

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

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан.
E-mail: virprot@mail.ru)

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ГЛИКОЗИДОВ КЕМПФЕРОЛА

Аннотация. Поиск новых противоиных препаратов растительного происхождения является важной задачей современной фармакологии. На сегодняшний день продукты растений можно встретить в 30% фармацевтических препаратов, находящихся на рынке. Эпидемиологические исследования флавоноидных препаратов показали положительную связь между потреблением продуктов, содержащих кемпферол и снижением риска развития ряда заболеваний, таких как рак и сердечно-сосудистые заболевания. Многочисленные доклинические исследования показали, что кемпферол и некоторые гликозиды кемпферола обладают широким спектром фармакологической активности. Проведено сравнительное изучение способности производных кемпферола подавлять репродукцию вируса гриппа. Установлено, что максимальная противовирусная активность выявляется при наличии одного углеводного остатка с малонил или галлоил заместителями. Добавление второй углеводной цепи к молекуле препарата снижает противовирусные свойства производных кемпферола. Показано, что производные кемпферола могут рассматриваться как перспективный источник для получения новых эффективных противовирусных средств.

Ключевые слова: грипп, кемпферол, противовирусная активность.

Тірек сөздер: тұмау, кемпферол, вирусқа қарсы белсенділік.

Keywords: influenza, kaempferol, antiviral activity.

Введение. Поиск новых противоиных препаратов растительного происхождения является важной задачей современной фармакологии, поскольку растительные препараты практически не имеют противопоказаний, обладают более выраженными свойствами биоутилизации и отсутствием проявлений токсичности. На сегодняшний день продукты растений можно встретить в 30% фармацевтических продуктов, находящихся на рынке [1]. Эпидемиологические исследования флавоноидных препаратов показали положительную связь между потреблением продуктов, содержащих кемпферол и снижением риска развития ряда заболеваний, таких как рак и сердечно-сосудистые заболевания. Многочисленные доклинические исследования показали, что кемпферол и некоторые гликозиды кемпферола обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе антиоксидантной, противовоспалительной, антимикробной, противоопухолевой, кардиопротекторной, нейропротекторной, антидиабетической, антиостеопорозной, эстрогенной/антиэстрогенной, анксиолитической, обезболивающей и противоаллергенной активностью [2].

*Целью наших исследований являлся сравнительный анализ противовирусных свойств производных кемпферола, выделенных из разных видов *Polygonum*.*

Материалы и методы исследования

В работе были использованы 4 препарата производных кемпферола, любезно предоставленные сотрудниками кафедры химии и технологии органических веществ, природных соединений и полимеров факультета химии и химической технологии КазНУ (таблица 1).

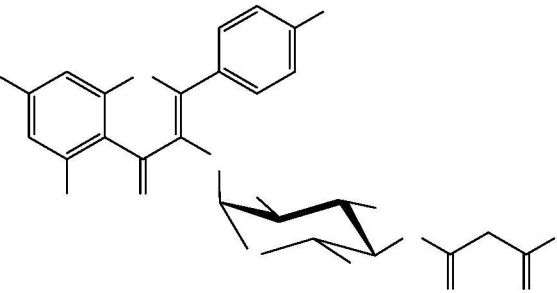
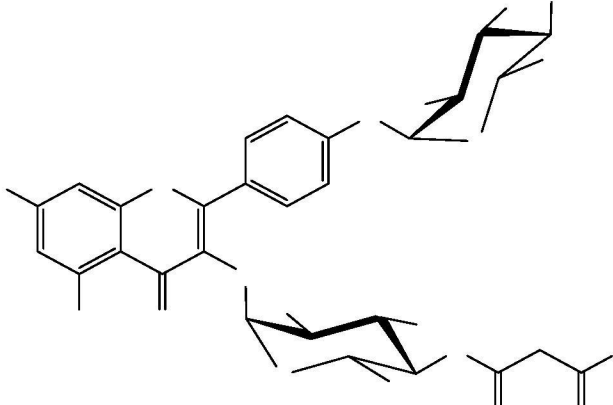
Суспензии и растворы изучаемых препаратов готовили на фосфатно-солевом буфере, pH 7,2.

