

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 309 (2015), 42 – 47

**ANTIVIRAL PROPERTIES
OF *Picea abies* AND *Illicium anisatum* EXTRACTS**

A. S. Turmagambetova, N. S. Sokolova, M. S. Alexyuk, A. P. Bogoyavlenskiy, V. E. Berezin

Institute of microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: aichyck@mail.ru

Key words: influenza virus, *Picea abies* extract, *Illicium anisatum* extract, antiviral activity, neuraminidase inhibitors.

Abstract. Folk medicine remedies are traditionally used in the case of not serious forms of the flu. It is believed that the plant preparations possess a wide spectrum of biological activity, effects on the various ways of the virus – cell interaction. In the paper the antiviral activity of *Picea abies* and *Illicium anisatum* extracts was studied. Extracts of these plants are the main suppliers of natural shikimic acid from which during the multi-stage synthesis receives the oseltamivir, the active substance of the antiviral preparation «Tamiflu». It is shown that *Picea abies* and *Illicium anisatum* plant extracts possess a pronounced antiviral activity against epidemiologically relevant strains of influenza virus type A (H3N2 and H7N1). It was found that the *Picea abies* and *Illicium anisatum* plant extracts can effectively inhibit the influenza A virus neuraminidase activity of N2 and N6 subtypes, which is comparable to the activity of commercial antiviral preparation «Tamiflu».

УДК 578.832

**АНТИВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ВОДНО-СПИРТОВЫХ
ЭКСТРАКТОВ *Picea abies* И *Illicium anisatum***

А. С. Турмагамбетова, Н. С. Соколова, М. С. Алексюк, А. П. Богоявленский, В. Э. Березин

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

Ключевые слова: вирус гриппа, хвоя ели, семена бадьяна, противовирусная активность, ингибиторы нейраминидазы.

Аннотация. Ежегодно в мире во время гриппозных эпидемий по данным ВОЗ болеют от 3 до 5 млн. человек и умирают до 500 тысяч человек, что является серьезной социальной и медицинской проблемой. В Казахстане на грипп и острые респираторные инфекции приходится свыше 90% от всех заболеваний инфекционной природы. Средства народной медицины традиционно применяются в случае нетяжелых форм гриппа. Считается, что растительные препараты обладают широким спектром биологической активности, воздействующей на различные пути взаимодействия вируса с клеткой. В работе изучалась противовирусная активность водно-спиртовых экстрактов, полученных из хвои ели и семян бадьяна, являющихся основными поставщиками природной шикимовой кислоты, из которой в ходе многоступенчатого синтеза получают осельтамивир, активное действующее вещество противовирусного препарата «Тамифлю». Показано, что растительные экстракты, проявляют выраженную противовирусную активность против эпидемически актуальных штаммов вирусов гриппа типа А (H3N2 и H7N1). Установлено, что растительные экстракты способны эффективно подавлять активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипов N2 и N6, что сопоставимо с активностью коммерческого противовирусного препарата «Тамифлю».

Введение. Ежегодно в мире во время гриппозных эпидемий по данным ВОЗ болеют от 3 до 5 млн. человек и умирают до 500 тысяч человек, что является серьезной социальной и медицинской проблемой [1, 2].

В Казахстане на грипп и острые респираторные инфекции приходится свыше 90% от всех заболеваний инфекционной природы [3].

Периодически (через каждые 2-5 лет) вирус гриппа типа А мутирует, значительно меняя свою антигенную структуру, что позволяет ему «обходить» иммунную систему организма и приводит к появлению новых штаммов, способных быстро распространяться среди населения, что зачастую сопровождается возникновением серьезных вспышек инфекции с тяжелыми осложнениями, вплоть до летальных исходов [1, 4, 5]. Смертность от самого гриппа невелика, однако вирусная инфекция отягощает течение хронических заболеваний, приводя к дополнительным соматическим заболеваниям и смертности населения, достигающей наибольших показателей по сердечно-сосудистым заболеваниям, нарушениям кровообращения мозга и поражениям лёгких [2]. Экономические потери от гриппа составляют миллиарды тенге только за одну эпидемию.

