

Механизмы противовирусной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в отношении респираторных вирусов человека

Я. Л. ЕСАУЛКОВА¹, А. А. МУРЫЛЕВА¹, Е. О. СИНЕГУБОВА¹, С. В. БЕЛЯЕВСКАЯ¹, А. В. ГАРШИННИНА¹,
М. А. КИРЕЕВА², А. С. ВОЛОБУЕВА¹, А. В. СЛИТА¹, Р. А. КАДЫРОВА¹, *В. В. ЗАРУБАЕВ¹

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург

Mechanisms of Antiviral Activity of *Cistus Salviifolius* Extract Against Human Respiratory Viruses

YA. L. ESAULKOVA¹, A. A. MURYLEVA¹, E. O. SINEGUBOVA¹, S. V. BELYAEVSKAYA¹, A. V. GARSHININA¹,
M. A. KIREEVA², A. S. VOLOBUEVA¹, A. V. SLITA¹, R. A. KADYROVA¹, *V. V. ZARUBAEV¹

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg

² St. Petersburg University, St. Petersburg

Грипп и ОРВИ являются наиболее распространёнными формами инфекционных респираторных заболеваний человека. В этой связи разработка и внедрение средств профилактики и лечения вирусных инфекций представляет актуальнейшую задачу. Целью настоящего исследования явилось изучение механизмов противовирусной активности экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salviifolius*) в отношении возбудителей гриппа и ОРВИ у человека. В ходе работы было показано, что экстракт ладанника ингибирует репродукцию вирусов гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09, А(H3N2), А(H5N2), А(H7N9) и вируса гриппа В. Максимальную вирусингибирующую активность экстракт проявлял на ранних стадиях вирусного цикла (0–2 ч после инфицирования). Экстракт ладанника существенно снижал гемагглютинирующую активность вируса, и при этом не влиял на фузогенные свойства вирусного гемагглютинина. При помощи электронной микроскопии показано, что экстракт ладанника препятствует сорбции вирионов гриппа на поверхности клеток в культуре. Показана также ингибирующая активность экстракта в отношении других респираторных вирусов человека — вируса парагриппа и аденовируса. В опытах на модели гриппозной пневмонии у мышей показана протективная активность экстракта ладанника при интраназальном применении. Степень этой активности ослабевала с увеличением времени между применением экстракта и инфицированием животных. Вирус, предварительно инкубированный с экстрактом ладанника, вообще не вызывал гибели животных. Полученные данные свидетельствуют, что экстракт ладанника шалфеелистного является эффективным средством профилактики респираторных вирусных инфекций человека широкого спектра действия.

Ключевые слова: инфекционные респираторные заболевания, экстракт ладанника, пневмония, противовирусная активность, мыши.

Influenza and ARVIs are the most common forms of infectious respiratory diseases in humans. In this regard, the search and development of means for the prevention and treatment of viral infections is a high priority task. The aim of this study was to assess the mechanisms of the antiviral activity of sage-leaved rock-rose extract (*Cistus salviifolius*) against the causative agents of influenza and ARVIs in humans. In the course of the study, it was shown that *C. salviifolius* extract inhibits reproduction of influenza viruses A(H1N1), A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H5N2), A(H7N9) and influenza B virus. The extract showed maximum virus-inhibiting activity at the early stages of the viral cycle (0–2 hours after infection). *C. salviifolius* extract significantly reduced the hemagglutinating activity of the virus, and at the same time did not affect the fusogenic properties of viral hemagglutinin. Transmission electron microscopy was used to demonstrate that the cistus extract prevents the absorption of influenza virions on the surface of cells in culture. The inhibitory activity of the extract against other human respiratory viruses, parainfluenza virus and adenovirus, was also shown. The protective activity of *C. salviifolius* extract was demonstrated when applied intranasally during the experiments on a model of influenza pneumonia in mice. The degree of this activity was in inverse proportion to the time window between the application of the extract and the infection of the animals. The virus, pre-incubated with *C. salviifolius* extract, did not cause death in the animals. The data obtained indicate that *C. salviifolius* extract serves as an effective and broad-range means of preventing respiratory viral infections in humans.

Keywords: infectious respiratory diseases, cistus extract, pneumonia, antiviral activity, mice.

Введение

Грипп и ОРВИ являются наиболее распространёнными формами инфекционных респираторных заболеваний человека. Эти патологии вызывают около 90% всей инфекционной заболеваемости населения. В России регистрируется от 27 до 41 млн случаев этих заболеваний в год. В эту группу патогенов, помимо гриппа, входят также вирусы других семейств: корона-, адено-, пикорна- и парамиксовирусы, а также метапневмо- и

торных заболеваний человека. Эти патологии вызывают около 90% всей инфекционной заболеваемости населения. В России регистрируется от 27 до 41 млн случаев этих заболеваний в год. В эту группу патогенов, помимо гриппа, входят также вирусы других семейств: корона-, адено-, пикорна- и парамиксовирусы, а также метапневмо- и

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

бокавирусы, чья роль в развитии поражений респираторного тракта определена недавно [1].

Наиболее опасную вирусную инфекцию представляет грипп. Благодаря особенностям генома, вирусы гриппа являются высокоизменчивыми организмами. Это обуславливает ускользание от иммунного ответа организма, в том числе стимулированного вакцинами, а также способность к формированию штаммов, устойчивых к действию противовирусных препаратов [2]. Благодаря антигенному дрейфу и реассортации фрагментов генома вирус гриппа вызывает ежегодные эпидемии и пандемии, последняя из которых произошла в 2009 г. («свиной» грипп) [3].

Разработка и внедрение средств профилактики и лечения вирусных инфекций представляет актуальнейшую задачу для медицинской науки и практического здравоохранения. На сегодняшний день на фармацевтическом рынке представлены специфические противовирусные препараты против гриппа — ингибиторы ионного канала М2 ремантадин и амантадин, ингибиторы нейраминидазы осельтамивир, занамивир, перамивир и ланинамивир, ингибитор вирусного гемагглютинина умифеновир (Арбидол), а также блокатор вирусного полимеразного комплекса балокасава марбоксил (Ксофлюза). Тем не менее, до настоящего времени не создано средств достаточно широкого спектра действия, способных кардинально предотвратить распространение ОРВИ. В этой связи на первый план выходят методы неспецифической профилактики и терапии этих заболеваний.

Ранее была показана противогриппозная активность экстракта ладанника (*Cistus incanus*) [4–6]. Нами были также показаны противогриппозные свойства экстракта близкородственного растения, ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) [7]. Целью настоящего исследования явилось изучение механизмов противовирусной активности экстракта ладанника шалфеелистного в отношении возбудителей гриппа и ОРВИ у человека. В задачи работы входило исследование вирусингибирующей активности экстракта ладанника в отношении вирусов парагриппа и аденовируса человека, изучение механизмов противовирусной активности экстракта ладанника в отношении вируса гриппа, а также оценка протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного при местном применении на модели гриппозной пневмонии у животных.

