

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-4-9-15>
УДК 578.832; 582.734; 615.281



Оригинальная статья/Research article

Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, полученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей

Н. А. Мазуркова¹, М. А. Проценко^{1*}, Е. И. Филиппова¹, Т. А. Кукушкина², Г. И. Высочина², И. Е. Лобанова², О. Ю. Мазурков¹, Л. Н. Шишкина¹, А. П. Агафонов¹

1 – ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"» Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор»), 630559, Россия, Новосибирская область, р.п. Кольцово
2 – ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

*Контактное лицо: Проценко Мария Анатольевна. E-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Статья получена: 11.10.2019. Статья принята к печати: 18.11.2019

Резюме

Введение. Отмена вакцинации против натуральной оспы после ее ликвидации в 1980 году привела к снижению противооспенного иммунитета у людей. Близкие по структуре к вирусу натуральной оспы зоонозные вирусы оспы обезьян, верблюдов, буйволов и коров тоже представляют опасность для человека. В России на сегодняшний день отсутствуют эффективные и безопасные лекарственные средства для профилактики и лечения натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека и животных. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris*) является перспективным источником для разработки новых противовирусных препаратов. Проведенные ранее исследования показали, что водные растворы сухого этанольного извлечения из надземной части и этилацетатного извлечения из корней *Alchemilla vulgaris* проявляют активность в отношении вируса гриппа и вируса простого герпеса.

Цель. Цель данной работы заключалась в исследовании химического состава и противовирусной активности экстрактов из корней и травы *Alchemilla vulgaris* в отношении ортопоксвирусов.

Материалы и методы. Качественный анализ образцов экстрактов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Количественный анализ проводили, используя комплекс спектрофотометрических методов. Определение токсичности и противовирусной активности препаратов на основе *Alchemilla vulgaris in vitro* проводили на перевиваемой культуре клеток Vero. Противовирусную активность полученных препаратов оценивали по снижению инфекционности (титра) ортопоксвирусов в монослое клеток Vero, зараженных ортопоксвирусами в присутствии препаратов с различной концентрацией, относительно культуры клеток, зараженной ортопоксвирусами без препаратов.

Результаты и обсуждение. Показано, что образец препарата, полученный методом этилацетатного извлечения из корней исследуемого растения и очищенный хлороформом, содержит в основном катехины и лейкоантоцианы (70 %). В то же время очищенный хлороформом этанольный экстракт из сырой массы травы растения содержит сумму флавоноидов (71 %). При этом содержание флавоноидов в неочищенных этанольных экстрактах из корней и травы *Alchemilla vulgaris* составляло 5 % и 6 % соответственно. Выявлено, что противовирусную активность в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей проявили очищенные препараты, полученные из корней *Alchemilla vulgaris* при использовании в качестве экстрагента этилацетата, а также препараты, полученные из травы путем этанольного извлечения.

Заключение. Таким образом, очищенные этилацетатные экстракты из корней и этанольные экстракты из сырой массы травы *Alchemilla vulgaris* проявляют противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов *in vitro*.

Ключевые слова: *Alchemilla vulgaris*, флавоноиды, катехины, лейкоантоцианы, вирус осповакцины, вирус оспы мышей.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Н. А. Мазуркова, Л. Н. Шишкина и А. П. Агафонов провели статистическую обработку и интерпретацию результатов, М. А. Проценко и Т. А. Кукушкина получили экстракты *Alchemilla vulgaris*, Е. И. Филиппова и О. Ю. Мазурков определили токсичность и противовирусную активность экстрактов, Г. И. Высочина и И. Е. Лобанова провели качественный и количественный анализ экстрактов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Мазуркова Н. А., Проценко М. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П. Исследование противовирусной активности экспериментальных образцов препаратов, полученных из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. в отношении вирусов осповакцины и оспы мышей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(4): 9–15.

Investigation of the Antiviral Activity of Experimental Samples Obtained from the Grass and Roots of *Alchemilla vulgaris* L. Against Vaccinia Virus and Ectromelia Virus

Natalya A. Mazurkova¹, Mariya A. Protsenko¹, Ekaterina I. Filippova¹, Tatyana A. Kukushkina², Galina I. Vysochina², Irina E. Lobanova², Oleg Yu. Mazurkov¹, Larisa N. Shishkina¹, Alexander P. Agafonov¹

1 – State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, w.v. Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia
2 – Central Siberian Botanical Garden SB RAS, 101, Zolotodolinskaya str., Novosibirsk, 630090, Russia

*Corresponding author: Mariya A. Protsenko. E-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Received: 11.10.2019. Accepted: 18.11.2019

© Мазуркова Н. А., Проценко М. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Мазурков О. Ю., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П., 2019

© Mazurkova N. A., Protsenko M. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Lobanova I. E., Mazurkov O. Yu., Shishkina L. N., Agafonov A. P., 2019

Abstract

Introduction. The abolition of smallpox vaccination after its elimination in 1980 led to a decrease in the immunocompromised immunity in humans. Zoonotic monkeypox, camelpox, buffalopox and cowpox viruses that are close to the variola virus also pose a danger to humans. In Russia today there are no effective and safe medicines for the prevention and treatment of smallpox and other orthopoxvirus infections in humans and animals. The Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris*) is a promising source for the development of new antiviral drugs. Previous studies have found that *Alchemilla vulgaris* shows activity against influenza virus and herpes simplex virus.