Средства народной медицины традиционно применяются в случае нетяжелых форм гриппа. Считается, что растительные препараты обладают широким спектром биологической активности, воздействующей на различные пути взаимодействия вируса с клеткой.

Одним из растений, содержащих биологически активные вещества, обладающие противогриппозным действием, является ель обыкновенная (*Picea abies*) – удивительное растение, которое может использоваться для лечения различных заболеваний. Шишки, хвоя, ветки и почки этого дерева обладают уникальными полезными свойствами. Мочегонный эффект настоя хвои применяется для эффективного лечения органов мочевыделительной системы. Эфирные соединения могут похвастаться бактерицидными и противовирусными свойствами. В качестве ароматерапии эфирное масло ели используется при насморке, заболеваниях верхних дыхательных путей, а также для повышения иммунитета и профилактики ОРЗ. Кроме того, еловое масло способно устранять перенапряжение и нервозность, усиливать защитные свойства кожи и повышать общий тонус организма человека.

В хвое содержатся эфирные масла, обладающие бактерицидными свойствами, каротин и аскорбиновая кислота (витамин С), повышающие защитные силы организма, дубильные вещества, обладающие противовоспалительным действием, микроэлементы, поддерживающие обмен веществ. А в состав смолы (живицы), например, входят терпентин, скипидар, древесный уксус и другие вещества, которые широко применяются в медицине. Именно в еловой хвое содержится большинство аминокислот, в том числе незаменимых, минеральные вещества, а также соли кобальта, марганца, железа, меди, хрома. Каротин в хвое 140-320 мг/кг, витаминов Е – 350-360 мг/кг, С – 300 мг/кг зимой и 250 мг/кг летом.

Шикимовая кислота — органическая моноциклическая одноосновная мононенасыщенная тригидроксимонокарбоновая кислота. Является ключевым интермедиатом в метаболическом пути, получившем название шикиматный путь, благодаря чему является предшественником синтеза ароматических аминокислот. Впервые изолирована в 1885 г. Иоганном Фредериком Эйкманом из семян плода бадьяна анисового (*Illicium anisatum*) [6].

Шикимовая кислота используется в качестве хиральной «затравки» в синтезе фармацевтических препаратов. Из природной шикимовой кислоты в ходе многоступенчатого синтеза получают осельтамивир – активное вещество коммерческого противовирусного препарата «Тамифлю» [7]. Длинный путь синтеза через опасные промежуточные соединения, небольшой общий выход (примерно 35%) и дорогостоящая добыча шикимовой кислоты из растительного сырья – бадьяна настоящего (*Illicium verum*) – затрудняют производство осельтамивира в больших количествах и диктуют необходимость поиска другого растительного сырья богатого шикимовой кислотой.

По данным Бочкова Д.В. и соавторов [8], хвоя ели содержит достаточное количество шикимовой кислоты, при этом содержание шикимовой кислоты в зимней и летней хвое, различается незначительно.

Целью данной работы являлось изучение антивирусной активности водно-спиртовых экстрактов полученных из хвои ели обыкновенной (*Picea abies*) и семян плода бадьяна анисового (*Illicium anisatum*).

Материалы и методы

Суспензии и растворы изучаемого экстракта готовили на фосфатно-солевом буфере, рН 7,2.

Получение препаратов путём водно-спиртовой экстракции. Растительный материал измельчали до получения частиц диаметром 2-3 мм. Для удаления липидов измельчённый растительный материал двукратно, в течение четырех часов обрабатывали 5 кратным объёмом этилового эфира уксусной кислоты. Экстракцию растительного материала осуществляли 5 кратным объёмом 80% этилового спирта в течение четырёх часов, двукратно. Полученный экстракт отфильтровывали от растительного материала и высушивали при температуре не выше 56°C.

В качестве объектов исследования были использованы вирусы гриппа (ортомиксовирусы) трех штаммов с различной антигенной формулой, штаммы: А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/Алматы/8/98 (H3N2) и А/Речная крачка/Коргалжын/847/04 (H3N6). Вирус выращивали в аллантоисной полости 10-11-дневных куриных эмбрионов в течение 24-36 ч. при 37° С. Титр вируса в аллантоисной жидкости составлял 10^7 - 10^9 ЭИД₅₀/мл.