Материал и методы

1. Исследуемые препараты. В работе использовали экстракт ладанника шалфеелистного производства ООО «Торговый дом «Фармпроект»» в виде бурого водорастворимого порошка.

2. Вирусы и клетки. В исследовании использовали следующие вирусы из коллекции вирусных штаммов НИИЭМ им. Пастера:

- вирус парагриппа человека 3 типа;

- аденовирус человека 5 типа;
- вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2);
- вирус гриппа A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2);
- вирус гриппа B/Florida/04/06 (Yamagata-like);
- вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1);
- вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09;
- вирус гриппа A/Anhui/1/13 (H7N9);

Вирусы накапливали в клетках перmissive линий: вирусы гриппа — в клетках MDCK, аденовирус — в клетках Vero, вирус парагриппа — в клетках MA-104.

3. Изучение противовирусного действия экстракта ладанника в отношении респираторных вирусов человека. Клетки перmissive линий сеяли на 24-луночные планшеты и инкубировали в течение 16–24 ч до формирования монослоя. Экстракт ладанника вносили в диапазоне концентраций в лунки планшетов с монослоем клеток в объёме 0,5 мл. Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 1 ч. После этого в лунки вносили по 0,5 мл соответствующего вируса (m.o.i. 0,01) в среде альфа-МЕМ и инкубировали в течение 1 ч. После этого жидкость из лунок отбирали, клетки промывали и вносили в лунки по 1 мл свежей среды с экстрактом ладанника в соответствующих концентрациях. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 48–72 ч в зависимости от вируса. Далее в культуральной жидкости определяли инфекционный титр вируса, как описано ниже.

4. Титрование вирусов. Из вирусосодержащего материала готовили серию десятикратных разведений на среде для культивирования клеток. Этими разведениями заражали клетки перmissive линии, рассеянные в 96-луночные планшеты. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 72 ч. По окончании инкубации визуально оценивали наличие ЦПД в лунках. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в логарифмах числа 50% инфекционных доз.

5. Определение стадии вирусного цикла — мишени действия экстракта ладанника. Для определения стадии жизненного цикла вируса гриппа, на которой экстракт ладанника проявляет максимальную активность, клетки MDCK рассеивали в 24-луночные планшеты и инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 24 ч до формирования монослоя. Клетки отмывали от ростовой среды, после чего вносили в лунки вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (m.o.i. 1). Планшеты с клетками выдерживали в течение 1 ч при температуре +4°C. Затем вирус удаляли и промывали планшеты два раза чистой культуральной средой. Далее, в точке 0, в клетки вносили препарат и помещали планшет в CO₂ — инкубатор при 36°C. Экстракт ладанника вносили в следующие сроки относительно добавления вируса: (-2) — препарат внесен за час до добавления вируса, (-1) — 0 — одновременно с вирусом, а также через 2, 4 и 6 ч после заражения. В качестве позитивного контроля использовали интервал (-2) — 8, где экстракт ладанника присутствовал в течение всего эксперимента.

После окончания эксперимента из супернатанта в лунках готовили серию десятикратных разведений (10⁻²–10⁻⁷) и вносили в 96-луночные планшеты с монослойной культурой клеток MDCK. Планшеты инкубировали в течение 48 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Результаты эксперимента учитывали с помощью реакции гемагглютинации (см. далее). Вирусные титры выражали в lgTCID₅₀/0,2 мл.

6. Реакция гемагглютинации. Для определения наличия вируса гриппа в культуральной жидкости проводили реакцию гемагглютинации. Для этого культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объём 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали при 20°C в течение 1 ч, после чего визуально проводили учёт результатов. Положительным считали результат реакции, при котором эритроциты равномерно покрывали всё дно лунки. При отрицательной реакции эритроциты в виде маленького диска или «пуговки» располагались в центре дна анализируемой лунки планшета. За титр вируса принимали наибольшее

разведение вирусосодержащего материала, при котором наблюдалась положительная реакция гемагглютинации.

7. Изучение антифузогенной активности экстракта ладанника шалфейлистного в отношении гемагглютинирующего вируса гриппа. Метод оценки фузогенной активности вирусного гемагглютинирующего экстракта был адаптирован из протокола [8]. Метод основан на том, что при кислом pH происходит активация гемагглютинирующей мембраны, что индуцирует слияние вирусной и эритроцитарной мембран, разрушение эритроцита и высвобождение во внеклеточную среду гемоглобина, концентрация которого измеряется спектрофотометрически.

Для постановки теста использовали 96-луночный планшет с U-образным дном лунок. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора изучаемого препарата в конечной концентрации 50 мкг/мл и 50 мкл изучаемого вируса гриппа. Планшеты инкубировали в течение 60 мин при +37°C. В качестве контроля вместо вирусов использовали физиологический раствор. После инкубации добавляли 100 мкл 1% суспензии куриных эритроцитов и инкубировали 60 мин при +4°C. Затем 150 мкл жидкости аккуратно удаляли, не задевая осевших эритроцитов, добавляли 150 мкл MES-буфера (32,5mM MES-гидрат, Sigma-M5287, 4mM CaCl₂ pH=5,0) и инкубировали в течение 1,5 ч при +37°C. Планшеты центрифугировали 15 мин при 2000 об./мин для осаждения интактных эритроцитов и остатков мембран, отбирали 100 мкл жидкости и переносили в планшет для измерения оптической плотности при длине волны 405 нм (OD₄₀₅). Об активности соединения судили по снижению OD₄₀₅ по сравнению с контролем без соединения.

8. Изучение анти-рецепторсвязывающей активности экстракта ладанника в отношении гемагглютинирующего вируса гриппа. Для изучения механизма активности экстракта ладанника шалфейлистного была изучена его способность блокировать связывание вирионов гриппа с клеточной мембраной. Для этого использовали вирусы гриппа разных типов и подтипов, накопленные в аллантоисной жидкости. Из вирусосодержащего материала готовили серию двукратных разведений от 1:2 до 1:1024. В лунках круглодонного планшета эти разведения (100 мкл на лунку) смешивали с равным объемом 1% куриных эритроцитов, инкубировали в течение 1 ч при 20°C, после чего проводили визуальный учёт гемагглютинации. За гемагглютинирующий титр вируса принимали последнее его разведение, при котором отмечалась положительная реакция гемагглютинации (см. п. 7).

Из экстракта ладанника готовили серию двукратных разведений (200–12,5 мкг/мл). Вирус в дозе 1, 2, 4 и 8 гемагглютинирующих единиц (ГЕ) смешивали с равным объемом экстракта ладанника в диапазоне концентраций, инкубировали 1 ч при 20°C, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 20°C, после чего проводили визуальный учёт гемагглютинации. Об активности экстракта ладанника судили по его способности блокировать вирусиндуцированную агглютинацию эритроцитов.