Aim. The aim of this work was to study the chemical composition and antiviral activity of extracts from the roots and the grass of *Alchemilla vulgaris* against orthopoxviruses.

Materials and methods. Qualitative analysis of the samples was performed by high performance liquid chromatography. Quantitative analysis was performed using a complex of spectrophotometric methods. To determine the toxicity and antiviral activity of experimental samples from *Alchemilla vulgaris in vitro*, a transplantable Vero cell culture was used. Antiviral activity of the obtained preparations was evaluated by reducing the infectivity (titer) of orthopoxviruses in the monolayer of Vero cells infected with orthopoxviruses in the presence of preparations with different concentrations relative to the cell culture infected with orthopoxviruses without the preparations.

Results and discussion. It was shown that the experimental sample from *Alchemilla vulgaris* obtained by the method of ethyl acetate extraction from the roots of the studied plant and purified with chloroform contains mainly catechins and leucoanthocyanins (70 %). In parallel, extract from the raw mass of the grass of the plant purified with chloroform and ethanol contains the amount of flavonoids (71 %). Wherein the content of flavonoids in unpurified ethanol extracts from the roots and the grass of *Alchemilla vulgaris* composed 5 % and 6 %, respectively. It was revealed that purified preparations obtained from *Alchemilla vulgaris* roots when using ethyl acetate and ethanol as extractants showed antiviral activity against vaccinia virus and ectromelia virus, as well as preparations obtained from grass by ethanol extraction.

Conclusion. Thus, purified ethyl acetate extracts from the roots and ethanol extracts from the wet grass mass of *Alchemilla vulgaris* exhibit antiviral activity against orthopoxviruses *in vitro*.

Keywords: *Alchemilla vulgaris*, flavonoids, catechins, leucoanthocyanins, Vaccinia virus, Ectromelia virus.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Natalya A. Mazurkova, Larisa N. Shishkina and Alexander P. Agafonov carried out statistical processing and participated in data interpretation, Mariya A. Protsenko and Tatyana A. Kukushkina received *Alchemilla vulgaris* extracts, Ekaterina I. Filippova and Oleg Yu. Mazurkov determined the toxicity and antiviral activity of the extracts, Galina I. Vysochina and Irina E. Lobanova conducted a qualitative and quantitative analysis of the extracts. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

For citation: Mazurkova N. A., Protsenko M. A., Filippova E. I., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Lobanova I. E., Mazurkov O. Yu., Shishkina L. N., Agafonov A. P. Investigation of the antiviral activity of experimental samples obtained from the grass and roots of *Alchemilla vulgaris* L. against Vaccinia virus and Ectromelia virus. *Drug development & registration*. 2019; 8(4): 9–15.

ВВЕДЕНИЕ

Отмена вакцинации против натуральной оспы после ее ликвидации в 1980 году привела к снижению противооспенного иммунитета у людей. Близкие к вирусу натуральной оспы и относящиеся к тому же роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* зоонозные вирусы оспы обезьян, верблюдов, буйволов и коров представляют опасность для человека [1]. Следует также отметить, что в наше время человечество подвергается потенциальной опасности заражения оспой, преднамеренного использования против населения штаммов вируса натуральной оспы в качестве биологического оружия. Все это создает реальные предпосылки для заболевания людей оспой [2].

Кроме того, для ортопоксвирусов характерна способность приобретать устойчивость к лекарственным препаратам вследствие мутаций [2, 3]. В связи с вышесказанным, для эффективного лечения ортопоксвирусных инфекций, в том числе натуральной оспы, разработка новых противооспенных препаратов с различными механизмами антиортопоксвирусного действия остается актуальной.

13 июля 2018 г. Администрация по контролю над продуктами и лекарствами США (FDA) зарегистрировала препарат для лечения натуральной оспы – Тековиримат (Tecovirimat, ТРОХХ), созданный на основе ST-246 (4-трифторметил-N-

(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[ф]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид) [3, 4]. На стадии клинических испытаний находится также еще один современный, эффективный и биодоступный при пероральном введении противовирусный химический препарат – CMX001 (Brincidofovir), созданный на основе препарата Cidofovir [5, 6]. Российский препарат НИОХ-14, аналогичный ST-246, находящийся в стадии доклинических исследований, также проявляет противовирусную активность в отношении вируса натуральной оспы [7].

В исследованиях *in vivo* были получены многообещающие результаты для соединений – ингибиторов тирозинкиназы, CI-1033 и Gleevec, в отношении системной ортопоксвирусной инфекции. Данные соединения не предотвращали репликацию вируса, но резко снижали высвобождение внеклеточного вируса натуральной оспы [8].