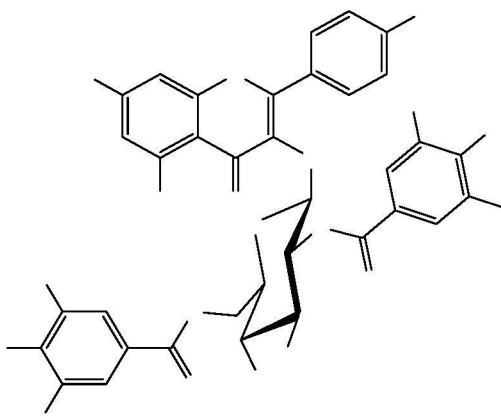
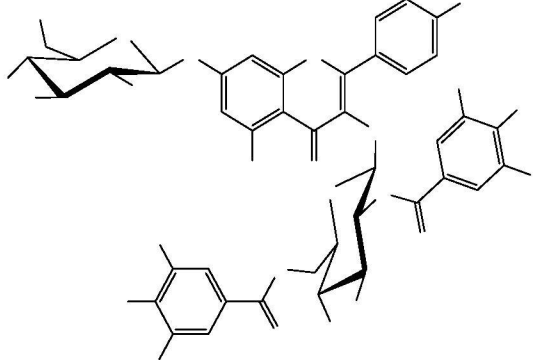
Для выращивания вирусов использовали куриные эмбрионы, полученные из птицефабрик АО «Алпель Агро» (Алматы, Казахстан).

Исследования проводили с вирусом гриппа, штаммы A/Almaty/8/98 (H3N2) и A/FPV/Rostock/34 (H7N1).

Вирусы выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов в течение 24–36 часов при 37°C.