9. Электронно-микроскопические исследования. Для морфологического изучения процесса сорбции вирионов на плазматическую мембрану клетки MDCK, выращенные в лунках 6-луночного планшета инкубировали в течение 1 ч при +4°C с вирусосодержащей жидкостью в объеме 1 мл (5×10⁶

TCID₅₀). Несвязавшийся вирус отмывали 2 раза по 5 мин средой для культур клеток, клетки соскабливали со дна лунок, центрифугировали 15 мин при 2000 об./мин, после чего полученный клеточный осадок фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом на среде DMEM (pH 7,2) и 2,5% раствором OsO₄. Клетки обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон/аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония) при инструментальном увеличении 5000–50000.

10. Оценка протективной активности экстракта ладанника шалфейлистного в опытах *in vivo*. Экстракт ладанника шалфейлистного растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия до концентрации 200 мкг/мл. Лабораторных животных (белые мыши линии Balb/c, самки, возраст 6–8 нед.) разделяли на 8 групп по 15 животных в группе. Полученный раствор вводили мышам интраназально под лёгким эфирным наркозом в объёме 30 мкл за 3 (группа 1), 1,5 (группа 2) или 0,5 (группа 3) часа до заражения вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Животных 4-й группы инфицировали вирусом сразу после введения раствора экстракта ладанника, животных 5-й группы инфицировали вирусом, предварительно инкубированным с экстрактом ладанника (200 мкг/мл) в течение 1 ч при +4°C. Животные 6-й группы получали перорально при помощи желудочного зонда один раз в сутки раствор осельтамивира фосфата (Тамифлю) в объёме 0,2 мл и дозе 20 мг/кг. Животные 7-й группы были инфицированы вирусом и не получали никаких препаратов.

Мышей заражали интраназально под лёгким эфирным наркозом вирусом в дозе 5×10⁵ TCID₅₀ на мыш в объёме 30 мкл. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали смертность в каждой группе опыта. На основании полученных данных высчитывали процент смертности в каждой из групп и индекс защиты — отношение разницы в гибели контрольной и опытной группы к проценту гибели в контрольной группе.

11. Статистическая обработка результатов. Расчёт значений 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) и 50% эффективной концентрации (IC₅₀) проводили при помощи пакета программ GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» — «логарифм ингибитора — ответ»). На основании полученных данных для каждого соединения и каждого вируса рассчитывали индекс селективности (SI) — отношение CC₅₀ к IC₅₀. Достоверность различий в выживаемости животных проводили при помощи анализа кривых выживаемости Каплана–Мейера по методу Манта–Хансена пакета программ GraphPad Prism 6.01. Достоверными считали различия между группами, если параметр *p* не превышал 0,05.

Результаты исследования

1. Определение стадии вирусного цикла — мишени действия препарата. Для определения стадии жизненного цикла вируса, на которой экстракт

Таблица 1. Инфекционная активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в клетках MDCK в условиях применения экстракта ладанника шалфейлистного в зависимости от срока его добавления в культуру

Время присутствия экстракта ладанника, ч	Инфекционный титр вирусного потомства, lg TCID ₅₀ /0,2 мл	<i>p</i> *
(-2)–8	1,3±0,6	0,0011
(-2)–(-1)	4,7±0,6	0,2302
(-1)–0	1,7±0,6	0,0015
0–8	1,7±0,6	0,0015
2–8	2,3±0,6	0,0031
4–8	3,7±0,6	0,0241
6–8	4,0±0,0	0,0572
Контроль вируса	5,3±0,6	1,0000

Примечание. * — коэффициент Стьюдента при сравнении с группой контроля вируса.

ладанника шалфеелистного проявляет максимальную противовирусную активность, его добавляли к инфицированной культуре клеток в различные моменты времени по отношению к моменту заражения, затем после прохождения одного вирусного цикла (8 ч) оценивали инфекционную активность сформировавшегося вирусного потомства. Результаты опыта суммированы в табл. 1. и для наглядности представлены на рис. 1.

Как видно из представленных данных, присутствие экстракта ладанника на всём протяжении эксперимента (от точки -2 до точки 8 ч после инфицирования) приводила к достоверному снижению активности продукции инфекционного вируса на 4 порядка. При этом предварительная инкубация клеток с экстрактом ладанника (от -2 до -1 ч, т. е. за час до инфицирования) не влияла на титр вируса, что позволяет утверждать, что экстракт ладанника воздействует на вирусную, а не на клеточную мишень.

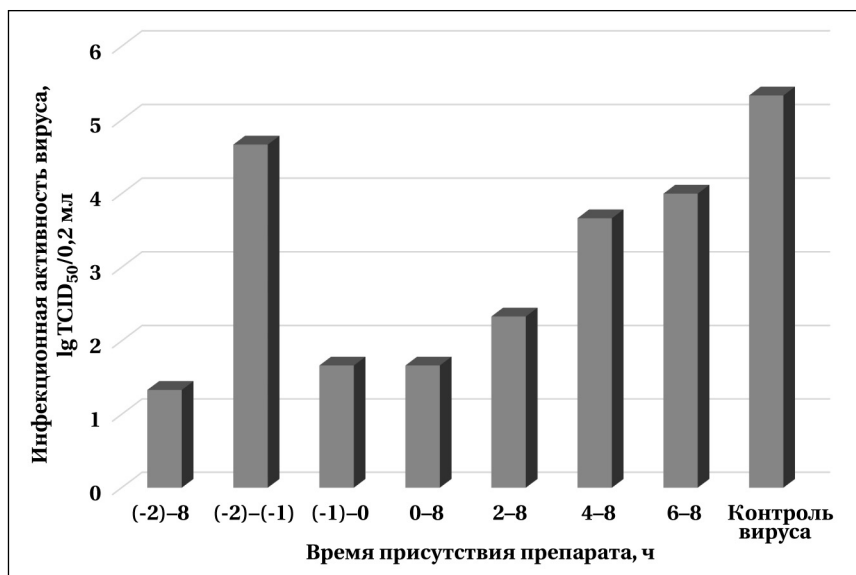


Рис. 1. Влияние экстракта ладанника шалфеелистного на инфекционную активность вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в клетках MDCK в зависимости от времени добавления в культуру.