В XIX веке в Северной Америке коренные жители успешно лечили натуральную оспу экстрактами, полученными из насекомоядного растения *Sarracenia purpurea* из семейства *Sarraceniaceae*. В современных научных исследованиях показано, что водно-этанольные экстракты *Sarracenia purpurea* способны эффективно ингибировать репликацию вирусов осповакцины, оспы обезьян и натуральной оспы *in vitro*, также вызванный ими цитопатический эффект [9]. Извлече-

ния, полученные из других растений (*Acacia arabica*, *Ocimum sanctum*, *Eugenia jambolana*, *Azadirachta indica*, *Opuntia streptacantha* и *Perscia vulgaris*), также проявляя активность в отношении ортопоксвирусов [10].

Манжетка обыкновенная *Alchemilla vulgaris* L. из семейства Rosaceae является перспективным источником для разработки новых противовирусных препаратов. В народной медицине манжетка применяется как противовоспалительное, вяжущее, антисептическое, ранозаживляющее, успокаивающее, мочегонное и отхаркивающее средство, при вирусных заболеваниях [11–14]. Ранее проведенные нами исследования показали, что экспериментальные образцы препаратов на основе этанольного извлечения из наземной части и этилацетатного извлечения из корней *Alchemilla vulgaris* проявляют активность в отношении вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, а также вируса гриппа [15, 16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали измельченные корни и траву *Alchemilla vulgaris*, собранной на Семинском перевале Горного Алтая в фазу бутонизации – начала цветения в 2012 году.

Получение водных и этанольных экстрактов из *Alchemilla vulgaris*. Для получения сухих водных и этанольных экстрактов использовали разработанную нами ранее технологию [17]. Выход этанольного экстракта для травы и корней *Alchemilla vulgaris* составляет 30 % и 35 % соответственно.

Получение образцов на основе суммы флавонолов из травы *Alchemilla vulgaris*. Сырую массу травы растения экстрагировали 90–96 % этиловым спиртом. После упаривания этилового спирта добавляли дистиллированную воду и проводили очистку водного остатка хлороформом. Очищенный водный остаток экстрагировали этилацетатом, и полученный экстракт упаривали. Выход осадка составляет 1,5 % [18].

Получение экспериментальных образцов препаратов на основе суммы флавоноидов (катехинов и лейкоантоцианов) из корней *Alchemilla vulgaris*. Измельченные и просеянные через сито корни манжетки обыкновенной экстрагировали 50-кратным объемом этилацетата в три приема при нагревании на водяной бане с обратным холодильником по 20 минут. Объединенный этилацетатный экстракт концентрировали в ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 50 °С до остатка, превышающего в 3 раза массу сырья. Полученный экстракт вливали тонкой струей при помешивании в 6-кратно больший объем хлороформа, в котором растворяется примесь инертных веществ (смолы, пигменты и т.д.). Выпадает хлопьевидный осадок белого цвета, который отфильтровывали через воронку со стеклянным фильтром. Полученный осадок высушивали в вакууме. Высушенный продукт подвергали размолу, рассыпали

тонким слоем в затемненном месте и выдерживали до отсутствия запаха растворителя. Выход осадка составляет 5–10 % от массы сырья.

Качественный анализ экспериментальных образцов растительных препаратов проводили как методом хроматографии на бумаге, используя в качестве проявителя 10 % спиртовой раствор хлорида алюминия, так и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на ВЭЖХ-системе, состоящей из жидкостного хроматографа «Agilent-1200» (США) с диоднолучным детектором и системы сбора и обработки данных ChemStation. Для разделения использовали колонку Zorbax SB-C18 (Agilent, США), размером 4,6 × 150 мм, с диаметром частиц 5 мкм, применив градиентный режим элюирования. В подвижной фазе содержание метанола в водном растворе ортофосфорной кислоты (0,1 %) изменялось от 50 до 52 % за 56 мин. Скорость потока элюента 1 мкл/мин. Температура колонки 26 °С. Объем вводимой пробы 5 мкл. Детектирование осуществляли при $\lambda = 360$ нм. Для приготовления подвижных фаз использовали метиловый спирт (ос.ч.), 0,1 % ортофосфорную кислоту (ос.ч.), бидистиллированную воду. Растворы стандартных образцов готовили в концентрации 10 мкг/мл в этиловом спирте. Состав фенольных соединений определяли, сопоставляя времена удерживания пиков веществ и спектральных данных.

Количественный анализ экспериментальных образцов растительных препаратов. Количественное определение суммы флавонолов в пересчете на рутин проводили по методике В. В. Беликова и М. С. Шрайбер, в которой использована реакция комплексообразования флавонолов с хлоридом алюминия. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-26 (Россия) при $\lambda = 415$ нм [19].

Содержание катехинов в пересчете на (+)-катехин определяли спектрофотометрическим методом при $\lambda = 502$ нм. Методика основана на способности катехинов давать малиновое окрашивание с раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте [20].

Для определения дубильных веществ в пересчете на танин применяли реакцию с 2 % водным раствором аммония молибденовокислого. Интенсивность образовавшейся окраски измеряли при $\lambda = 420$ нм [21].

