

УДК 578.832

*Н. С. СОКОЛОВА, А. С. ТУРМАГАМБЕТОВА, М. С. АЛЕКСЮК,
И. А. ЗАЙЦЕВА, П. Г. АЛЕКСЮК, А. П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, В. Э. БЕРЕЗИН*

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан)

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОФЛАВОНОВ СОИ ГЕНИСТЕИНА И ДАЙДZEИНА

Аннотация. Соевые бобы, кроме белка, содержат так называемые фитоэстрогены или изофлавоны, состоящие из гетероциклических соединений дифенилпропанового ряда, содержащих гидроксильные группы [1,2]. Изофлавоны сои объединяют в 3 основных типа (глицетин, дайдзеин и генистеин), каждый из которых существует в 4 различных химических формах: агликон, глюкозид, ацетилглюкозид и малонилглюкозид. Наиболее интересными по ряду причин являются генистеин и дайдзеин [3]. Проведены исследования вирусингибирующих и противовирусных свойств основных изофлавонов сои. Показано, что генистеин и дайдзеин обладают противовирусной активностью, сопоставимой с противовирусной активностью коммерческих препаратов ремантадин и тамифлю. Это обстоятельство позволяет рекомендовать продукты функционального питания с повышенным содержанием изофлавонов сои в качестве дополнительного источника для противовирусной терапии

Ключевые слова: грипп, противовирусная активность, соевые бобы, изофлавоны, дайдзеин, генистеин, вирусингибирующая активность, вирулицидная активность.

Тірек сөздер: тұмау, вирусқа қарсы тұру белсенділігі, соя бұршағы, изофлавоноидтар, дайдзеин, генистеин, вирусынталандырушы белсенділік, вирулицидті белсенділік.

Keywords: influenza antiviral activity, soybeans, isoflavones, daidzein, genistein, the virus inhibitory activity, virucidal activity.

Соевые бобы, кроме белка содержат так называемые фитоэстрогены или изофлавоны, состоящие из гетероциклических соединений дифенилпропанового ряда, содержащих гидроксильные группы. Изофлавоны сои объединяют в 3 основных типа (глицетин, дайдзеин и генистеин), каждый из которых существует в 4 различных химических формах: агликон, глюкозид, ацетилглюкозид и малонилглюкозид [4-6]. Интерес к этой группе соединений обусловлен их широким фармакологическим действием. Изофлавоны проявляют антиоксидантные свойства, ингибируя окисление различных классов липидных соединений, понижают уровень холестерина в крови, замедляют рост ряда злокачественных новообразований, уменьшают риск сердечнососудистых заболеваний, сглаживают климактерический синдром и т.д. [7,8].

Задачей наших исследований явилось сравнительное изучение вирусингибирующей способности основных изофлавонов сои: генистеина и дайдзеина на модели ортомиксовирусов.

Материалы и методы

Препараты:

1. Генистеин, дайдзеин («Sigma», США)
2. Ремантадин (АО «Олайнфарм», Латвия)
3. Тамифлю (Осельтамивир, Синексис САС, Франция)

Приготовление суспензий и растворов препаратов осуществляли в растворе фосфатно-солевого буфера, pH 7,2.

В работе использовали 9-11 дневные куриные эмбрионы, полученные из птицефабрик АО «Аллель Агро» (Алматы, Казахстан).

Штаммы вируса гриппа А:

Штамм А/малая крачка/Южная Африка/1/61, H5N3 (вирус гриппа птиц) получен из коллекции вирусов ГУ «Институт вирусологии им Д. И. Иванковского». Штамм А/Алматы/8/98, H3N2 (вирус гриппа человека) получен из коллекции вирусов гриппа РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК.

Вирусы выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов в течение 36 ч при 37 °С.

Вирусингибирующую активность препаратов определяли на куриных эмбрионах методом «скрининг-тест», рассчитанным на подавление репродукции 100 ЭИД₅₀ вируса заданными дозами изучаемых препаратов. Критерием противовирусного действия считали снижение титра вируса при обработке препаратом в сравнении с контролем.

Вирулицидную активность исследуемых препаратов определяли путем обработки вирусов гриппа при 37°C в течение 30 мин с последующим титрованием инфекционности обработанного материала. За реальное вирулицидное действие принимали разность между титром вируса в пробе до и после обработки [9].