Таблица 1 – Флавоноидные гликозиды, выделенные из растений рода *Polygonum*

Препарат	Структура флавоноидных гликозидов и результаты их структурного анализа
1	<div style="text-align: center;">  <p>3-O-(4''-малонил)-α-L-рамнопиранозидкемпферола</p> </div> <p>УФ: λ_{MAX} (MeOH), нм: 270, 358; (+NaOMe): 284, 392; (+NaOAc): 291, 375; (+NaOAc/H₃BO₃): 276, 363; (+AlCl₃): 290, 371; (+AlCl₃/HCl): 289, 371</p> <p>¹³C-ЯМР (100 MHz, CD₃OD) σ м.д.: 156.3 (C-2), 135.2 (C-3), 178.4 (C-4), 161.7 (C-5), 98.2 (C-6), 166.0, (C-7), 93.8 (C-8), 158.5 (C-9), 104.4 (C-10), 122.7 (C-1'), 128.9 (C-2',6'), 115.5 (C-3',5'), 156.9 (C-4'), 105.6 (C-1''), 71.7 (C-2''), 73.2 (C-3''), 62.6 (C-4''), 71.9 (C-5''), 72.3 (C-6''), 168.2 (C-1'''), 42.3 (C-2'''), 169.7 (C-3''')</p> <p>MS m/z (70 eV): 533, 532, 446, 430, 429, 417, 400, 367, 337, 335, 302, 301, 288, 285, 279, 278, 260, 259, 248, 245, 242, 231, 179, 178, 170, 165, 163, 154, 153, 152, 136, 135, 134, 126, 125, 112, 108, 107, 97, 92, 83, 77, 71, 69, 56, 52, 45, 43, 39</p> <p>Кислотный гидролиз вещества 1 показал отщепление рамнозы с образованием незамещенного кемпферола. Щелочной слав вещества дал в качестве продуктов 1,3,5-триоксисбензол и 4-оксисбензойную кислоту.</p>
2	<div style="text-align: center;">  <p>3-O-(4''-малонил)-α-L-рамнопиранозид-4''-O-α-L-рамнопиранозидкемпферола</p> </div> <p>УФ: λ_{MAX} (MeOH), нм: 270, 358; (+NaOMe): 271, 389; (+NaOAc): 270, 377; (+NaOAc/H₃BO₃): 270, 359; (+AlCl₃): 269, 382; (+AlCl₃/HCl): 271, 359</p> <p>¹³C-ЯМР (100 MHz, CD₃OD) σ м.д.: 156.2 (C-2), 135.1 (C-3), 178.6 (C-4), 161.5 (C-5), 98.1 (C-6), 166.2 (C-7), 93.6 (C-8), 158.7 (C-9), 104.3 (C-10), 122.6 (C-1'), 128.3 (C-2',6'), 114.6 (C-3',5'), 156.2 (C-4'), 105.8 (C-1''), 71.7 (C-2''), 73.1 (C-3''), 62.5, (C-4''), 71.9 (C-5''), 72.4 (C-6''), 105.1 (C-1'''), 72.4 (C-2'''), 71.8 (C-3'''), 73.5 (C-4'''), 73.8 (C-5'''), 16.7 (C-6'''), 167.7 (C-1'''), 41.6 (C-2'''), 168.9 (C-3''')</p> <p>MS m/z (70 eV): 679, 678, 592, 576, 566, 432, 431, 417, 400, 367, 337, 335, 302, 301, 288, 285, 279, 278, 260, 248, 245, 242, 231, 179, 178, 170, 165, 163, 153, 152, 146, 136, 135, 134, 126, 125, 112, 108, 107, 97, 92, 83, 77, 72, 69, 55, 52, 45, 42, 39</p> <p>Стадийный кислотный гидролиз вещества 2 показал отщепление рамнозы с образованием незамещенного кемпферола. Щелочной слав вещества дал в качестве продуктов 1,3,5-триоксисбензол и 4-оксисбензойную кислоту.</p>