Инкубация заражённых клеток с экстрактом ладанника на всех остальных стадиях вирусной репродукции приводила к снижению инфекционной активности вирусного потомства. Этот эффект был наиболее выражен при одновременной инкубации кле-

Таблица 2. Антирецепторсвязывающая активность экстракта ладанника шалфеелистного в отношении гемагглютинаина вирусов гриппа разных типов и подтипов

Вирус гриппа	Гемагглютинирующий титр вируса (ГАЕ/0,05 мл) в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного, мкг/мл					
	200	100	50	25	12,5	0
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	>1:512	>1:512	<1:64	<1:64	1:128	1:512
A/California/07/09 (H1N1)pdm09	>1:256	>1:256	<1:32	<1:32	1:32	1:256
A/Aichi/2/68 (H3N2)	>1:256	>1:256	<1:32	<1:32	1:32	1:256
A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2)	>1:1024	>1:1024	1:256	1:256	1:256	1:1024
A/Anhui/1/13 (H7N9)	>1:256	>1:256	<1:32	<1:32	1:64	1:256
B/Florida/04/06	>1:512	>1:512	<1:64	<1:64	<1:64	1:512

Примечание. Цветом выделены значения гемагглютинирующего титра, обусловленные неспецифическим связыванием компонентов экстракта с эритроцитами.

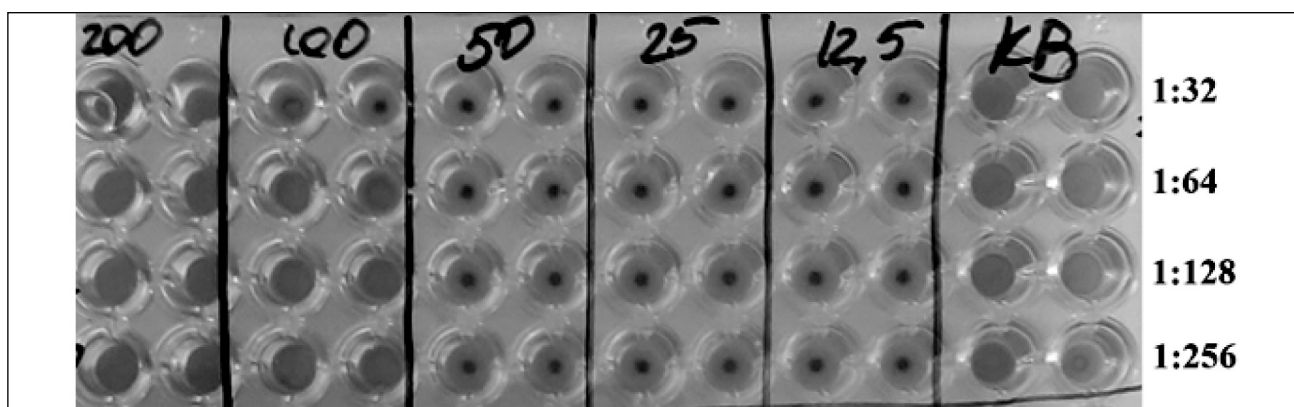


Рис. 2. Ингибирование рецепторсвязывающей активности гемагглютинаина вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) экстрактом ладанника шалфеелистного.

По вертикали — разведения вируса. По горизонтали — концентрация экстракта ладанника (мкг/мл).

Таблица 3. Фузогенная активность гемагглютинаина вирусов гриппа в присутствии экстракта ладанника

Состав реакционной смеси	OD ₄₀₅ в присутствии вируса*					
	PR	PN	AN	AI	CL	FL
Э	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Э+В	-0,0036	0,0514	0,0708	0,0068	0,0008	0,0720
Э+М	0,0184	0,0665	0,0732	0,0285	0,0754	0,0674
Э+В+М	0,0652	0,1077	0,1387	0,0964	0,0763	0,1743
Э+Л	0,0573	0,0703	0,0740	0,0470	0,0672	0,0561
Э+Л+М	0,1546	0,1546	0,1505	0,1192	0,1608	0,2568
Э+Л+М+В	0,1607	0,2185	0,2125	0,1341	0,2104	0,2208

Примечание. Э – эритроциты; В – вирус; М – MES-буфер; Л – экстракт ладанника. Обозначения вирусов: PR – A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); PN – A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2); AN – A/Anhui/1/13 (H7N9); AI – A/Aichi/2/68 (H3N2); CL – A/California/07/09 (H1N1)pdm09; FL – B/Florida/04/06. * – значения оптической плотности представлены за вычетом фона пустых лунок и фона эритроцитов.

ток с вирусом и экстрактом (–1–0 ч), а также на ранних стадиях вирусного цикла (0–2 ч после инфицирования). При добавлении экстракта ладанника на более поздних стадиях его ингибирующее влияние ослабевало, однако разница в титрах вируса с контрольной группой оставалась достоверной вплоть до срока 4 ч после инфицирования клеток.

2. Оценка способности препарата ингибировать рецепторсвязывающую активность гемагглютинаина вируса гриппа. Для расшифровки механизмов способности экстракта ладанника блокировать ранние этапы репродукции вируса гриппа была изучена его способность блокировать рецепторсвязывающую активность вирусного гемагглютинаина. Результаты тестирования суммированы в табл. 2 и на для иллюстрации представлены на рис. 2.

Как видно из представленных данных, использование экстракта ладанника приводило к потере вирусом гемагглютинирующих свойств. Так, уже в наименьшей из использованных концентраций экстракт ладанника снижал гемагглютинирующую активность вируса гриппа минимум в 8 раз.

3. Оценка способности препарата ингибировать фузогенную активность гемагглютинаина вируса гриппа. Следующая стадия исследований была посвящена изучению антифузогенных свойств экстракта ладанника шалфеелистного. С этой целью была использована тест-система, в которой активность вирусного гемагглютинаина приводила к лизису эритроцитов, степень которого можно было измерить количественно как оптическую плотность раствора, обусловленную выходом из эритроцитов свободного гемоглобина. При наличии у изучаемого препарата ингибирующих свойств добавление его в

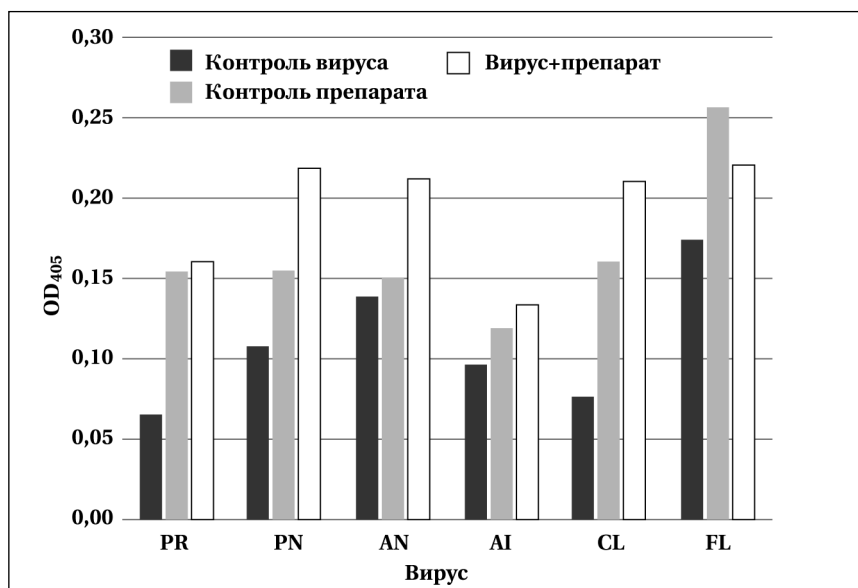


Рис. 3. Фузогенная активность гемагглютинаина вирусов гриппа в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного.