Растительные экстракты: водно-спиртовые экстракты получали из хвои ели обыкновенной (*Picea abies*) и из семян плода бадьяна анисового (*Illicium anisatum*).

Инфекционный титр ортомиксовирусов определяли титрованием на куриных эмбрионах методом предельных разведений. О наличии вируса судили по реакции гемагглютинирующей активности. Титр инфекционности вирусов высчитывали по методу Рида и Менча [9].

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике с использованием 1% взвеси куриных эритроцитов [10].

Вирусингибирующие свойства экстрактов изучали в экспериментах с ортомиксовирусами на куриных эмбрионах. Антивирусную активность определяли методом «скрининг-тест», рассчитанным на нейтрализацию вируса в количестве 100 ЭИД₅₀ заданными концентрациями экстракта. Критерием противовирусного действия считали отличие инфекционного титра обработанного вируса в сравнении с контролем. При этом, как правило, учитывалось только полное подавление инфекционной активности вируса.

Вирулицидную активность исследуемых экстрактов определяли путем обработки вируса испытуемыми препаратами при 37°C в течение 30 мин с последующим титрованием инфекционности обработанного вируса. За реальное вирулицидное действие принимали разность между инфекционным титром вируса в пробе без обработки и его титром после обработки [11].

Нейраминидазную активность определяли стандартным тиобарбитуровым методом по Aminoff с использованием в качестве субстрата фетуина [12]. Об активности фермента судили по способности расщеплять субстрат с образованием окраски, дающей поглощение при длине волны 549нм.

Обработку данных производили в программе Microsoft Office Excel 2003. Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [13].

Результаты исследования

На модели вируса гриппа штаммы: А/FPV/Rostock/34 (H7N1) и А/Алматы/8/98 (H3N2) проводилось изучение действия водно-спиртовых экстрактов, полученных из хвои ели и семян бадьяна на инфекционный титр вируса гриппа.

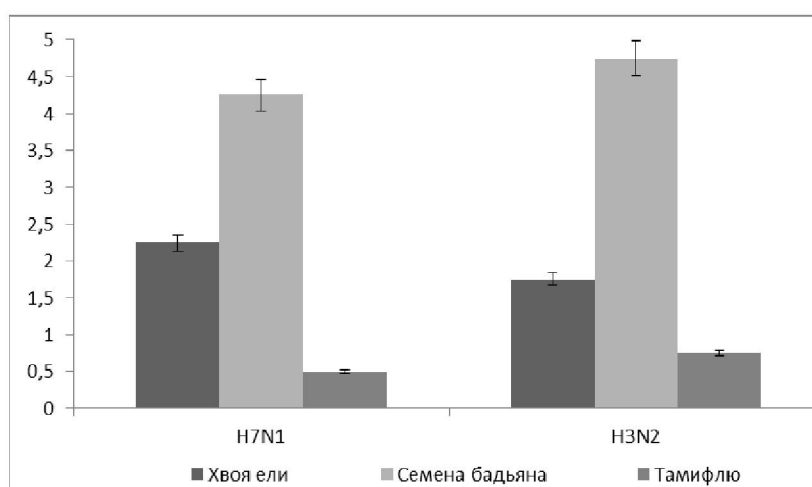
Антивирусная активность экстрактов была исследована в диапазоне доз 0,05 – 25,0 мг/мл. В качестве положительного контроля использовали коммерческий антивирусный препарат «Тамифлю» (осельтамивир) производства компании Сенекси САС (Франция), обладающий способностью активно подавлять размножение вируса гриппа типа А.