Инфекционный титр вирусов на куриных эмбрионах определяли методом десятикратных разведений в соответствии с методом Reed и Muench [10].

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [11].

Выбор изофлавонов сои для сравнительного изучения их вирусингибирующих свойств был обусловлен рядом причин. Во-первых, дайдзеин и генистеин составляют более 80% изофлавонов сои, во-вторых, по структуре они отличаются только наличием дополнительной гидроксильной группы, в-третьих, анализируя структуру химических соединений с помощью программы предсказания биологических свойств известных химических соединений PASS, было показано, что с вероятностью до 50% именно генистеин и дайдзеин обладают средневыраженными противовирусными свойствами [12] (таблица).

Вероятностные характеристики противовирусных свойств химических соединений, рассчитанные с помощью программы PASS

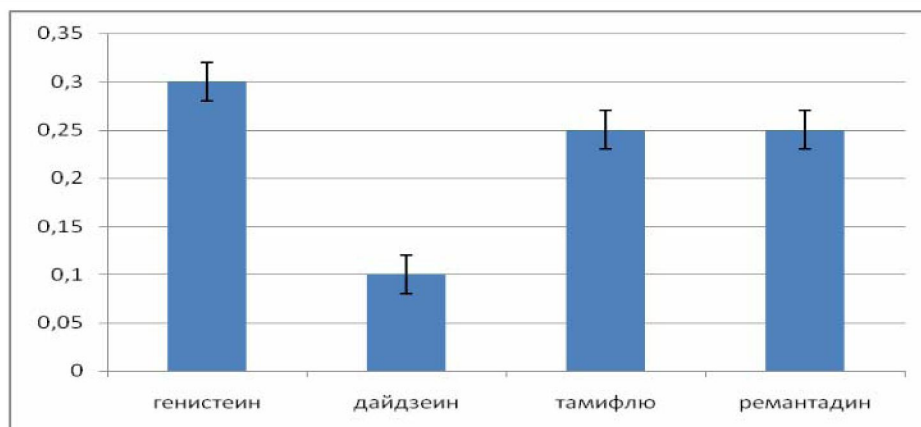
Дайдзеин		Активность	Генистеин	
Pa	Pi		Pa	Pi
0,660	0,009	Противоинфекционная активность	0,648	0,010
0,407	0,032	Противовирусная активность (вирус герпеса)	0,430	0,024
0,417	0,097	Antiviral (Picornavirus)	0,346	0,162
0,304	0,086	Antiviral (Adenovirus)	0,249	0,140
0,296	0,092	Antiviral (Influenza)	0,370	0,056
0,227	0,064	Antiviral (Hepatitis B)	0,349	0,023
0,182	0,117	Противовирусные свойства	0,197	0,098
0,078	0,006	Подавление нейраминидазной активности	0,091	0,004

Примечание. Pa – вероятность присутствия активности, Pi – вероятность отсутствия активности.

Для сравнительного изучения противовирусных свойств изофлавонов сои были выбраны ремантадин и тамифлю, способные подавлять 50% репродукции 100 инфекционных доз вируса в дозах менее 1 мг на куриный эмбрион независимо от антигенной структуры вируса. Поэтому верхняя граница исследуемого интервала доз фитоэстрогенов сои не превышала этого значения. Кроме того, в силу своих фитоэстрогенных свойств генистеин и дайдзеин способны оказывать цитостатическое действие в дозах выше 1 мг на куриный эмбрион, поэтому интервал доз изофлавонов был подобран таким образом, чтобы он не превышал подобное значение.