Обозначения вирусов: PR – A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); PN – A/mallard/Pennsylvania/1984 (H5N2); AN – A/Anhui/1/13 (H7N9); AI – A/Aichi/2/68 (H3N2); CL – A/California/07/09 (H1N1)pdm09; FL – B/Florida/04/06.

такую систему должно приводить к снижению оптической плотности благодаря угнетению мембранотропной активности гемагглютинаина.

Результаты, полученные в ходе опыта, суммированы в табл. 3 и для наглядности представлены на рис. 3.

Как видно из представленных данных, само по себе закисление среды в присутствии экстракта ладанника (см. табл. 3, группа опыта Э+Л+М) приводило к деструкции мембраны эритроцитов, что проявлялось в повышении OD₄₅₀. Введение в такую реакционную смесь вируса гриппа приводило к дополнительному повышению, а не снижению, показателя OD₄₅₀ (см. табл. 3, группа опыта Э+Л+М+В). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что экстракт ладанника не обладает антифузогенной активностью в отношении вирусного гемагглютинаина, и что его

НА-блокирующие свойства обусловлены исключительно рецепторсвязывающим действием.

4. Изучение ингибирующей активности препарата в отношении респираторных вирусов человека. На следующей стадии исследования была изучена вирусингибирующая активность экстракта ладанника в отношении респираторных вирусов человека в опытах *in vitro*. В качестве критериев эффективности для каждой линии клеток рассматривались значения IC_{50} и снижение титра вируса (ΔT) при максимальной нетоксичной концентрации экстракта ладанника. Полученные данные представлены в разделах 4.1–4.2 и суммированы на рис. 4.

4.1. Аденовирус (Ad5). Результаты изучения активности экстракта ладанника в отношении аденовируса человека суммированы в табл. 4.

Видно, что экстракт ладанника проявляет дозозависимую активность в отношении аденовируса человека. Основываясь на полученных данных, значение IC_{50} было рассчитано как 29,3 мкг/мл, что с учётом показателей цитотоксичности (190 мкг/мл) даёт значение индекса селективности 6. Максимальная нетоксичная концентрация экстракта снижала вирусный титр на 3 порядка.

4.2. Вирус парагриппа человека. Результаты изучения активности экстракта ладанника в отношении вируса парагриппа человека суммированы в табл. 5.

Видно, что экстракт ладанника проявляет дозозависимую активность в отношении вируса парагриппа человека. Основываясь на полученных данных, значение IC_{50} было рассчитано как 10,5 мкг/мл, что с учётом показателей цитотоксичности (190 мкг/мл) даёт значение индекса селективности 18, что характерно для препаратов с выраженной противовирусной активностью. Максимальная нетоксичная концентрация экстракта снижала вирусный титр на 2,3 порядка.

5. Изучение способности экстракта ладанника шалфеелистного блокировать сорбцию вирионов гриппа на клетках-мишенях. Для подтверждения данных о способности экстракта ладанника блокировать сорбцию вирионов гриппа на поверхности клеток были проведены эксперименты по непосредственной визуализации этого процесса. С этой целью проводили сорбцию вирионов гриппа

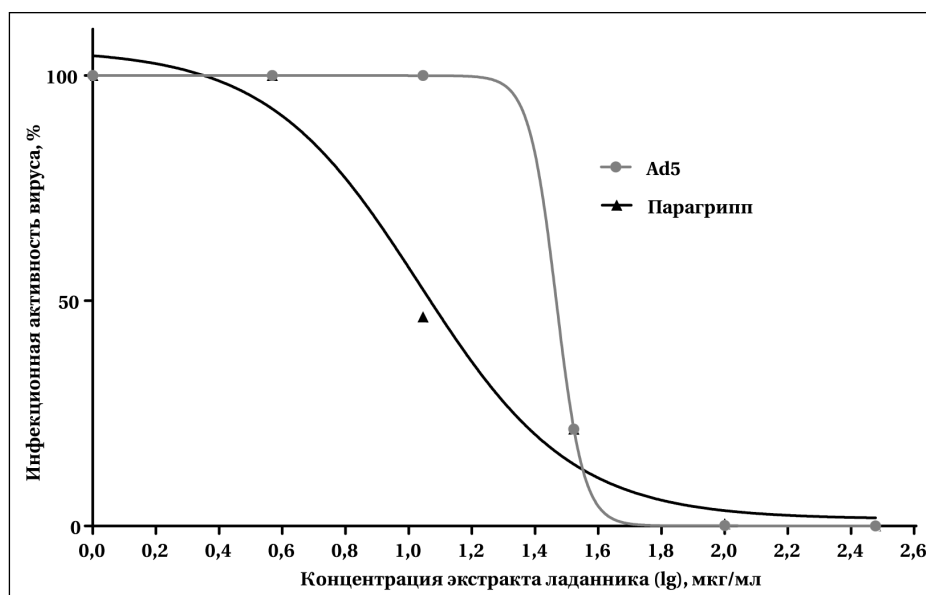


Рис. 4. Ингибирующая активность экстракта ладанника в отношении аденовируса человека и вируса парагриппа человека.

Таблица 4. Репродукция аденовируса человека 5-го типа в клетках Vero в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного

Концентрация препарата, мкг/мл	Титр аденовируса (lg TCID ₅₀ /0,2 мл)
0 (контроль вируса)	6,0±0,0
3	6,0±0,0
10	6,0±0,0
30	5,3±0,6
100	3,0±0,0
300	0,0±0,0
$IC_{50}=29,3$ мкг/мл	

Таблица 5. Репродукция парагриппа человека в клетках МА-104 в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного

Концентрация препарата, мкг/мл	Титр аденовируса (lg TCID ₅₀ /0,2 мл)
0 (контроль вируса)	4,0±0,0
3	4,0±0,0
10	3,7±0,6
30	3,3±0,6
100	1,7±0,6
300	0,3±0,6
$IC_{50}=10,8$ мкг/мл	

на клетках MDCK в присутствии и отсутствии экстракта, после чего клетки изучали при помощи электронной микроскопии.

