

СКЛАД, АНТИОКСИДАНТНА ТА ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ РОСЛИННОГО ЕКСТРАКТУ *ANOECTOCHILUS ROXBURGHII* (Wall.) Lindl.

*Лагута І.В.*¹, *Ставинська О.М.*¹, *Кузема П.О.*¹, *Аніщенко В.М.*², *Іванніков Р.В.*³,
*Salmeron A.-L.*⁴, *Рибалко С.Л.*⁴, *Архінова М.А.*⁴, *Старосила Д.Б.*⁴, *Дерябін О.М.*⁴

¹Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, icvmtt34@gmail.com

²Інститут фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, Київ

³Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Київ, Україна

⁴ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України”, Київ, Україна

Зростання інтересу до медичного використання лікарських рослин обумовлюється їх високою ефективністю і нешкідливістю при тривалому лікуванні хронічних хвороб. У фітотерапевтичній практиці використовуються збори та галенові препарати на їх основі. Терапевтичні властивості фітозасобів, зазвичай, визначаються біохімічним складом рослин. Останнім часом значну увагу приділяють дослідженню здатності природних флавоноїдів з антиоксидантними та антимікробними властивостями інгібувати коронавірусну інфекцію.

Потенційно цікавою групою рослин – джерелом антиоксидантних та антимікробних агентів – є рослини родини орхідних (Orchidaceae Juss.). Орхідні традиційно використовуються в східній медицині, особливо в країнах Східної та Південної Азії, де ці рослини широко розповсюджені в природі. В умовах помірного клімату орхідні вирощують в оранжереях чи в умовах *in vitro*. Наші попередні дослідження показали, що одержані з таких рослин екстракти містять флавоноїди, володіють антиоксидантними властивостями і, ймовірно, можуть проявляти противірусну активність.

Метою даної роботи було проаналізувати склад екстракту *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl., дослідити його антирадикальну здатність щодо DPPH радикалу та противірусну активність по відношенню до вірусів грипу, герпесу та коронавірусу.

Як сировину для одержання екстракту використовували листки орхідеї *A. roxburghii* із стерильної культури. Листки подрібнювали та заливали етанолом з розрахунку 10 мл на 1 г сировини. Екстракцію проводили під дією ультразвуку протягом 2 год при температурі 60°C.

Якісний аналіз складу екстрактів виконували за допомогою методів високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та мас-спектрометрії з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією (МАЛДІ MS).

Для оцінки антирадикальної активності екстракту використовували реакцію зі стабільним вільним радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом (DPPH). До 1 мл досліджуваного екстракту додавали 2 мл 70%-го етанолу та 2 мл 0,15 мМ розчину DPPH у 70%-му етанолі. Суміш перемішували, концентрацію стабільних радикалів у різний час після початку реакції визначали спектрофотометрично за зміною оптичної густини при максимумі поглинання розчину DPPH 520 нм. Як контроль використовували розчин з такою ж концентрацією DPPH, але без антиоксидантів.

Противірусну активність екстракту вивчали на експериментальних моделях вірусів грипу (штам A/FM/1/47(H1N1), простого герпесу 2 типу (штам ВН) і на моделі коронавірусу трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС). Дослідження проводили на трьох видах перещеплюваних культур клітин: MDCK (культура клітин нирки собак), ВНК (культура клітин нирки хом'яка), СНЕВ (культура клітин нирки ембріона свині). Інфекційність вірусу встановлювали шляхом титрування інфекційності вірусних матеріалів на культурах клітин методом кінцевих розведень по ЦПД (цитопатогенна дія), а титр інфекційності визначали за методом Кербера-Ашмаріна і виражали в тканинних цитопатичних дозах (IgТЦД₅₀/мл). Результати обраховували через 120 год культивування при 37°C.

Антивірусну дію екстракту оцінювали за допомогою показників СС₅₀ (цитотоксична дія, концентрація екстракту, яка сприяє зменшенню життєздатності культури клітин на 50%), ЕС₅₀ (антивірусна активність, ефективна концентрація екстракту, при якій рівень

реплікації вірусу в інфікованій культурі клітин пригнічується на 50%), та IS (індекс селективності, який розраховується як співвідношення CC_{50} до EC_{50}).