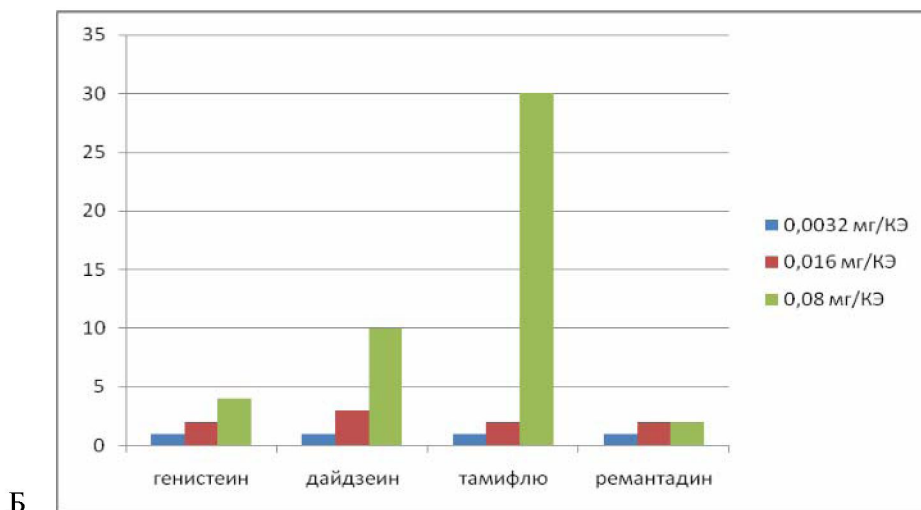
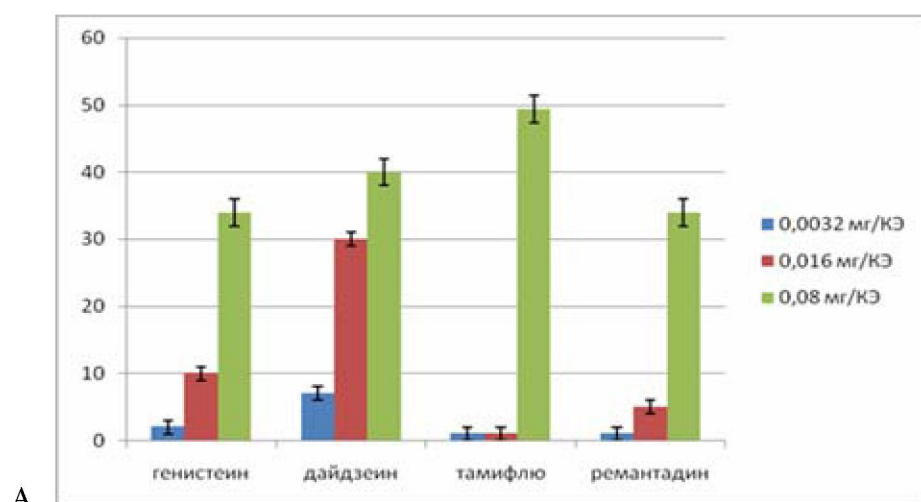
Для сравнительного анализа противовирусных свойств дайдзеина и генистеина было проведено изучение вирулицидной активности исследуемых препаратов в дозе 1 мг на куриный эмбрион. Показано (рисунок 1), что генистеин обладает способностью подавлять инфекционность вируса гриппа сопоставимой с коммерческими препаратами ремантадин и тамифлю и способен понижать количество вирионов вируса гриппа в образце более, чем на 50%. Дайдзеин в силу своей большей гидрофобности был не способен влиять на титр инфекционности вируса гриппа.

В дальнейших исследованиях было проведено изучение вирусингибирующей активности. Показано (рисунок 2), что изофлавоны сои способны подавлять репродукцию вируса независимо



Примечание. По оси ординат – разность между титром инфекционности вируса (обратные значения lg) в пробе без экспозиции с препаратом и его титром после.

Рисунок 1 – Влияние генистеина и дайдзеина на титр инфекционности вируса гриппа А/Алматы/8/98 (H3N2)



По оси ординат – процент подавления репродукции 100 инфекционных доз вируса. По оси абсцисс – исследованные препараты в разных дозах. А – на модели вируса А/Алматы/8/98 (H3N2), Б - А/малая крачка/Южная Африка/1/61 (H5N3)

Рисунок 2 – Вирусингибирующие свойства изофлавонов сои

от антигенной структуры вируса. При этом дайдзеин обладает более выраженными вирусингибирующими свойствами по сравнению с генистеином. Разная вирусингибирующая способность исследуемых препаратов в зависимости от используемого штамма косвенным образом указывает на то, что противовирусное действие изофлавонов сои представляет собой комплексный процесс и основан не только на воздействии препарата на вирусную частицу, но и влияет на биосинтетические процессы клетки хозяина.

В наших исследованиях было обнаружено некоторое противоречие между структурой соединения и его биологической активностью. Так, несмотря на отсутствие дополнительного гидроксила, дайдзеин показывает более выраженную противовирусную активность.