Определение токсичности и противовирусной активности растительных препаратов *in vitro* проводили на перевиваемой линии клеток почки зеленой мартышки Vero, полученной из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Определяли максимально переносимые концентрации (МПК) образцов для данной культуры клеток. Для этого 10 мг каждого экстракта растворяли в 1 мл среды DMEM (Биолот, Россия) с 2 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия), затем разводили в 10 раз (до 1000 мкг/мл) и делали 2-кратные последовательные разведения этой же питательной средой (20 концент-

раций). После этого по 100 мкл разведений экстрактов вносили в соответствующие лунки планшета (по 4 лунки для каждой концентрации) и ставили в термостат на 4 суток при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и 100 % влажности. Через 4 суток 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 МПК, равную концентрации экстракта, при которой сохранялось 100 % жизнеспособного монослоя клеток во всех лунках.

В экспериментах использовали полученные из отдела коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ортопоксвирусы: вирус осповакцины (ВОВ, штамм Л-ИВП) и вирус оспы мышей – экстромелии (ВОМ, штамм К-1). Вирусы нарабатывали в культуре клеток Vero. Концентрацию (титр) вирусов в культуральной жидкости определяли путем титрования методом бляшкообразования в чувствительной культуре клеток Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в 1 мл (lg БОЕ/мл). Титр вируса в используемых в работе образцах составлял от 4,8 до 5,5 lg БОЕ/мл.

Противовирусную активность препаратов на основе *Alchemilla vulgaris* оценивали по снижению инфекционности (титра) ортопоксвирусов в монослое клеток Vero, зараженных ортопоксвирусами в присутствии препаратов с различной концентрацией, относительно культуры клеток, зараженной ортопоксвирусами без препарата. В лунки 24-луночных планшетов (Costar, Германия) с клетками вносили по 0,1 мл раствора препаратов в среде DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки с разными концентрациями за 1 ч до заражения. Заражение осуществляли десятикратными разведениями вирусов (с 1-го по 6-е) на среде DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки в объеме 0,1 мл. Монослой клеток с вирусом культивировали в общем объеме питательной среды DMEM, равном 1,0 мл, содержащем 2 % эмбриональной сыворотки. Эксперименты были проведены в 4-х повторах. Через 6 суток культивирования в монослое клеток подсчитывали количество бляшек и определяли титр вирусов (в lg БОЕ/мл) в опыте и контроле (без препаратов). На основании этого рассчитывали индекс нейтрализации (ИН, в lg) вирусов: $ИН = \text{Титр}_{\text{контроль}} - \text{Титр}_{\text{опыт}}$

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [22]. Показатели титров вирусов представлены как среднее значение $\pm 95\%$ -й доверительный интервал ($M \pm I_{95}$). Сравнение показателей средних значений проводили с применением непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при 95 % уровне надежности ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Препарат, выделенный методом этилацетатного извлечения из корней *Alchemilla vulgaris*, содержал в своем составе в основном катехины и лейкоантоцианы (70 %). В препарате идентифицированы (+)-катехин и галловая кислота. Содержание флавоноидов в очищенном этанольном экстракте, выделенном из сырой массы травы растения, составляло 71 %. В экстракте обнаружено не менее 30 соединений, из которых идентифицированы рутин, авикулярин, кверцетин, кемпферол и (-)-катехин.

Показано, что в этанольном экстракте, полученном из сухой травы методом четырехкратной дробной мацерации, содержалось не менее 21 соединения. Идентифицированы авикулярин, (+)-катехин, галловая, гентизиновая, феруловая кислоты и кумарин эскулетин. Суммарные количества катехинов, флавонолов и танинов в сухом экстракте составляли 0,15 %, 5,85 % и 42,0 % соответственно. При этом этанольный экстракт корней манжетки, полученный тем же методом, содержал 5 % катехинов и лейкоантоцианов. В составе экстракта обнаружен (+)-катехин.

При определении токсичности препаратов из манжетки обыкновенной в отношении клеток Vero было показано, что образцы из корней *Alchemilla vulgaris*, выделенные методом этилацетатного и этанольного извлечений, были малотоксичными для данной линии клеток, их МПК составляли 400 и 100 мкг/мл соответственно. МПК для экстрактов, полученных из травы методом этанольного извлечения, составляли 200 мкг/мл для неочищенного и 50 мкг/мл для очищенного образца. В то время как образцы, полученные из корней и травы методом водного извлечения, были более токсичными, их МПК составляли 25 мкг/мл.

Результаты изучения противовирусной активности полученных извлечений представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, противовирусный эффект в культуре клеток Vero в отношении вируса осповакцины проявили препараты, полученные из корней *Alchemilla vulgaris* при использовании в качестве экстрагентов этилацетата и 70 % этанола, а также препараты, полученные из травы растения путем этанольного извлечения.

