

*А. П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ¹, А. С. ТУРМАГАМБЕТОВА¹,
М. С. АЛЕКСЮК¹, В. Э. БЕРЕЗИН¹, В. М. ДУШЕНКОВ², И. РАСКИН²*

¹РГП «Институт микробиологии и вирусологии», КН МОН РК, Алматы
²Государственный университет Нью-Джерси, г. Ратгерс, США)

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ КЛЮКВЫ НА ВИРУС ГРИППА

Аннотация

Респираторные вирусные инфекции продолжают оставаться серьезной проблемой для здравоохранения из-за их широкого распространения и высокой степени смертности. Поиски новых препаратов растительного происхождения, способных подавлять репродукцию вирусов, остаются одной из наиболее актуальных проблем практической вирусологии. В представленных исследованиях проводилось изучение способности иммобилизованных препаратов биологически активных соединений, полученных из сока клюквы подавлять репродукцию вируса гриппа. Показано, что полученные препараты угнетают размножение вируса гриппа. Механизм подобного действия обусловлен не только противовирусной активностью флавоноидов, содержащихся в препаратах, полученных из сока клюквы, но и способностью иммобилизованных препаратов адсорбировать вирусные частицы на поверхность носителя.

Ключевые слова: Nutrasorb, флавоноиды клюквы, противовирусные свойства.

Кілт сөздер: Nutrasorb, флавоноид мүк жидегі, вирусқа қарсы сипаты.

Keywords: Nutrasorb, cranberry flavonoids, antiviral properties.

Введение. С древних времен люди старались использовать в качестве лечебных средств продукты, употребляемые в пищу или препараты, полученные из них [1-4]. К ним относятся корни, плоды, кора, листья и стебли растений, органы различных животных, а также минеральные соединения. Информация о профилактических и терапевтических свойствах растений, используемых в пищу пришла к нам из древнейшей восточной медицины (Древний Китай, Индия и Тибет). В состав подобных препаратов входят многие компоненты, в том числе соединения с противовирусной и антимикробной активностью.

Антивирусные и антимикробные свойства полифенольных препаратов винограда известны в течение многих столетий, поэтому изучение способности растительных препаратов, содержащих полифенольные комплексы, подавлять репродукцию вирусов является весьма перспективным направлением исследований. К сожалению, многие биологически активные полифенольные соединения обладают слабой стабильностью при изменении температуры и рН окружающей среды, что может быть причиной, препятствующей их использованию в качестве противовирусных препаратов. Известно, что иммобилизация биологически-активных растительных и микробных соединений может многократно усиливать стабильность подобных препаратов.

Технология Nutrasorb™ – технология получения нового поколения иммобилизованных белковых сорбентов [5, 6]. Принцип получения препаратов основан на осаждении на микрочастицы сорбента биологически активных соединений съедобных ягод и фруктов, вследствие чего биологическая активность этих природных соединений увеличивается в несколько раз.

Nutrasorb™ – инновационная и экономически эффективная технология производства натурального концентрированного сырья из фруктов, которые обеспечивают организм достаточной дозой витаминов и питательных веществ для поддержания здоровья и

хорошего самочувствия с сохранением вкуса и длительным сроком хранения. Технология Nutrasorb™, запатентована в университете г. Ратгерса, Нью-Джерси, США. Это эффективный метод концентрации полезных натуральных веществ из фруктов и овощей, с одновременным устранением потенциально нежелательных соединений, таких как сахара и жиры. 1,5 г сорбированных по технологии Nutrasorb проантоцианидинов из плодов клюквы (основные антибактериальные соединения), соответствуют одному стакану клюквенного сока (240 мл).

Технология производства препарата делится на две принципиальные части – это Nutrasorb S (использование для иммобилизации биологически активных соединений из концентрата сока) и Nutrasorb C (использование для иммобилизации биологически активных соединений из ягодного шрота).

В настоящей работе изучалась способность иммобилизованных биологически активных препаратов, полученных из клюквы подавлять репродукцию вируса гриппа.