Установлено, что в дозе 0,25 мг/мл растительные экстракты полностью подавляли репродукцию вируса гриппа с антигенной структурой H7N1 и H3N2. В дозе 0,05 мг/мл экстракт, полученный из хвои ели был способен подавлять репродукцию вируса гриппа с антигенной структурой H7N1 на 56%, а со структурой H3N2 – на 31% (таблица). В этой же дозе экстракт, полученный из семян бадьяна, обладал более выраженной антивирусной активностью в отношении изученных вирусов гриппа. Показано, что в дозе 0,25 мг/мл антивирусная активность растительных экстрактов заметно превышала антивирусную активность коммерческого антивирусного препарата «Тамифлю».

Сравнительная вирусингибирующая активность растительных водно-спиртовых экстрактов при воздействии на вирусы гриппа типа А

| Доза вещества, мг/мл | Вирусингибирующая активность, % | | | | | |
|----------------------|---------------------------------|----------------|----------|-----------------------------|----------------|----------|
| | <i>A/FPV/Rostock/34 (H7N1)</i> | | | <i>A/Алматы/8/98 (H3N2)</i> | | |
| | Хвоя ели | Семена бадьяна | Тамифлю | Хвоя ели | Семена бадьяна | Тамифлю |
| 25,0 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 |
| 2,5 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 | 100±0,00 |
| 0,25 | 100±0,00 | 100±0,00 | 27±0,04 | 100±0,00 | 100±0,00 | 46±0,04 |
| 0,05 | 56±0,05 | 61±0,04 | 8±0,05 | 31±0,03 | 67±0,05 | 0±0,00 |

Также было проведено изучение вирулицидной активности растительных экстрактов в дозе 25,0 мг/мл (рисунок 1).



По оси абсцисс – препараты, по оси ординат – снижение титра инфекционности вируса гриппа в lg, штаммы: A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и A/Алматы/8/98 (H3N2).

Рисунок 1 – Вирулицидная активность растительных водно-спиртовых экстрактов, при обработке вируса гриппа А препаратами в дозе 25,0 мг/мл

Показано, что обработка вируса гриппа экстрактом, полученным из хвои ели приводила к падению инфекционного титра вируса – на 2,25–1,75 lg в зависимости от штамма. Обработка вируса гриппа экстрактом, полученным из семян бадьяна, приводила к снижению инфекционного титра разных штаммов вируса на 4,75–4,25 lg. При этом вирулицидная активность коммерческого противовирусного препарата «Тамифлю» уступала вирулицидной активности растительных экстрактов. Полученные данные указывают на ярко выраженную вирулицидную активность экстрактов, полученных из хвои ели и семян бадьяна, в особенности из семян бадьяна.

Изучена способность растительных экстрактов ингибировать нейраминидазную активность поверхностных антигенов ортомиксовирусов.

Исследования проводили на различных штаммах вируса гриппа человека и птиц с разными подтипами нейраминидаз: H7N1, H3N2 и H3N6. Влияние экстрактов на нейраминидазную активность изучали в диапазоне доз от 0,4 до 25,0 мг/мл.

По полученным данным была рассчитана доза экстрактов способная подавлять 50% активности фермента (IC₅₀) (рисунок 2).

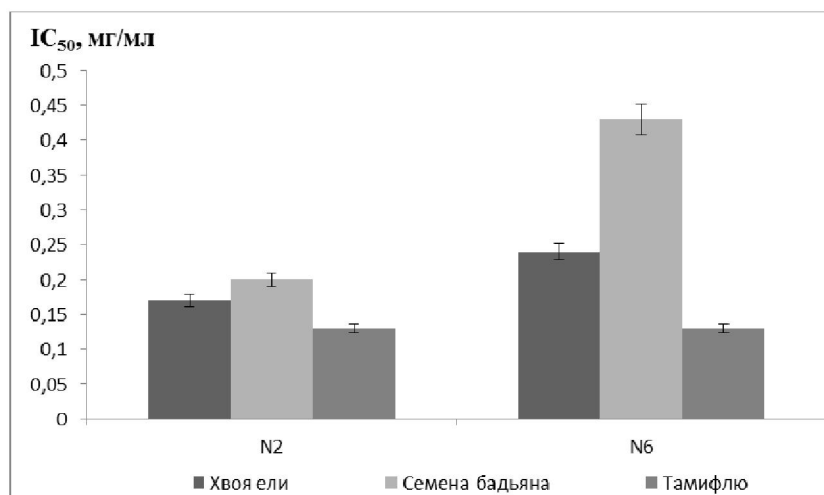


Рисунок 2 – Сравнительное изучение чувствительности нейраминидазы различных штаммов вируса гриппа при обработке растительными экстрактами