Как было показано в ходе ультраструктурных исследований, клетки интактной культуры MDCK имели округлую или овальную форму и содержали крупное центрально расположенное ядро. Плазматическая мембрана была гладкой, на поверхности клеток отмечались отдельные микроворсинки. В цитоплазме находились многочисленные округлые или овальные митохондрии, вакуоли гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети. В вакуолях определялись рыхлые округлые тела

умеренной электронной плотности. Аппарат Гольджи был представлен скоплениями уплощённых цистерн, вакуолями и микропузырьками. Ядерный хроматин в нуклеоплазме в виде конденсатов располагался по всему объёму ядра или был частично смещен к периферии. В центре каждого ядра обнаруживались крупные ядрышки (рис. 5).

Через час после инкубации клеток с вирусом ультраструктура цитоплазмы и ядер не отличалась от соответствующих структур клеток интактной культуры. Однако на поверхности клеток отмечались многочисленные вирионы, сорбированные на плазматической мембране (рис. 6), что свидетельствует о наличии у использованного вируса полноценных молекул гемагглютинаина, обеспечивающих прикрепление вирусных частиц к клеточным рецепторам.

В случае инкубации клеток с вирусом в присутствии экстракта ладанника ультраструктура поверхности клеток кардинально отличалась от таковой в контрольных образцах без экстракта. Вирионы на поверхности клеток практически отсутствовали, и морфология клеточной поверхности была практически идентичной интактным клеткам MDCK (рис. 7).

Таким образом, полученные результаты служат дополнительным подтверждением того, что механизм действия экстракта ладанника заключается в блокировке процесса прикрепления вирусных частиц к поверхности клеток-мишеней.

6. Изучение протективной активности экстракта ладанника шалфеелистного на модели *in vivo*. Для исследования противовирусных свойств экстракта ладанника на модели гриппозной инфекции у животных были проведены эксперименты, направленные на изучения его способности снижать уровень гибели мышей при местном применении. Для этого экстракт ладанника вводили в дыхательные пути животных, после чего через различные промежутки времени животных заражали вирусом гриппа. При наличии у экстракта способности инактивировать вирионы и препятствовать их связыванию с клеткой

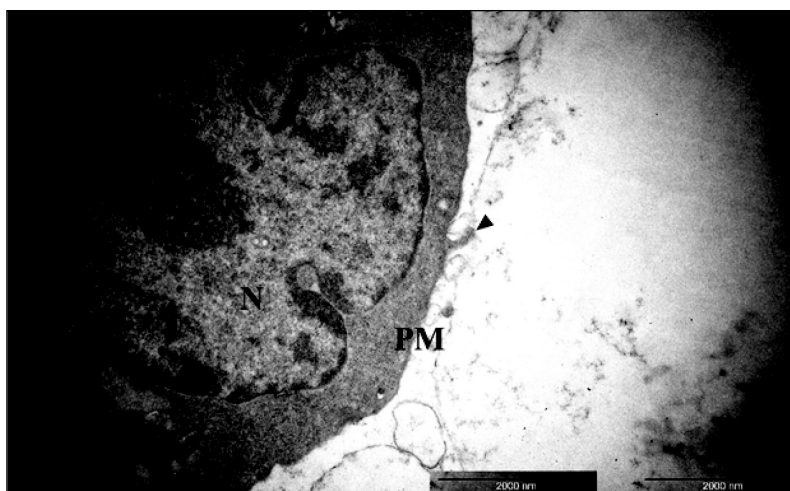


Рис. 5. Клетка интактной культуры MDCK.

N — ядро, Ns — ядрышко, PM — плазматическая мембрана. Стрелкой указана микроворсинка.

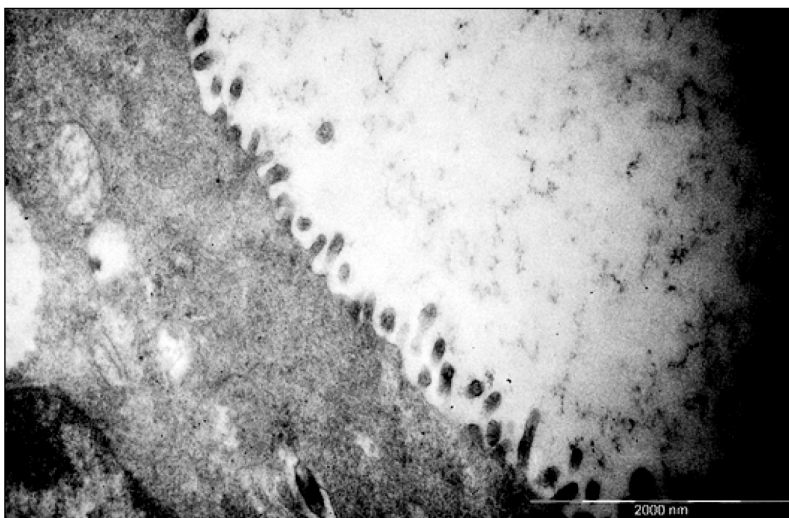


Рис. 6. Вирионы гриппа, сорбированные на поверхности клетки MDCK через 1 ч совместной инкубации.

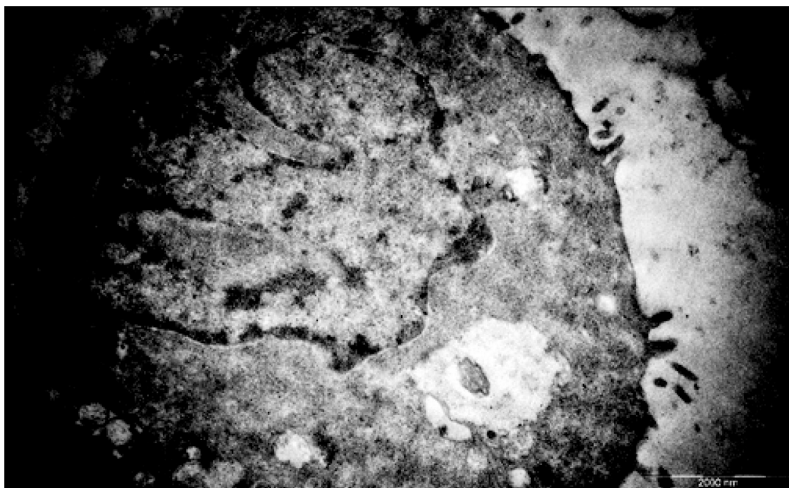
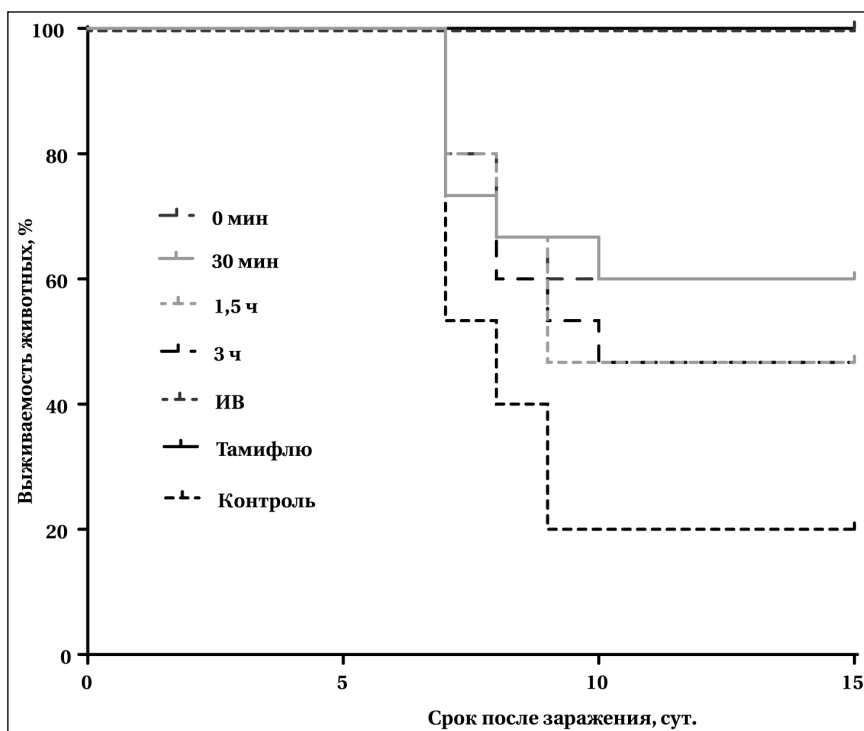