Материалы и методы

Вирусы гриппа: вирус гриппа птиц, штаммы *A/FPV/Rostock/34* (H7N1), *A/малая крачка/Южная Африка/1/61* (H5N3) и вирус гриппа человека, штамм *A/Алматы/8/98* (H3N2) выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов. После инкубации при 37°C в течение 24-36 часов, аллантоисную жидкость собирали для постановки экспериментов.

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике [7] с использованием 0,75% взвеси куриных эритроцитов.

Подавление адсорбции вирусов. Двукратные разведения 5% растворов препаратов готовили в солевом фосфатном буфере pH 7,2. К каждой пробе была добавлена вирусосодержащая аллантоисная жидкость в равном объеме. После инкубации в течение 30 минут при 4°C и центрифугировании при 3000 об/мин. – 5 минут, к пробам добавляли 5% взвесь куриных эритроцитов, через 30 минут инкубации при 4°C определяли гемагглютинирующую активность вирусов. В качестве положительного контроля использовали вирусосодержащий аллантоисный материал, в качестве отрицательного контроля – фосфатный буфер [8].

Вирусингибирующие свойства. Наличие вирусингибирующей активности изучали по способности препаратов в разных дозах подавлять репродукцию вируса в количестве 100 ЭИД₅₀ при экспериментальном заражении 10-дневных куриных эмбрионов. Критерием противовирусного действия считали отличие титра инфекционной активности вируса по сравнению с контролем. При этом, как правило, учитывалось только полное подавление титра вируса.

Наличие вирулицидной активности изучали по способности иммобилизованных препаратов биологически активных соединений клюквы инактивировать вирусные частицы (разрушать) до попадания в куриный эмбрион. Вирулицидную активность исследуемых препаратов определяли путем обработки вирусосодержащего материала экстрактами при 37°C в течение 30 мин с последующим титрованием инфекционности обработанного материала.

Инфекционный титр вирусов определяли по методу Reed и Muench [9].

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [10].

Результаты и обсуждение

Для изучения антивирусных свойств иммобилизованных полифенолов клюквы использовали 3 вируса гриппа, которые могут вызывать не только острые респираторные инфекции, но также и инфекции желудочно-кишечного тракта.

В экспериментах изучалось влияние иммобилизованных полифенолов клюквы Nutrasorb S и C в разных дозах на способность вирусов гриппа (штаммы *A/FPV/Rostock/34* (H7N1), *A/малая крачка/Южная Африка/1/61* (H5N3) и *A/Алматы/8/98* (H3N2)) адсорбироваться на поверхности эритроцитов. Для этого экстракты в различных концентрациях смешивали с равным объемом вирусосодержащего материала и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Результаты экспериментов показали, что при повышении концентрации препаратов от 0 до 2,5% сорбция вирусов снижалась до 80%. Это свидетельствует, что иммобилизованные полифенольные препараты, полученные из клюквы Nutrasorb S и C обладают сорбционной активностью и способны эффективно подавлять прикрепление вирусов гриппа на клеточные рецепторы. При этом, препарат Nutrasorb C обладал более выраженными адсорбционными свойствами (рисунок 1).

В последующих экспериментах исследовалась способность препаратов Nutrasorb S и C подавлять репродукцию вируса гриппа с различной антигенной структурой. Диапазон исследованных доз препаратов Nutrasorb S и C варьировал от 0 до 5 мг/куриный эмбрион (0-100 мг/кг веса).