Исследование противовирусной активности препаратов *Alchemilla vulgaris* в отношении другого вируса семейства ортопоксвирусов – вируса оспы мышей показало сходные результаты, а именно, все препараты, кроме полученных водным извлечением, обладали противовирусным действием в отношении данного вируса. Результаты представлены в таблице 2.

На основании данных представленных в таблице 2, выявлено, что наибольшую противовирусную активность проявил очищенный этилацетатный экстракт из корней растения и очищенный этанольный экстракт из сырой массы травы. Оба образца также показали самое высокое содержание флавоноидов в пересчете на сухой препарат.

Таблица 1. Противовирусный эффект экспериментальных образцов *Alchemilla vulgaris* в культуре клеток Vero в отношении вируса осповакцины

Table 1. Antiviral effect of experimental samples from *Alchemilla vulgaris* in Vero cell culture against Vaccinia virus

Вид сырья	Тип извлечения	Концентрация препарата, мкг/мл	Титр вируса, Ig БОЕ/мл ($M \pm I_{95}$, n = 4)	ИН (Титр _{контроль} / Титр _{опыт}), Ig	
Корни	Этилацетатное (очищенное хлороформом) (70 % катехинов и лейкоантоцианов)	400	2,50 ± 0,10*	3,01	
		200	2,98 ± 0,24*	2,53	
		100	3,34 ± 0,08*	2,17	
		50	3,83 ± 0,20*	1,68	
		25	4,18 ± 0,10*	1,33	
		12,5	4,83 ± 0,25*	0,68	
		6,25	5,51 ± 0,04	0	
	Этанольное (5 % катехинов и лейкоантоцианов)	100	4,52 ± 0,05*	1,31	
		50	5,00 ± 0,10*	0,83	
		25	4,83 ± 0,25*	0,68	
		12,5	5,51 ± 0,04	0	
		6,25	5,51 ± 0,04	0	
		Водное	25	5,18 ± 0,10*	0,65
		12,5	5,51 ± 0,04	0	
	6,25	5,51 ± 0,04	0		
Трава	Этанольное (очищенное хлороформом) (71 % флавоноидов)	50	3,71 ± 0,20*	1,80	
		25	4,91 ± 0,24*	0,60	
		12,5	5,51 ± 0,05	0	
		6,25	5,51 ± 0,05	0	
	Этанольное (6 % флавоноидов)	200	3,83 ± 0,20*	1,68	
		100	4,18 ± 0,10*	1,33	
		50	4,51 ± 0,20*	1,00	
		25	4,83 ± 0,25*	0,68	
		12,5	5,50 ± 0,04	0,01	
		6,25	5,51 ± 0,04	0	
		Водное	25	5,50 ± 0,04	0,01
			12,5	5,51 ± 0,04	0
	6,25		5,51 ± 0,04	0	
	Контроль вируса			5,51 ± 0,04	-

Примечание: ИН – индекс нейтрализации; M – среднее, I_{95} – 95%-й доверительный уровень; n – число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса; * – достоверное отличие от соответствующего контроля при $p \leq 0,05$.

Следует отметить, что при наименьшей (6,25 мкг/мл) из всех исследованных концентраций экстрактов достоверное снижение титра вируса оспы мышей в сравнении с титром этого же вируса в контроле, где вместо экстракта вносили ту же самую питательную среду, наблюдали только для препарата, полученного из корней этилацетатным извлечением.

Показано, что с увеличением концентрации всех исследованных экспериментальных образцов препаратов наблюдали снижение титров вирусов осповакцины и оспы мышей и соответственное увеличение индекса нейтрализации в отношении этих ортопоксвирусов.

Таблица 2. Противовирусный эффект экспериментальных образцов *Alchemilla vulgaris* в культуре клеток Vero в отношении вируса оспы мышей

Table 2. Antiviral effect of experimental samples from *Alchemilla vulgaris* in Vero cell culture against Ectromelia virus

Вид сырья	Тип извлечения	Концентрация препарата, мкг/мл	Титр вируса, Ig БОЕ/мл ($M \pm I_{95}$, n = 4)	ИН (Титр _{контроль} / Титр _{опыт}), Ig	
Корни	Этилацетатное (очищенное хлороформом) (70 % катехинов и лейкоантоцианов)	400	2,83 ± 0,10*	3,50	
		200	3,17 ± 0,20*	2,66	
		100	3,85 ± 0,08*	1,98	
		50	4,14 ± 0,11*	1,69	
		25	4,50 ± 0,04*	1,33	
		12,5	5,00 ± 0,10*	0,83	
		6,25	4,83 ± 0,25*	0,68	
	Этанольное (5 % катехинов и лейкоантоцианов)	100	4,18 ± 0,10*	1,33	
		50	4,51 ± 0,20*	1,00	
		25	4,83 ± 0,25*	0,68	
		12,5	5,80 ± 0,10	0,03	
		6,25	5,83 ± 0,25	0	
		Водное	25	5,21 ± 0,24	0,62
			12,5	5,83 ± 0,25	0
6,25	5,83 ± 0,25		0		
Контроль вируса			5,83 ± 0,20	-	
Трава	Этанольное (очищенное хлороформом) (71 % флавоноидов)	50	3,34 ± 0,08*	2,17	
		25	4,32 ± 0,11*	1,51	
		12,5	5,18 ± 0,10*	0,65	
		6,25	5,83 ± 0,20	0	
	Этанольное (6 % флавоноидов)	200	4,15 ± 0,11*	1,68	
		100	4,50 ± 0,04*	1,33	
		50	4,83 ± 0,20*	1,00	
		25	5,33 ± 0,10	0,50	
		12,5	5,83 ± 0,20	0	
		6,25	5,83 ± 0,20	0	
		Водное	25	5,80 ± 0,10	0,03
			12,5	5,80 ± 0,10	0,03
	6,25		5,83 ± 0,20	0	
	Контроль вируса			5,83 ± 0,20	-

