

УДК 577.175.1:578.831:615.37

И. В. НАСОНОВ<sup>1</sup>, М. И. ЛИХАЧЕВА<sup>1</sup>, П. А. КИСЕЛЕВ<sup>2</sup>, Н. И. БОВДЕЙ<sup>2</sup>,  
А. Л. САВЧУК<sup>2</sup>, В. Н. ЖАБИНСКИЙ<sup>2</sup>, Р. П. ЛИТВИНОВСКАЯ<sup>2</sup>, Н. Б. ХРИПАЧ<sup>2</sup>

## НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ КОМПЛЕКСЫ СТЕРОИДНОГО ФИТОГОРМОНА: НОВЫЙ ПОДХОД К ЗАЩИТЕ ОТ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

(Представлено академиком В. А. Хрипачом)

<sup>1</sup>Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслеского, Минск

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Поступило 08.10.2014

**Введение.** Брассиностероиды (БС) – гормоны растений, играющие важную роль в регуляции роста, развития и ряда ключевых физиологических функций [1; 2]. Обработка растений экзогенными БС повышает их урожайность и устойчивость к различного рода стрессам – температурному, солевому, биотическому и др., что было использовано при создании новых эффективных агропрепаратов [3]. В последние годы получили развитие исследования физиологических эффектов БС у животных и человека, ориентированные на создание новых лечебно-профилактических средств. Результатом данных исследований явилось обнаружение различных видов биологического действия, имеющего аналогию с эффектами БС в растениях и перспективного для использования в медицине, например, анаболический и иммуностимулирующий эффекты, антистрессовая активность и защита от патогенов, в том числе, вирусной природы. Эти данные стали предпосылкой для проведения настоящей работы, которая посвящена получению и изучению антивирусных свойств композиций природного стероидного фитогормона, 24-эпибрассинолида, с целью профилактики и лечения вирусных заболеваний птицы.

Интерес, проявляемый к антивирусным препаратам в птицеводстве, обусловлен, прежде всего, тем, что использование живых и инактивированных вакцин не всегда эффективно и оправдано, а обеспеченность неспецифическими, действующими на широкий спектр вирусов средствами очень низка из-за высокой стоимости. Применение стероидных гормонов растений может оказаться наиболее перспективным подходом к решению рассматриваемой проблемы. Применение таких соединений связано, однако, с определенными трудностями, в частности, с плохой растворимостью их в воде, а следовательно, малой биодоступностью.

Целью наших исследований является поиск средств на основе БС для профилактики и лечения скрытопротекающих и латентных вирусных инфекций у птиц. Задача настоящего исследования – получение наноструктурированных комплексов включения, обеспечивающих достаточную растворимость БС, и изучение антивирусных свойств полученных комплексов *in vitro* в отношении вируса инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) на развивающихся эмбрионах кур.

В ходе выполнения работы была показана возможность получения водных растворов БС путем первоначального растворения 24-эпибрассинолида в этиловом спирте и последующего разбавления полученного раствора водой. Полученные данные свидетельствовали о наличии у фитогормона противовирусной активности. Недостатком такого подхода является сравнительно низкая достигаемая концентрация 24-эпибрассинолида и необходимость использования этилового спирта. Перспективной в связи с этим представлялась попытка создания водорастворимого комплекса 24-эпибрассинолида с циклодекстрином. Циклодекстрины – это тороидальные циклические олигомеры, наиболее известные среди которых состоят из 6, 7 или 8 глюкопиранозных звеньев, и имеют название  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов соответственно. В случае образования комплексов включения физические и химические свойства «гостей» могут значительно изме-

няться, что позволяет улучшать прикладные свойства связываемых веществ, например, увеличивать растворимость в воде неполярных субстанций (в 10–100 раз).

**Материалы и методы исследования.** Комплекс готовили по аналогии с работой [4] смешиванием двух растворов: водного раствора  $\gamma$ -циклодекстрина (50 мг в 5 мл воды) и ацетонового раствора 24-эпибрассинолида (19 мг в 2 мл ацетона) в мольном соотношении 1 : 1. Перемешивали 24 ч, затем упаривали досуха, к остатку добавляли 7 мл воды, перемешивали при 37 °С в течение 3–4 ч и раствор центрифугировали.