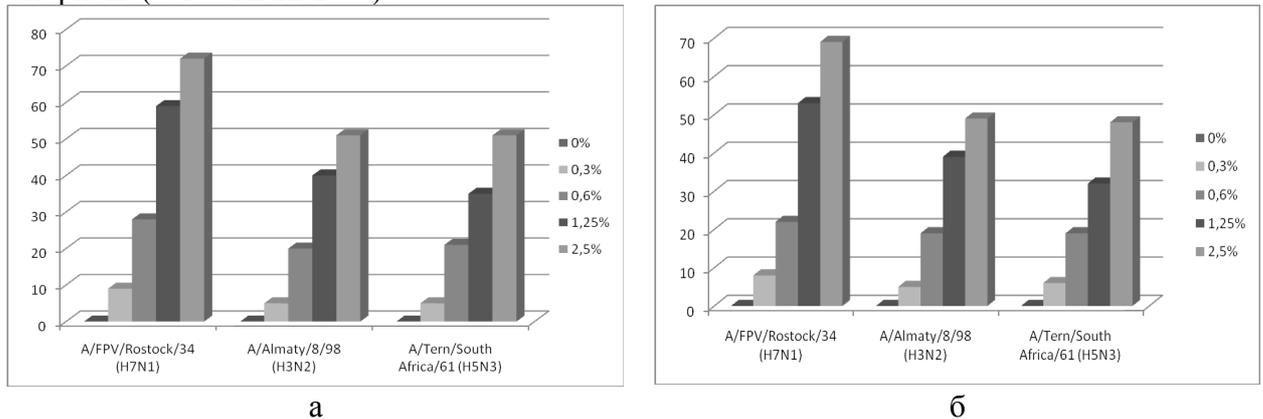


Рисунок 1 – Влияние иммобилизованных полифенолов клюквы Nutrasorb S и C на адсорбцию вирусов гриппа.

По оси ординат – процент подавления гемагглютинации вирусов после взаимодействия с препаратами:

а – Nutrasorb C, б – Nutrasorb S

Показано, что при увеличении дозы препаратов Nutrasorb до 5 мг/куриный эмбрион инфекционная активность вирусов снижается от 39% до 100% в зависимости от штамма вируса (рисунок 2). Вирусингибирующие свойства препарата Nutrasorb C были выше, чем у препарата Nutrasorb S.

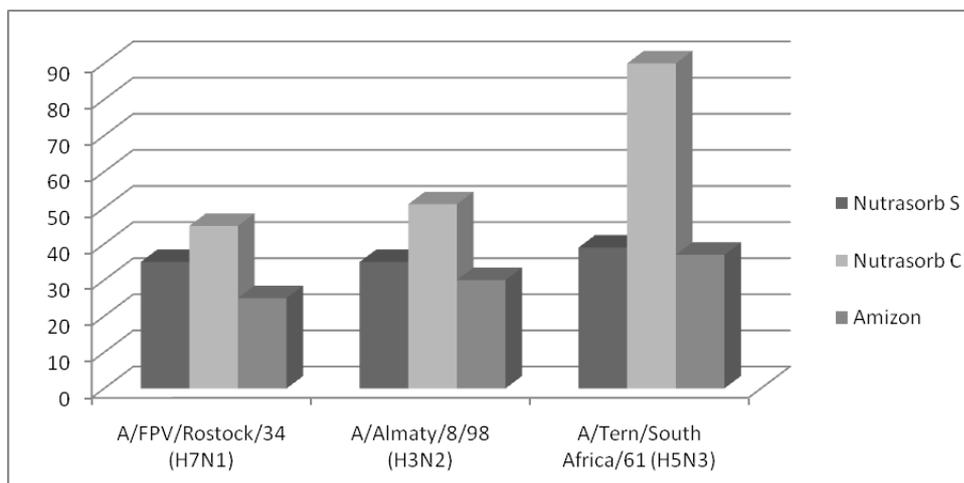


Рисунок 2 – Способность иммобилизованных полифенолов клюквы Nutrasorb S и C подавлять репродукцию 100 ИЭД вируса гриппа (доза 5 мг/куриный эмбрион). По оси ординат – процент подавления репродукции вируса гриппа

Проведено изучение антивирусных и вирулицидных свойств препаратов S и C в сравнении с коммерческим антивирусным препаратом амизон. Выбор коммерческого антивирусного препарата обусловлен тем, что амизон подавляет репродукцию вирусов, изменяя гомеостаз организма, что в какой-то мере соответствует возможному механизму действия изучаемых энтеросорбентов (препараты S и C).