Рис. 7. Клетка MDCK после 1 ч инкубации с вирусом гриппа в присутствии экстракта ладанника шалфеелистного.

Таблица 6. Протективная активность экстракта ладанника шалфеелистного на модели летальной гриппозной инфекции у белых мышей в зависимости от срока применения по отношению к моменту заражения

Группа опыта (время введения перед заражением)	Показатели патологического процесса			
	пало/заражено, шт.	смертность, %	индекс защиты, %	p^*
Группа 1 (3 ч)	8/15	53	29	0,1192
Группа 2 (1,5 ч)	8/15	53	29	0,0908
Группа 3 (30 мин)	6/15	40	47	0,0310
Группа 4 (0 мин)	6/15	40	47	0,0314
Группа 5 (предварительно инкубированный вирус)	0/15	0	100	<0,0001
Группа 6 (Тамифлю)	0/15	0	100	<0,0001
Группа 7 (контроль вируса)	12/15	75	0	1,0000

**Рис. 8.** Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в условиях применения экстракта ладанника шалфеелистного.

можно было ожидать снижения уровня смертности мышей по сравнению с контрольной группой.

Результаты исследования суммированы в табл. 6 и представлены на рис. 8.

Как видно из приведённых данных, инфицирование мышей вирусом гриппа приводило к гибели животных начиная с 7-го дня после инфицирования. В контрольной группе через 14 дней эксперимента гибель составила 75%. Использование препарата сравнения Тамифлю полностью предотвращало гибель животных (индекс защиты 100%).

Экстракт ладанника также проявлял протективную активность при местном применении по профилактической схеме перед заражением животных вирусом гриппа. Применение экстракта одновременно с заражением и за 30 мин до заражения приводило к достоверному снижению гибели животных. Со временем степень защитного

действия снижалась, и через 1,5 и 3 ч после применения экстракта достоверных различий не отмечалось, хотя смертность в этих группах была также ниже, чем в контроле.

Предварительная инкубация вируса с экстрактом ладанника приводила к полной потере вирусом инфекционной активности. Заражение животных таким вирусом вообще не приводило к гибели животных.

Таким образом, полученные данные подтверждают способность экстракта ладанника к блокировке вирусных белков, обеспечивающих связывание вируса с клеткой, что объясняет его длительное профилактическое действие на модели гриппозной инфекции у мышей.

Обсуждение результатов

Противовирусная активность экстрактов растений рода *Cistus* продемонстрирована во

многих исследованиях. Так, благодаря присутствию терпеноидов лабданового типа экстракт критского ладанника *Cistus creticus* L. ингибирует репродукцию вируса Денге [9], экстракт *Cistus incanus* блокирует ВИЧ-1 и -2, а также псевдовirus с поверхностными белками вирусов Эбола и Марбург [10]. Ранее нами были показаны противогриппозные свойства экстракта ладанника шалфеелистного (*Cistus salvifolius*) [7]. Таким образом, как наши данные, так и результаты других лабораторий свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале растений этого рода.

В настоящем исследовании показана ингибирующая активность экстракта ладанника шалфеелистного против респираторных вирусов человека — гриппа А различных подтипов, гриппа В, вируса парагриппа, аденовируса 5 типа. Максимальную вирусингибирующую

шую активность экстракт ладанника проявляет при одновременной инкубации клеток с вирусом и экстрактом (-1–0 ч), а также на ранних стадиях вирусного цикла (0–2 ч после инфицирования). Полученная временная характеристика активности экстракта ладанника позволяет предполагать, что его противовирусный эффект имеет комплексный характер, и что в его составе содержатся компоненты, блокирующие вирусную репродукцию на разных сроках.

Состав экстракта ладанника был изучен в нескольких работах [11–14]. Было показано, что среди вторичных метаболитов экстракта в большом количестве содержатся вещества полифенольной природы — гликозилированные и негликозилированные флавоноиды, катехины, таннины, антоцианидины, ряд алкалоидов, моно-, ди- и сесквитерпены и др. Для некоторых из этих соединений была изучена их противовирусная, в том числе противогриппозная, активность. Так, было показано, что полифенольные соединения способны блокировать опосредованную MAP-киназами передачу сигнала, контролирующего ядерно-цитоплазматический транспорт рибонуклеопротеинов вируса гриппа, а также редокс-чувствительные сигнальные пути, контролирующие процессинг вирусного гемагглютинина [15]. При помощи компьютерного моделирования было продемонстрировано, что полифенольные соединения класса флавоноидов и их производных способны связываться с активным центром вирусной нейраминидазы [16].

Ведущим механизмом, однако, является ингибирование ранних этапов вирусной репродукции, в том числе процесса сорбции вируса на клетки при контакте экстракта ладанника с внеклеточными вирионами. Экстракт ладанника приводил к потере вирусами гриппа гемагглютинирующих свойств. Этот эффект был продемонстрирован нами в отношении широкого спектра вирусов, различающихся по типу и подтипу, в том числе вирусов гриппа птиц H5N2 и H7N9. При этом экстракт ладанника не проявлял антифузогенной активности в отношении вирусного гемагглютинина. Аналогичные свойства были показаны для конъюгатов тритерпеновых соединений с полифенольными фрагментами [17]. Индивидуальные соединения растительного происхождения класса полифенолов (хлорогеновая кислота, кверцетин, кемпферол и их производные) также обладали способностью блокировать сорбцию вируса гриппа на поверхности клеток [18], что говорит о соответствии наших данных и данных, полученных в других лабораториях. Более того, при помощи электронной микроскопии нами непосредственно показано, что

экстракт ладанника препятствует сорбции вирусных частиц на клетке, что проявляется резко сниженным их количеством по сравнению с контрольной клеточной культурой.