Показано, что растительный экстракт, полученный из хвои ели способен эффективно подавлять активность нейраминидазы подтипа N2 уже в дозе 0,17 мг/мл, подтипа N6 – в дозе 0,24 мг/мл. Однако, растительный экстракт не был способен подавлять активность нейраминидазы подтипа N1 во всем исследованном диапазоне доз (данные не приведены). Экстракт из семян бадьяна активно подавлял нейраминидазу подтипа N2 и менее активно нейраминидазу подтипа N1. При этом способность растительных экстрактов подавлять нейраминидазную активность вируса гриппа типа А подтипов N2 и N1 была сопоставима с активностью коммерческого противовирусного препарата «Тамифлю», блокирующего размножение вируса гриппа именно за счет угнетения активности вирусного фермента нейраминидазы.

Заключение. Таким образом, показано, что водно-спиртовые экстракты, полученные из хвои ели и семян бадьяна проявляют выраженную противовирусную активность против эпидемически актуальных штаммов вирусов гриппа. Установлено, что растительные экстракты способны эффективно подавлять активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипов N2 и N6, что сопоставимо с активностью коммерческого противовирусного препарата «Тамифлю».

Работа выполнена благодаря наличию грантовых проектов 0112РКО2471 и 0113РК00473 финансируемых Министерством образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Nelson K., Williams C. Infection disease epidemiology: theory and practice. “Jones and Bartlett Learning”. – Burlington. – USA, 2014. – 940 p.
- [2] Woodland D.L. Chronic viral infections // *Viral immunology*. – 2014. – Vol. 27, № 1. – P. 1-15.
- [3] Джанабаев Р.Т., Аяпбергенова Г.С., Мухтаркызы Ф. и др. Состояние инфекционного контроля в медицинских организациях в Южно-Казахстанской области // *Мат-лы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням*. – М., 2014. – С. 86-87.
- [4] Toohar R., Collins J., Street J., Braunack-Mayer, Marshall H. Community knowledge, behaviors and attitudes about the 2009 H1N1 influenza pandemic: a systematic review // *Influenza and other respiratory viruses*. – 2013. – Vol. 7, № 6. – P. 1316-1327.
- [5] Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses // *Microbiol Rev*. – 1992. – Vol. 56. – P. 152-179.
- [6] Hoffmann-La Roche. Factsheet Tamiflu, Stand 17. – November 2006.
- [7] Jang, S. and Singh. G. Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues // *Tetrahedron*. – 1998. – № 54. – P. 4697.
- [8] Бочков Д.В., Сысолятин С.В., Калашников А.И. и др. Поиск сырья для выделения шикимовой кислоты // *Химия растительного сырья*. – 2012. – № 3. – С. 81-87.
- [9] Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // *Amer. J. Hyg.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- [10] Закстельская Л.Я., Шендерович С.Ф. Метод удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации из диагностических и постинфекционных сывороток // *Вопросы вирусологии*. – 1979. – № 5. – С. 560-561.
- [11] Макарова Н.В., Бореко Е.И., Моисеев И.К. и др. Противовирусная активность адамантансодержащих гетероциклов // *Химико-фармацевтический журнал: Научно-технический и производственный журнал. Центр химии лекарственных средств – ВНИХФИ*. – 2002. – № 1. – С. 5-7.

[12] Aminoff D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // *Biochem. J.* – 1961. – Vol. 81. – P. 384-392.

[13] Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 296 с.

REFERENCES

[1] Nelson K., Williams C. Infection disease epidemiology: theory and practice. “*Jones and Bartlett Learning*”, Burlington, USA, **2014**, 940 p. (in Eng.).

[2] Woodland D.L. Chronic viral infections. *Viral immunology*, **2014**, Vol. 27, №1, P. 1-15 (in Eng.).