При изучении вирулицидной активности и возможности препаратов S и C подавлять репродукцию вируса гриппа было показано, что оба изученных препарата способны подавлять репликацию вирусов гораздо эффективнее, чем амизон и снижают инфекционную активность вируса не менее, чем на 1,5 lg (рисунок 3). Эти данные свидетельствуют о более высокой вирулицидной активности изучаемых препаратов, по сравнению с коммерческим антивирусным препаратом амизон.

Заключение. Таким образом, было установлено, что использование технологии иммобилизации полифенольных соединений, содержащихся в ягодах и фруктах, на белково-полисахаридные носители, позволяет использовать данные препараты в качестве антивирусных средств, благодаря наличию биологически активных полифенольных соединений, способных эффективно подавлять репродукцию вирусов гриппа.

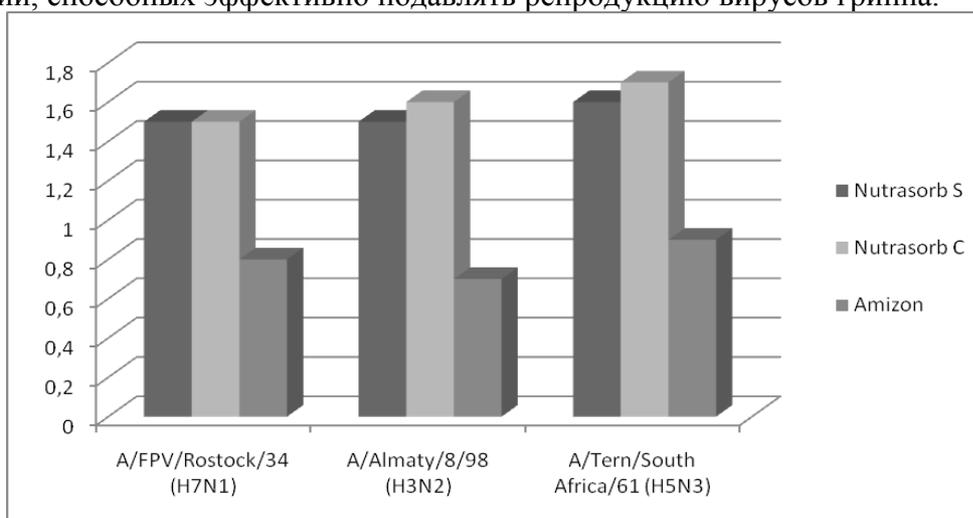


Рисунок 3 – Способность иммобилизованных полифенолов клюквы Nutrasorb S и C подавлять инфекционный титр вируса гриппа (доза 5 мг/куриный эмбрион). По оси ординат – логарифм снижения инфекционной активности вирусов

В результате проведенных исследований установлено, что использование технологии Nutrasorb позволяет получить биологически активные препараты, сочетающие антивирусную активность с безопасностью натуральных пищевых продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Hong-Fang Ji, Xue-Juan Li, and Hong-Yu Zhang. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? // *EMBO Rep.* 2009 March; 10(3): 194–200.

2 Borchardt JK. Traditional Chinese drug therapy // *Drug News Perspect.* 2003 Dec; 16(10):698-702.

3 Wang X., Jia W., Zhao A. Anti-influenza agents from plants and traditional Chinese medicine // *Phyther. Res.* – 2006. – Vol. 20, № 5. – P. 335-341.

4 Ison M.G. [Antivirals and resistance: influenza virus](#) // *Curr. Opin. Virol.* 2011. Dec, 1(6):563-73.

5 Roopchand D.E., Kuhn P., Poulev A., Oren A., Lila M.A., Fridlender B., Raskin I. Biochemical analysis and in vivo hypoglycemic activity of a grape polyphenol-soybean flour complex // *J. Agric. Food Chem.* 2012. Sep 12;60(36):8860-5.

6 Roopchand D.E., Kuhn P., Rojo L.E., Lila M.A., [Raskin I.](#) Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice // *Pharmacol. Res.* 2013 Feb, 68(1):59-67.