Примечание: ИН – индекс нейтрализации; M – среднее, I_{95} – 95%-й доверительный уровень; n – число лунок с монослоем клеток, инфицированных разными разведениями вируса; * – достоверное отличие от соответствующего контроля при $p \leq 0,05$.

При этом наибольшей антивирусной активностью в отношении и вируса осповакцины, и вируса оспы мышей обладал препарат, полученный из корней *Alchemilla vulgaris* методом этилацетатного извлечения, и препарат, полученный из сырой массы травы методом этанольного извлечения.

Стандартизация лекарственных средств является основным гарантом их высокого качества при серийном производстве и обеспечивает эффективность и безопасность применения. Важным моментом стандартизации разрабатываемых лекарственных препаратов на основе растительных источников является определение вещества или групп веществ, ответственных за фармакологическое действие этих препаратов.

Впоследствии, для достоверного установления параметров для стандартизации разрабатываемых лекарственных средств следует провести выделение групп активных соединений из растения и анализ их биологической активности.

Анализ литературных данных по фитохимическому анализу экстрактов растений, проявляющих активность в отношении поксвирусов, показал наличие алкалоидов, глюкозидов, полифенольных соединений, флавоноидов в *Eugenia jambolana*. Авторы работы [10] полагают, что противовирусная активность может быть обусловлена полифенольными соединениями и флавоноидами. *Acacia arabica* содержит алкалоиды, антрахиноны, флавоноиды, сапонины, дубильные вещества, редуцирующие сахара и белки. В *Ocimum sanctum* обнаружены сапонины, флавоноиды, тритерпеноиды, танины и эфирные масла. В *Perscia vulgaris* содержатся глюкозиды, нарингенин, хинная кислота, ликопен, дубильные вещества и гликозиды [10]. *Sarracenia purpurea* содержит в своем составе фенольные соединения, флавоноиды, иридоиды [23].

В связи с вышеуказанным, а также с тем, что высшую активность в отношении ортопоксвирусов проявили экспериментальные образцы, содержащие в своем составе повышенное содержание флавоноидов, сделано предположение о том, что именно эта группа биологически активных веществ отвечает за противовирусный эффект экстрактов *Alchemilla vulgaris*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован химический состав сухих этанольных, этилацетатных и водных экстрактов из травы и корней *Alchemilla vulgaris* L. Выявлено, что флавоноиды в этанольных и этилацетатных экстрактах представлены такими группами, как катехины, лейкоантоцианы, флавонолы.

Показано, что очищенные этилацетатные и этанольные экстракты *Alchemilla vulgaris* способны проявлять существенную противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов (вирусов осповакцины и оспы мышей) *in vitro*, что делает их перспективными для дальнейшего исследования в качестве потенциальных лекарственных препаратов для лечения вирусных инфекций.

Таким образом, повышенная противовирусная активность очищенных этилацетатных и этанольных экстрактов в сравнении с неочищенными водными и

этанольными экстрактами, вероятно, обусловлена высоким содержанием в них флавоноидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и государственного задания ЦСБС СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами».