1	2
3	 <p style="text-align: center;">3-О-(2'',6''-дигаллоил)-β-D-глюкопиранозидкемпферола</p> <p>УФ: λ_{MAX} (MeOH), нм: 270, 355; (+NaOMe): 283, 388; (+NaOAc): 287, 371; (+NaOAc/H₃BO₃): 278, 361; (+AlCl₃): 288, 371; (+AlCl₃/HCl): 287, 365</p> <p>¹³C-ЯМР (100 MHz, CD₃OD) σ м.д.: 156.3 (C-2), 135.2 (C-3), 178.4 (C-4), 161.8 (C-5), 98.4 (C-6), 166.3 (C-7), 93.9 (C-8), 158.7 (C-9), 104.4 (C-10), 122.7 (C-1'), 128.9 (C-2',6'), 115.4 (C-3',5'), 157.4 (C-4'), 105.2 (C-1''), 73.8 (C-2''), 73.1 (C-3''), 71.6 (C-4''), 77.6 (C-5''), 64.1 (C-6''), 166.4 (C-1'''), 121.1 (C-2'''), 109.5 (C-3''', 7''', 3''', 7'''), 145.6 (C-4''', 5''', 4''', 5'''), 140.1 (C-6''', 6''')</p> <p>MS m/z (70 eV): 752, 751, 599, 583, 430, 429, 417, 400, 367, 337, 335, 301, 288, 285, 279, 278, 260, 259, 248, 245, 242, 231, 179, 178, 169, 165, 154, 153, 152, 136, 135, 134, 126, 125, 112, 108, 107, 97, 92, 83, 77, 71, 69, 56, 51, 45, 42, 39</p> <p>Кислотный гидролиз вещества 3 показал отщепление рамнозы с образованием незамещенного кемпферола. Щелочной гидролиз вещества показал наличие галловой кислоты. Щелочной сплав вещества дал в качестве продуктов 1,3,5-триоксibenзол и 4-оксibenзойную кислоту.</p>
4	 <p style="text-align: center;">3-О-(2'',6''-дигаллоил)-β-D-глюкопиранозид-7-О-β-D-глюкопиранозидкемпферола</p> <p>УФ: λ_{MAX} (MeOH), нм: 268, 351; (+NaOMe): 273, 408; (+NaOAc): 267, 402; (+NaOAc/H₃BO₃): 266, 353; (+AlCl₃): 276, 405; (+AlCl₃/HCl): 275, 405.</p> <p>¹³C-ЯМР (100 MHz, CD₃OD) σ м.д.: 156.2 (C-2), 135.4 (C-3), 178.2 (C-4), 161.8 (C-5), 98.5 (C-6), 166.4 (C-7), 93.7 (C-8), 158.6 (C-9), 104.3 (C-10), 122.5 (C-1'), 129.0 (C-2',6'), 115.5 (C-3',5'), 157.6 (C-4'), 105.4 (C-1''), 73.7 (C-2''), 73.1 (C-3''), 71.5 (C-4''), 77.6 (C-5''), 64.2 (C-6''), 106.3 (C-1'''), 73.4 (C-2'''), 76.7 (C-3'''), 71.3 (C-4'''), 77.9 (C-5'''), 63.7 (C-6'''), 166.1 (C-1'''), 121.2 (C-2'''), 109.2 (C-3''', 7''', 3''', 7'''), 145.9 (C-4''', 5''', 4''', 5'''), 140.5 (C-6''', 6''')</p> <p>MS m/z (70 eV): 914, 913, 761, 745, 598, 592, 583, 430, 429, 417, 400, 367, 337, 335, 301, 288, 285, 279, 278, 260, 259, 248, 245, 242, 241, 231, 179, 178, 169, 165, 153, 152, 136, 135, 134, 126, 125, 112, 108, 107, 97, 92, 83, 77, 71, 69, 55, 52, 44, 42, 39</p> <p>Стадийный кислотный гидролиз вещества 4 показал отщепление глюкозы, с образованием незамещенного кемпферола. Щелочной гидролиз вещества показал наличие галловой кислоты. Щелочной сплав вещества дал в качестве продуктов 1,3,5-триоксibenзол и 4-оксibenзойную кислоту.</p>

Определение противовирусных свойств выполняли методом «скрининг-тест», рассчитанным на подавление репродукции вируса в количестве 100 ЭИД₅₀ заданными дозами лекарственных препаратов. Критерием противовирусного действия считали снижение инфекционного титра вируса при обработке противовирусным средством в сравнении с контролем [3].

Вирулицидную активность исследуемых препаратов определяли путем обработки вирусосодержащего материала лекарственными препаратами в различных дозах при 37°C в течение 30 мин с последующим титрованием инфекционности обработанного материала. За реальное вирулицидное действие принимали разность между инфекционным титром вируса в пробе до и после экспозиции с исследуемым препаратом [4].

Инфекционный титр вирусов на куриных эмбрионах определяли путем десятикратных разведений в соответствии с методом Reed и Muench[5].

Математическая обработка результатов проводилась стандартными методами [6].

Результаты и обсуждение исследования

Было проведено изучение вирусингибирующей активности 4 растительных препаратов кемпферола с разным строением углеводной части молекулы (см. Таблицу 1). Действие всех четырех испытуемых препаратов было исследовано в диапазоне доз 0,4–10,0 мг/кг из расчета 0,02–0,25 мг на куриный эмбрион.

Для определения вирусингибирующей активности были использованы штамм вируса гриппа птиц А/крячка/Южная Африка/1/61 (H5N3), вируса гриппа человека А/Алматы/8/98 (H3N2), а также 2 парамиксовируса: вирус болезни Ньюкасла, штамм ПМВ-1/курица/Алматы/541/04 и вирус Сендай, штамм 960.