Однако, анализ структуры соединений (рисунок 3) показывает, что это противоречие мнимое [5, с. 1]. Более высокая противовирусная активность дайдзеина может быть обусловлена влиянием водородной связи, которая образуется между водородом гидроксильной группы в 5-м положении и 4-кето группой. За счет этой связи молекула генистеина проявляет более выраженные гидрофобные свойства и, как следствие, менее выраженные противовирусные свойства.

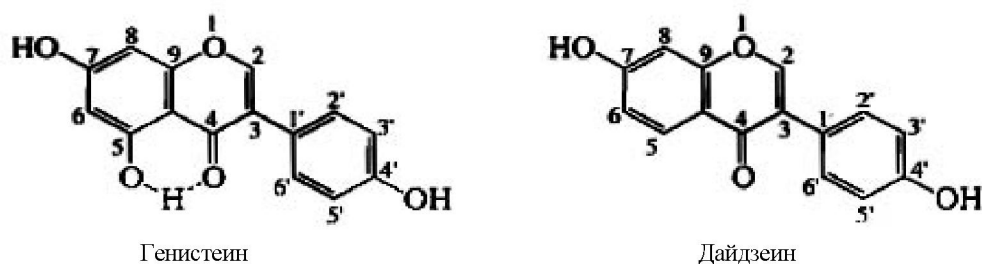


Рисунок 3 – Структурная формула изофлавонов сои

Таким образом, в проведенных исследованиях было установлено, что изофлавоны сои обладают антивирусной активностью, сопоставимой с антивирусной активностью коммерческих препаратов ремантадин и тамифлю. Это обстоятельство позволяет рекомендовать продукты функционального питания с повышенным содержанием изофлавонов сои в качестве дополнительного источника для противовирусной терапии

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Arai S., Studies on functional foods in Japan: State of Art // Biosci. Biotech. Biochem. – 1996. – Vol. 60. – P. 9-15.
- 2 Cornwell T., Cohick W., Raskin I. Dietary phytoestrogens and health // Phytochemistry. – 2004. – Vol. 65. – P. 995-1016.
- 3 Andresa A., Donovanb S.M., Kuhlenschmidtc M.S. Soy isoflavones and virus infections // Journal of Nutritional Biochemistry. – 2009. – Vol. 20. – P. 563-569.
- 4 Filz O.A., Poroikov V.V. Design of chemical compounds with desired properties using fragment libraries // Russian Chemical Reviews. – 2012. – Vol. 81, N 2. – P. 158-174.
- 5 Музычкина Р.К., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. – Алматы: Қазақ университеті, 2004. – 288 с.
- 6 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Основы химии природных соединений. – Алматы: Қазақ университеті, 2010. – 564 с.
- 7 Ogbuewu I.P., Uchegbu M.C., Emenalom O.O., Okoli I.C., Iloeje M.U. Overview of the chemistry of soy isoflavones, potential threats and potential therapeutic benefits // Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. – 2010. – Vol. 9, N 4. – P. 682-695.
- 8 Богоявленский А.П., Турмагамбетова А.С., Березин В.Э. Противовирусные препараты растительного происхождения // Фундаментальные исследования (Россия). – 2013. – № 6 (часть 5). – С. 1141-1146.
- 9 Шнейдер М.А. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. – Минск: Наука, 1977. – 150 с.
- 10 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // Amer. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- 11 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М., 1975. – 295 с.
- 12 Goel R.K., Singh D., Lagunin A., Poroikov V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products // Med. Chem. Res. – 2011. – Vol. 20, N 9. – P. 1509-1514.

REFERENCE

- 1 Arai S., Studies on functional foods in Japan: State of Art. Biosci. Biotech. Biochem. 1996. Vol. 60. P. 9-15.
- 2 Cornwell T., Cohick W., Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. Phytochemistry. 2004. Vol. 65. P. 995-1016.
- 3 Andresa A., Donovanb S.M., Kuhlenschmidtc M.S. Soy isoflavones and virus infections. Journal of Nutritional Biochemistry. 2009. Vol. 20. P. 563-569.