За допомогою методів ВЕРХ та МАЛДІ МС встановлено якісний склад та визначено кількісний вміст основних груп біологічно активних речовин, присутніх у екстракті, зокрема флавоноїдів та фенольних кислот (рис. 1). Флавоноїди в екстрактах переважно представлені антоціанами та флавонолами, зокрема глікозидами цианідину, кверцетину, метилкверцетину та ізорамнетину, у той час як фенольні кислоти – похідними оксикоричних кислот, зокрема похідними кавової, ферулової і *p*-кумарової кислот. Загальна концентрація поліфенольних сполук у екстракті становить 583 мкг на 1 г сировини, в тому числі флавоноїдів – 385 мкг/г.

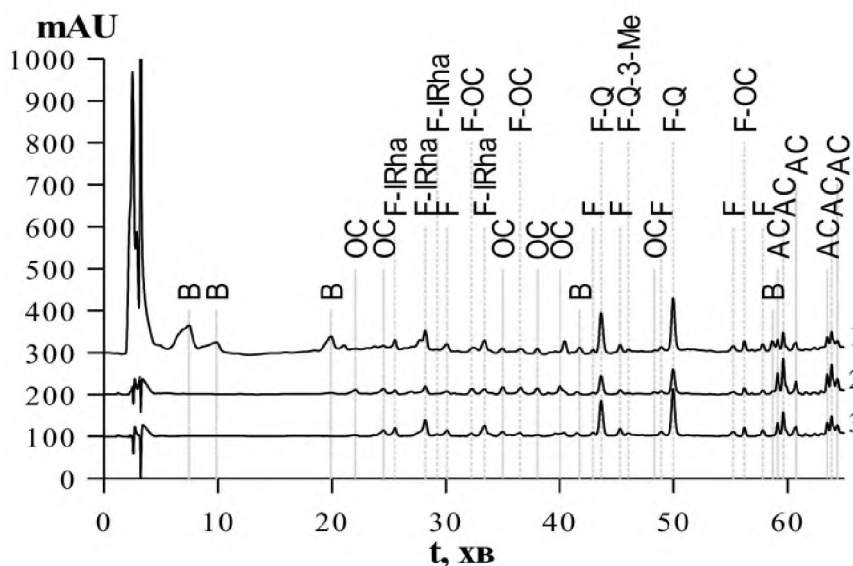


Рис. 1 Фрагмент хроматографи екстракту *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.: детектування при 206 нм (1), 300 нм (2) і 350 нм (3). Умовні позначення піків: В – похідні простих фенолів та оксibenзойних кислот; ОС – похідні оксикоричних кислот; АС – антоціани; F – флавоноли, флавони та їх глікозиди; F-Q, F-Q-3Me – глікозиди кверцетину та метилкверцетину; F-OC – коньюгати глікозидів флавонолів з оксикоричними кислотами; F-IRha – глікозиди ізорамнетину

Екстракт *A. roxburghii* виявляє високу антирадикальну активність у тестовій реакції зі стабільним радикалом DPPH (рис. 2). Як видно з рис. 2, відновлення більшої частини радикалів DPPH відбувається в перші 5 хв, що свідчить про наявність в екстрактах біологічно активних сполук, які характеризуються швидкою кінетикою відновлення радикалів і відносяться до найактивніших антиоксидантів. Одержані дані узгоджуються з результатами ВЕРХ та МАЛДІ досліджень.

Результати дослідження антивірусної активності екстракту *A. roxburghii* представлено в таблиці. Як видно з наведених даних, рослинний екстракт ефективно інгібує репродукцію всіх досліджуваних вірусів (грипу, герпесу, ТГС) на 2,0–5,0 $lgTCID_{50}/мл$ з індексом селективності від 80 до 160, що свідчить про високий рівень антивірусної активності екстракту *A. roxburghii*. Найбільшу інгібуючу ефективність досліджений рослинний екстракт проявив при герпетичній інфекції.