Вирусы выращивали в аллантоисной полости 9–10 дневных куриных эмбрионов в течение 36 часов при 37°C.

Таблица 2 – Вирусингибирующая активность флавоноидов с агликоном кемпферола

Препарат	Процент подавления инфекционной активности вируса гриппа, %		
	0,4 мг/кг 0,02 мг/к.э. 0,01%	2 мг/кг 0,1 мг/к.э. 0,05%	10 мг/кг 0,5 мг/к.э. 0,25%
Вирус гриппа человека А/Алматы/8/98 (H3N2)			
1	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
2	37,0±4,8	39,0±4,8	61,0±4,8
3	11,0±2,1	46,0±4,8	83,0±4,8
4	0,0±0,0	0,0±0,0	2,0±0,8
Вирус гриппа птиц А/крячка/Южная Африка/1/61 (H5N3)			
1	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
2	4,0±0,8	11,0±2,1	15,0±2,1
3	31,0±4,8	43,0±4,8	100,0±0,0
4	2,0±0,8	6,0±0,8	33,0±4,8
ПМВ-1/курица/Алматы/541/04			
1	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
1	2	3	4
2	0,0±0,0	2,0±0,8	4,0±0,8
3	10,0±2,1	27,0±2,1	42,0±4,8
4	5,0±0,8	10,0±2,1	15,0±2,1
Вирус Сендай, штамм 960			
1	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
2	0,0±0,0	10,0±2,1	15,0±2,1
3	0,0±0,0	13,0±2,1	40,0±4,8
4	0,0±0,0	3,0±0,8	7,0±0,8

Вирусингибирующие свойства препаратов изучали методом «скрининг-тест», рассчитанным на нейтрализацию вируса в количестве 100 ЭИД₅₀ заданными дозами препаратов. Критерием противовирусного действия считали наличие достоверного отличия титра вируса по сравнению с контролем.

Установлено, что препарат № 1 полностью подавлял репродукцию 100 инфекционных доз вирусов гриппа, вируса болезни Ньюкасла и вируса Сендай во всем диапазоне исследуемых доз. Препарат № 3 в дозе 10 мг/кг был способен подавлять репродукцию вирусов гриппа на 83–100%, а репродукцию парамиксовирусов не менее, чем на 40%. Препараты № 2 и № 4 во всем диапазоне исследуемых доз проявляли слабый вирусингибирующий эффект (таблица 2).

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что препараты производные кемпферола 3-О-(4''-малонил)- α -L-рамнопиранозид и 3-О-(2'',6''-дигаллоил)- β -D-глюкопиранозид обладали выраженными вирусингибирующими свойствами по отношению к орто- и парамиксовирусам. При изучении зависимости «структура – активность» было показано, что наличие двух углеводных цепей в качестве заместителя у агликона кемпферола снижает антивирусные свойства флавоноида.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Moriarty L.F., Omer S.B. Infants and the seasonal influenzavaccine: A global perspective on safety, effectiveness, and alternate forms of protection // Hum VaccinImmunother. – 2014. – Vol. 10, N 9. – P. 10-12.
- 2 Chen A.Y., Chen Y.C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention // Food Chem. Jun. – 2013. – Vol. 138, N 4. – P. 2099-2107.
- 3 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus // AvianDis. – 1970. – Vol. 14. – P. 542-549.
- 4 Шнейдер М.А. Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. – Минск: Наука, 1977. – С. 150.
- 5 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points // Amer. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- 6 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М., 1975. – С. 295.

REFERENCES

- 1 Moriarty L.F., Omer S.B. Infants and the seasonal influenzavaccine: A global perspective on safety, effectiveness, and alternate forms of protection. Hum VaccinImmunother. 2014. Vol. 10, N 9. P. 10-12.
- 2 Chen A.Y., Chen Y.C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. Food Chem. Jun. 2013. Vol. 138, N 4. P. 2099-2107.
- 3 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus. AvianDis. 1970. Vol. 14. P. 542-549.
- 4 Shnejder M.A. Metodicheskie voprosy nauchnoj razrabotki protivovirusnyh sredstv. Minsk: Nauka, 1977. S. 150. (in Russ)
- 5 Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. Amer. J. Hyg. 1938. Vol. 27. P. 493-497.
- 6 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovaniyah. M., 1975. S. 295. (in Russ)

Резюме

*М. С. Алексюк, П. Г. Алексюк, И. А. Зайцева, Н. С. Соколова,
А. С. Тұрмағамбетова, Д. Ю. Корулькин, А. П. Богоявленский, В. Э. Березин*

(ҚР БҒҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы, Қазақстан)

КЕМПФЕРОЛА ГЛИКОЗИДТЕРДІҢ ВИРУСЫНТАЛАНДЫРҒЫШ БЕЛСЕНДІЛІКТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Инфекцияға қарсы жаңа өсімдік тектес препараттарды іздестіру заманауи фармакологияда маңызды мәселе болып отыр. Бүгінгі күні нарықта фармацевтикалық препараттардың 30%-нан өсімдік өнімін кездестіруге болады. Флавоноидтық препараттардың эпидемиологиялық зерттеулер өнім тұтынумен арасында оң байланыс көрсетті, кемпферол кездеседі және аурулардың өсуі төмендеумен, ісік аурулары сондай сияқты жүрек қан-тамыр аурудың қатарының дамуы азаюда. Көптеген клиникаға дейінгі зерттеулер, кемпферол және кейбір гликозидтер кемпферола фармакологиялық белсенділіктер кең спектрмен ие болып жатқанын көрсетті. Тұмау вирусының репродукциясы қабілеттіліктеріне салыстырмалы зерттеуі өткізілген туынды кемпферола басым болды. Анықталған, максималді вирусқа қарсы белсенділіктен бір көмірсутек қалдықта малонил немесе галлоил орынбасарлармен бар болуы білініп жатты. Препаратқа молекула екінші көмірсутек тізбегі қосылуы кемпферола туындысының вирусқа қарсы қасиеттерін төмендетті. Көрсетілген, жаңа тиімді вирусқа қарсы құралдар алу үшін болашағы бар туынды ретінде кемпферола қарастырылды.

Тірек сөздер: тұмау, кемпферол, вирусқа қарсы белсенділік.

Summary

*M. S. Alexyuk, P. G. Alexyuk, I. A. Zaitseva, N. S. Sokolova,
A. S. Turmagambetova, D. Y. Korulkin, A. P. Bogoyavlenskiy, V. E. Berezin.*

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

STUDY OF VIRUS INHIBITING ACTIVITY OF KAEMPFEROL GLYCOSIDES

The search for new anti-infective preparations of plant origin is an important goal of modern pharmacology as herbal medicines have virtually no contraindications, have more pronounced properties of bioutilization and the absence of toxicity. To date, plant products can be found in 30% of pharmaceutical preparations that are on the market. Epidemiological studies of flavonoid drugs showed a positive association between the consumption of foods containing kaempferol and a reduced risk of several diseases, such as cancer and cardiovascular disease. Numerous preclinical studies showed that kaempferol and some kaempferol glycosides possess a wide spectrum of pharmacological activity.

The aim of this research was to conduct a comparative study of kaempferol derivatives having the ability to inhibit influenza virus reproduction. It was found that the maximum antiviral activity detected in the presence of a carbohydrate residue with malonyl or galloylsubstituents. Adding a second carbohydrate chain to the drug molecule reduces the antiviral properties of kaempferol derivatives. It is shown that kaempferol derivatives can be considered as a promising source for new effective antiviral agents.

Keywords: influenza, kaempferol, antiviral activity.