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисевич С. В., Маренникова С. С., Махлай А. А., Терентьев А. И., Логинова С. Я., Перекрест В. В., Краснянский В. П., Бондарев В. П., Рыбак С. И. Оспа обезьян: особенности распространения после отмены обязательного оспопрививания. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012; 2: 69–73.
2. Parker S., Chen N. G., Foster S. et al. Evaluation of disease and viral biomarkers as triggers for therapeutic intervention in respiratory mousepox – an animal model of smallpox. *Antiviral Research*. 2012; 94(1): 44–53.
3. Yang G., Pevear D. C., Davies M. H. et al. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal orthopoxvirus Challenge. *Journal of Virology*. 2005; 79(20): 13139–13149.
4. Grosenbach D. W., Honeychurch K., Rose E. A., Chinsangaram, J., Frimm A., Maiti B., Lovejoy C., Meara I., Long P., Hruby D. E. Oral tecovirimat for the treatment of smallpox. *New England Journal of Medicine*. 2018; 379: 44–53.
5. Parker S., Touchette E., Oberle C., Almond M., Robertson A., Trost L. C., Lampert B., Painter G., Buller R. M. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether–lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Res.*, 2008; 77(1): 39–49.
6. Rice A. D., Adams M. M., Wallace, G. et al. Efficacy of CMX001 as a post exposure antiviral in New Zealand white rabbits infected with rabbitpox virus, a model for orthopoxvirus infections of humans. *Viruses*. 2011; 3: 47–62.
7. Mazurkov O. Yu., Kabanov A. S., Shishkina L. N., Sergeev A. A., Skarnovich M. O., Bormotov N. I., Skarnovich M. A., Ovchinnikova A. S., Titova K. A., Galahova D. O., Bulychev L. Ye., Sergeev A. A., Taranov O. S., Selivanov B. A., Tikhonov A. Ya., Zavjalov E. L., Agafonov A. P., Sergeev A. N. The new effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14. *Journal of General Virology*. 2016; 97: 1229–1239. Doi:10.1099/jgv.0.000422.
8. Damon I., Karem K., Olson V. Use of live variola virus to evaluate antiviral agents // WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, Switzerland, 31 Oct. – 1 Nov. 2011: 23–24.
9. Arndt W., Mitnik C., Denzler K.L., White S., Waters R. Jacobs B. L., Rochon Y., Olson V. A., Damon I. K., Langland J. O. *In vitro* Characterization of a Nineteenth-Century Therapy for Smallpox // *PLoS ONE*. 2012; 7(3): e32610. Doi:10.1371/journal.pone.0032610.
10. Bhanuprakash V., Hosamani M., Balamurugan V., Gandhale P., Naresh R., Swarup D., Singh R. K. *In vitro* antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008; 46: 120–127.
11. Dimins F., Mikelsone V., Kaneps M. Antioxidant characteristics of Latvian herbal tea types. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact and Applied Sciences*. 2013; 67(4/5): 433–436. DOI:10.2478/prolas-2013-0067.
12. Jayanegara A., Marquardt S., Kreuzer M., Leiber F. Nutrient and energy content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methanogenic potential of alpine forage plant species during early summer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(10): 1863–1870. DOI:10.1002/jsfa.4398.
13. Shrivastava R., John G. Treatment of aphthous stomatitis with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine. *Clinical Drug Investigation*. 2006; 26(10): 567–573. DOI:10.2165/00044011-200626100-00003.

