

ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ *ARTEMISIA ANNUA* L. ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2Журинов М.Ж.<sup>1</sup>, Мифтахова А.Ф.<sup>1,2</sup>, Шустов А.В.<sup>3</sup>, Кеер В.<sup>3</sup>, Солодова Е.В.<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>Акционерное общество «Институт топлива, катализа и электрохимии им. Д.В.Сокольского», ул. Кунаева, 142, 050010, г. Алматы, Республика Казахстан;<sup>2</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби пр. аль-Фараби, 71, 050040, Алматы, Республика Казахстан;<sup>3</sup>Лаборатория генетической инженерии РГП «Национальный центр биотехнологии», Шоссе Коргалжын 13/5, 010000, г. Нур-Султан, Республика Казахстан.

\*neftgas@inbox.ru

## АННОТАЦИЯ

Рассматривается получение экстрактов *Artemisia annua* L. и сравнительный анализ активности экстрактов против коронавируса SARS-CoV-2. Экстракты (горяче-водный, водно-спиртовой и бутанольный) исследовали в тестах скринингового формата на культуре клеток VeroE6 *in vitro* для измерения собственной токсичности и противовирусной активности. Значения 50% ингибирующей концентрации (IC50), которая показывает цитотоксичность экстрактов, составили: для горяче-водного экстракта – 1587 мкг/мл, бутанольный – 713 мкг/мл и водно-спиртовой > 2000 мкг/мл. Очень высокие значения IC50 показывают, что горяче-водный и бутанольный экстракты обладают небольшой цитотоксичностью, а водно-спиртовой экстракт практически не токсичен. Концентрации экстрактов, при которых наблюдали определенный уровень защиты инфицированных культур, были измерены путем подсчета плотности живых клеток в культурах, инфицированных SARS-CoV-2 и растущих в присутствии разных концентраций исследуемых веществ. Были построены графики плотности живых клеток в зависимости от концентрации, демонстрирующие защитное действие. Все три экстракта обладают способностью подавлять репликацию вируса SARS-CoV-2. Для горяче-водного и бутанольного экстрактов пик плотности живых клеток в зараженных культурах наблюдали при концентрации экстрактов 667 мкг/мл; в этой концентрации горяче-водный и бутанольный экстракты демонстрируют максимальное защитное действие, но в более высокой концентрации (2000 мкг/мл) оба экстракта подавляют рост клеток. Однако ни один из трех экстрактов в оптимальной концентрации не подавляет вирусную репликацию полностью, что указывает на необходимость продолжения исследований для получения эффективного лекарства против вируса SARS-CoV-2 из растительного сырья.

**Ключевые слова:** противовирусная активность, SARS-CoV-2, *Artemisia annua* L., экстракция, цитотоксичность, 50% ингибирующая концентрация, скрининг.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается тенденция к использованию натуральных растительных экстрактов в качестве альтернативы лекарствам, содержащим химически чистые неприродные (или ксеногенные) вещества. Эта тенденция вызвана ожидаемо меньшей токсичностью природных компонентов, длительной историей применения трав в народной медицине. Эпидемия коронавирусной болезни-2019, COVID-19, потребовала поиска лекарственных препаратов, обладающих противовирусной активностью и безопасностью для пациентов. Разнообразие флоры Казахстана представляет большие возможности для поиска потенциальных лекарств против коронавируса SARS-CoV-2 среди разных видов и различных фитоконпонентов, а насущная необходимость обеспечить больных в Казахстане доступным лекарством стала причиной данного исследования.

Многочисленные исследования (обзор представлен в [1]) показали, что вещества из полыни (род *Artemisia* L.) проявляют широкий спектр биологической активности, и в том числе, некоторые из них обладают противовирусным действием. В ряде работ указывается, что полынь однолетняя (*Artemisia annua* L.) содержит вещества, которые ингибируют репликацию вируса SARS-CoV-2 [2–4]. Например, в работе [5] исследовали экстракты *Artemisia*

*annua* L. и обнаружили, что независимо от места и времени сбора растительного материала, экстракты подавляли инфекцию SARS-CoV-2; обнаруженная противовирусная эффективность не коррелировала с содержанием артемизинина и общим содержанием флавоноидов в экстрактах. Был сделан вывод, что противовирусная активность связана не только с артемизинином, но с другими компонентами, которые блокируют вирусную инфекцию на этапе, предшествующем проникновению вируса в клетку. В другой работе исследовано вещество аргесунат 2 – полусинтетическое производное артемизинина, и показано, что оно ингибирует SARS-CoV-2 [6]. Растительные экстракты многокомпонентны и содержащиеся в них смеси биологически активных веществ могут иметь более сильное действие (синергетический эффект), в том числе против вируса. Скрининг видов растений Казахстана на противовирусную активность против коронавируса – возбудителя продолжающейся пандемии – актуальная и практически важная задача.

Целью работы было исследование противовирусной и цитотоксической активностей экстрактов полыни однолетней, полученных разными способами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовались традиционные ме-

тоды экстрагирования и перспективный – ультразвуковой метод. Известно, что ультразвуковым воздействием из растительного сырья возможно извлекать практически все известные соединения, сокращая при этом время экстракции до 2-3 часов [7].

В качестве объекта исследования выбрана надземная часть полыни однолетней (*Artemisia annua L.*), собранной в 2021 г. в фазе цветения в предгорьях Заилийского Алатау. В качестве растворителя использовали водный 50% этанол, т.к он является лучшим экстрагентом по результатам наших предварительных исследований [8]. Фракционную экстракцию полученного водно-спиртового экстракта начали с *n*-бутанола, с целью извлечения активных компонентов.

Получение горяче-водного экстракта. Измельченное сырье заливали горячей очищенной водой 90°C (500 мл горячей воды на 50 г растительного материала) и выдерживали на водяной бане в течении 30 минут. Затем настаивали в течении 60 мин и процеживали. Полученный отвар концентрировали в мягких условиях (на ротормном испарителе модели «RE300», температура водяной бани не более 75 °C до уменьшения в объеме до 10 раз. Таким образом получили горяче-водный экстракт в количестве 5 г.

Получение водно-спиртового экстракта. Проветренное сырье экстрагировали 50%-ным водным этиловым спиртом в течении 30 мин, при комнатной температуре методом ультразвуковой экстракции, в стальном экстракторе с перемешиванием (скорость перемешивания 50 об/мин., рабочая частота 20 – 25 кГц, ультразвуковая мощность 1500 Вт). Извлечение сливали, сырье отжимали и заливали второй порцией экстрагента и повторно течение 24 ч. Обе вытяжки объединяли (3 л 50 % водного этанола на 500 г растительного материала). Отфильтрованный водно-спиртовый экстракт концентрировали в мягких условиях (на ротормном испарителе модели «RE300», температура водяной бани не более 55°C) до консистенции густого экстракта. Экстракт №2 был получен в количестве 50 г (рисунок 1).

Получение бутанольного экстракта. Полученный экстракт №2 подвергали фракционной экстракции *n*-бутанолом. Густой экстракт № 2 в количестве 50 г растворяли в воде (200 мл) и экстрагировали в делительной воронке 500 мл *n*-бутанола, после разделения на два слоя отделяли маточный слой и бутанольный слой. Маточный раствор подвергали дополнительной двукратной экстракции бутанолом. Бутанольные вытяжки объединяли и проводили концентрирование на ротормном испарителе в мягких условиях (на ротормном испарителе модели «RE300», температура водяной бани не более 75°C). Таким образом был получен бутанольный экстракт в количестве 30 мл.

Горяче-водный экстракт из полыни однолетней (*Artemisia annua L.*) представляет собой жидкость зеленовато-коричневого цвета. Далее по тексту данный экстракт обозначен аббревиатурой *VOP*. Водно-спиртовый экстракт в данной работе (обозначен *SOP*) представляет собой вязкую смолку темно-коричневого цвета. Бутанольный экстракт (*BOP*) – текучая жидкость темно-коричневого цвета. Все экстракты обладают специфическим запахом эфирного масла полыни.

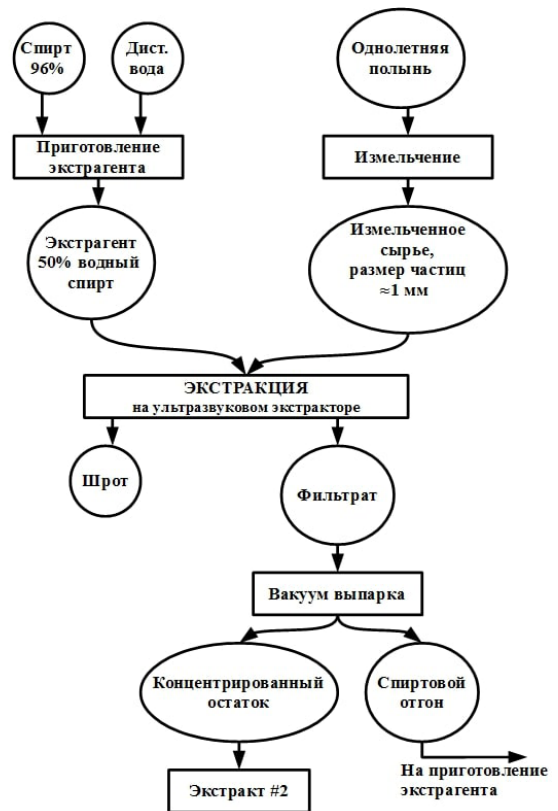


Рисунок 1 – Технология получения водно-спиртового экстракта методом ультразвуковой экстракции

Полученные три экстракта были переданы в РГП «Национальный центр биотехнологии» для изучения противовирусной активности в отношении коронавируса SARS-CoV-2, а также собственной цитотоксичности.

#### Культура клеток и штамм вируса SARS-CoV-2

Клеточная линия VeroE6 (ATCC CRL-1586) хранится в коллекции Национального центра биотехнологии (г. Нур-Султан, Республика Казахстан). Клетки VeroE6 выращивали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Lonza BE12-604 F/U1), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Gibco 16000-044), 2 мМ L-глутамин, 1% раствор витамина MEM (Thermo Scientific 11120052), 1% раствора аминокислот (Thermo Scientific 11140050), пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл).

Используемый в работе штамм коронавируса был получен из клинического образца и зарегистрирован в коллекции вирусных штаммов НЦБ с шифром hCoV-19/Kazakhstan/20679/2020. Определена нуклеотидная последовательность всего генома этого штамма, результаты опубликованы в [9]. Последовательность вирусной геномной РНК депонирована в базе данных GISAID (<https://www.gisaid.org/>) под номером EPI\_ISL\_454501. Используемый штамм коронавируса относится к филогенетической линии B.1, изоляты этой линии часто встречались в первой половине 2020 года.

Наработка вирусных препаратов (стоков). Использовали метод, описанный в [10] с небольшими изменениями. Клетки VeroE6 высевали в чашки Петри P100 в количестве  $2 \times 10^6$  клеток. Культуры выращивали до 90% конфлуэнтности ( $\sim 8 \times 10^6$  клеток). Для заражения монослоев и получения вирусных препаратов использовали

среду, аналогичную полной среде, но с добавлением 2% теплоинактивированной сыворотки (сыворотка FBSHI прогрета при 55 °С в течение 30 мин). Стандартную среду для наработки вируса заменяли на среду с 2% FBSHI, после чего в культуру добавляли вирус, так чтобы множественность инфицирования (МОИ) составляла 0,01.

Чашки с культурами инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 72 часов. Культуры ежедневно микроскопировали и следили за появлением вирус-индуцированного цитопатического действия (ЦПД). Среду из инфицированных культур собирали через 72 часа после заражения. Среду осветляли центрифугированием, разделяли на аликвоты по 0,5 мл, вирус хранили при -80 °С до использования.

Определение титра вируса. Использовали метод предельных разведений (метод Рида-Менча) с модификациями [11]. Клетки VeroE6 высевали в 96-луночные планшеты (37500 клеток на лунку). Готовили серийные разведения препарата вируса SARS-CoV-2. В качестве разбавителя использовали фосфатно-солевой буфер (PBS) с добавлением 1% инактивированной нагреванием лошадиной сыворотки. Делали восемь десятикратных разведений, начиная с 1:10 до 1:10<sup>8</sup>. Одно разведение занимает длинный ряд на 96-луночном планшете (11 лунок). Во всех экспериментах ряд 12 планшета оставляли неинфицированным, этот ряд используется в качестве контроля роста неинфицированного монослоя. Среду удаляли из лунок. Ряд 12 заполняли 150 мкл среды с 2% FBSHI. Лунки на пересечении рядов H-A и 1-11 заполняли разведениями вируса, по 100 мкл на лунку.

Планшет инкубировали в течение 1 ч с периодическим встряхиванием для перемешивания инокулятов. Далее вирусные инокуляты (из рядов H-A × 1-11) удаляли и в лунки вносили по 150 мкл среды с 2% FBSHI. Планшеты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в течение 3-4 дней, до появления видимого ЦПД.

Во всех планшетах подсчитывали количество лунок с видимым ЦПД, в каждом ряду. Результаты обрабатывали по схеме Рида-Менча [12]. Титр коронавируса выражали в инфекционных единицах TCID<sub>50</sub> (единица 50% вероятности заражения тканевой культуры).

Определение 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>). Цитотоксическое действие экстрактов измеряли путем определения полумаксимальной ингибирующей концентрации IC<sub>50</sub> (т.е. концентрации, которая подавляет скорость роста культуры по сравнению с контролем в 2 раза и снижает плотность клеточного монослоя на 50%) [13].

Клетки VeroE6 высевали в лунки 96-луночного планшета по 20 000 клеток на лунку. Планшеты инкубировали в течение ночи. На следующий день навески исследуемых экстрактов (200 мг) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) с получением растворов с концентрацией 200 мг/мл. Затем полученный раствор в ДМСО разбавляли в 100 раз культуральной средой для получения образцов с концентрацией 2000 мкг/мл (это образец для заполнения ряда H).

Разведения (испытуемых экстрактов) вносили в длинные ряды 96-луночного планшета (образцы вносили в лунки рядов 1-10; ряды 11-12 экстрактов не содержат, эти

ряды используются для контроля роста здорового монослоя без воздействия испытуемых веществ). Делали следующим образом: из лунок (рядов H-A × 1-10) удаляли ростовую среду и добавляли по 100 мкл среды в ряды A-G. В ряд H вносили по 150 мкл на лунку образца для заполнения ряда H (т.е., раствора экстракта в среде с концентрацией 2000 мкг/мл). Далее с помощью 8-канальной пипетки переносили по 50 мкл образца в параллельный ряд (из H в G, из G в F, и т.д.), при каждом переносе содержимое лунок перемешивали.

Планшеты инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 3-х суток. Состояние клеток в культуре контролировали с помощью микроскопии. Для количественной оценки плотности живых клеток в монослоях использовали колориметрический тест с окрашиванием нитросинимтетразолием (МТТ, SigmaM2128). В этом тесте используется способность МТТ окрашивать только живые метаболически-активные клетки, в которых клеточные оксидоредуктазы превращают МТТ в пурпурное вещество формазан. В лунки культуральных планшетов вносили по 20 мкл раствора МТТ (3 мг/мл) в среде без сыворотки. Планшет инкубировали в течение 3 часов. Среду количественно удаляли из лунок, не нарушая целостность окрашенных монослоев. Формазан растворяли в 100 мкл ДМСО (с добавлением 1% уксусной кислоты). Оптическую плотность в лунках определяли на планшетном фотометре при длине волны 595 нм. Для каждого экстракта эксперимент проводили в двух повторностях.

Оценку значения IC<sub>50</sub> вычисляли из данных оптической плотности с использованием четырехпараметрической нелинейной регрессии [14]. Обработку результатов проводили в программе GraphPadPrism (GraphPadInc).

Измерение противовирусного действия и определение эффективной концентрации. Использовали тест скринингового формата, подобный вышеописанному тесту на цитотоксичность, но отличающийся тем, что культуры заражали коронавирусом SARS-CoV-2. В данном тесте, если испытуемая субстанция защищает культуры клеток от гибели в результате вирусной инфекции, то эта защита проявляется увеличением количества живых клеток и ростом оптической плотности в МТТ-тесте. Противовирусную активность экстрактов оценивали путем построения графиков зависимости плотности живых клеток в инфицированных культурах, при этом к культурам добавляли растворы экстрактов в разных концентрациях. Концентрацию экстракта, дающую максимальную защиту (пик оптической плотности в МТТ-тесте) определяли как эффективную концентрацию. При работе с разными экстрактами, в тех случаях, когда график оптической плотности демонстрирует «плато», использовали нелинейную регрессию для определения 50% эффективной концентрации (EC<sub>50</sub>) (т.е. концентрации, в которой испытуемое вещество снижает вирусное ЦПД на 50%). В данной работе исследованы экстракты VOP, BOP и SOP. Максимальная испытанная концентрация экстрактов составила 2000 мкг/мл. В качестве контролей, то есть веществ, для которых доказано противовирусное действие против SARS-CoV-2 в культурах *in vitro*, были использованы допущенные до клинического применения фармпрепараты Фавипиравир (таблетки Favipiravir 200 mg, производитель Glenmark;



Mumbai, India), Тилорон (таблетки Тилаксин, 125 мг действующей субстанции, производитель ТОО «ВИВА Фарм»; Алматы, Казахстан) и Циклоферон (таблетки 150 мг действующей субстанции, производитель ООО «ПОЛИСАН»; Санкт-Петербург, Россия).

Используемый протокол представляет модификацию метода, описанного в работе Аль-Джабри [15]. Тест проводили в 96-луночных планшетах. Планшеты засеивали клетками VeroE6 и заполняли средой с добавлением тестируемых экстрактов в разных концентрациях (в рядах 1–10); в ряды 11–12 экстракты не добавляли. До этого этапа планшеты готовили аналогично тому, как описано выше в разделе «Определение 50% ингибирующей концентрации (IC50)». Далее, в ряды 1–11 вносили вирус SARS-CoV-2 в количестве 20 000 инфекционных единиц TCID50. Через 3 суток после заражения наличие вирусного ЦПД контролировали под микроскопом. Количественные данные для построения графиков и определения эффективной концентрации получали путем измерения количества живых клеток с помощью МТТ-теста, аналогично тому, как описано в разделе «Определение 50% ингибирующей концентрации (IC50)». Для каждого экстракта измерения проводили в двух повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Был выполнен тест для измерения собственной токсичности экстрактов на культурах клеток. Были измерены оптические плотности в МТТ-тесте для культур клеток VeroE6, растущих в присутствии следующих концентраций экстрактов (мкг/мл): 0,91, 2,7, 8,2, 25, 74, 222, 667 и 2000. Измеренные значения оптической плотности были использованы для построения непрерывных кривых с использованием четырехпараметрической нелинейной регрессии. Зависимости оптической плотности от концентрации для измерения 50% ингибирующей концентрации (IC50) показаны на рисунке 2.

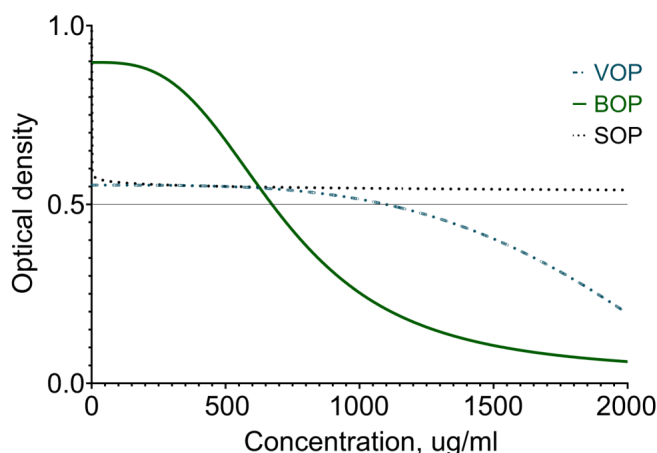


Рисунок 2 – Графики зависимости оптической плотности от концентрации для измерения 50% ингибирующей концентрации (IC50)

Для трех экстрактов были получены следующие значения IC50: VOP – 1587 мкг/мл, BOP – 713 мкг/мл, и SOP > 2000 мкг/мл (для экстракта SOP 50%-ое ингибирование роста не было достигнуто при максимальной испытанной концентрации). Очень высокие значения IC50 подтверждают, что экстракты VOP и BOP малотоксичны, а SOP вообще не обладает измеримой токсичностью в экспери-

менте *invitro*.

Три экстракта в тех же концентрациях были испытаны на способность ингибировать репликацию вируса SARS-CoV-2. Графики, показывающие зависимость плотности живых клеток в культурах, зараженных вирусом SARS-CoV-2, и растущих в присутствии разных концентраций экстрактов приведены на рисунке 3.

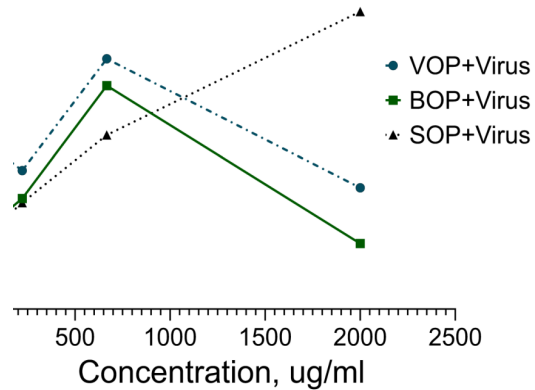


Рисунок 3 – Значения оптической плотности (MTT-тест) в культурах, зараженных вирусом SARS-CoV-2, и растущих в присутствии разных концентраций экстрактов

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данном эксперименте, для всех испытанных экстрактов значения оптической плотности в лунках были ниже, в чем в контролях без заражения. Это наблюдение вероятнее всего объясняется тем, что вирус SARS-CoV-2 сохраняет способность реплицироваться на определенном уровне в присутствии каждого из испытанных экстрактов, и такая вирусная репликация приводит к гибели части клеток. Однако в этом же эксперименте наблюдается защита.

Кривые на рисунке 3 показывают выраженный пик для экстрактов BOP и VOP при концентрации 667 мкг/мл, а для экстракта SOP плотность вирус-инфицированной культуры монотонно растет с ростом концентрации SOP. Представленные кривые показывают диапазоны концентраций, при которых противовирусное действие становится измеримым.

Экстракты BOP и VOP в концентрации 667 мкг/мл подавляют вирус, из-за этого клетки растут быстрее, чем в лунках с меньшими концентрациями веществ; но в концентрации 2000 мкг/мл экстракты BOP и VOP сами подавляют рост клеток. Для экстракта SOP, как было указано выше, значение IC50 > 2000 мкг/мл указывает на то, что экстракт нетоксичен во всем диапазоне испытанных концентраций. Поэтому чем выше концентрация SOP в культуре, тем сильнее подавляется вирусная репликация и тем лучше рост клеток в данном скрининговом тесте.

Впрочем, сравнение значений оптических плотностей зараженных и незараженных культур показывает, что даже в концентрации 2000 мкг/мл субстанция SOP не подавляет вирусное цитопатическое действие полностью.

## ВЫВОДЫ

Таким образом, из представленных эксперименталь-

ных данных следует, что водно-спиртовой экстракт полыни однолетней по сравнению с горяче-водным и бутанольным экстрактами проявил наиболее выраженную противовирусную активность. Полученный результат будет использован для развития данной работы и идентификации веществ, обладающих противовирусным действием.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант BR10965271).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dib, I., El Alaoui-Faris, F.E. *Artemisia Campestris L.: Review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. Biomed. Pharmacother*, 2019, n 109. – P. 1884–1906.

2. Miller, L.H., Su, X. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. *Cell*, 2011, vol. 146. – P. 855-858.

3. Wang, X., Zheng, B., Ashrafet, U., Zhangal, H. Artemisinin inhibits the replication of flaviviruses by promoting the type I interferon production. *Antiviral Research*, 2020, n 179. – P. 104810.

4. Sehailia, M., Chemat, S. Antimalarial-agent artemisinin and derivatives portray more potent binding to Lys353 and Lys31-binding hotspots of SARS-CoV-2 spike protein than hydroxychloroquine: potential repurposing of arteminol for COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020. – P. 1–11.

5. Nair, M.S., Huang, Y., Fidock, D.A., Polyak, S.J., Wagoner, J., Towler, M.J., Weathers P.J. Artemisia annua L. extracts inhibit the in vitro replication of SARS-CoV-2 and two of its variants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, n 274. – P. 114016.

6. Nie, Ch., Trimpert, J., Moon, S., Haag, R., Gilmore, K., Benedikt, B. Kaufer, Seeberger P. In vitro efficacy of Artemisia extracts against SARS-CoV-2. *Virology*, 2021, n 18. – P. 182.

7. Жматова, Г.И., Неведов, А.Р., Гордеев, А.С., Клиник А.В. Методы интенсификации технологических процессов выделения биологически активных веществ из растительного сырья, Вестник ТГТУ, 2005, № 3. – С. 701-707.

8. Журинов, М.Ж., Мифтахова, А.Ф., Бекежанова, Т.С. и др. Разработка способа разделения биологически активных веществ из растительного сырья Artemisia Cina Berg. и Artemisia Annu L., *Известия НАН РК. Серия химических наук*, 2022, № 1, С. 27–34. <https://doi.org/10.32014/2022.2518-1491.87>

9. Alm, E, Broberg, E.K., Connor, T., Hodcroft, E.B., Komissarov, A.B., Maurer-Stroh, S., Melidou, A., Neher, R.A., O’Toole, Á., Pereyaslov, D. Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020. *Euro Surveill*, 2020, vol. 25. – P. 2001410.

10. Case, J.B., Bailey, A.L., Kim, A.S., Chen, R.E., Diamond, M.S. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2, *Virology*, 2020, n 548. – P. 39-48.

11. Brandolini, M., Taddei, F., Marino, M.M., Grumiro, L., Scalcione, A., Turba, M.E., Gentilini, F., Fantini, M., Zannoli,

S., Dirani, G. Correlating qRT-PCR, dPCR and Viral Titration for the Identification and Quantification of SARS-CoV-2: A New Approach for Infection Management. *Viruses*, 2021, vol 13. – P. 1022.

12. Smith, M.R., Schirtzinger, E.E., Wilson, W.C., Davis, A.S. Rift Valley Fever Virus: Propagation, Quantification, and Storage. *CurrProtocMicrobiol*, 2019, vol. 55. – P. 92.

13. Postnikova, E., Cong, Y., De, Wald, L.E., Dyal, J., Yu S., Hart, B.J., Zhou, H., Gross, R., Logue, J., Cai, Y. Testing therapeutics in cell-based assays: Factors that influence the apparent potency of drugs, *PLoS*, 2018, vol. 13. – P. 0194880.

14. Motulsky, H., Christopoulos, A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting. By Harvey Motulsky and Arthur Christopoulos / Oxford University Press, 2004. 351 p.

15. Al-Jabri, A.A., Wigg, M.D. Initial in vitro screening of drug candidates for their potential antiviral activities. In: Mahy, BWJ, Kangro HO, editors. *Virology methods manual* / London: Academic Press Ltd, 1996. P. 293–356.

## REFERENCES

1. Dib, I., El Alaoui-Faris, F.E. *Artemisia Campestris L.: Review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. Biomed. Pharmacother*, 2019, n 109. – P. 1884–1906. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.149>.

2. Miller, L.H., Su, X. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. *Cell*, 2011, 146, pp. 855-858.

3. Wang, X., Zheng, B., Ashrafet, U., Zhangal, H. Artemisinin inhibits the replication of flaviviruses by promoting the type I interferon production. *Antiviral Research*, 2020, n 179. – P. 104810.

4. Sehailia, M., Chemat, S. Antimalarial-agent artemisinin and derivatives portray more potent binding to Lys353 and Lys31-binding hotspots of SARS-CoV-2 spike protein than hydroxychloroquine: potential repurposing of arteminol for COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020. – P. 1-11.

5. Nair, M.S., Huang, Y., Fidock, D.A., Polyak, S.J., Wagoner, J., Towler, M.J., Weathers, P.J. Artemisia annua L. extracts inhibit the in vitro replication of SARS-CoV-2 and two of its variants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, n 274. – P. 114016.

6. Nie, Ch., Trimpert, J., Moon, S., Haag, R., Gilmore, K., Benedikt, B. Kaufer, Seeberger, P. In vitro efficacy of Artemisia extracts against SARS-CoV-2. *Virology*, 2021, n 18. – P. 182. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01651-8>.

7. Zhmatova, G.V., Nefedov, A.N., Gordeev, A.S., Kilimnik, A.B. Metody intensifikatsii tekhnologicheskikh processov vydeleniya biologicheskii aktivnykh veshchestv iz rastitel'nogo syr'ya. *Vestnik TGTU*, 2005, n. 3. – S. 701-707. [Zhmatova, G.V., Nefedov, A.N., Gordeev, A.S., Kilimnik, A.B. Methods of intensification of technological processes of extraction of biologically active substances from plant materials. *Bulletin of TSTU*, 2005, n 3. – P. 701-707.].

8. Zhurinov, M. Zh. et all. Development of separating way of biologically active substances from plant raw materials of Artemisia Cina Berg. and Artemisia Annu L. *News of the*

National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. *Chemical Sciences Series*. 2022, n 1. – P. 27–34. <https://doi.org/10.32014/2022.2518-1491.87>

9. Alm, E., Broberg, E.K., Connor, T., Hodcroft, E.B., Komissarov, A.B., Maurer-Stroh, S., Melidou, A., Neher, R.A., O'Toole, Á., Pereyaslov, D. Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020. *Euro Surveill*, 2020, vol. 25. – P. 2001410. 7427299. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410>.

10. Case, J.B., Bailey, A.L., Kim, A.S., Chen, R.E., Diamond, M.S. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology*, 2020, n 548. – P. 39-48. 7293183. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.05.015>.

11. Brandolini, M., Taddei, F., Marino, M.M., Grumiro, L., Scalcione, A., Turba, M.E., Gentilini, F., Fantini, M., Zannoli, S., Dirani, G. Correlating qRT-PCR, dPCR and Viral Titration for the Identification and Quantification of SARS-CoV-2: A New Approach for Infection Management. *Viruses*, 2021, vol 13. – P. 1022. 8229388. <https://doi.org/10.3390/v13061022>.

12. Smith, MR, Schirtzinger, EE, Wilson, WC, Davis, A.S. Rift Valley Fever Virus: Propagation, Quantification, and Storage. *CurrProtocMicrobiol*, 2019, vol. 55. – P. 92. PMID: 31763765 DOI: 10.1002/cpmc.92 (in Eng.).

13. Postnikova, E., Cong, Y., De, Wald, L.E., Dyall, J., Yu S., Hart, B.J., Zhou, H., Gross, R., Logue, J., Cai, Y. Testing therapeutics in cell-based assays: Factors that influence the apparent potency of drugs. *PLoS*, 2018, vol. 13. – P. 0194880–5864066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194880>.

14. Motulsky, H., Christopoulos, A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting. By Harvey Motulsky and Arthur Christopoulos. Oxford and New York: Oxford University Press, 2004, 351 p.

15. Al-Jabri A.A., Wigg M.D., Oxford J.S. Initial in vitro screening of drug candidates for their potential antiviral activities. In: Mahy, BWJ, Kangro HO, editors. *Virology methods manual*. London: Academic Press Ltd, 1996. P. 293–356.

## INHIBITORY ACTIVITY OF ARTEMISIA ANNUA L. EXTRACTS AGAINST SARS-COV-2 CORONAVIRUS

Zhurinov M.Zh.<sup>1</sup>, Miftakhova A.F.<sup>1,2</sup>, Shustov A.V.<sup>3</sup>, Keyer V.<sup>3</sup>, Solodova E.V.<sup>1,2,\*</sup>

*1«D.V. Sokolskiy Institute of Fuel, Catalysis and Electrochemistry» JSC, Kunaev Street, 142, Almaty, 050010, Republic of Kazakhstan;*

*2Al-Farabi Kazakh National University, 71 al-Farabi Ave., Almaty, 050040, Republic of Kazakhstan;*

*3Laboratory for genetic engineering, RSE «National Center for Biotechnology», Highway Korgalzgyn, 13/5, Nur-Sultan, 010000, Republic of Kazakhstan/*

