 2006. Vol. 148. P. 366–375.
11. Osakabe N., Takano H., Sanbongi C. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism // Biofactors. 2004. Vol. 21, No. 1–4. P. 127–131.
12. Sroka Z., Fecka I., Cisowski W. Antiradical and anti-H2O2 properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract // Z. Naturforsch. 2005. Vol. 60, No. 11–12. P. 826–832.
13. Ueda H., Yamazaki C., Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens* // Biol. Pharm. Bull. 2002. Vol. 25, No. 9. P. 1197–1202.

Поступила в редакцию 08.04.2009.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF COMBINED MEDICATION ZOSTERA ASIATICA-DERIVED ROSMARINIC ACID AGAINST TICK-BORNE ENCEPHALITIS PATHOGEN

N.V. Krylova¹, G.N. Leonova¹, A.M. Popov², A.A. Artyukov², O.S. Maistrovskaya¹, E.P. Kozlovskaya²

¹ Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary — Experimental tick-borne encephalitis models allowed *in vivo* and *in vitro* researches into combined medication *Zostera asiatica*-derived rosmarinic acid created on the basis of plant polyphenol compound of rosmarinic acid and bioflavonoids (luteolin, apigenin, etc.). As shown, when introduced orally (the most efficient mode of administration) this medication increased survival rate of mice infected with highly pathogenic strain of the tick-borne encephalitis virus and prolonged their life. It did not cause a pig embryo kidney cell culture destruction and suppressed viral infection activity.

Key words: rosmarinic acid, luteolin, antiviral activity, tick-borne encephalitis.