7 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus // *Avian Dis.* – 1970. - Vol. 14. – P.542-549.

8 Serkedjieva J., Toshkova R., Antonova-Nikolova S. et al. Effect of a plant polyphenol – rich extract on the lung protease activities of influenza-virus – infected mice // *Antivir. Chem. Chemother.* – 2007. – Vol. 18, № 2. – P. 75-82.

9 Reed, L.J.; Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints // *The American Journal of Hygiene.* **27**: 493–497.

10 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 295 с.

REFERENCES

1 Hong-Fang Ji, Xue-Juan Li, and Hong-Yu Zhang. *EMBO Rep.*, **2009**, 10 (3), 194–200.

2 Borchardt JK. *Drug News Perspect.*, **2003**, 16 (10), 698-702.

3 Wang X., Jia W., Zhao A. *Phyther. Res.*, **2006**, Vol. 20, №5, 335-341.

4 Ison M.G. *Curr. Opin. Virol.*, **2011**, 1 (6), 563-73.

5 Roopchand D.E., Kuhn P., Poulev A., Oren A., Lila M.A., Fridlender B., Raskin I. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 12, 8860-8865.

6 Roopchand D.E., Kuhn P., Rojo L.E., Lila M.A., [Raskin I.](#) *Pharmacol. Res.*, **2013**, 68 (1), 59-67.

7 Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. *Avian Dis.*, **1970**, 14, 542-549.

8 Serkedjieva J., Toshkova R., Antonova-Nikolova S. et al. *Antivir. Chem. Chemother.*, **2007**, Vol. 18, №2, 75-82.

9 Reed, L.J.; Muench, H. *The American Journal of Hygiene*, **1938**, 27, 493–497.

10 Urbach V.Y. *Moscow: Medicine*, **1975**, 295 (in Russ).

Резюме

*А. П. Богоявленский¹, А. С. Тұрмағамбетова¹, М. С. Алексюк¹,
В. Э. Березин¹, В. М. Душенков², И. Раскин²*

(¹РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы

²Мемлекеттік университет Нью-Джерси, қ. Ратгерс, АҚШ)

ИММОБИЛИЗИОНДЫҚ ПОЛИФЕНОЛДЫ МҮК ЖИДЕГІНІҢ
ТҰМАУ ВИРУСЫНА ӘСЕРІ

Респираторлық вирус инфекциясы денсаулық сақтау үшін негізгі мәселесі және жоғары дәрежедегі өлімнің кең ауқымды таралуына әкеп соғады. Жаңа өсімдіктестес препараттарды іздестіру, репродукциялық вирус практикалық вирусологияда негізгі өзекті мәселе болып қалады. Көрсетілген зерттеуде иммоби-лизиондық препаратының байқауы мүк жидектің шырыны тұмау вирусының репродукциясына басым. Алынған препараттар тұмау вирусының көбеюін жебірлейді.

Кілт сөздер: Nutrasorb, флавоноид мүк жидегі, вирусқа қарсы сипаты.

Summary

A. P. Bogoyavlenskiy¹, A. S. Turmagambetova¹, M. S. Alexyuk¹,

V. E. Berezin¹, V. M. Dushenkov², I. Raskin²

(¹Institute microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan

²Rutgers State University, New Jersey, USA)

THE INFLUENCE OF IMMOBILIZED CRANBERRY POLYPHENOLS
ON THE INFLUENZA VIRUS

Respiratory viral infections remain a serious public health problem because of their wide spread and high mortality. The searches of new preparations of plant origin that inhibit the reproduction of viruses remain one of the most relevant problems of practical virology. The ability of immobilized preparations of biologically active compounds obtained from cranberry juice to inhibit the influenza virus replication was studied. It is shown that these preparations inhibit the reproduction of influenza virus. The mechanism of this effect is due to not only antiviral activity of flavonoids contained in preparations obtained from cranberry juice, but also the ability of immobilized preparations adsorbs the viral particles to the vector surface.

Keywords: Nutrasorb, cranberry flavonoids, antiviral properties.

Поступила 05.06.2013 г.