

УДК 575.874

АКТИВНОСТЬ *CHAMAECYTISUS RUTHENICUS* (FABACEAE) В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А (H1N1)

© И.П. Цытышева^{1*}, Е.Г. Галкин¹, Н.И. Федоров², Я.Р. Оршанская³, В.А. Федорова³, В.В. Зарубаев³

¹Уфимский институт химии РАН, пр. Октября, 71, Уфа, 450054 (Россия),
e-mail: tsipisheva@anrb.ru

²Уфимский институт биологии РАН, пр. Октября, 69, Уфа, 450054 (Россия)

³НИИ гриппа Минздрава России, ул. проф. Попова, 15/17,
Санкт-Петербург, 197376 (Россия)

Проведено исследование противогриппозной активности алкалоидов надземной части *Chamaecytisus ruthenicus* (раkitника русского), собранного в период цветения в предгорьях Южного Урала, в отношении вируса гриппа A/California/07/09(H1N1)pdm09. Компонентный состав тестируемых смесей определяли хромато-масс-спектрометрическим методом. Цитотоксичность и противогриппозные свойства суммы алкалоидов *Ch. ruthenicus* и ее фракций были изучены *in vitro* в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09, в качестве препарата сравнения использовали римантадин. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую дозу CTD50, 50% эффективную дозу EC50, а также индекс селективности SI (отношение CTD50 к EC50), характеризующий избирательность действия образца в отношении вируса. Согласно полученным данным наибольшей противогриппозной активностью обладает сумма алкалоидов *Ch. Ruthenicus* (SI = 77), в которой содержатся мажорные алкалоиды спартеин, 17-окоспартеин, лупанин, 10,17-диоксоспартеин, и фракция 4 (SI=52), содержащая спартеин и лупанин. Показано, что рассчитанные индексы селективности (SI) для суммы алкалоидов и отдельных фракций раkitника русского значительно превосходят таковые для препарата сравнения римантадин (SI = 5). Этот факт подтверждает перспективность дальнейшего изучения противовирусных свойств индивидуальных алкалоидов *Ch. rithenicus* с целью поиска новых противогриппозных агентов растительного происхождения.

Ключевые слова: *Chamaecytisus ruthenicus* (Fabaceae), хинолизиндиновые алкалоиды, вирус гриппа А(H1N1), индекс селективности.

Введение

Природные соединения, в том числе и алкалоиды, занимают лидирующие позиции в разработке лекарственных препаратов различных терапевтических групп [1, 2]. Так, среди некоторых представителей семейства *Fabaceae* найдены растения *Sophora*, *Acacia*, *Caragana*, *Thermopsis*, экстракты которых проявляют высокую активность в отношении вирусов гепатита В и С, вируса простого герпеса и вируса гриппа А(H1N1) [3–8]. В продолжение поиска новых противовирусных агентов среди хинолизиндиновых алкалоидов, содержащихся в растениях семейства *Fabaceae* [8],

Цытышева Инна Петровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: tsipisheva@anrb.ru

Галкин Евгений Григорьевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: spectr@anrb.ru

Федоров Николай Иванович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией, e-mail: fedorov@anrb.ru

Оршанская Яна Рафаэлевна – младший научный сотрудник, e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru

Федорова Виктория Александровна – младший научный сотрудник, e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru

Зарубаев Владимир Викторович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией,
e-mail: zarubaev@influenza.spb.ru

проведено исследование противогриппозной активности алкалоидов надземной части *Chamaecytisus ruthenicus* (раkitника русского), широко распространенного вида горно-лесной зоны Южного Урала.

Экспериментальная часть

Сбор и подготовка растительного сырья.
Надземная часть *Ch. ruthenicus* собрана в конце мая типичного по погодным условиям 2013 г. в окрестностях поселка Меседа (Катав-Ивановского района Че-

* Автор, с которым следует вести переписку.

лябинской области) в период цветения. Видовая принадлежность растения определена доктором биологических наук Н.И. Федоровым (Уфимский институт биологии РАН). Гербарный образец *Ch. ruthenicus* хранится в гербарии УФИБ РАН (№ 49-2013). Обработка растительного сырья подробно описана нами в [8].

Хромато-масс-спектрометрические исследования. Сумму алкалоидов извлекали классическим методом в виде свободных оснований [9]. Колоночную хроматографию проводили на стандартном силикагеле 60 с размером частиц 0,05–0,1 мм (MACHEREY-NAGEL, Германия). Хромато-масс-спектрограммы регистрировались на приборе Thermo Finnigan MAT95XP, метод ионизации – электронный удар 70 eV, температура инжектора – 250 °С, колонка HP-5MS, 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм толщина фазы; режим: начальная температура – 170 °С, 3 мин, изотерма, конечная температура – 260 °С, скорость нагрева – 10 °С·мин⁻¹). Компоненты исследуемых смесей идентифицировали по полным масс-спектрам и по библиотеке хромато-масс-спектрометрических данных при использовании систем обработки данных AMDIS (The Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System [10]). Количественный анализ выполняли методом внутренней нормировки по площадям хроматографических пиков без использования корректирующих коэффициентов, за 100% принимали сумму площадей пиков компонентов.

