

С. А. Кедик, Е. И. Ярцев, И. Е. Станишевская

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СУХОГО ЭКСТРАКТА СТЕВИИ

Московская государственная академия тонкой химической технологии имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Проведена оценка биологической активности (противовирусной) сухого очищенного экстракта стевии *in vitro*. Испытания проводились с вирусами болезни Тешена, инфекционного ринотрахеита, человеческим коронавирусом.

Ключевые слова: стевия, сухой экстракт, дитерпеновые гликозиды, противовирусная активность.

В настоящее время экстракты и выделенные дитерпеновые гликозиды стевии широко используются в пищевой промышленности как заменители сахара, подсластители, что обусловлено их уникальными органолептическими свойствами, а именно сладостью и практическим отсутствием горечи и посторонних привкусов, а также крайне низкой калорийностью [1].

В тоже время большой интерес представляют опубликованные сведения об антивирусной и антибактериальной активности экстрактов стевии. Так, было обнаружено, что экстракты стевии в опытах *in vitro* эффективно подавляли активность человеческих ретровирусов (HRV) путем блокирования связи вируса с инфицируемой клеткой. В другой работе были представлены данные об антибактериальной активности водных экстрактов стевии в отношении энтерогеморрагической *Escherichia coli* [2 – 5].

Ограниченность информации по данному вопросу вызвала необходимость проведения нами исследований антивирусных свойств сухого экстракта стевии.

Экспериментальная часть

Для оценки биологической активности сухого очищенного экстракта, полученного нами из листьев стевии по модифицированному методу [6, 7], были проведены испытания антивирусного действия совместно с Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ).

Вирусы

Испытания проводили с РНК-содержащим вирусом болезни Тешена (*Porcine teschovirus*) и ДНК-содержащим вирусом инфекционного ринотрахеита (ИРТ) (*Bovine herpesvirus 1*).

Исследования проводились также в отношении РНК-содержащего человеческого коронавируса (*Human coronavirus* (HCoV-229E)).

Методика исследования

В качестве модели для исследований использовали перевиваемые культуры клеток почек зеленых мартышек (Vero). Испытание вирусстатического и вирулицидного действия сухого экстракта стевии проводили в 3-кратной повторности на монослойной культуре

клеток Vero, которые инкубировали при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, с использованием 96-луночных планшетов (“Costar”, GB). Противовирусную активность сухого экстракта из листьев стевии оценивали по общепринятой методике, определяли способность вещества предотвращать цитопатическое действие вируса на клетки по сравнению с контролем через 72 ч инкубации в термостате [8]. Титр вируса оценивали в lg ТЦД₅₀ (50 % тканевая цитопатическая доза) по методу Рида и Менча [9].

Контролем служили культура клеток, зараженная вирусом в опытной дозе, без внесения раствора испытуемого вещества (контроль вируса), и интактная культура клеток, в которую вместо раствора вещества вносили поддерживающую среду “Игла – М” (контроль клеток).

При определении вирусстатического (ингибирующего) действия культуры клеток Vero инфицировали вирус-содержащим материалом с множественностью инфицирования 0,0001 – 0,001 ТЦД_{50/клетка}. После заражения вирусом культуры клеток инкубировали при 37 °С в течение 1 – 1,5 ч (период адсорбции вируса), после чего в культуры клеток вносили растворы сухого очищенного экстракта стевии в различных концентрациях и инкубировали в термостате при 37 °С до четкого проявления цитопатогенного действия (ЦПД) в контроле вируса. После проявления ЦПД в контроле вируса опытные и контрольные образцы титровали в культуре клеток. Вирусстатическое действие вещества оценивали по разнице титров вирусов в опыте и контроле, которое выражали в lg ТЦД₅₀ (тканевых цитопатических доз).