*\*neftgas@inbox.ru*

### ABSTRACT

The article describes preparing extracts of *Artemisia annua L.* and the use of the extracts to compare the virus-inhibiting activity against the coronavirus SARS-CoV-2. The extracts were prepared using hot water, water-alcohol mixture and butanol. The extracts were tested in screening-format tests on Vero E6 cells to measure the cytotoxicity and antiviral activity. Values of 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) which measure the cytotoxicity were as follows: for the hot-water extract - 1587 µg/ml, for butanol extract - 713 µg/ml, and for water-alcohol extract >2000 µg/ml. The quite high IC<sub>50</sub> values indicate that the hot-water and butanol extracts have little cytotoxicity, and the water-alcohol extract is not toxic in vitro. Protection from the virus-induced cytopathic effect was observed in infected cultures upon addition of the extracts. Concentrations at which the extracts demonstrate the highest protection were measured by counting densities of live cells (in infected cultures) using the MTT-test. The results of the MTT-test in a form of dependence of optical densities from extracts' concentrations are presented in the paper. All three extracts show the ability to inhibit the replication of the SARS-CoV-2 virus. For hot-water and butanol extracts, the peak density of live cells in infected cultures was observed when the extracts were present at the concentration of 667 µg/ml; however at the higher concentration (2000 µg/ml), both extracts inhibit cell growth. However, none of the three extracts at the optimal concentration completely suppress viral replication. The work needs to be continued to produce an effective herbal drug against the SARS-CoV-2 virus.

**Key words:** antiviral activity, SARS-CoV-2, *Artemisia annua L.*, extraction, cytotoxicity, 50% inhibitory concentration, screening.

## ARTEMISIA ANNUA L. СЫҒЫНДЫЛАРЫНЫҢ ИНГИБИТОРЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІ SARS-COV-2 КОРОНАВИРУСЫНА ҚАРСЫ

Жұрынов М.Ж.<sup>1</sup>, Мифтахова А.Ф.<sup>1,2</sup>, Шустов А.В.<sup>3</sup>, Кеер В.<sup>3</sup>, Солодова Е.В.<sup>1,2,\*</sup>

*1«Д.В. Сокольский атындағы жанармай, катализ және электрохимия институты» АҚ, Қунаев қ., 142, 050010, Алматы қ., Қазақстан Республикасы*

*2Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті, әл-Фараби даңғылы, 71, 050040, Алматы қ., Қазақстан Республикасы*

*3 Генетикалық инженерия зертханасы «Ұлттық биотехнология орталығы» РМК*

*Қорғалжын тас жолы, 13/5, 010000, Нұр-сұлтан қ., Қазақстан Республикасы*

*\*neftgas@inbox.ru*

### ТҮЙІН

Мақалада *Artemisia annua L.* сығындыларының дайындалуы және сығындылардың SARS-CoV-2 коронавирусына қарсы белсенділігінің салыстырмалы талдауы қарастырылған.

Сығындылар (ыстық су, гидроалкоголь және бутанол) ішкі уыттылық пен вирусқа қарсы белсенділікті өлшеу үшін *in vitro* Vero E6 жасушасында скрининг форматындағы сынақтарда сыналды. Сығындылардың цитоуыттылығын көрсететін 50% ингибиторлық концентрацияның (IC<sub>50</sub>) мәндері мыналар болды: ыстық су сығындысы үшін - 1587 мкг/мл, бутанол - 713 мкг/мл және гидроспирт >2000 мкг/мл. Өте жоғары IC<sub>50</sub> мәндері ыстық су мен бутанол сығындыларының цитотоксикалық әсері аз екенін, ал гидро-спирт сығындысы іс жүзінде улы емес екенін көрсетеді.

Жұқтырған дақылдарда белгілі бір қорғаныс деңгейі байқалған сығынды концентрациясы SARS-CoV-2 жұқтырған және зерттелетін заттардың әртүрлі концентрациясы болған кезде өсетін дақылдардағы тірі жасушалардың тығыздығын санау арқылы өлшенді. Қорғаныс әсерін көрсететін концентрацияға байланысты тірі жасушалардың тығыздығының графиктері тұрғызылды. Барлық үш сығындының SARS-CoV-2 вирусының репликациясын басу мүмкіндігі бар. Ыстық су және бутанол сығындылары үшін 667 мкг/мл экстракт концентрациясында жұқтырылған дақылдардағы тірі жасушалардың ең жоғары тығыздығы байқалды; бұл концентрацияда ыстық су мен бутанол сығындылары максималды қорғаныс әсерін көрсетеді, бірақ жоғары концентрацияда (2000 мкг/мл) екі сығынды да жасушалардың өсуін тежейді. Қолданылатын концентрация диапазонында іс жүзінде уытты емес су-спирт сығындысы үшін вирусқа қарсы әсер концентрацияға пропорционалды және максимум 2000 мкг/мл жоғарылайды.

**Түйін сөздер:** вирусқа қарсы белсенділік, SARS-CoV-2, жылдық шырша, *Artemisia annua L.*, сығынды, цитотоксикалық, 50% тежегіш концентрация, скрининг.