

УДК 578.832

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РАЗЛИЧНЫЕ ПОДТИПЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А**Турмагамбетова А.С., Соколова Н.С., Алексюк М.С., Анаркулова Э.И.,
Богоявленский А.П., Березин В.Э.***РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы,
e-mail: anpav_63@mail.ru*

В настоящее время для лечения инфекционных заболеваний все чаще используют биологически активные вещества растительного происхождения, обладающие меньшим побочным действием, чем синтетические препараты и сходные по структуре и действию с естественными компонентами организма человека. В настоящей работе проведено сравнительное изучение способности веществ полифенольной природы подавлять нейраминидазу вируса гриппа. Показано, что препарат дигидрокверцетин обладал одинаковой способностью эффективно снижать активность разных подтипов нейраминидазы вируса гриппа А. Отсутствие двойной связи между 2 и 3 атомами углерода в С кольце фенольного соединения, делало его наиболее активным против нейраминидазы подтипа N2, а наличие метильной группы значительно снижало антинейраминидазную активность вещества. Наличие гидроксильных групп в положении С-3, 5, 7 С и А колец фенолов способствует подавлению активности нейраминидазы подтипа N1 вируса гриппа А, а добавление углеводного компонента по 3-О положению С кольца значительно снижает антинейраминидазную активность вещества. Изученные вещества полифенольной природы одинаково эффективно снижали активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипа N6. Подобные исследования позволяют разработать экспериментально обоснованные рекомендации к применению медикаментозных средств направленного действия, как для профилактики, так и для лечения вируса гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, полифенолы, нейраминидазная активность**INFLUENCE OF POLYPHENOLIC PREPARATIONS ON DIFFERENT SUBTYPES OF INFLUENZA TYPE A VIRUS NEURAMINIDASE****Turmagambetova A.S., Sokolova N.S., Alexyuk M.S., Anarkulova E.I.,
Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.***Institute of microbiology and virology, Almaty, e-mail: anpav_63@mail.ru*

Currently, for the infectious diseases treatment are increasingly using the biologically active substances of plant origin, having a fewer side effects than synthetic medicines and similar in structure and actions to the natural components of the human organism. In the present paper was carried out a comparative study of the ability of polyphenolic preparations (dihydroquercetin, vitamin P, silibinin, KB8 and RAM 3) to inhibit the neuraminidase of influenza type A virus. It is shown that the dihydroquercetin effectively reduced the activity of the N1, N2 and N6 subtypes of influenza type A virus neuraminidase. The absence of a double bond between the 2 and 3 carbon atoms in the C ring of phenolic compound is making it the most active against the N2 subtype of neuraminidase (dihydroquercetin and KB8), availability of methyl group in such polyphenols is significantly reduced the anti-neuraminidase activity of substance (silibinin). The presence of OH-groups at C-3, 5, 7, of phenols C and A rings promotes suppression of the activity of N1 subtype of influenza type A virus neuraminidase (dihydroquercetin and silibinin). The substitution of OH-group on the carbohydrate component by 3-O position of C ring is lead to the reduction of anti-neuraminidase activity of the substance (vitamin P). However, the addition of gallic acid to the carbohydrate residue leads to the increasing of N1 subtype anti-neuraminidase activity (KB8). The adding of second gallic acid residue leads to the ability of substance to inhibit the neuraminidase activity in twice (RAM 3). The investigated polyphenolic preparations are equally effective reduced the activity of N6 subtype of influenza type A virus neuraminidase. Similar research will allow to develop the experimentally based recommendations for the use of directed action medications for both treatment and prophylaxis of influenza.

Keywords: influenza virus, polyphenols, neuraminidase activity

Несмотря на предпринимаемые усилия, направленные на борьбу с инфекционными заболеваниями, их уровень распространения не только не сокращается, но даже возрастает. Ежегодно во всем мире заболевает около 2 млрд человек, из которых гибнет более 17 млн [9]. При этом начало третьего тысячелетия характеризуется ярко выраженной тенденцией к преобладанию заболеваний вирусной этиологии в общей структуре инфекционной патологии человека и животных, среди которых основными являются острые респираторные вирусные инфекции.