Изучение цитотоксичности и противовирусной активности. Цитотоксичность и противовирусные свойства образцов, включающих сумму алкалоидов *Ch. ruthenicus*, и фракций после колоночной хроматографии, были изучены в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09. В качестве препарата сравнения использовали римантадин; методики проведения экспериментов подробно описаны в [11, 12]. На основании полученных данных рассчитывали 50% цитотоксическую дозу (CTD₅₀, концентрацию образца, вызывающую гибель 50% клеток), 50% эффективную дозу (EC₅₀, концентрацию образца, вызывающую снижение вирусной продукции на 50%) и индекс селективности (отношение CTD₅₀ к EC₅₀), характеризующий избирательность действия образца в отношении вируса по сравнению с клетками.

Результаты и обсуждение

Вес выделенных алкалоидов надземной части *Ch. ruthenicus* составил 1,3 г (2,6% от веса воздушно-сухого сырья). После разделения полученной суммы алкалоидов методом градиентной колоночной хроматографии на SiO₂ (полярность элюента повышали с CHCl₃ : MeOH = 99 : 1 до CHCl₃ : MeOH = 1 : 1) получили четыре фракции, алкалоидный состав которых был определен хромато-масс-спектрометрически (табл.).

Мажорными компонентами суммы алкалоидов *Ch. ruthenicus* являются известные алкалоиды спартеин, 17-оксоспартеин, лупанин, а также 10,17-диоксоспартеин [13–15]. Анализ фракций после колоночной хроматографии показал, что во фракции **1** (0,125 г) (элюент – смесь CHCl₃ : MeOH = 99 : 1) содержатся 17-оксоспартеин (14%) и лупанин (22%), во фракции **2** (0,500 г) (элюент – смесь CHCl₃ : MeOH = 95 : 5) лупанин (77%) и 10,17-диоксоспартеин (4%). По мере повышения полярности элюента распределение алкалоидов становится следующим: фракция **3** (0,300 г) (CHCl₃ : MeOH = 7 : 1), обогащенная спартеином (57%), содержит также лупанин (4%), а фракция **4** (0,325 г) (CHCl₃ : MeOH = 1 : 1) – в основном спартеин (75%) и лупанин (2%).

Противогриппозная активность узких фракций и суммы алкалоидов *Chamaecytisus ruthenicus*, произрастающего на Южном Урале

Алкалоид	RRT ^a	M ⁺	Q ^b	Σ	Содержание алкалоидов, % ^b			
					I	II	III	IV
Спартеин	0,54	234	98	28	–	–	57	75
17-оксоспартеин	0,90	248	96	4	14	–	–	–
Лупанин	1,00	248	99	54	22	77	4	2
10,17-диоксоспартеин	1,09	262	87	1	–	4	–	–
		CTD ₅₀ , мкг/мл ^f		> 300	183	> 300	190	171
		EC ₅₀ , мкг/мл ^g		3,9	4,5	7,6	24,3	3,3
		SI ^e		77	41	39	8	52

Примечания: ^a относительный индекс удерживания (RT d-лупанина 1,00); ^b вероятность сходства зарегистрированных и библиотечных спектров; ^c от веса фракции; ^d МТТ-тест, клетки MDCK (ATCC CCL-34); ^e в отношении вируса гриппа A/California/07/09(H1N1)pdm09, полученного из Центра по контролю за заболеваемостью (CDC, Atlanta, USA); ^f отношение CTD₅₀/EC₅₀.

Согласно экспериментальным данным цитотоксичность суммы алкалоидов *Ch. ruthenicus*, а также фракций 1–4 была невысока, значения CTD_{50} лежали в интервале от 171 до 300 мкг/мл (табл.). Индексы селективности (SI), рассчитанные как отношение CTD_{50}/EC_{50} , для суммы алкалоидов и четырех фракций составили: SI = 41, 39, 8, 52 и 77 соответственно.

Анализ значений EC_{50} позволяет сделать вывод, что наибольшей противогриппозной активностью обладает фракция 4 ($EC_{50}=3,3$ мкг/мл). Несмотря на максимальную токсичность ($CTD_{50} = 171$ мкг/мл), среди изученных фракций она проявила максимальный противовирусный эффект (SI = 52).

