

## ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

**ВЛИЯНИЕ НА РАСТИТЕЛНИ ЕКСТРАКТИ  
С АНТИВИРУСНИ СВОЙСТВА ВЪРХУ ПРЕЖИВЯЕМОСТТА  
НА СВИНСКИ ЯЙЦЕКЛЕТКИ**

МИХАИЛ ЧЕРВЕНКОВ, ТЕОДОРА ИВАНОВА\*, ДИМИТРИНА КАЧЕВА,  
ТАТЯНА СТОЕВА\*, ЕЛЕНА КИСТАНОВА

Институт по биология и имунология на размножаването, БАН - София,

\*Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН - София

Вирусите са най-опасните патогени, които могат да бъдат пренесени при извършването на асистираните репродуктивни технологии (АРТ) в животновъдството. За разлика от повечето бактериални причинители, при които третирането с антибиотици има добър ефект, при вирусите то е неефективно. Основните процедури, за превенция на вирусната трансмисия чрез ембриони при извършване на АРТ, са десетократно промиване с чист медиум, или третирането им с трипсин. Тези процедури обаче не повлияват всички видове вируси (Singh et al., 1983; Stringfellow & Seidel, 1998; Edens et al., 2003).

Към веществата, добавяни в средите за обработка и съхранение на половите клетки, с цел премахване на патогени има следните изискванията: да са ефективни срещу микроорганизмите в концентрацията, в която се използват и при условията при които се прилагат; да не са токсични за половите клетки и да не влияят върху тяхната преживяемост и фертилитет; да не взаимодействат по нежелан начин с други субстанции, намиращи се в средите за обработка на полови клетки; третирането с тях трябва да е кратко и лесно за прилагане (Bielanski, 2007).

За редица дезинфекционни агенти, като антибиотиците е известно, че могат да бъдат токсични за половите клетки при определени условия. Magli et al. (1996) установяват, че комбинацията от пеницилин и стрептомицин,

добавени към среда за IVF (In vitro fertilization) на човешки ембриони, в стандартни концентрации имат негативен ефект върху ембрионалното развитие. Подобен резултат е получен и при добавяне на комбинация от двата антибиотика към среда за култивиране на ембриони от хамстер (Zhou et al., 2000). Установено е, че трипсинът, ензимът с най-широко приложение за саниране на полови клетки, може да увреди спермалната мембрана, ако бъде използван в концентрация по-висока от 0.25% (Silva et al., 1999). Антивирусният препарат Foscarnet, който инхибира *Bovine herpes virus - 1*, влияе негативно върху ембрионалното развитие на *in vitro* получени говежди ембриони (Marley et al., 2006). Затова е актуално търсенето на ефективни и нетоксични антивирусни агенти, които могат да се използват в средите за работа с яйцеклетки и ембриони.

Лечебните растения са източник на богат набор от вторични метаболити с антивирусни свойства, които се прилагат успешно в практиката и се характеризират с по-ниска степен на токсичност и развитие на резистентност в сравнение със синтетичните препарати (Tolo et al., 2006; Bernhoft, 2008). Етеричното масло от *Melissa officinalis* (маточина, lemon balm) съдържа разнообразие от органични киселини, моно- и сесквитерпени, флавоноиди и др., като за основен компонент с антивирусно действие се смята розмариновата киселина (Anonymous,

Авторите изказват благодарността си на доц. Е. Генова за предоставения материал от *M. officinalis*.

2002; **Dastmalchi et al.**, 2008). Прилагана под формата на водни и алкохолни инфузи и екстракти, наред с антивирусно, маточината има и антигъбно, антибактериално, седативно и др. действия. (Anonymous, 2002; Erturk, 2006). *M. officinalis* има доказан вируциден ефект върху *Newcastle disease virus*, *Vaccinia virus*, *Herpes simplex* и *Semliki Forest virus* (**Kucera et al.**, 1965; **Allahverdiyev et al.**, 2004; **Mazzanti et al.**, 2008; **Schnitzler et al.**, 2008).

Алкалоидите, характерни за сем. *Amaryllidaceae*, спадат към групата на изохинолиновите алкалоиди и се отличават с разнообразна структура и фармакологична активност: антихолинестеразна, антивирусна, антитуморна, имуностимулаторна, антигъбна и др. (**Bastida et al.**, 2011; **Jin**, 2011). Ликоринът е един от най-разпространените и характерни амарилисови алкалоиди и в *Leucojum aestivum* (блатно кокиче, summer snowflake) се открива като доминиращ или минорен алкалоид, в зависимост от произхода на растителния материал (**Bogdanova et al.**, 2008). Ликоринът проявява антивирусно действие срещу представители от семейство *Flaviviridae*, *Punta Toro virus* и *Rift Valley fever virus* (**Ieven et al.**, 1982; **Gabrielsen et al.**, 1992). Други вируси, за които има сведения, че се повлияват от ликорина или други алакалоиди от сем. *Amaryllidaceae* са: *Herpes simplex virus* type 1, някои полиовируси, *Coxsackie u SARS-CoV* (Severe Acute Respiratory Syndrome-associated *Coronavirus*) (**Ghosal et al.**, 1985; **Renard-Nozaki et al.**, 1989; **Li et al.**, 2005).

Естествен е въпросът дали използването на антивирусния ефект на тези растения не е съпроводен с риск за жизнеспособността на третираните клетки. Една от съставките на екстракта от *M. officinalis* – евгенолът, е известна със своето апоптично действие и се използва като антипролиферативно средство при туморните клетки (**Jaganathan and Supriyanto**, 2012). От друга страна **Geuenich et al.** (2008) отбелязват, че използването на екстракти от етерично-маслени растения, включително и от *M. officinalis* като антивирусни агенти засягат жизнеспособността на третираните клетки само в много високи концентрации.

Целта на нашето проучване бе да се определят оптималните нетоксични разреждания на екстракти от *M. officinalis* и *L. aestivum* при добавянето им за един час към средата за култивиране на ооцити.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### Получаване на растителни екстракти.

#### Растителен материал

Надземна биомаса от *M. officinalis* и *L. aestivum* беше събрана във фазата на цъфтеж от колекцията на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН през 2011 г. При *L. aestivum* бе взет материал от клон с доминиращо съдържание на ликорин (**Bogdanova et al.**, 2008). Растенията бяха изсушени в сушилна съответно за *M. officinalis* при 40°C и за *L. aestivum* - при 65°C и смлени на фин прах.

#### *M. officinalis*

От получената дрога бе приготвен инфуз с вряла дестилирана вода в съотношение 10g в 100 ml за 10 min. Инфузът бе филтриран през хартиен филтър (FILTRAK 390, Munktell & Filtrak GmbH, Germany) и центрофугиран за 10 min при 6000 rpm. Получената супернатанта бе филтрувана през 0.22 µm PES филтър (Millipore, USA) и се съхраняваше в хладилник (0-4°C) за не повече от седмица.

В опитите бяха използвани следните разреждания на екстракта: 1:3; 1:5; 1:7; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320.

#### *L. aestivum*

Екстрактът бе получен чрез двукратно екстрахиране на дрогата с метанол в съотношение 1:10 за 24 h при 25°C. По време на екстракцията пробите бяха инкубирани в ултразвукова баня за 10 min, 4-кратно на всеки 12 часа. След центрофугиране за 10 min при 6000 rpm, екстрактите бяха филтрувани през хартиен филтър (FILTRAK 390, Munktell & Filtrak GmbH, Germany) и се изпаряваха до сухо под вакуум при 40°C (Laborota 4003, Heidolph, Germany). От сухия екстракт 600 mg бяха разредени в 10 ml фосфатно буферен разтвор с рН 7.2, филтрирани през 0.22 µm PES филтър (Millipore, USA) и съхранявани при -20 °C във криостатни епруветки

В опитите бяха използвани следните разреждания на екстракта: 1:3; 1:5; 1:10; 1:50; 1:100; 1:150; 1:200; 1:300; 1:500.

#### **Използвани клетъчни линии и хранителни среди**

Използвана беше постоянна клетъчна линия МДВК (CCLV 1992, RIE 261), която се помещаваше в количество  $4.10^5$  клетки/ml в плаки (24, 96 ямкови).

Като растежни среди бяха използвани MEM-Eagle (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) и MEM-Hanks (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) с добавка на антибиотици (пеницилин 100 UI/ml, стрептомицин 100  $\gamma$ /ml), незаменими аминокиселини, 5% или 10% фетален телешки серум (ФТС) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA). За поддържане на културата се използваша същите среди и добавки, но с намалено количество на ФТС - 2% или 3%.

#### **Получаване и обработване на яйцеклетките**

Яйчниците бяха получени след клане на клинично здрави прасета, от породите Голяма бяла, Ландрас и хибридни кръстоски.

Получаването на яйцеклетки се извършваше посредством пункция на фоликули с размери между 3 и 6 mm (средни фоликули). Събраните оцити се поставяха в пластмасови стерилни епруветки за еднократна употреба с обем 15 ml и се оставяха да се утаят за 10 min. Впоследствие фоликулната течност се отливаше и към епруветките се добавяше промиващ медиум, състоящ се от фосфатно буферен разтвор (ФБР) с 0.4% BSA. Отлятата фоликулна течност се центрофугираше на 2000 rpm при 4°C за 15 min и се филтруваше през 0.22  $\mu$ m PES филтър (Millipore, USA).

След утаяване за 10 min натантата се отпипираще и се поставяше в пластмасова плака с промивен медиум, след което яйцеклетките се събираха в петри с промивен медиум. Следваше трикратно промиване с промивен медиум и еднократно с култивационен медиум. Само оцити с добра морфология и запазен кумулус (кумулус-ооцитен комплекс (КОК)), бяха използвани за експериментите (фиг.1 А, Б).

Селектираните КОК се поставяха в група от по 27 в малки петрита с култивационен медиум (минимум 10  $\mu$ l на ооцит) и се инкубираха в CO<sub>2</sub> инкубатор (Binder, Germany) на 38.5°C с 5%CO<sub>2</sub> и висока влажност (около 95%).

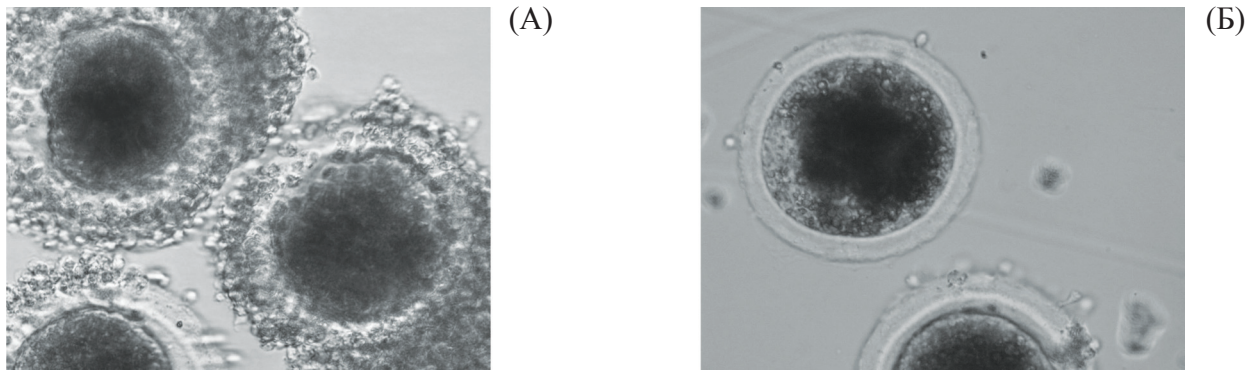
Култивационният медиум бе изготвен по рецептата на **Brevini et al. (2005)** и включваше TCM 199, с добавени фоликулна течност, глутамин, пируват, цистеамин, фоликулостимулиращ хормон, епидермален растежен фактор, естрадиол, пеницили и стрептомицин. Всички реактиви за двата медиума бяха производство на Sigma, St. Louis, MO, USA.

#### **Оценка влиянието на растителните екстракти върху клетъчна линия MDBK**

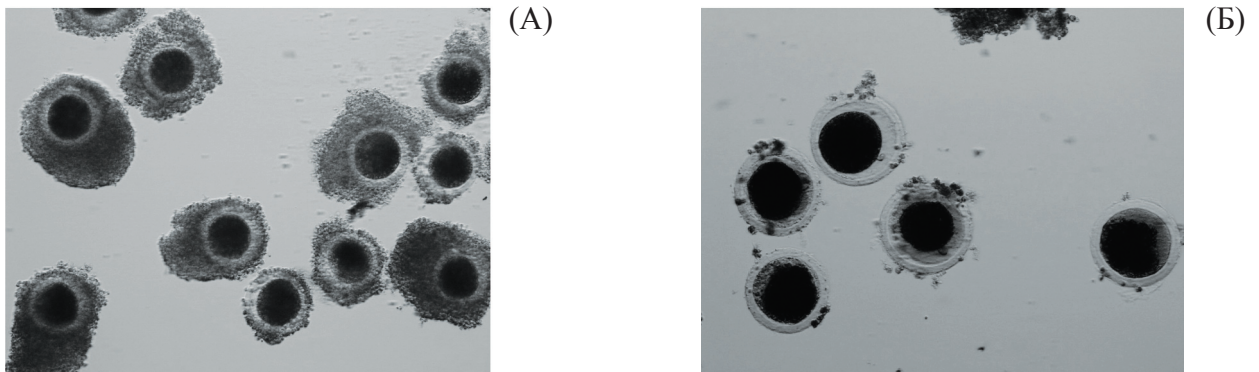
Определянето на цитотоксичността на растителните екстракти беше извършено в плаки (24; 96 ямкови), върху плътен клетъчен монослой, към който се добавяше хранителна среда със съответното количество от стоковия разтвор на изследваните вещества, до получаване на желаната тествана концентрация. Плаките бяха поставяни за 1 h на 37°C, след което се промиваха с физиологичен разтвор, или ФБР с рН 7.2 и се добавяше поддържащата среда. Цитотоксичността на растителните екстракти върху клетъчната линия MDBK бе контролирана микроскопски на 24-, 48- и 72-ия час, като промените се отчитаха на база ЦПЕ (Цитопатичен ефект). При залагането на плаките за всяка концентрация на тестваните вещества бяха направени двойни проби, като винаги се правеше и двойна контрола на клетъчния монослой. Всеки експеримент се повтаряше трикратно.

#### **Оценка влиянието на растителните екстракти върху виталитета на свински яйцеклетки**

След култивиране за 24 h групите от КОК бяха промити в чист култивационен медиум и разпределени в малки петриеви панички съдържащи по 250  $\mu$ l култивационен медиум, с добавени различни концентрации от изследваните екстракти. Така обработените групи от оцити, бяха инкубирани за 1 h при 38.5°C с 5% CO<sub>2</sub> и около 95% влажност. Впоследствие



Фиг. 1. Ооцити с добра (А) и лоша (Б) морфология  
Fig. 1. Oocytes with good (A) and bad (B) morphology



Фиг. 2. Свински яйцеклетки, оцветени с трипан блу. А – живи; Б- мъртви  
Fig. 2. Porcine oocytes stained with Trypan blue. A – alive; B- dead

всяка група беше поставяна в 100  $\mu$ l 0.05% разтвор на трипан блу със ФБР за 5 min. След оцветяване всяка група ооцити беше промивана във ФБР с добавен 0.4% говежди серумен албумин и поставяна в мини петрита, съдържащи 100  $\mu$ l култивационен медиум. Морфологичната оценка на ооцитите беше направена с помощта на инвертен микроскоп Nikon Eclipse Ti (Nikon, Japan). За всеки растителен екстракт бяха направени трикратни повторения с по 7 опитни групи и една нетретирана контрола.

#### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

След предварително тестване на всички разреждания на екстрактите върху клетъчна линия MDBK, бе установено, че при разреждания от 1:3 и 1:5 на екстракта от *M. officinalis* имаше наличие на ясно забележим цитопатичен

ефект (ЦПЕ), а при останалите разреждания - 1:7; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 такъв не беше отчетен. При тестването на екстракта от *L. aestivum*, ЦПЕ беше установен при разреждания 1:3 и 1:5. При останалите разреждания - 1:10; 1:50; 1:100; 1:150; 1:200; 1:300; 1:500, не се установяваше токсично действие на екстракта.

На базата на тези предварителни резултати в последващите опити бяха използвани следните разреждания: за *M. officinalis* - 1:7; 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320, за *L. aestivum* - 1:10; 1:50; 1:100; 1:150; 1:200; 1:300; 1:500.

Данните от проведените изследвания върху преживяемостта на свинските ооцити след третирането с екстрактите на *M. officinalis* и *L. aestivum* са представени в табл. 1 и 2.

Тестът за виталност с трипан блу се базира на промяна в интегритета на плазмената мембрана (Schrek, 1936), при което мъртвите

Таблица 1. Преживяемост на свински яйцеклетки след третиране с различни разреждания на екстракт от *M. officinalis*Table 1. Survival rate of pig oocytes, after treatment with different dilutions of the *M. officinalis* extract

| Тествани разреждания<br>Tested dilutions | Тест за виталност с трипан блу<br>Trypan Blue exclusion test |                                  |
|--|--|----------------------------------|
|  | общ брой ооцити/живи<br>Total number oocytes/alive           | среден % живи<br>Average % alive |
| <i>M. officinalis</i> 1:7                | 81/78  | 96,30                            |
| <i>M. officinalis</i> 1:10               | 81/78  | 96,30                            |
| <i>M. officinalis</i> 1:20               | 81/79  | 97,53                            |
| <i>M. officinalis</i> 1:40               | 81/80  | 98,77                            |
| <i>M. officinalis</i> 1:80               | 81/80  | 98,77                            |
| <i>M. officinalis</i> 1:160              | 81/80  | 98,77                            |
| <i>M. officinalis</i> 1:320              | 81/80  | 98,77                            |
| Контролни групи<br>Control groups        | 81/81  | 100                              |

Таблица 2. Преживяемост на свински яйцеклетки след третиране с различни разреждания на екстракт от *L. aestivum*Table 2. Survival rate of pig oocytes, after treatment with different dilutions of the *L. aestivum* extract

| Тествани разреждания<br>Tested dilutions | Тест за виталност с трипан блу<br>Trypan Blue exclusion test |                                  |
|--|--|----------------------------------|
|  | общ брой ооцити/живи<br>Total number oocytes/alive           | среден % живи<br>Average % alive |
| <i>L. aestivum</i> 1:10                  | 81/72  | 88,89                            |
| <i>L. aestivum</i> 1:50                  | 81/73  | 90,12                            |
| <i>L. aestivum</i> 1:100                 | 81/77  | 95,06                            |
| <i>L. aestivum</i> 1:150                 | 81/77  | 95,06                            |
| <i>L. aestivum</i> 1:200                 | 81/78  | 96,30                            |
| <i>L. aestivum</i> 1:300                 | 81/78  | 96,30                            |
| <i>L. aestivum</i> 1:500                 | 81/78  | 96,30                            |
| Контролни групи<br>Control groups        | 81/81  | 100                              |

клетки се оцветяват в син цвят (интегритетът е нарушен и боята прониква в цитоплазмата), а живите остават неочветени (Lenz et al., 1983). Ефективността на теста бе проверена чрез оцветяване на предварително умъртвени чрез сту-

дов шок свински яйцеклетки (свински яйчници бяха поставени без криопротектанти на -80°C за 96 h, след което от тях бяха добити яйцеклетки и оцветени по описаната процедура). Това беше абсолютната контрола на опита ( фиг.2).

Получените данни показват, че след третиране с екстракт от *M. officinalis*, преживяемостта на ооцитите при всяко разреждане е над 96.30%, а при третиране с екстракт от *L. aestivum* – над 88.89%. Нетретирани контролни групи и при двата екстракта имаха преживяемост от 100%. Разликата в процента на преживяемост между третирани и нетретирани групи е много малка, затова тези разреждания на растителните екстракти могат да се приемат за нетоксични и могат да бъдат тествани върху заразени ооцити, с цел проверяване на антивирусната им активност. Препоръчително е да се използват по-ниските разреждания на екстрактите (за *M. officinalis* от 1:7 до 1:20; за *L. aestivum* от 1:10 или 1:50), тъй като при големите разреждания има риск да не се наблюдава добре изразен антивирусен ефект, поради намаляване количествата на биологичноактивни вещества в екстрактите.

Резултати за добра преживяемост на клетъчни култури и линии след третиране с екстракт от *M. officinalis* са получени от **Geuenich et al.** (2008), на T- клетъчни линии и култури от първични макрофаги. **Mazzanti et al.** (2008) получават сходни резултати и върху Vero (ATCC CCL-81) клетъчна линия.

При третиране с екстракти от растения, съдържащи високи нива на ликорин, също са били получени добри резултати за преживяемост на клетъчните линии Vero E6 и HepG2 (**Li et al.**, 2005).

Получените от нас резултати за преживяемостта на свинските яйцеклетките след третиране с екстракти от *M. officinalis* и *L. aestivum*, както и данните за антивирусния ефект на двете растения, получени от други автори (**Dimitrova et al.**, 1993; **Ieven M et al.**, 1983; **Li et al.**, 2005; **Mazzanti et al.**, 2008; **Renard-Nozaki et al.**, 1989; **Schnitzler et al.**, 2008) дават предпоставка, за проучване на възможността, тези растения да бъдат използвани за разработване на процедури за антивирусно saniране на свински ооцити

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследваните екстракти не показват изразен токсичен ефект спрямо ооцитите. При най-висо-

ката концентрация на екстракта от *M. officinalis* се запазват над 96% живи яйцеклетки, а при екстракта от *L. aestivum* – над 88%.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Allahverdiyev, A, N. Duran, M. Ozguven, S. Koltas**, 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*, 11 (7-8), 657-61.
- Anonymous, 2004. *Folium Melissae*. In: WHO monograph on selected medicinal plants, vol. 2, World Health Organization, Geneva, 180 – 187.
- Bastida, J., S. Berkov, L. Torras, N. Belén Pigni, J. Paulo de Andrade, V. Martínez, C. Codina & F. Viladomat**, 2011.3. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, ed. Diego Munoz – Torrero, Transworld Research Network, Kerala, India, 65-100.
- Bernhoft, Aksel**, 2008. A brief review on bioactive compounds in plants. In: *Proceedings from a symposium “Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals”*, Oslo, Norway, The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 11-17.
- Bielanski, A.**, 2007, Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals, *Theriogenology*, 68 (1), 1–22.
- Bogdanova, Y., T. Stoeva, S. Yanev, B. Pandova, E. Molle, M. Burrus, M. Stanilova**, 2009. Influence of plant origin on propagation capacity and alkaloid biosynthesis during long-term in vitro cultivation of *Leucojum aestivum* L.. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 45, 4, 458–465.
- Brevini, T., R. Vassena, C. Francisci and F. Gandolfi**, 2005. Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes. *Biology of Reproduction*, 72 (5), 1218–1223.
- Dastmalchi, K., H. J. D. Dorman, P. P. Oinonen, Y. Darwis, I. Laakso, R. Hiltunen**, 2008. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT Food Science and Technology*, 41, 3, 391-400.

9. **Dimitrova, Z., B. Dimov, N. Manolova, S. Pancheva, D. Ilieva, S. Shishkov**, 1993. Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 29, 65-72.
10. **Edens, M. S, P. K Galik, K. P Riddell, M. D Givens, D. A Stringfellow, N. M Loskut-off**, 2003. Bovine herpesvirus-1 associated with single, trypsin-treated embryos was not infective for uterine tubal cells. *Theriogenology*, 60 (8), 1495-504.
11. **Erturk, O.**, 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 61 (3), 275-278.
12. **Gabrielsen, B., T. P. Monath, J. W. Huggins, D. F. Kefauver, G. R. Pettit, G. Groszek, M. Hollingshead, J. J. Kirsi, W. M. Shannon, E. M. Schubert, J. Dare, B. Ugarkar, M. A. Ussery, M. J. Phelan**, 1992. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *J. Nat. Prod.*, 55 (11), 1569-81.
13. **Ghosal, S., K. S. Saini, S. Razdan**, 1985. Crinum alkaloids: their chemistry and biology. *Phytochemistry*, 24, 10, 2141-2156.
14. **Ieven, M., A. Vlietinck, D. Vanden Berghe, J. Totte, R. Dommissie, E. Esmans, F. Alderweireldt**, 1982. Plant antiviral agents. III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). *J. Nat. Prod.*, 45, 5, 564-573.
15. **Ieven, M., D. A. van den Berghe, A. J. Vlietinck**, 1983. Plant antiviral agents. IV. Influence of lycorine on growth pattern of three animal viruses. *Planta Med.*, 49 (2), 109-14.
16. **Jaganathan, S. and E. Supriyanto**, 2012. Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Molecules*, 17 (6), 6290-6304.
17. **Jin, Zhong**, 2011. Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28 (6), 1126-1142.
18. **Kucera, Louis S., R. A. Cohen, E. C. Herrmann Jr.**, 1965. Antiviral Activities of Extracts of the Lemon Balm Plant. *Annals of the New York Academy of Sciences Volume 130, Antiviral Substances*, 474-482
19. **Lenz, R.W, G. D. Ball, M. L. Leibfried, R. L. Ax and N. L. First**, 1983. In vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes are Temperature-Dependent Processes. *Biology of Reproduction*, 29 (1), 173-179.
20. **Li, S., C. Chen, H. Zhang, H. Guo, H. Wang, L. Wang, X. Zhang, S. Hua, J. Yu, P. Xiao, R. Li, X. Tan**, 2005. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Res.*, 67, 1, 18-23.
21. **Magli, MC, L. Gianaroli, A. Fiorentino, AP. Ferraretti, D. Fortini, S. Panzella**, 1996. Improved cleavage rate of human embryos cultured in antibiotic-free medium. *Hum. Reprod.*, 11 (7), 1520-4.
22. **Marley, M. S, M. D Givens, D. A Stringfellow, P. K Galik, K. P Riddell**, 2006. Effect of phosphonoformic acid in the development of bovine embryos in vitro. *Vet Ther*, 7 (2), 156-66.
23. **Mazzanti, G, L. Battinelli, C. Pompeo, AM Serrilli, R. Rossi, I. Sauzullo, F. Mengoni, V. Vullo**, 2008. Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. extract on Herpes simplex virus type 2 replication. *Nat Prod Res.*, 22 (16), 1433-40.
24. **Renard-Nozaki, J., T. Kim, Y. Imakura, M. Kihara, S. Kobayashi**, 1989. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. *Res. Virol.*, 140, 115-128.
25. **Schnitzler, P., A. Schuhmacher, A. Astani, J. Reichling**, 2008. *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 15 (9), 734-40.
26. **Shrek, R.**, 1936. A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Am. J. Cancer*, 28, 389-392.
27. **Silva, N, A. Solana, J. M Castro**, 1999. Evaluation of the effects of different trypsin treatments on semen quality after BHV-1 inactivation, and a comparison of the results before and after freezing, assessed by a computer image analyzer. *Anim. Reprod. Sci.*, 54 (4), 227-35.
28. **Singh, E. L., W. C. D. Hare, F. C. Thomas, M. D. Eaglesome, A. Bielanski**, 1983. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. Non-transmission of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. *Theriogenology*, Volume 20, Issue 2, 169-176.