На сегодняшний день существует не менее 3 основных групп этиотропных противовирусных лекарственных препаратов:

1. Блокаторы M2 ионных каналов вируса гриппа А (амантадин и ремантадин).

2. Ингибиторы функции нейраминидазы вируса гриппа А и В (осельтамивир и занамивир).

3. Другие препараты (рибавирин, интерферон, индукторы интерферонов и т.д.).

Большую проблему представляет появление новых вариантов вирусов, устойчивых к лекарственным противовирусным

препаратам [8]. В 2006 г. Центр контроля заболеваний и профилактики США опубликовал материалы, согласно которым в последние годы отмечена необычайно высокая резистентность (более 90%) вируса гриппа H3N2 к адамантанам [5]. По данным L. Barclay, резистентность вируса гриппа H3N2 к амантадину и римантадину в мире увеличилась с 1,8% в 2001–2002 гг. до 12,3% в 2003–2004 гг. [3].

Ранее считалось, что развитие резистентности вируса гриппа к ингибиторам нейраминидазы встречается редко и не является клинической проблемой. Частота резистентности клинических изолятов вируса гриппа А в 2001 году не превышала 1,5% (резистентность к осельтамивиру составляла 0,32% у взрослых и 4,1% у детей), а среди штаммов гриппа В резистентных к препаратам не было обнаружено [7]. Однако по данным Ferraris O. и Lina B., развитие резистентности к ингибиторам нейраминидазы возрастает, и изучение появления резистентности является весьма актуальной проблемой [4]. Это, в первую очередь, обусловлено структурой активного центра нейраминидазы, которая консервативна не только между подтипами, но и типами фермента, что указывает не только на важность всех составляющих его компонентов, но и эволюционно-отлаженную систему его функционирования [6]. Механизм действия NA за счет формирования оксокарбониевого иона субстрата является ключевым моментом в поиске новых соединений, способных в той или иной степени подавлять активность вирусного фермента, т.к. из-за сильных ионных взаимодействий между карбоксилатом субстрата и гуанидиновыми группами аргининов 118, 292 и 371 остаток Neu5Ac переходит из конформации кресла в конформацию полукресла, т.е. образуется оксокарбониевый ион, что приводит к расщеплению гликозидной связи. Другими словами, ингибирующими свойствами может обладать большая группа полифенольных соединений, содержащих фенольную группу и боковые заместители углеродного скелета.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния веществ полифенольной природы на активность различных подтипов нейраминидаз вируса гриппа А.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы 5 веществ полифенольной природы (рис. 1).

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

В качестве объектов исследования были использованы вирусы гриппа птиц и человека (ортомиксовирусы) трех штаммов с различными подтипами ней-

раминидазы (N1, N2, N6): А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/Алматы/8/98 (H3N2), 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 107–109 ИД₅₀/мл.

В работе были использованы коммерческие лекарственные средства, содержащие полифенолы: «Капилар» (Дигидрохверцетин), «Аскорутин» (Витамин Р) и «Карсил» (Силибинин), а также флавоноидные препараты KB8 (3-0-(2)-галлоил)-β-D-глюкопиранозид кверцетина) и RAM 3 (3-0-(2),6)-дигаллоил)-β-D-глюкопиранозид кемпферола), выделенные из растений рода Polygonum, произрастающих на территории Казахстана.

Нейраминидазную активность определяли стандартным тиобарбитуровым методом по Aminoff с использованием в качестве субстрата фетуин [2]. Об активности фермента судили по оптической плотности при длине волны 549 нм.

Обработку данных производили в программе Microsoft Office Excel 2003. Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [1].

Результаты исследования и их обсуждение

В работе изучена способность 5 препаратов полифенольной природы 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 препаратов на нейраминидазную активность изучали в диапазоне доз от 0,7 до 12,5 мг/мл.

По полученным данным была рассчитана доза вещества, способная подавлять 50% активности фермента (IC₅₀) (рис. 2). При изучении влияния полифенолов на нейраминидазу вируса гриппа А 2 подтипа (N2) показано, что дигидрохверцетин способен эффективно подавлять активность фермента уже в дозе 0,7 мг/кг, препарат KB8 – в дозе 1,5 мг/кг. IC₅₀ для препаратов рутина и RAM 3 наблюдалось в дозе 5,7 мг/кг. Силибинин во всем исследованном диапазоне доз не был способен подавить на 50% активность нейраминидазы подтипа N2.

Далее изучалось влияние полифенольных препаратов на способность снижать активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипа 1 (N1). Установлено, что препараты дигидрохверцетин и силибинин в дозе 0,7 мг/кг подавляли 50% активности нейраминидазы подтипа N1. Препарат RAM 3 был способен подавить 50% активности фермента подтипа N1 в дозе 3,0 мг/кг, а KB8 – в дозе 6,2 мг/кг. Наименьшую способность влиять на активность нейраминидазы подтипа N1 показал препарат рутин (11,7 мг/кг).

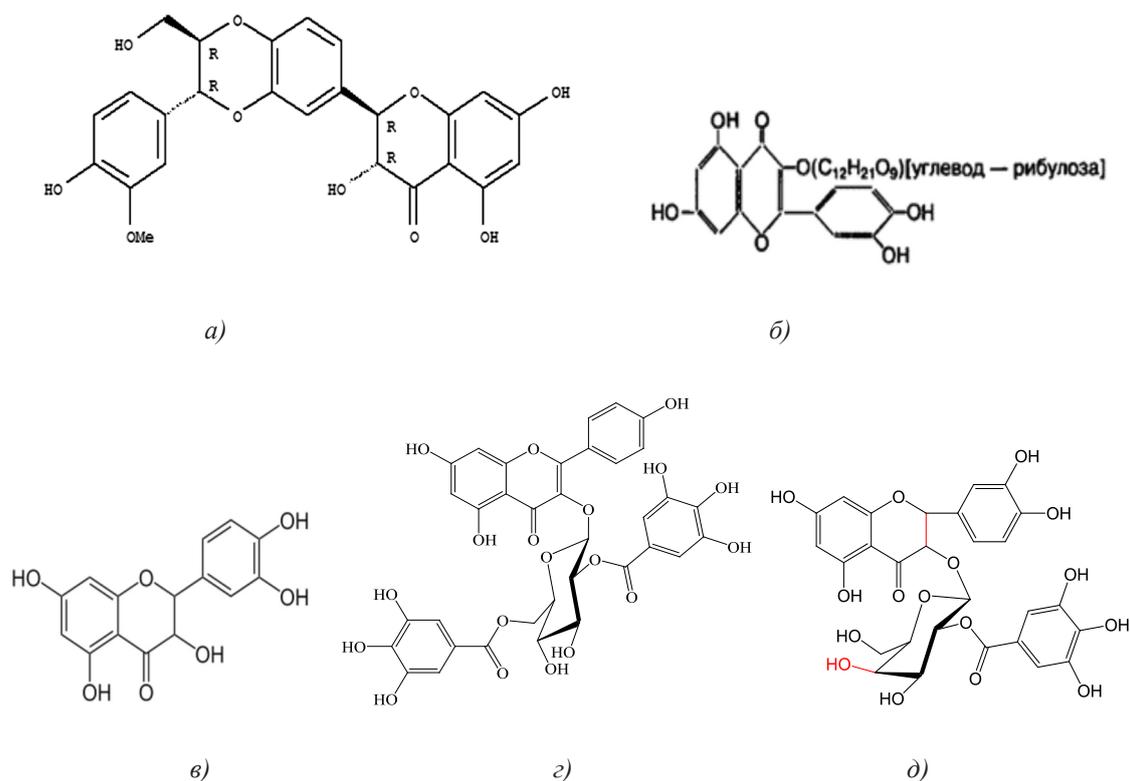


Рис. 1. Химическая структура Силибинина (а), Рутина (б), Дигидрокверцетина (в), RAM 3 (з), KB8 (д)

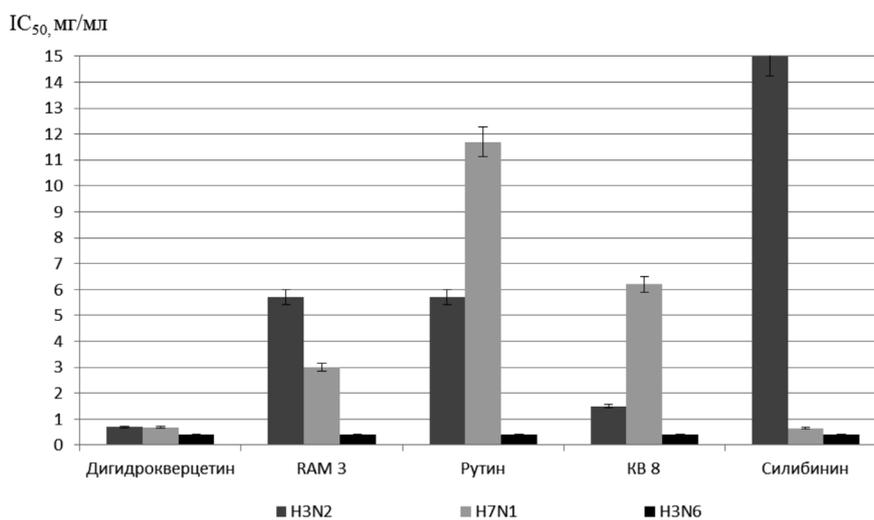


Рис. 2. Подавление активности нейраминидазы вируса гриппа веществами полифенольной природы

При изучении влияния веществ полифенольной природы на снижение активности нейраминидазы вируса гриппа А подтипа 6 (N6) показано, что все исследованные пре-

параты уже в дозе 0,7 мг/кг подавляли более 95% активности фермента.

Анализ действия исследуемых препаратов на нейраминидазную активность ви-

руса гриппа А с разными подтипами нейраминидазы (Н7N1, Н3N6, Н3N2) показал, что дигидрохверцетин и KB8 снижают активность нейраминидазы подтипа N2 наиболее эффективно, что по-видимому связано с отсутствием двойной связи между 2 и 3 атомами углерода в С кольце. Препараты RAM 3 и рутин проявляют сходную активность при воздействии на нейраминидазу подтипа N2, что, скорее всего, связано с наличием углеводного компонента в структуре этих соединений. Силибинин, единственный из изученных препаратов имеющий в своем составе метильную группу проявлял наименьшую способность снижать активность нейраминидазы подтипа N2.

Установлено, что наибольшей способностью подавлять активность нейраминидазы подтипа N1 вируса гриппа А, обладали препараты дигидрохверцетин и силибинин, что возможно связано с наличием у них гидроксильных групп в положении С-3, 5, 7 С и А колец. Нейраминидазная активность препаратов RAM 3 и KB8 была ниже, что может быть связано с увеличением молекулы вещества и заменой гидроксильной группы по 3-О положению С кольца на углеводный компонент, содержащий остатки галловой кислоты. Наименьшую способность подавлять нейраминидазу подтипа N1 вируса гриппа А показал препарат рутин, сходный по химической структуре с препаратами RAM 3 и KB8, но не содержащий остатков галловой кислоты.

Показано, что вещества полифенольной природы в изученном диапазоне доз обладали одинаково эффективной способностью снижать активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипа N6, что скорее всего связано с менее специфичным активным центром данного фермента.

Заключение

Таким образом показано, что препарат дигидрохверцетин обладал одинаковой способностью эффективно снижать активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипов N1, N2 и N6. В зависимости от изменения структуры веществ полифенольной природы изменялась и их способность подавлять ферментативную активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипов N1, N2 и N6. Так, отсутствие двойной связи между 2 и 3 атомами углерода в С кольце фенольного соединения, делает его наиболее активным против нейраминидазы подтипа N2, а наличие метильной группы значительно снижает антинейраминидазную активность веще-

ства. Наибольшую способность подавлять активность нейраминидазы подтипа N1 вируса гриппа А проявляли вещества, содержащие гидроксильные группы в положении С-3, 5, 7 С и А колец, а наименьшую показало вещество, содержащее по 3-О положению С кольца углеводный компонент, не содержащий остатка галловой кислоты. Изученные вещества полифенольной природы обладали одинаково эффективной способностью снижать активность нейраминидазы вируса гриппа А подтипа N6, что скорее всего связано с менее специфичным активным центром данного фермента.

Подобные исследования позволяют разработать экспериментально обоснованные рекомендации к применению медикаментозных средств направленного действия для лечения острых респираторных вирусных инфекций.

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

Список литературы

1. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 296 с.
2. 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.
3. Barclay L. Amantadine and Rimantadine should not be used for influenza this season CME/CE // MMWR Dispatch. – 2006. – V. 55. – P. 1–2.
4. Ferraris O., Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance // J. Clin. Virol. – 2008. – V. 41. – P. 9–13.
5. Hayden F.G. Antiviral resistance in influenza viruses – implications for management and pandemic response // NEJM. – 2006. – V. 354, № 8. – P. 785–788.
6. Meijer a A., Rebelo-de-Andrade H., Correia V., et.al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors // Antiviral Research. – 2014. – Vol. 110. – P. 31–41.
7. Preziosi P. Influenza pharmacotherapy: present situation, strategies and hopes // Expert Opin. Pharmacotherapy. – 2011. – V. 12, № 8. – P. 1523–1549.
8. Shobugawa Y., Saito R., Sato I. et.al. Clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors—oseltamivir, zanamivir, laninamivir, and peramivir – for treatment of influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 infection: an observational study in the 2010–2011 influenza season in Japan // J Infect Chemother. – 2012. – Vol. 18. – P. 858–864.
9. Thompson W.W., Shay D.K., Weintraub E. et al. Influenza associated hospitalizations in the United States // JAMA. – 2004. – V. 292. – P. 1333–1340.

References

1. Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskij i medicinskih issledovanijah. M.: Medicina, 1975. 296 p.
2. Aminoff D. Method for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // Biochem. J. 1961. Vol. 81. pp. 384–392.

3. Barclay L. Amantadine and Rimantadine should not be used for influenza this season CME/CE // MMWR Dispatch. 2006. V. 55. pp. 1–2.
4. Ferraris O., Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance // J. Clin. Virol. 2008. V. 41. pp. 9–13.
5. Hayden F.G. Antiviral resistance in influenza viruses implications for management and pandemic response // NEJM. 2006. V. 354, no. 8. pp. 785–788.
6. Meijer a A., Rebelo-de-Andrade H., Correia V., et.al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors // Antiviral Research. 2014. Vol. 110. pp. 31–41.
7. Preziosi P. Influenza pharmacotherapy: present situation, strategies and hopes // Expert Opin. Pharmacotherapy. 2011. V. 12, no. 8. pp. 1523–1549.
8. Shobugawa Y., Saito R., Sato I. et.al. Clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors—oseltamivir, zanamivir, laninamivir, and peramivir for treatment of influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 infection: an observational study in the 2010–2011 influenza season in Japan // J Infect Chemother. 2012. Vol. 18. pp. 858–864.
9. Thompson W.W., Shay D.K., Weintraub E. et al. Influenza associated hospitalizations in the United States // JAMA. 2004. V. 292. pp. 1333–1340.

Рецензенты:

Смирнова И.Э., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории экологии микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии, г. Алматы;

Кыдырманов А.И., д.в.н., заведующий лабораторией экологии вирусов, Институт микробиологии и вирусологии, г. Алматы.