- 4 Filz O.A., Poroikov V.V. Design of chemical compounds with desired properties using fragment libraries. Russian Chemical Reviews. 2012. Vol. 81, N 2. R. 158-174.
- 5 Muzychkina R.K., Korul'kin D.Ju., Abilov Zh.A. Kachestvennyj i kolichestvennyj analiz osnovnyh grupp BAV v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i fitopreparatah. Almaty: Kazak universiteti, 2004. 288 s.
- 6 Muzychkina R.A., Korul'kin D.Ju., Abilov Zh.A. Osnovy himii prirodnyh soedinenij. Almaty: Kazak universiteti, 2010. 564 s.
- 7 Ogbuewu I.P., Uchegbu M.C., Emenalom O.O., Okoli I.C., Iloeje M.U. Overview of the chemistry of soy isoflavones, potential threats and potential therapeutic benefits. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2010. Vol. 9, N 4. P. 682-695.
- 8 Bogojavlenskij A.P., Turmagambetova A.S., Berezin V.Je. Protivovirusnye preparaty rastitel'nogo proishozhdenija. Fundamental'nye issledovanija (Rossija). 2013. N 6 (chast' 5). S. 1141-1146.
- 9 Shnejder M.A. Metodicheskie voprosy nauchnoj razrabotki protivovirusnyh sredstv. Minsk: Nauka, 1977. S. 150.
- 10 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg. 1938. Vol. 27. P. 493-497.
- 11 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. M., 1975. S. 295.
- 12 Goel R.K., Singh D., Lagunin A., Poroikov V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. Med. Chem. Res. 2011. Vol. 20, N 9. P. 1509-1514.

Резюме

*Н. С. Соколова, А. С. Турмагамбетова, М. С. Алексюк,
И. А. Зайцева, П. Г. Алексюк, А. П. Богоявленский, В. Э. Березин*

(PMK «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы, Қазақстан)

ГЕНИСТЕИН ЖӘНЕ ДАЙДZEIN СОЯСЫНЫҢ ИЗОФЛАВОНОИДТАРЫН САЛЫСТЫРМАЛЫ ТҮРДЕ ВИРУСҚА ҚАРСЫ БЕЛСЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

Соя бұршағының құрамында ақуыздардан басқа дифенилпропан қатарының гетероциклді қосылыстарынан тұратын фитоэстрогендер немесе изофлавоноидтар бар. Соя изофлавоноидтары 3 негізгі түрге бөлінеді (глицетин, дайдзеин және генистеин), әрқайсысы әртүрлі 4 химиялық формада кездеседі: тұрады: агликон, глюкозид, ацтилглюкозид және малонилглюкозид. Көптеген себептерге байланысты қызықты генистеин және дайдзеин саналады. Сояның негізгі изофлавоноидтарының вируссынталандырушы және вирусқа қарсы қасиеттері зерттелді. Көрсеткіш бойынша генистеин және дайдзеин вирусқа қарсы белсенділігі бар, коммерциялық препараттар ремантадин және тамифлю препараттарын салыстырмалы түрде қарағанда. Бұл функционалды азықтануға құрамында соя изофлавоноидтарының көп мөлшері бар азық тәулікті вирусқа қарсы терапия үшін ұсынуға мүмкіндік береді.

Тірек сөздер: тұмау, вирусқа қарсы тұру белсенділігі, соя бұршағы, изофлавоноидтар, дайдзеин, генистеин, вируссынталандырушы белсенділік, вирулицидті белсенділік.

Summary

*N. S. Sokolova, A. S. Turmagambetova, M. S. Aleksjuk,
I. A. Zajceva, P. G. Aleksjuk, A. P. Bogojavlenskij, V. Je. Berezin*

(RGE «Institute of microbiology and virology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan)

COMPARATIVE STUDY OF THE ANTIVIRAL ACTIVITY SOYBEAN ISOFLAVONES GENISTEIN AND DAIDZEIN

Abstract. Soybeans except protein contain so-called phytoestrogens or isoflavones composed of heterocyclic compounds difenylpropane series containing hydroxyl groups. Soybean isoflavones are combined in three major types (glycetin, daidzein and genistein), each of which exist in four different chemical forms: the aglycone, glycoside, acetyl glycoside and malonyl glycoside. The most interesting for several reasons genistein and daidzein are. The studies of virusinhibitory and antiviral properties of the main soy isoflavones were shown. It is shown that genistein and dadzein exhibits antiviral activity comparable to commercial preparations with antiviral activity of Tamiflu and rimantadine. This allows us to recommend functional food products with a high content of soy isoflavones as an additional source for antiviral therapy

Keywords: influenza antiviral activity, soybeans, isoflavones, daidzein, genistein, the virus inhibitory activity, virucidal activity.

Поступила 14.03.2014 г.