Выводы

Несмотря на относительно невысокие значения SI фракций суммы алкалоидов ракичника русского значительно превосходят таковые для препарата сравнения римантадин (SI = 5 [11]). Также для четырех из пяти исследованных образцов значения SI выше 10, что свидетельствует об их потенциале в качестве противовирусных средств, а также об иной, отличной от римантадина мишени в жизненном цикле вируса.

Необходимо отметить, что активность суммы алкалоидов *Ch. ruthenicus* несколько выше, чем активность каждой из составляющих фракций (табл.). Этот эффект, по-видимому, связан с различием в механизме действия ее индивидуальных компонентов, что может приводить к усилению ингибирования репродукции вируса гриппа при их совместном использовании.

Таким образом, дальнейшее выделение и изучение противовирусных свойств индивидуальных алкалоидов *Ch. ruthenicus*, включая минорные, являются необходимым этапом на пути поиска новых противогриппозных агентов растительного происхождения.

Список литературы

1. Stratton C.F., Newman D.J., Tan D.S. Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. Vol. 25. Pp. 4802–4807.
2. Gullo V.P., Mc-Alpine J., Lam K.S., Baker D., Petersen F. Drug discovery from natural products // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 3. Pp. 523–531.
3. Ding P.-L., Huang H., Zhou P., Chen D.-F. Quinolizidine Alkaloids with Anti-HBV Activity from *Sophora tonkinensis* // *Planta Med.* 2006. Vol. 72. Pp. 854–856.
4. Ding P.-L., Liao Zh.-X., Huang H., Zhou P., Chena D.-F. (+)-12a-Hydroxysophocarpine, a new quinolizidine alkaloid and related anti-HBV alkaloids from *Sophora flavescens* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. Vol. 16. Pp. 1231–1235.
5. Rehman S., Ashfaq U.A., Riaz S., Javed T., Sheikh Riazuddin. Antiviral activity of *Acacia nilotica* against Hepatitis C Virus in liver infected cells // *Virology Journal.* 2011. Vol. 8. Pp. 220–225.
6. Atta-ur-Rahman, Choudhary M.I., Parvez K., Ahmed A., Akhtar F., Nur-e-Alam M., Hassan N.M. Quinolizidine Alkaloids from *Sophora alopecuroides* // *J. Nat. Prod.* 2000. Vol. 63. Pp. 190–192.
7. Woo E.-R., Kim H.J., Kwak J.H., Lim Y.K., Park S.K., Kim H.S., Lee Ch.-K., Park H. Anti-herpetic activity of various medicinal plant extracts // *Arch. Pharm. Res.* 1997. Vol. 20. Pp. 58–67.
8. Tsypysheva I.P., Galkin E.G., Baikova I.P., Fedorov N.I., Petrova P.R., Orshanskaya Ya.R., Fedorova V.A., Zarubaev V.V. Activity of *Thermopsis schischkinii* alkaloids against influenza A(H1N1)pdm09 virus // *Chem. Nat. Compd.* 2015. Pp. 1003–1005.
9. Минина С.А., Каухова И.Е. Химия и технология фитопрепаратов. М., 2009. 560 с.
10. D'Arcy P., Mallard W.G., Reed J. *Amdis Manual*. Gaithersburg, 2005.
11. Tsypysheva I.P., Koval'skaya A.V., Lobov A.N., Zarubaev V.V., Karpinskaya L.A., Petrenko I.A., Nikolaeva E.A., Shtro A.A., Yunusov M.S. Search for compounds with antiviral activity among synthetic (-)-cytosine derivatives // *Chem. Nat. Compd.* 2013. Vol. 48. Pp. 1042–1046.
12. Zarubaev V.V., Golod E.L., Anfimov P.M., Shtro A.A., Saraev V.V., Gavrilov A.S., Logvinov A.V., Kiselev O.I. Synthesis and anti-viral activity of azolo-adamantanes against influenza A virus // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. Vol. 8. Pp. 839–848.
13. Saxton J.E. *The Alkaloids*. Vol. 4. Royal Society of Chemistry. 1974. 453 p.
14. Buckingham J. *Dictionary of Natural Products*. Vol. 3. CRC Press. 1993. 8584 p.
15. Glasby J. *Encyclopedia of the Alkaloids*. Vol. 3. Springer Science & Business media. 2012. 520 p.

Поступило в редакцию 4 февраля 2016 г.

После переработки 9 марта 2016 г.