При определении вирулицидного (инактивирующего) действия раствор сухого очищенного экстракта стевии в дозах 5,0 – 5000,0 мкг/мл смешивали в равных объемах с вирусосодержащим материалом и инкубировали при 37 °С в течение 18 – 20 ч. Максимально переносимая доза составляла 5000,0 мкг/мл. Контролем служил вирусосодержащий материал, к которому вместо раствора вещества добавляли поддерживающую культуральную среду “Игла — М” и интактную культуру клеток. Смесь после контакта титровали параллельно с контролем. Вирулицидное действие оценивали по разнице титров вируса в опыте и контроле и выражали в lg ТЦД₅₀. Результат учитывали через

Таблица 1
Результаты изучения вирусстатического действия сухого очищенного экстракта из листьев стевии

Вирус	Доза вещества, мкг/мл	Титр вируса в		Разница титров вируса между контролем и опытом, lg ТЦД ₅₀
		опыте, lg ТЦД ₅₀	контроле, lg ТЦД ₅₀	
Вирус болезни Тешена	2000,0	3,25	3,75	0,5
Коронавирус	2000,0	3,00	3,33	0,33
Вирус ИРТ	2000,0	4,50	4,75	0,25

72 – 144 ч после инкубирования при 37 °С, после четкого проявления ЦПД в контроле вируса.

Результаты и их обсуждение

На основании проведенных исследований установлено, что сухой очищенный экстракт, полученный из листьев стевии, в дозе 2000 мкг/мл ингибирует репродукцию вируса болезни Тешена на 0,5 lg ТЦД₅₀, ИРТ — на 0,25 lg ТЦД₅₀ и коронавируса — на 0,33 lg ТЦД₅₀ (табл. 1).

Сухой очищенный экстракт в дозе 4000 мкг/мл инактивирует вирусы болезни Тешена на 0,75 lg ТЦД₅₀, ИРТ — на 0,5 lg ТЦД₅₀ и коронавируса — на 0,66 lg ТЦД₅₀ (табл. 2).

Известно, что часто используемый противовирусный препарат ремантадин [10] обладает высоким вирусстатическим действием, но практически не проявляет вирулицидное действие, то есть не подавляет вирус в межклеточном пространстве и кровяном русле. В отличие от ремантадина, растворы сухого очищенного экстракта стевии обладают выраженными вирусстатическими и вирулицидными свойствами. До последнего времени сухие экстракты стевии (стевиозиды) рассматривались преимущественно как подсластитель. Подтверждение противовирусных свойств экстракта сте-

Таблица 2
Результаты изучения вирулицидного действия сухого очищенного экстракта из листьев стевии

Вирус	Доза вещества, мкг/мл	Титр вируса в		Разница титров вируса между контролем и опытом, lg ТЦД ₅₀
		опыте, lg ТЦД ₅₀	контроле, lg ТЦД ₅₀	
Вирус болезни Тешена	4000,0	3,00	3,75	0,75
Коронавирус	4000,0	2,66	3,33	0,66
Вирус ИРТ	4000,0	4,25	4,75	0,5

вии делает его привлекательным для дальнейшего исследования в качестве потенциального лекарственного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Th. Kroyer, *Lebensm. Wiss. Technol.*, № 32, 509 – 512 (1999).
2. E. Koyama, K. Kitazawa, Y. Ohori, et al., *Food Chem. Toxicol.*, № 41, 359 – 374 (2003).
3. M. Yabu, M. Takase, K. Toda, et al., *Hiroshima Daigaku Shigaku Zasshi.*, № 9, 12 – 17 (1977).
4. J. M. Pezzuto, N. P. Nanayakkara, C. M. Compadre, et al., *Mutat. Res.*, № 169, 93 – 103 (1986).
5. T. Tomita, N. Sato, T. Arai, et al., *Microbiol. Immunol.*, № 41, 1005 – 1009 (1997).
6. С. А. Кедик, Е. И. Ярцев, И. Е. Станишевская и др., *Вестник МИТХТ*, 3(2), 74 – 79 (2008).
7. С. А. Кедик, С. В. Федоров, Н. А. Януль и др., *Хим.-фарм. журн.*, 37(10), 19 – 22 (2003).
8. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000), с. 398.
9. Г. Н. Першин, *Методы экспериментальной химиотерапии*, Москва (1971), с. 539.
10. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Минск (1987), т. 2, с. 527.

Поступила 04.02.08

ANTIVIRAL PROPERTIES OF STEVIA DRY EXTRACT

S. A. Kedik, E. I. Yartsev, and I. E. Stanishevskaya

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

The biological (antiviral) activity of the dry purified extract of stevia has been studied *in vitro*. The tests were carried out with viruses of Teschen disease, infectious rhinotracheitis, and human coronavirus.

Key words: stevia rebaudiana Bertoni, dry extract, diterpene glycosides, anti-virus properties.