

In vitro μελέτη για την ανασταλτική δράση τυποποιημένου υγρού εκχυλίσματος elderberry έναντι παθογόνων βακτηρίων και ιών γρίπης A και B

Christian Krawitz^{1†}, Mobarak Abu Mraheil^{1†}, Michael Stein², Can Imirzalioglu¹, Eugen Domann¹, Stephan Pleschka^{2*}, Torsten Hain^{1*}

Περίληψη

Ιστορικό: Το μαύρο σαμπούκο (*Sambucus nigra* L.) είναι γνωστό ως υποστηρικτικό μέσο κατά του κοινού κρυολογήματος και της γρίπης. Είναι περαιτέρω γνωστό ότι η βακτηριακή επιμόλυνση κατά τη διάρκεια ενός ιού γρίπης (IV) μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή πνευμονία. Αναλύεται ένα τυποποιημένο εκχύλισμα elderberry (Rubini, BerryPharma AG) για αντιμικροβιακή και αντιική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία μικρο-αραιώσεως ζυμού μικροτίτλων κατά τρία Gram+ βακτήρια και ενός Gram-αρνητικού βακτηρίου που είναι υπεύθυνα για μολύνσεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού, καθώς και ως πειράματα κυτταρικής καλλιέργειας για δύο διαφορετικά στελέχη του ιού της γρίπης.

Μέθοδοι: Η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος elderberry προσδιορίστηκε με πειράματα ανάπτυξης βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες με τη χρήση του εκχυλίσματος σε συγκεντρώσεις 5%, 10%, 15% και 20%. Τα ανασταλτικά αποτελέσματα προσδιορίστηκαν με επίστρωση των βακτηρίων σε πλάκες άγαρ. Επιπλέον ερευνήθηκε η ανασταλτική ικανότητα του εκχυλίσματος στη διάδοση των ανθρωπίνων παθογόνων H5N1 τύπου ιού της γρίπης A που απομονώνεται από έναν ασθενή και ένα στέλεχος του ιού της γρίπης τύπου B, χρησιμοποιώντας MTT ως εστίαση στις δοκιμασίες.

Αποτελέσματα: Για πρώτη φορά, δείχθηκε ότι ένα τυποποιημένο υγρό εκχύλισμα elderberry έχει αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι τόσο των Gram+ βακτηρίων του *Streptococcus pyogenes* και της ομάδας O και G στρεπτοκοκκόων, όσο και κατά του Gram- βακτηρίου *Branhamella catarrhalis* σε υγρές καλλιέργειες. Το υγρό εκχύλισμα εμφανίζει επίσης ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα επί της διάδοσης των ανθρωπίνων παθογόνων ιών.

Συμπέρασμα: Το υγρό εκχύλισμα elderberry Rubini είναι δραστικό έναντι ανθρωπίνων παθογόνων βακτηρίων καθώς και των ιών της γρίπης. Έτσι διαφαίνεται ότι αυτό το φυσικό προϊόν μπορεί να προταθεί ως πρόσθετη και εναλλακτική προσέγγιση για την καταπολέμηση των ανθρωπίνων λοιμώξεων.

Αναδρομή

Elders (*Sambucus* spp.) Απαντώνται σε όλα τα σημεία του κόσμου. Στην κεντρική Ευρώπη, τα πιο κοινά είδη είναι το μαύρο elder (*Sambucus nigra* L.), το κόκκινο (*Sambucus racemosa* L.), και ο νάνος (*Sambucus ebulus* L.). Το μαύρο είναι το πιο διαδεδομένο και βρίσκεται σε όλη την Ευρώπη, την κεντρική και τη δυτική Ασία, και τη Βόρεια Αφρική [1].

Είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος που μεγαλώνει σε ύψος 4-6 μ. Από την άνοιξη μέχρι το καλοκαίρι οι κόρυμβοι είναι σε άνθηση. Τα μούρα είναι σκούροι βιολετί έως μαύροι καρποί που μεγαλώνουν σε ομάδες και είναι βρώσιμα μόνο όταν είναι πλήρως ώριμα. Άλλα μέρη του φυτού, όπως τα πράσινα στελέχη και τα κλαδιά, δεν είναι βρώσιμα και δεν συνιστάται η κατανάλωση τους από τον άνθρωπο.

* Correspondence: Stephan.Pleschka@mikro.bio.uni-giessen.de; Torsten.

Hain@mikro.bio.med.uni-giessen.de† Contributed equally

¹Institute for Medical Microbiology, Justus-Liebig-University, Frankfurter Strasse 107, 35392 Giessen, Germany

²Institute for Medical Virology, Justus-Liebig-University, Frankfurter Strasse 107, 35392 Giessen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

Το 400 π.Χ., ο Ιπποκράτης αναφέρεται στο εν λόγω δέντρο ως «το γιατρικό του στήθους." Άλλοι κλασικοί θεραπευτές, όπως ο Θεόφραστος, ο Διοσκουρίδης και ο Γαληνός, θεωρούν το σαμπούκο το μεγαλύτερο φυτό της επούλωσης. Ο βοτανολόγος Hildegard von Bingen τον 12ο αιώνα, και ο ιατρός και συγγραφέας, Dr. Martin Blochwich τον 17ο αιώνα, συνέχισαν να εκθειάζουν τις αρετές του [2]. Στις αρχές του 20ου αιώνα, ο Βρετανός βοτανολόγος Maud Grieve εξέδωσε μια συνολική έκθεση των ιστορικών χρήσεων του μαύρου elderberry κατά την παραδοσιακή ιατρική [3]. Πριν την ύπαρξη των αντιβιοτικών, το elderberry βρέθηκε ως ένα από τα βασικά συστατικά σε πολλά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται από βοτανολόγους [4], φαρμακοποιούς και γιατρούς. Σήμερα, το elderberry χρησιμοποιείται ως εναλλακτική λύση στα συμβατικά σκευάσματα και κυρίως με τη μορφή ενός εκχυλίσματος για την αγωγή του κοινού κρυολογήματος, της γρίπης και των λοιμώξεων από τον ιό του έρπητα [5-9]. Το elderberry συχνά συνιστάται για χρήση ως συμπληρωματική θεραπεία μαζί με τα κλασικά αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής, τη βιταμίνη C και τον ψευδάργυρο, για την υποστήριξη της φυσικής διαδικασίας της ανάρρωσης [7].