29. **Stringfellow, D. A., S. Seidel**, 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd ed., USA, IETS, Savoy, Illinois
30. **Tolo, F. M., G. M. Rukunga, F. W. Muli, E. N. Njagi, W. Njue, K. Kumon, G. M. Mungai, C. N. Muthaura, J. M. Muli, L. K. Keter, E. Oishi, M. W. Kofi-Tsekpo**, 2006. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. *J. Ethnopharmacol.*, 104 (1-2), 92–99.
31. **Zhou, H., S. H McKiernan, W. Ji, B. D Bavister**, 2000. Effect of antibiotics on development in vitro of hamster pronucleate ova. *Theriogenology*, 54 (7), 999–1006.

## EFFECT OF PLANT EXTRACTS WITH ANTIVIRAL PROPERTIES ON THE SURVIVAL RATE OF PIG OOCYTES

*M. Chervenkov, T. Ivanova\*, D. Kacheva, T. Stoeva\*, E. Kistanova*  
*Institute of Biology and Immunology of Reproduction, BAS - Sofia*  
*\*Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, BAS - Sofia*

### SUMMARY

The use of mechanical methods for disinfection of oocytes and embryos alone or in combination with enzymes (mainly trypsin), when performing assisted reproductive technology (ART) in livestock are not effective against all kind of viruses. Therefore, it is essential the search for new antiviral agents, which have no adverse effect on the oocyte and embryo development.

The aim of our study was to determine the optimal, non toxic concentrations of extracts from *Melissa officinalis* and *Leucosium aestivum* for porcine oocytes. These are plants with known antiviral properties and widely used in medicine.

The oocytes were obtained from clinically healthy pigs, slaughtered in an approved slaughterhouse. Oocytes were treated with plant extracts at dilutions from 1:7 to 1:320 for *Melissa officinalis*, and from 1:10 to 1:500 for *Leucosium aestivum*. The assessment of the oocytes survival rate, was made on the base of morphological examination and staining with trypan blue. The dilutions of the extracts, used for oocytes treatment, were defined, after preliminary testing on MDBK cell line.

The obtained data shows, that the survival rate of the oocytes, after treatment with extract of *M. officinalis*, at each tested dilution was above 96.00%. Regarding the treatment with extract of *L. aestivum*, the percentage of alive oocytes, was more than 88.00%, at each tested dilution. In both cases, the untreated control groups, had survival rate of 100%.

**Key words:** *Melissa officinalis, Leucosium aestivum, antiviral, oocytes, pig, sanitary*

Corresponding author e-mail: [vdmchervenkov@abv.bg](mailto:vdmchervenkov@abv.bg)