Для подтверждения факта образования комплекса применяли спектроскопию ЯМР высокого разрешения с использованием спектрометра AVANCE 500 фирмы Брукер-Биоспин с рабочей частотой 500,03 МГц. Образцы растворяли в тяжелой воде и регистрировали сигналы протонного резонанса. Обнаружение сигналов эпибрассинолида, практически нерастворимого в воде в индивидуальном состоянии, и изменение спектральных характеристик циклодекстрина по сравнению со спектром свободного соединения свидетельствует о встраивании стероида во внутреннюю полость молекулы циклодекстрина и об образовании химического комплекса.

Количественное определение 24-эпибрассинолида (ЭБ) в комплексе декстрин-эпибрассинолид проводили методом иммуноферментного анализа [5]. Сущность аналитического метода состоит в следующем: в лунки планшета помещали исследуемый раствор, содержащий то или иное количество эпибрассинолида, и раствор конъюгата эпикастастерона с пероксидазой хрена. Планшет инкубировали при определенной температуре, при этом устанавливается равновесие между брассиностероидом и конъюгатом с пероксидазой хрена с антителами, иммобилизованными предварительно на внутренней поверхности лунок. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами брассиностероида, свободного и связанного антителами соответствующего конъюгата с пероксидазой. Количество связанного антителами конъюгата обратно пропорционально количеству брассиностероида в образце. Во время дальнейшей инкубации содержимого лунок с хромоген/субстратной смесью происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного антителами конъюгата с пероксидазой. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании градуировочной прямой рассчитывается содержание 24-эпибрассинолида в препарате. Полученный раствор комплекса содержал до  $1,9 \cdot 10^{-3}$  моль/л действующего вещества и использовался для приготовления водных растворов различной концентрации.

Для определения противовирусной активности композиции были исследованы концентрации ЭБ в диапазоне  $(0,01–0,50) \cdot 10^{-4}$  моль/л. В каждом варианте исследовали 10 развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ), растворы композиций в воде смешивали с вирусом инфекционного ларинготрахеита птиц (доза  $10 \text{ ЭИД}_{50}$ ) в соотношении 1 : 1. Полученную смесь инкубировали при 4 °С в течение 24 ч, после чего производили заражение девяти суточных эмбрионов на хорион-аллантаисную оболочку в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. В качестве контроля использовали стерильный физиологический раствор, а в качестве контроля вируса использовали смесь вируса и стерильного физиологического раствора в соотношении 1 : 1. В качестве контроля фитогормона брали растворы исследуемых концентраций и смешивали со стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 1. Все полученные контрольные образцы выдерживали при 4 °С в течение 24 ч

Куриные эмбрионы перед заражением вирусом ИЛТ овоскопировали и отбирали для заражения хорошо развитые, активно подвижные, жизнеспособные эмбрионы. Вирусосодержащий материал вносили в аллантаисную полость в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. Зараженные и контрольные куриные эмбрионы помещали в термостат и выдерживали 12–168 ч при температуре 37,5 °С и влажности воздуха 60–70 %. Овоскопию эмбрионов проводили ежедневно в течение 72 ч. По окончании инкубации эмбрионы помещали в холодильные камеры и выдерживали при температуре 2–6 °С в течение 6–18 ч, перед вскрытием эмбрионы выдерживали 2–3 ч при комнатной температуре до испарения конденсата на скорлупе. Затем эмбрионы вскрывали в стерильных боксах. Отбирали пробы экстраэмбриональной жидкости в количестве 1 см<sup>3</sup>. Наличие вируса ИЛТ определяли по характерным патоморфологическим признакам при вскрытии эмбрионов (наличие или отсутствие помутнения и уплотнения хорион-аллантаисной оболочки с образованием на ней мелкозернистых или крупнозернистых бляшек серо-белого цвета величиной 0,5–2,0 мм округлой фор-

мы, кровоизлияния на всех участках тела, а также отклонения в росте, развитии и оперении самого эмбриона).