[3] Janabayev P.T., Ayapbepgenova G.S., Muhtapkyzy F., et al. Status CHECK-infectious medical opganizatsii in South Kazakhstan region. Materials of VI Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases. - M., 2014. - P. 86-87. (in Russ.).

[4] Toohar R., Collins J., Street J., Braunack-Mayer, Marshall H. Community knowledge, behaviors and attitudes about the 2009 H1N1 influenza pandemic: a systematic review. *Influenza and other respiratory viruses*, **2013**, Vol.7, №6, P. 1316-1327 (in Eng.).

[5] Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.*, **1992**, Vol. 56, P. 152-179 (in Eng.).

[6] Hoffmann-La Roche: *Factsheet Tamiflu, Stand 17*, November **2006** (in Eng.).

[7] Jiang. S., Singh. G. Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues. «*Tetrahedron*», **1998**, №54, P. 4697 (in Eng.).

[8] Bochkov D.V., Sysolyatin S.V., Kalashnikov A.I. and others. Search for the allocation of raw material shikimic acid. Chemistry of plant raw materials. - 2012. - № 3. - p. 81-87 (in Russ.).

[9] Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer.J.Hyg.*, **1938**, Vol. 27, P. 493-497 (in Eng.).

[10] Zakstelskaya L.Ya., Shenderovich S.F. The method of removing non-specific inhibitors of hemagglutination diagnostic and postinfectious sera. Problems of Virology. - 1979. - № 5. - p. 560-561. (in Russ.).

[11] Makarova N.V., Boreko E.I., Moiseev I.K., et al. Antiviral activity of adamantane hetero-cycles. Chemical and Pharmaceutical Journal: Scientific-technical and industrial journal. Center for Chemistry-governmental funds pharmaceuticals - VNIKhFI. - 2002. - № 1. - P. 5-7. (in Russ.).

[12] Aminoff D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **1961**, Vol. 81, P. 384-392 (in Eng.).

[13] Urbach V.Yu. Statistical analysis in biological and medical research. - M.: Medicine, 1975. - 296 p. (in Russ.).

Picea abies ЖӘНЕ *Illicium anisatum* СУЛЫ-СПИРТТІ ЭКСТРАКТІЛЕРДІҢ АНТИВИРУСТЫҚ ҚАСИЕТІ

А. С. Тұрмағамбетова, Н. С. Соколова, М. С. Алексюк,
А. П. Богоявленский, В. Э. Березин

ҚР БҒМ ҒК Микробиология және Вирусология институты РМК, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: тұмау вирусы, шырша қылқаны, бадьяна тұқымы, вирустарға қарсы белсенділік, нейраминидаза ингибитор.

Аннотация. Жыл сайын әлемде ДСҰ мәліметтері бойынша тұмау эпидемиясымен 3-тен 5 млн. адам ауырса, оның 500 мыңы қайтыс болады, бұл ірі әлеуметтік және медициналық мәселе. Қазақстанда барлық инфекциялық аурулардың 90 % осы тұмау мен респираторлық инфекцияларға тиесілі. Тұмаудың жеңіл түрлерін емдеуде дәстүрлі емес медицина қолданылуда. Өсімдік препараттары вирус пен клетканың өзара қарым-қатынас жасайтын жолдарына әсер етеді деген түсінік бар. Мақалада шыршаның және қылқанынды тұқымның сулы-спиртті экстрактінің вирусқа қарсы белсенділігі зерттелінген, шырша қылқанынан және бадьядан бөлініп алынған дәрі негізінде осельтамивир, вирустарға қарсы «Тамифлю» препаратының негізгі құрамы. Көрсетілген, өсімдік препараттарының экстракттері, тұмау вирустарының А (H3N2 и H7N1) қарсы қолдануға болатындығын көрсетті. Өсімдік экстракттері А вирусының подтиптері N2 және N6 нейраминазаларын залалсыздандыратындығы анықталды, яғни вирустарға қарсы препарат «Тамифлюге» коммерциялық бәсекелес бола алады.

Поступила 20.05.2015 г.