14. Вайс Р. Ф., Финтельманн Ф. Фитотерапия. Руководство. Пер. с нем. Ю. Коршикова. М.: Медицина. 2004: 552.
15. Мазуркова Н. А., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Ибрагимова Ж. Б., Лобанова И. Е., Филиппова Е. И., Мазурков О. Ю., Макаревич Е. В., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П. Изучение противогерпетической активности экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 1(14): 118–127.
16. Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Лобанова И. Е., Высочина Г. И., Мазуркова Н. А. Противовирусные свойства препарата на основе суммы флавоноидов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) в отношении вируса гриппа. *Фундаментальные исследования*. 2015; 2: 5139–5144.
17. Проценко М. А., Костина Н. Е., Теплякова Т. В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer. *Биотехнология*. 2018; 34(1): 45–51.
18. Патент РФ № 2128516. Способ получения Р-витаминного средства / Т. А. Кукушкина, Т. А. Жанаева, А. А. Зыков, Л. А. Обухова, В. Г. Селятская. 1999.
19. Беликов В. В., Шрайбер М. С. Методы анализа флавоноидных соединений. *Фармация*. 1970; 1: 66–72.
20. Кукушкина Т. А., Зыков А. А., Обухова Л. А. Манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris* L.) как источник лекарственных средств. Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. *Фитофарм*. 2003: 64–69.
21. Федосеева Л. М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае. *Химия растительного сырья*. 2005; (2): 45–50.
22. Закс Л. Статистическое оценивание. *Статистика*. 1976: 598.
23. Muhammad A., Guerrero-Analco J. A., Martineau L. C., Musallam L., Madiraju P., Nachar A., Saleem A., Haddad P. S., Arnason J. T. Antidiabetic compounds from *Sarracenia purpurea* used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nation. *J. Nat. Prod.* 2012; 75(7): 1284–1288. Doi:10.1021/np3001317.
8. Damon I., Karem K., Olson V. Use of live variola virus to evaluate antiviral agents // WHO Advisory Committee on Variola Virus Research Report of the Thirteenth Meeting, Geneva, Switzerland, 31 Oct. – 1 Nov. 2011: 23–24.
9. Arndt W., Mitnik C., Denzler K.L., White S., Waters R. Jacobs B. L., Rochon Y., Olson V. A., Damon I. K., Langland J. O. *In vitro* Characterization of a Nineteenth-Century Therapy for Smallpox // PLoS ONE. 2012; 7(3): e32610. Doi:10.1371/journal.pone.0032610.
10. Bhanuprakash V., Hosamani M., Balamurugan V., Gandhale P., Naresh R., Swarup D., Singh R. K. *In vitro* antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008; 46: 120–127.
11. Dimins F., Mikelsone V., Kaneps M. Antioxidant characteristics of Latvian herbal tea types. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact and Applied Sciences*. 2013; 67(4/5): 433–436. DOI:10.2478/prolas-2013-0067.
12. Jayanegara A., Marquardt S., Kreuzer M., Leiber F. Nutrient and energy content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methanogenic potential of alpine forage plant species during early summer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(10): 1863–1870. DOI:10.1002/jsfa.4398.
13. Shrivastava R., John G. Treatment of aphthous stomatitis with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine. *Clinical Drug Investigation*. 2006; 26(10): 567–573. DOI:10.2165/00044011-200626100-00003.
14. Vajs R. F., Fintelmann F. Herbal medicine. Leadership. Translation from German Yu. Korshikova. М.: Медицина. 2004: 552 (in Russ.).
15. Mazurkova N. A., Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Ibragimova Zh. B., Lobanova I. Ye., Filippova Ye. I., Mazurkov O. Yu., Makarevich Ye. V., Shishkina L. N., Agafonov A. P. Study of antiherpetic activity of lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) extracts. *Drug development & registration*. 2016; 1(14): 118–127 (in Russ.).
16. Filippova E. I., Kukushkina T. A., Lobanova I. E., Vysochina G. I., Mazurkova N. A. Antiviral properties based drug total flavonoids lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) against influenza virus. *Fundamental research*. 2015; 2: 5139–5144 (in Russ.).
17. Protzenko M. A., Kostina N. E., Teplyakova T. V. Selection of Nutrient Media for Submerged Culturing of Wood-Destroying Mushroom of *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer. *Biotechnology*. 2018; 34(1): 45–51 (in Russ.).
18. RF patent No. 2128516. The method of obtaining P-vitamin funds / T. A. Kukushkina, T. A. Zhanaev, A. A. Zыков, L. A. Obukhova, V. G. Selyatitskaya. 1999 (in Russ.).
19. Belikov V. V., Shrajber M. S. Methods of analysis of flavonoid compounds. *Farmaciya*. 1970; 1: 66–72 (in Russ.).
20. Kukushkina T. A., Zыков A. A., Obukhova L. A. Common cuff (*Alchemilla vulgaris* L.) as a source of medicines. Actual problems of creating new drugs of natural origin. *Fitofarm*. 2003: 64–69. (in Russ.).
21. Fedoseeva L. M. The study of tannins of underground and aboveground vegetative organs of the *Bergenia Crassifolia* (L.) Fitch., growing in Altai. *Chemistry of plant raw material*. 2005; (2): 45–50 (in Russ.).
22. Zaks L. Statistical evaluation. *Statistika*. 1976: 598 (in Russ.).
23. Muhammad A., Guerrero-Analco J. A., Martineau L. C., Musallam L., Madiraju P., Nachar A., Saleem A., Haddad P. S., Arnason J. T. Antidiabetic compounds from *Sarracenia purpurea* used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nation. *J. Nat. Prod.* 2012; 75(7): 1284–1288. Doi:10.1021/np3001317.

REFERENCES

1. Borisevich S. V., Marennikova S. S., Makhlai A. A., Terentiev A. I., Loginova S. Ya., Perekrest V. V., Krasnyansky V. P., Bondarev V. P., Rybak S. I. Monkeypox: features of spread after cancellation of mandatory pox immunization. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2012; 2: 69–73 (in Russ.).
2. Parker S., Chen N. G., Foster S. et al. Evaluation of disease and viral biomarkers as triggers for therapeutic intervention in respiratory mousepox – an animal model of smallpox. *Antiviral Research*. 2012; 94(1): 44–53.
3. Yang G., Pevear D. C., Davies M. H. et al. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal orthopoxvirus Challenge. *Journal of Virology*. 2005; 79(20): 13139–13149.
4. Grosenbach D. W., Honeychurch K., Rose E. A., Chinsangaram, J., Frimm A., Maiti B., Lovejoy C., Meara I., Long P., Hruby D. E. Oral tecovirimat for the treatment of smallpox. *New England Journal of Medicine*. 2018; 379: 44–53.
5. Parker S., Touchette E., Oberle C., Almond M., Robertson A., Trost L. C., Lampert B., Painter G., Buller R. M. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether–lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Res.* 2008; 77(1): 39–49.
6. Rice A. D., Adams M. M., Wallace, G. et al. Efficacy of CMX001 as a post exposure antiviral in New Zealand white rabbits infected with rabbitpox virus, a model for orthopoxvirus infections of humans. *Viruses*. 2011; 3: 47–62.
7. Mazurkov O. Yu., Kabanov A. S., Shishkina L. N., Sergeev A. A., Skarnovich M. O., Bormotov N. I., Skarnovich M. A., Ovchinnikova A. S., Titova K. A., Galahova D. O., Bulychev L. Ye., Sergeev A. A., Taranov O. S., Selivanov B. A., Tikhonov A. Ya., Zavjalov E. L., Agafonov A. P., Sergeev A. N. The new effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14. *Journal of General Virology*. 2016; 97: 1229–1239. Doi:10.1099/jgv.0.000422.