Tsypysheva I.P.^{1*}, *Galkin E.G.*¹, *Fedorov N.I.*², *Orshanskaya Ya.P.*³, *Fedorova V.A.*³, *Zarubaev V.V.*³ ACTIVITY OF CHAMAECYTISUS RUTHENICUS (FABACEAE) AGAINST INFLUENZA VIRUS A (H1N1)PDM09

¹*Ufa Institute of Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 71, pr. Otyabrya, Ufa, 450054 (Russia), e-mail: tsipysheva@anrb.ru.*

²*Ufa Institute of Biology of the Russian Academy of Sciences, pr. Oktyabrya 69, Ufa, 450054 (Russia)*

³*Research Institute of Influenza of MH RF, ul. prof. Popova, 15/17, St. Petersburg, 197376 (Russia)*

Activity of the four fractions of the total alkaloids of *Chamaecytisus ruthenicus* (Fabaceae) collected at the flowering period in the South Ural region against influenza virus A (H1N1) was investigated. The components of the alkaloid mixtures were identified by GC/MS method. Cytotoxicity and antifu properties of the sum and fractions of alkaloids *Ch. ruthenicus* have been studied in vitro (MDCK cells and flu virus of a A/California/07/09(H1N1)pdm09); rimantadin was used as a standard drug. CTD50 (50% cytotoxic dose), EC50 (50% effective dose), and also an index of selectivity SI (relation CTD50 to EC50), characterizing the antiviral action have been calculated. According to the obtained data, the sum of alkaloids *Ch. Ruthenicus* (major alkaloids – sparteine contain, 17-oksosparteine, lupanine, 10,17-dioksosparteine) and fraction 4 (major alkaloids – sparteine and lupanine) possess the high antuflu activity (SI = 77 and SI=52). It is shown that the calculated indexes of selectivity (SI) for the sum of alkaloids of *Ch. Ruthenicus* and its fractions considerably surpass those for a standard drug rimantadin (SI = 5). This fact confirms the perspective of the further studying of antiviral properties of individual alkaloids *Ch. rithenicus* for the purpose of search new antifu agents among plant substances.

Keywords: *Chamaecytisus ruthenicus* (Fabaceae), quinolizidine alkaloids, influenza virus A (H1N1)pdm09, index of selectivity.

References

1. Stratton C.F., Newman D.J., Tan D.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, vol. 25, pp. 4802–4807.
2. Gullo V.P., Mc-Alpine J., Lam K.S., Baker D., Petersen F. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, vol. 3, pp. 523–531.
3. Ding P.-L., Huang H., Zhou P., Chen D.-F. *Planta Med.* 2006, vol. 72, pp. 854–856.
4. Ding P.-L., Liao Zh.-X., Huang H., Zhou P., Chena D.-F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, vol. 16, pp. 1231–1235.
5. Rehman S., Ashfaq U.A., Riaz S., Javed T., Sheikh Riazuddin. *Virology Journal.* 2011, vol. 8, pp. 220–225.
6. Atta-ur-Rahman, Choudhary M.I., Parvez K., Ahmed A., Akhtar F., Nur-e-Alam M., Hassan N.M. *J. Nat. Prod.* 2000, vol. 63, pp. 190–192.
7. Woo E.-R., Kim H.J., Kwak J.H., Lim Y.K., Park S.K., Kim H.S., Lee Ch.-K., Park H. *Arch. Pharm. Res.* 1997, vol. 20, pp. 58–67.
8. Tsypysheva I.P., Galkin E.G., Baikova I.P., Fedorov N.I., Petrova P.R., Orshanskaya Ya.R., Fedorova V.A., Zarubaev V.V. *Chem. Nat. Compd.* 2015, pp. 1003–1005.
9. Minina S.A., Kauhova I.E. *Khimiia i tekhnologiia fitopreparatov.* [Chemistry and Technology of herbal remedies]. Moskva, 2009, 560 p. (in Russ.).
10. D'Arcy P., Mallard W.G., Reed J. *Amdis Manual.* Gaithersburg, 2005.
11. Tsypysheva I.P., Koval'skaya A.V., Lobov A.N., Zarubaev V.V., Karpinskaya L.A., Petrenko I.A., Nikolaeva E.A., Shtro A.A., Yunusov M.S. *Chem. Nat. Compd.* 2013, vol. 48, pp. 1042–1046.
12. Zarubaev V.V., Golod E.L., Anfimov P.M., Shtro A.A., Saraev V.V., Gavrilov A.S., Logvinov A.V., Kiselev O.I. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, vol. 8, pp. 839–848.
13. Saxton J.E. *The Alkaloids*, vol. 4, Royal Society of Chemistry, 1974, 453 p.
14. Buckingham J. *Dictionary of Natural Products*, vol. 3, CRC Press, 1993, 8584 p.
15. Glasby J. *Encyclopedia of the Alkaloids*, vol. 3, Springer Science & Business media, 2012, 520 p.

Received February 4, 2016

Revised March 9, 2016

* Corresponding author.