**Результаты и их обсуждение.** Обнаружение у брассиностероидов выраженной способности повышать устойчивость растений к фитопатогенам и, в частности, к вирусной инфекции [6–10], послужило предпосылкой для изучения возможностей применения БС для борьбы с вирусными заболеваниями человека и животных, которое показало перспективность работы в данном направлении [11; 12]. Одним из препятствий на пути к созданию лекарственных препаратов этого ряда является чрезвычайно низкая растворимость природных БС в воде и, как следствие, их сравнительно невысокая биодоступность. Один из путей решения проблемы – применение БС в составе наномолекулярных комплексов, в роли которых могут выступать соединения включения стероид-циклодекстрин [4]. В качестве последнего, т. е. молекулы «хозяина», наиболее подходящим представляется  $\gamma$ -циклодекстрин, геометрические размеры внутренней полости в молекуле которого наилучшим образом согласуются с размерами молекулы «гостя», т. е. БС. Это предположение было подтверждено рядом экспериментов с участием других представителей циклодекстринов ( $\alpha$ - и  $\beta$ -), а также различных мольных соотношений стероид-циклодекстрин. Изменение характеристик спектра ЯМР молекулы «хозяина» в составе комплекса по сравнению со спектром свободной молекулы циклодекстрина (смещение в слабое поле сигналов протонов звеньев глюкозы) может служить доказательством химического связывания и факта комплексообразования, а регистрация резонансных сигналов молекулы стероида в водном растворе – признаком существенно возросшей растворимости. Ее прямое измерение методом иммуноферментного анализа указывает на возможность увеличения растворимости БС этим путем в 10 и более раз.

Изучением противовирусных свойств композиции декстрин-24-эпибрассинолид на развивающихся куриных эмбрионах против вируса ИЛТ установлена зависимость эффекта от концентрации препаративной формы. Полученные данные приведены в таблице.

**Проявление патологоанатомических изменений при экспериментальном заражении эмбрионов птиц вирусом ИЛТ**

Концентрация 24-эпибрассинолида, моль/л	Процент РКЭ с явными патологоанатомическими изменениями
$0,50 \cdot 10^{-4}$	40
$0,33 \cdot 10^{-4}$	60
$0,20 \cdot 10^{-4}$	80
$0,25 \cdot 10^{-4}$	90
$0,10 \cdot 10^{-4}$	100
$0,01 \cdot 10^{-4}$	100
Контроль	0
Контроль вируса инфекционного ларинготрахеита	100
Контроль фитогормона	0

Полученные данные свидетельствуют о том, что наилучший эффект из изученных концентраций композиции декстрин-24-эпибрассинолид показал препарат в концентрации  $0,50 \cdot 10^{-4}$  моль/л, защищая 60 % эмбрионов от развития вируса ИЛТ. У 40 % развивающихся эмбрионов кур на хорион-аллантаической оболочке наблюдались незначительные мелкоузелковые поражения без отечности и слизи, нормальный рост и развитие с хорошим оперением.

При применении концентрации  $0,33 \cdot 10^{-4}$  моль/л у 60 % эмбрионов также отмечались незначительные мелкоузелковые поражения на хорион-аллантаической оболочке, эмбрионы были нормального роста и развития с хорошим оперением.

В рабочей концентрации  $0,25 \cdot 10^{-4}$  моль/л у 80 % эмбрионов при осмотре хорион-аллантаической оболочки наблюдались мелкие точечные кровоизлияния, мелкоузелковые поражения с отечностью, незначительное отставание в росте и развитии с хорошим оперением.

Брассиностероид в диапазоне концентраций  $(0,20–0,01) \cdot 10^{-4}$  моль/л оказался малоэффективным, проявив противовирусную активность к вирусу ИЛТ птиц менее 10 %. У эмбрионов при этом отмечались следующие патологоанатомические изменения – значительное отставание в росте

и развитии, кровоизлияния, при осмотре хорион-аллантаической оболочки присутствовали слизь, отечность и крупноузелковые поражения с непрозрачной периферией и некротическим центром.

В контроле со стерильным физиологическим раствором, а также в контроле 24-эпибрассинолида со стерильным физиологическим раствором развивающиеся эмбрионы кур имели хорошее оперение, хорион-аллантаическая оболочка была блестящей с отсутствием слизи и отечности, эмбрионы были нормального роста и развития, кровоизлияния на разных участках тела отсутствовали.

У контроля вируса инфекционного ларинготрахеита птиц с физиологическим раствором наблюдались помутнения и уплотнения хорион-аллантаической оболочки с образованием на ней мелкозернистых или крупнозернистых бляшек серо-белого цвета, величиной 0,5–2,0 мм округлой формы, кровоизлияния на всех участках тела, отклонения в росте, развитии и оперении самого эмбриона.

**Заключение.** Таким образом, установлено, что водорастворимая форма препарата на основе 24-эпибрассинолида в комплексе с  $\gamma$ -циклодекстрином обладает вирулицидным действием *in vitro* против вируса инфекционного ларинготрахеита птиц. Показано, что в концентрации композиционного препарата  $0,50 \cdot 10^{-4}$  моль/л эффективность подавления вируса достигает 60 %.

## Литература

1. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., de Groot A. Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones. San Diego: Acad. Press, 1999. – 456 p.
2. Sakurai A., Yokota T., Clouse S. Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. Berlin: Springer, 1999. – 253 p.
3. Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A. // Annals of Botany. 2000. Vol. 86. P. 441.
4. De Azevedo M. B. M., Zullo M. A. T., Alderete J. B. et al. // Plant Growth Regulation. 2002. Vol. 37. P. 233–240.
5. Хрипач В. А., Свиридов О. В., Прядко А. Г. и др. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33, № 3. С. 371–378.
6. Способ защиты картофеля от фитофтороза: Патент РБ № 3400 / Е. А. Савельева, И. И. Карась, А. В. Кильчевский, С. Н. Титова, В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский, Р. П. Литвиновская, М. И. Завадская; заяв. и патентообладатель В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский, Р. П. Литвиновская, М. И. Завадская // Офиц. бюл. 2000. № 2. – 75 с.
7. Способ защиты ячменя от листовых болезней: Патент РБ № 5168 / В. А. Хрипач, Р. П. Литвиновская, В. Н. Жабинский, М. И. Завадская, А. П. Волынец, Р. А. Прохорчик, Л. А. Пшеничная, Н. Е. Манжелесова, Г. В. Морозик // Офиц. бюл. 2003. № 2. – 95 с.
8. Способ размножения оздоровленного семенного материала картофеля: Патент РБ № 5698 / А. О. Бобрин, В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский, М. И. Завадская, Р. П. Литвиновская // Офиц. бюл. 2003. № 4. – 88 с.
9. Nakashita H., Yasuda M., Nitta T. et al. // Plant J. 2003. Vol. 33. P. 887–898.
10. Блоцкая Ж. В., Вабищевич В. В., Домаш В. И. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2010. Т. 54, № 4. С. 97–100.
11. Wachsmann M. B., Ramirez J. A., Talarico L. B. et al. // Curr. Med. Chem: Anti-Infect Agents. 2004. Vol. 3. P. 163–179.
12. Wachsmann M. B., Castilla V. // Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health / ed. A. B. Pereira-Netto. Bentham Science Publishers, 2012. P. 57–71.

I. V. NASONAU, M. I. LIKHACHOVA, P. A. KISELEV, N. I. BOVDEI, A. L. SAUCHUK,  
V. N. ZHABINSKII, R. P. LITVINOVSKAYA, N. B. KHRIPACH

litvin@iboch.bas-net.by

### NANOSTRUCTURATED COMPLEXES OF STEROID PHYTOHORMONE: A NEW APPROACH TO AN INFECTIOUS VIRUS PROTECTION

## Summary

The *in vitro* study of the antiviral activity of the dextrin-24-epibrassinolide complex in chicken embryos was carried out. The complex was shown to have an inhibitory effect against the infectious laryngotracheitis virus.