В настоящем исследовании также показано, что экстракт ладанника проявляет дозозависимую активность в отношении аденовируса человека и вируса парагриппа человека. Вирус парагриппа оказался наиболее чувствителен к действию экстракта, тогда как активность его в отношении аденовируса была умеренной. Такие результаты можно объяснить разными способами проникновения в клетку оболочечных (грипп, парагрипп) и безоболочечных (аденовирус) вирусов. Возможно, белок слияния вируса парагриппа, как и гемагглютинин вируса гриппа, является мишенью для компонентов экстракта благодаря структурному и функциональному сходству этих белков, тогда как аденовирус проникает в клетку при помощи других механизмов.

Наконец, нами показано, что экстракт ладанника обладает протективной активностью при местном применении перед заражением животных вирусом гриппа. Применение экстракта одновременно с заражением и за 30 мин до заражения приводило к достоверному снижению гибели животных. Со временем степень защитного действия снижалась, и через 1,5 и 3 ч после применения экстракта достоверных различий не отмечалось, хотя смертность в этих группах была также ниже, чем в контроле. При этом предварительная инкубация вируса с экстрактом ладанника приводила к полной потере вирусом инфекционной активности. Заражение животных таким вирусом вообще не приводило к гибели животных. Полученные данные подтверждают способность экстракта ладанника к блокировке вирусных белков, обеспечивающих связывание вируса с клеткой, что объясняет его длительное профилактическое действие на модели гриппозной инфекции у мышей.

В целом, можно заключить, что комплексный химический состав экстракта ладанника обеспечивает его многофакторное ингибирующее действие на вирус гриппа. Благодаря наличию разных соединений, воздействующих на разные вирусные мишени и стадии вирусной репродукции, экстракт ладанника обладает высокой степенью и широким спектром противовирусной активности, и с этой точки зрения его можно рассматривать как эффективное комплексное противовирусное средство. Следует также отметить, что в отношении такого средства маловероятно развитие вирусной резистентности, поскольку в этом случае от устойчивого вируса потребуются одновременное приобретение мутаций в разных генах, кодирующих разные вирусные мишени [19].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ruuskanen O., Meurman O., Sarkkinen H. Adenoviral diseases in children: a study of 105 cases. *Pediatrics* 1985; 76: 79–83.
2. Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* 2013; 98 (2): 174–185.
3. Steel J., Lowen A.C. Influenza A virus reassortment. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; 385: 377–401.
4. Ehrhardt C., Hrinčius E.R., Korte V. et al. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 338–347.
5. Droebner K., Ehrhardt C., Poetter A. et al. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res* 2007; 76: 1: 1–10.
6. Kalus U., Grigorov A., Kadecki O. et al. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res* 2009; 84: 3: 267–271.
7. Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Зарубаев В.В. Противовирусная активность экстракта ладанника шалфейлистного (*Cistus salvifolius*) в отношении вируса гриппа. Антибиотики и химиотер. — 2017. — Т. 62. — № 5–6. — С.12–20. / Lavrent'eva I.N., Sukhobaevskaya L.P., Zarubaev V.V. Protivovirusnaya aktivnost' ekstrakta ladannika shalfeelistnogo (*Cistus salvifolius*) v otnoshenii virusa grippa. Antibiotiki i Khimioter 2017; 62 (5–6): 12–20. [in Russian]
8. Maeda T., Kawasaki K., Ohnishi S. Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2 *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78 (7): 4133–4137.
9. Kuchta K., Tung N.H., Ohta T., Raekiansyah M., Gröttinger K., Rausch H., Shoyama Y., Rauwald H.W., Morita K. The old pharmaceutical oleoresin labdanum of *Cistus creticus* L. exerts pronounced *in vitro* anti-dengue virus activity. *J Ethnopharmacol* 2020; 257: 112316.
10. Rebensburg S., Helfer M., Schneider M., Koppensteiner H., Eberle J., Schindler M., Gürtler L., Brack-Werner R. Potent *in vitro* antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. *Sci Rep* 2016; 6: 20394.
11. Dimcheva V., Kaloyanov N., Karsheva M. The polyphenol composition of *Cistus incanus* L., *Trachystemon orientalis* L. and *Melissa officinalis* L. infusions by HPLC-DAD method. *Open J Anal Bioanal Chem* 2019; 3 (1): 031–038.
12. Sayah K., Marmouzi I., Naceiri Mrabti H., Cherrah Y., Faouzi M.E. Antioxidant activity and inhibitory potential of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 2789482. doi.org/10.1155/2017/2789482
13. Papaefthimiou D., Papanikolaou A., Falara V., Givanoudi S., Kostas S., Kanellis A.K. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem* 2014; 2: 35.
14. Barrajón-Catalán E., Fernández-Arroyo S., Roldán C., Guillén E., Saura D., Segura-Carretero A., Micol V. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem Anal* 2011; 22 (4): 303–312.
15. Fioravanti R., Celestino I., Costi R., Cuzzucoli Crucitti G., Pescatori L., Mattiello L., Novellino E., Checconi P., Palamara A.T., Nencioni L., Di Santo R. Effects of polyphenol compounds on influenza A virus replication and definition of their mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 2012; 20 (16): 5046–5052.
16. Sadati S.M., Gheibi N., Ranjbar S., Hashemzadeh M.S. Docking study of flavonoid derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Biomed Rep* 2019; 10 (1): 33–38.
17. Li H., Li M., Xu R., Wang S., Zhang Y., Zhang L., Zhou D., Xiao S. Synthesis, structure activity relationship and *in vitro* anti-influenza virus activity of novel polyphenol-pentacyclic triterpene conjugates. *Eur J Med Chem* 2019; 163: 560–568.
18. Derksen A., Kühn J., Hafezi W., Sendker J., Ehrhardt C., Ludwig S., Hensel A. Antiviral activity of hydroalcoholic extract from *Eupatorium perfoliatum* L. against the attachment of influenza A virus. *J Ethnopharmacol* 2016; 188: 144–52.
19. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., Manicassamy B. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr Med Chem* 2018; 25 (38): 5115–5127.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Есаулкова Яна Леонидовна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Мурылева Анна Андреевна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Синегубова Екатерина Олеговна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Беляевская Светлана Валентиновна — старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Гаршинина Анжелика Валерьевна — старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Киреева Марина Владимировна — студентка магистратуры каф. микробиологии биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург

Волобуева Александрина Сергеевна — младший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Слита Александр Валентинович — к. б. н., старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Кадырова Рената Анваровна — старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Зарубаев Владимир Викторович — д. б. н., старший научный сотрудник лаб. экспериментальной вирусологии, Федеральное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург