

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.25.23, 34.25.37

*А.С. Турмагамбетова¹, А.П. Богоявленский¹, Н.С. Соколова¹,
Э.С. Омиртаева¹, В.Э.Березин¹*

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии,
г. Алматы, Казахстан

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА МАНГУСТИНА И ГАРТАНИНА

Аннотация. Грипп и другие ОРВИ по сей день представляют серьезную проблему мирового здравоохранения, вызывая эпидемии и пандемии, сопровождающиеся высокой летальностью. Способность гриппа к изменчивости приводит к появлению новых резистентных к существующим противовирусным средствам штаммов, быстро распространяющихся по всем континентам. В связи с этим развитие отечественной фарминдустрии и создание новых эффективных препаратов для борьбы с опасными и широко распространенными вирусными инфекциями является одной из первоочередных задач, стоящих перед любым государством. Цель работы - изучение противовирусной активности мангустина и гартанина в отношении вирусов гриппа человека и птиц. Показано, что в диапазоне доз от 0,025 мкг/мл до 1,25 мкг/мл мангустин проявлял выраженные противовирусные свойства, сопоставимые с противовирусной активностью Тамифлю. Гартанин проявлял достаточно высокую противовирусную активность в отношении эпидемически значимых штаммов вируса гриппа человека.

Ключевые слова: ксантон, противовирусная активность, мангустин, гартанин.

• • •

Түйіндеме. Тұмау және басқа да жедел респираторлы вирустық инфекциялар әлі де денсаулық сақтаудың ғаламдық проблемасын туғызуда, бұл өлім-жітімнің жоғарылауымен бірге індеттер мен пандемияны тудырады. Тұмаудың өзгеру қабілеті, қолданыстағы тұмауға қарсы препараттарға тәзімді, жаңа штаммдардың пайда болуына, барлық континенттерде тез таралуына әкеліп соғады. Осыған байланысты отандық фармацевтика саласын дамыту және қауіпті, кең таралған вирустық инфекциялармен күресудің жаңа тиімді препараттарын жасау кез-келген мемлекеттің алдында тұрған басым міндеттердің бірі болып табылады. Жұмыстың мақсаты – адам мен құс тұмауы вирусына қарсы мангостан мен гартаниннің вирусқа қарсы белсенділігін зерттеу. 0,025 мкг/мл-ден 1,25 мкг/мл-ге дейінгі дозада

Источник финансирования исследований. Работа выполнена в рамках грантового проекта АР05130964 (0118РК00186) финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

мангостин Тамифлудың вирусқа қарсы белсенділігімен салыстыра алатын айқын вирусқа қарсы қасиеттерді білдіргені көрсетілген. Гартанин адамның тұмау вирусының эпидемиологиялық маңызды штамдарына қарсы антивирустық белсенділігін көрсетті.

Түйінді сөздер: ксантон, вирусқа қарсы белсенділік, мангостин, гартанин.

• • •

Abstract. To this day, influenza and other acute respiratory viral infections pose a serious global health problem, causing epidemics and pandemics accompanied by high mortality rates. The ability of influenza to change leads to the emergence of new strains that are resistant to existing anti-influenza drugs, rapidly spreading across all continents. In this regard, the development of the pharmaceutical industry and the creation of new effective drugs against dangerous and widespread viral infections is one of the priority tasks that faces any nation. The aim of the work was to study the antiviral action of mangosteen and gartanin against human and bird influenza viruses. It was revealed that in the dose range from 0.025 ug/ml to 1.25 ug/ml mangosteen demonstrated pronounced antiviral properties comparable with the antiviral activity of Tamiflu. Gartanin showed a rather high antiviral action against epidemiologically significant strains of the human influenza virus.

Keywords: xanthone, antiviral activity, mangosteen, gartanin.

Введение. До сих пор грипп представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения, вызывая ежегодные сезонные эпидемии и периодические пандемии, сопровождаемые довольно высокой летальностью. Течение инфекции также усугубляется развитием множества осложнений. По данным ВОЗ ежегодно фиксируются десятки миллионов случаев заболевания гриппом, в том числе до полумиллиона смертельных случаев [1].

Недавние исследования показали, что большинство современных штаммов вируса гриппа являются устойчивыми к основным, используемым в мире, противогриппозным средствам (римантадину, амантадину, тамифлю, реленза) [2,3]. Однако обеспеченность противовирусными препаратами является жизненно важной необходимостью. Этот вопрос напрямую связан с биобезопасностью и национальной безопасностью страны. Ведь в случае возникновения крупномасштабных эпидемий и пандемий, возможность обеспечения необходимыми диагностическими, вакцинными и лекарственными препаратами может оказаться под вопросом. Поэтому, развитие отечественной фарминдустрии и создание новых эффективных препаратов для борьбы с опасными и широко распространенными вирусными инфекциями является одной из первоочередных задач, стоящих перед государством. Особый интерес представляют лекар-

ственные средства растительного происхождения, обладающие малой токсичностью, широким спектром терапевтического действия, и возможностью длительного применения. Одним из путей разработки подобных препаратов является широкое изучение действия уже известных фармакопейных лекарственных растений, часто используемых по ограниченному числу показаний, которые содержат сложный комплекс биологически активных веществ с разносторонним фармакологическим действием. Дополнительные исследования по изучению химического состава, биологической активности таких растений позволяют выявить новый аспект их использования в медицине. В этом направлении ведется интенсивный поиск биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих противовирусными свойствами в отношении широкого круга возбудителей, в частности, для лечения и профилактики гриппа и других ОРВИ [4-9].

Цель работы - изучение противовирусной активности мангустина и гартанина в отношении вирусов гриппа человека и птиц, для расширения спектра перспективных профилактических и терапевтических препаратов, эффективных в отношении вируса гриппа. Преимуществом подобных препаратов является их комплексное действие на различные стадии взаимодействия вируса с клеткой, что позволяет рассчитывать на универсальный характер действия и широкий спектр активности.

Методы исследований. В экспериментах использовали эпидемически значимый штамм вируса гриппа человека А/Алматы/8/98 (H3N2), вирус гриппа человека (пандемический вариант, устойчивый к Тамифлю) А/Владивосток/2/09 (H1N1), вирус гриппа птиц, штамм А/малая крачка/Южная Африка/1/1961 (H5N3), высоко патогенный вирус гриппа птиц А/FPV/36/1 (H7N1). Вирус гриппа выращивали в аллантоисной полости 11-дневных куриных эмбрионов (КЭ) в течение 24-48 ч. при 37°C. Титр вируса в аллантоисной жидкости составлял 10^7 - 10^9 ЭИД₅₀/мл. Инфекционный титр вируса гриппа определяли титрованием на куриных эмбрионах методом предельных разведений. О наличии вируса судили по реакции гемагглютинирующей активности. Титр инфекционности вируса высчитывали по методу Рида и Менча [10] и выражали в Ig ЭИД₅₀/мл. Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике с использованием 0,75% взвеси куриных эритроцитов или эритроцитов морской свинки [10]. Очищенные препараты ксантонов (мангустин и гартанин) получали из кожуры плодов растения семейства *Clusiaceae*. Расти-

тельные экстракты получали описанным ранее методом [11]. Специфические реакции на ксантоны проводили известным методом [12,13]. Фракционирование частично очищенных растительных экстрактов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на системе HPLC фирмы "Agilent technologies", используя полупрепаративную колонку "Zorbax C18", 5 μ , 9,4x250 мм. Разделение проводили в градиенте 0,1% Trifluoroacetic acid (TFA) – 80% Acetonitrile (ACN). На колонку наносили до 10 мг материала. Контроль за хроматографическим процессом осуществляли спектрофотометрически при 208 нм (поглощение большинства окрашенных полифенольных соединений).

Хроматомасс-спектрометрический анализ проводили на хроматомасс-спектрометре фирмы "Shimadzu" LCMS-8040 в режиме положительной ионизации при электрораспылении. Напряжение на конусе распыления составляло 3,0 кВ, температура источника 120°C, температура блока десольватации 275°C, поток конического газа 50 л/ч, поток газа десольватации 600 л/ч. Определение масс спектров проводили в режиме сканирования 200 – 2000 m/z. Изучение токсичности и специфической противовирусной активности исследуемых соединений проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [14]. Основным критерием при изучении специфического противовирусного действия соединений является показатель ХТИ (химико-терапевтический индекс), определяемый отношением среднетоксичной концентрации вещества (TK₅₀) к среднеэффективной вирусингибирующей концентрации (ЭК₅₀). Изучение острой токсичности осуществляли на модели белых беспородных мышей методом однократного внутрижелудочного введения животным анализируемых препаратов в различных дозах в объеме 0,2 мл. Наблюдение за общим состоянием, поведением, двигательной активностью животных велось в течение 2-х недель. В первый день после введения препарата животные находились под непрерывным наблюдением. О токсичности судили по клиническим симптомам интоксикации, при этом оценивалось общее состояние животных, особенности поведения, интенсивность двигательной активности, реакции на звуковые и световые раздражители, состояние кожного и волосяного покрова, окраска слизистых оболочек, динамика массы тела, потребление кормов и воды, консистенция фекальных масс, смертность от острой токсической реакции [13-15].

Вирусингибирующие свойства исследуемых соединений изучали методом «скрининг-тест», рассчитанным на нейтрализацию вируса в количестве 100 ЭИД₅₀/0,2 мл заданными концентрациями изучаемых веществ. Критерием противовирусного действия считали различие в инфекционных титрах вируса при сравнении опытного образца с контролем (плацебо) [16].

В качестве препаратов сравнения были использованы Римантадин® («Оланфарм», Латвия, альфа-метилтрицикло [3.3.1.1^{1,7}] декан-1-метанамин (в виде гидрохлорида), CAS 13392-28-4) и Тамифлю® (Hoffmann-La Roche, Швейцария, (3R,4R, 5S)-4-ацетиламино-5-амино-3-(1-этилпропокси)-1-циклогексен-1-карбоновой кислоты этиловый эфир, фосфат, МНН осельтамивир, CAS 196618-13-0) [17,18]. Среднее квадратичное отклонение (*StD*) для отрицательного и положительного контролей для каждой концентрации исследуемого вещества рассчитывали по формуле:

$$StD = \sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 / (n - 1)}$$

где Y_i – результат измерения ОП у каждого объекта группы; n – число объектов в группе; \bar{Y} – среднее арифметическое значение ОП [19]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Microsoft Excel». Для табличного и графического изображения полученных результатов использовалась программа Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение исследований. Проведено изучение противовирусной активности биологически активных соединений растительного происхождения (мангустин и гартанин) в отношении вирусов гриппа человека и птиц с разными антигенными подтипами (рисунок 1).

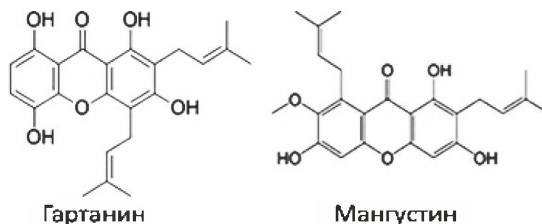


Рисунок 1 - Структурная формула исследуемых соединений

Изучение способности соединений подавлять репродукцию вируса гриппа проводили в интервале доз от 0,025 мкг/мл до 1,25 мкг/мл. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие про-тивогриппозные препараты – Римантадин и Тамифлю (рисунки 2-5).

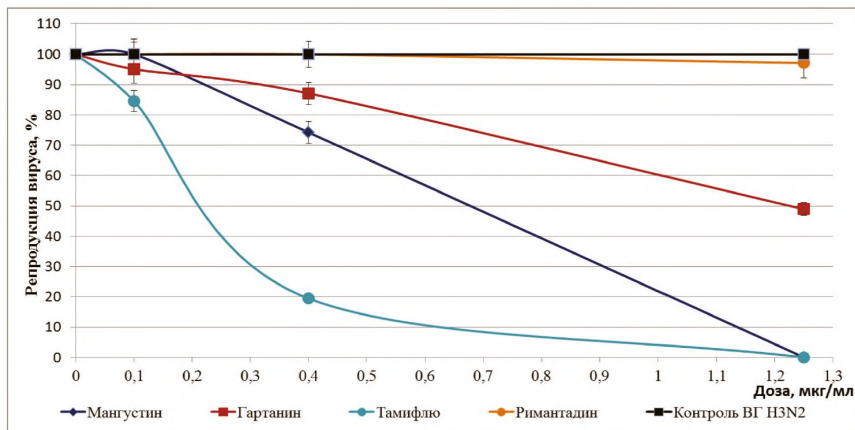


Рисунок 2 - Изучение дозо-зависимого эффекта вирусингибирующей активности исследуемых соединений на модели эпидемически значимого штамма вируса гриппа человека А/Алматы/8/98 (H3N2)

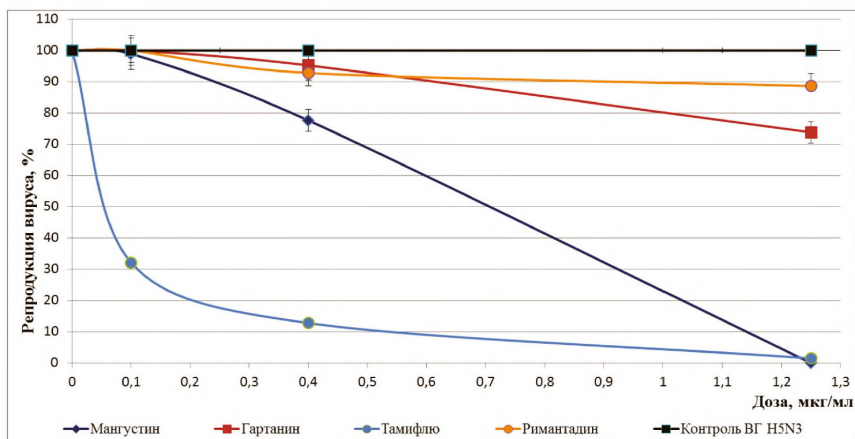


Рисунок 3 - Изучение дозо-зависимого эффекта вирусингибирующей активности исследуемых соединений на модели вируса гриппа птиц, штамм А/малая крачка/Южная Африка/1/1961 (H5N3)

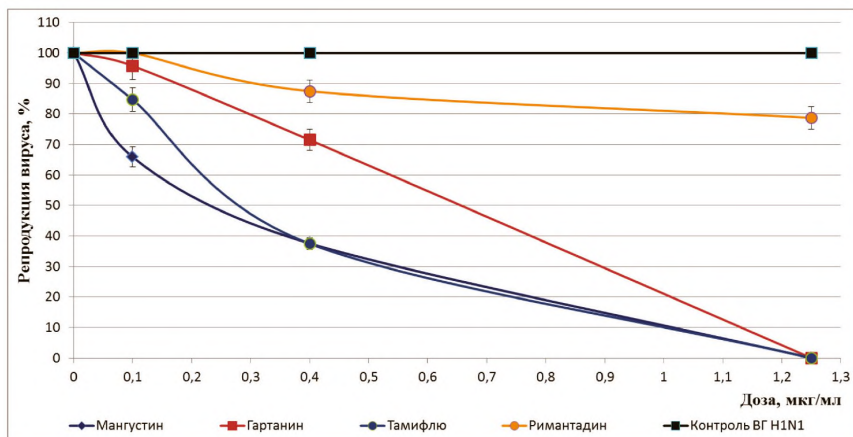


Рисунок 4 - Изучение дозо-зависимого эффекта вирусингибирующей активности исследуемых соединений на модели вируса гриппа человека (пандемический вариант, устойчивый к Тамифлю) A/Владивосток/2/09 (H1N1)

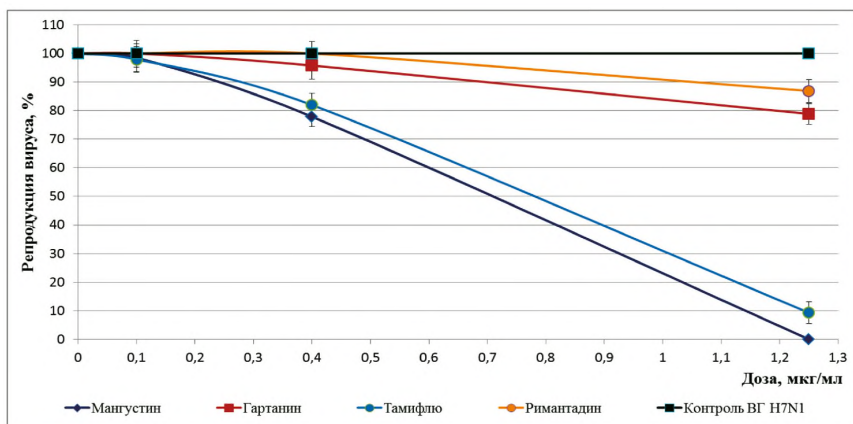


Рисунок 5 - Изучение дозо-зависимого эффекта вирусингибирующей активности исследуемых соединений на модели высокопатогенного вируса гриппа птиц A/FPV/36/1 (H7N1)

Показан выраженный противовирусный дозозависимый эффект ксантонов. В заданном диапазоне доз гартанин эффективно подавлял репродукцию вирусов гриппа человека (H1N1 и H3N2), но оказался неэффективным по отношению к вирусу гриппа птиц (H7N1)

и H5N3). Мангустин был способен в исследуемом интервале доз достигать 50%-подавления репродукции 100 инфекционных доз вируса гриппа независимо от его антигенной структуры и видовой принадлежности (рисунки 2-5). Проведен сравнительный анализ противогриппозной активности ксантонов (мангустиц, гартанин), отличающихся лишь пространственным расположением углеводных хвостов и одной гидроксигруппой. Показано, что выраженность противовирусной активности связана со структурой изучаемого ксантона. Наибольшую противовирусную активность в экспериментах *in ovo* на изученных штаммах модельных вирусов гриппа А проявлял мангустин. Противогриппозная активность мангустина в отношении штамма вируса гриппа А/Н1N1, устойчивого к коммерческим противогриппозным препаратам и в отношении штамма вируса гриппа А/Н7N1, была сопоставима с активностью коммерческого противовирусного препарата Тамифлю, наиболее эффективного противогриппозного лекарственного средства известного на сегодняшний день (таблица 1). Показана значительная противовирусная активность мангустина против эпидемического штамма вируса гриппа человека А/Н₃N₂.

Таблица 1 – ЭК50 исследуемых соединений на модельных штаммах вируса гриппа А

Соединение	Противовирусная активность, мкг/мл			
	H3N2	H1N1	H5N3	H7N1
Мангустин	0,67±0,03	0,23±0,01	0,1±0,005	0,71±0,04
Гартанин	1,23±0,05	0,66±0,03	Na*	Na*
Tamiflu	0,215±0,01	0,285±0,01	0,051±0,002	0,79±0,04

*Na – Концентрация не определена

Противовирусная активность гартанина в отношении человеческих штаммов вируса гриппа была ниже, чем у коммерческого противовирусного средства Тамифлю. Однако активность достаточно высока, чтобы рассматривать данный ксантон, как перспективное противогриппозное средство. На модели всех исследованных вирусов гриппа типа А (H3N2, H1N1, H5N3, H7N1) показано, что противовирусная активность изучаемых ксантонов - мангустина и гартанина выше противовирусной активности Римантадина. На изученных модельных штаммах Римантадин был способен подавлять лишь до 21% активности вируса гриппа А/Н1N1, противовирусная активность против штаммов А/Н3N2, А/Н5N3, А/Н7N1 составляла не более 15% в изученном интервале доз. Одним из основных общепринятых крите-

риев оценки противовирусного действия препаратов является индекс ХТИ (химико-терапевтический индекс), показывающий отношение среднетоксичной концентрации вещества (ТК₅₀) к концентрации, вызывающей подавление 50% репродукции вируса (среднеэффективная вирусингибирующая концентрация – ЭК₅₀) (таблица 2).

Таблица 2 - Сравнительная оценка ХТИ растительных соединений и коммерческих препаратов с противовирусной активностью

Штамм вируса гриппа	Осельтамивир	Ремантадин	Гартанин	Мангустин
A/Владивосток/2/09 (H1N1)	29,9	30,1	19,4	24,96
A/Алматы/8/98 (H3N2)	10,3	11,0	27,6	44,6
A/FPV/36/1 (H7N1)	15,3	15,2	Na*	44,5
A/малая крачка/Южная Африка/1/1961 (H5N3)	6,7	6,0	Na*	38,5

*Na – Концентрация не определена

Показано (таблица 2), что исследуемые растительные соединения превосходят по показателю ХТИ коммерческие противогриппозные препараты при тестировании на разных штаммах вируса гриппа человека и птиц.

Выводы. Таким образом, при изучении противовирусной активности очищенных соединений ксантонов в отношении вирусов гриппа человека и птиц, включая лекарственно устойчивые штаммы, было показано, что в диапазоне доз от 0,025 мкг/мл до 1,25 мкг/мл мангустин проявлял выраженные противовирусные свойства, сопоставимые с противовирусными свойствами Тамифлю и значительно превосходящие Римантадин. Гартанин проявлял достаточно высокую противовирусную активность в отношении эпидемически значимых штаммов вируса гриппа человека и по активности превосходил противогриппозный коммерческий препарат Римантадин. Исследуемые растительные соединения превосходят по показателю ХТИ коммерческие противогриппозные препараты при тестировании на разных штаммах вируса гриппа. При разработке новых лекарственных средств против гриппа очень важно учитывать их эффективность в отношении лекарственно устойчивых штаммов. В этом плане большой интерес представляет разработка лекарственных средств на основе природных биологически активных соединений растительного происхождения, имеющих, как правило, более широкий спектр биологической активности по сравнению с химиопрепа-

ратами и менее подверженных быстрому «привыканию» к ним высоко изменчивых вирусных штаммов.

Список литературы:

1 World Health Organization (WHO), World Health Statistics 2018. Available from: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2018_TOC.pdf.

2 Magano J. Synthetic approaches to the neuraminidase inhibitors zanamivir (Relenza) and oseltamivir phosphate (Tamiflu) for the treatment of influenza // *Chemical Reviews*. – 2009. – V. 109. – P. 4398–4438.

3 Moscona A. Global Transmission of Oseltamivir-Resistant Influenza // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – V. 360. – P. 953-956.

4 Fabricant D.S., Farnsworth N.R. The value of plants used in traditional Medicine for drug discovery // *Environmental Health Perspectives*. – 2001. – V. 109. – P. 69-75.

5 Bang S., Li W., Ha T.K.Q., Lee C., Oh W.K., Shim S.H. Anti-influenza effect of the major flavonoids from *Salvia plebeia* R.Br. via inhibition of influenza H1N1 virus neuraminidase // *Nat Prod Res*. – 2017. – V. 15. – P.1-5. doi: 10.1080/14786419.2017.1326042.

6 Hudson J.B. The use of herbal extracts in the control of influenza // *J Med Plants Res*. – 2009. – V. 3. – P. 1189-1194.

7 Kuroda K., Sawai R., Shibata T., Gomyou R., Osawa K., Shimizu K. Anti- influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis* // *J Ethnopharmacol.* – 2008. – V. 118. – P. 108-112.

8 Ludwig S., Ehrhardt C., Hrinčius E.R., Korte V., Mazur I., Droebner K., Poetter A., Dreschers S., Schmolke M., Planz O. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance // *Antiviral Res.* – 2007. – V. 76. – P. 38-47.

9 He W., Han H., Wang W., Gao B. Anti-influenza virus effect of aqueous extracts from dandelion // *Virology Journal*. – 2011. – V. 8. – P. 538.

10 Klimov A., Balish A., Veguilla V., Sun H., Schiffer J., Lu X., Katz J.M., Hancock K. Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection // *Influenza Virus*. – 2012. – V. 865. – P. 25–51.

11 Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk M.S., Turmagambetova A.S., Zaitseva I.A., Omirtaeva E.S., Berezin V.E. Adjuvant activity of multimolecular complexes based on *Glycyrrhiza glabra* saponins, lipids, and influenza virus glycoproteins // *Archives of Virology*. – 2019. – V. 164. – P. 1793-1803. DOI 10.1007/s00705-019-04273-2.

12 Бердимуратова Г.Д., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Тулегенова А.У. Биологически активные вещества растений. Выделение, разделение, анализ. Алматы: Атамұра, 2006. – 438 с.

13 Маркарян А.А. Основные принципы составления и стандартизации комплексных средств растительного происхождения. Проблемы управления здравоохранения. М.: Изд. Профтек, 2003. - № 6. - С. 78-81.

14 Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

15 Мошкова Л.В., Коржавых Э.А. Методология исследований в области создания новых лекарственных препаратов // Российский химический журнал. - 2010. - № 6. - С. 42-52.

16 Pandey M., Debnath M., Gupta S., Chikara S.K. Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics // Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. - 2011. - V. 3. - P. 27-37.

17 Bantia S., Parker C.D., Ananth S.L. et al. Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of oseltamivir and zanamivir // Antimicrob. Agents and Chemother. - 2001. - V. 45, №4. -P. 1162-1167.

18 Sidwell R. Ribavirin: A review of antiviral efficacy // Abstr. Recent. Res. Devel. in Antimicrob. Agents and Chemother. (G. Pandalai, ed.) Research Signpost. India. - 1995. - V. 1. - P. 219-256.

19 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева, Москва, 2005 г. - 398 с.

Турмагамбетова А.С. - ведущий научный сотрудник, e-mail: aichyck@mail.ru

Богоявленский А.П. - заведующий лабораторией, e-mail: anpav_63@mail.ru

Соколова Н.С. - научный сотрудник, e-mail: falcon7774@mail.ru

Омиртаева Э.С. - научный сотрудник, e-mail: omirel@mail.ru

Березин В.Э. - доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН РК, e-mail: vberezin359@gmail.com