Το ευρωπαϊκό μαύρο elderberry είναι πλούσιο σε διαιτητικές πηγές φυτικών χρωστικών και φαινολικές ενώσεις. Περιέχει φλαβονοειδή, κερκετίνη-3-γλυκοσίδη και κερκετίνη-3-ρουτινοζίδη, καθώς και μια

σειρά από ανθοκυανίνες, όπως μια ομάδα φαινολικών ενώσεων που είναι αρμόδιες για το ελκυστικό κόκκινο, μωβ και βιολετί χρώμα πολλών φρούτων, λουλουδιών, λαχανικών. Οι ανθοκυανίνες του elderberry επισημάνθηκαν ως κυανίδινο-3-sambubioside-5-γλυκοσίδη, cyanidin- 3,5-διγλυκοζίδη, κυανίδινο-3-sambubioside, κυανίδινο-3-γλυκοσίδη, κυανίδινο-3-ρουτινοζίδη, πελαργονίδινο-3-γλυκοσίδη και πελαργονίδινο-3-sambubioside. Οι ανθοκυανίνες του elderberry είναι βιοενεργές: για παράδειγμα, είναι σε θέση να ενισχύσουν την αντιοξειδωτική ιδιότητα του ανθρωπίνου πλάσματος. [10-13]. In vitro μελέτες στα ζώα έχουν δείξει ότι οι ανθοκυανίνες μειώνουν το νεκρωτικό και αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και ελλοτώνουν την πιθανότητα του εμφράγματος, μέσω της αντι-φλεγμονώδους και διασταλτικής δράσης των επί των στεφανιαίων αρτηριών [14].

Οι λοιμώξεις του ιού της γρίπης (IV) προκαλούν εποχικές επιδημίες με δυνατότητα να προκληθεί πανδημία. Δυστυχώς μόνον ορισμένα φάρμακα έχουν εγκριθεί για χρήση στη θεραπεία των λοιμώξεων του ιού της γρίπης A και B, που δρουν άμεσα και συγκεκριμένα κατά αυτών. Το πρόβλημα με αυτά τα φάρμακα είναι ότι η αντίσταση στα φάρμακα αυτά μπορεί να αναπτυχθεί σχετικά γρήγορα [15,16]. Έτσι, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για νέα φάρμακα με ευρεία βάση που δεν επιτρέπουν σχετική αντίσταση. Δραστικές ουσίες με μη εξειδικευμένη ανασταλτική δράση κατά της IV διάδοσης του ιού, ανεξάρτητα από τον ιικό υπότυπο, πιθανότατα δεν οδηγεί σε αντίσταση, εφόσον οι IVs δεν διαφεύγουν της αναστολής με περαιτέρω αλλαγές στις ιικές τους ιδιότητες [17]. Επιπλέον, βακτηριακή λοίμωξη κατά τη διάρκεια μιας συνεχούς μόλυνσης IV μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή πνευμονία [18], γι' αυτό το λόγο ουσίες με διπλή δράση κατά των δύο ειδών παθογόνων βακτηρίων και του ιού IV θα ήταν περαιτέρω ενδιαφέρον.

Αποδεικνύεται ότι ένα τυποποιημένο υγρό εκχύλισμα elderberry εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση κατά Gram+ βακτηρίων *Streptococcus pyogenes* και της ομάδας O και G *Streptococci*, καθώς και του Gram-βακτηρίου *Branhamella catarrhalis*, τα οποία συχνά προκαλούν λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Όπως ήταν ήδη γνωστό το εκχύλισμα elderberry μπορεί να εμφανίσει δραστηριότητα έναντι IV, εδώ ερευνήσαμε την ικανότητα ενός συγκεκριμένου τυποποιημένου εκχυλίσματος μαύρου elderberry να αναστείλει την διάδοση σε ανθρώπους των παθογόνων στελεχών του ιού της γρίπης A και B, A/Thailand/KAN-1/2004 (KAN-1,H5N1) και B/Massachusetts/71 (Mass), σε κυτταρική καλλιέργεια και σε μη τοξικές συγκεντρώσεις.

Μέθοδοι

Υγρό εκχύλισμα elderberry (Rubini)

Το εκχύλισμα που χρησιμοποιείται στις δοκιμές είναι

ένα πατενταρισμένο προϊόν γνωστό ως Rubini και παρέχεται από την BerryPharma AG (Solinger Strasse 7, D-42799 Leichlingen, Γερμανία). Το συγκεκριμένο εκχύλισμα σαμπούκου επελέγη για τις μελέτες μας, διότι είναι τυποποιημένο με HPLC και πάντα παράγεται από την ίδια "Haschberg" ποικιλία του *S. nigra* L., το οποίο καλλιεργείται συστηματικά στην περιοχή Steiermark της Αυστρίας. Ο λόγος elderberry-προς-εκχύλισμα αυτού είναι 18:1. Το εκχύλισμα είναι συμπυκνωμένο και τυποποιημένο με τη χρήση διήθησης με μεμβράνη για να επιτευχθεί μια ελάχιστη συγκέντρωση ανθοκυανίνης της τάξης του 3,2%. Η συγκέντρωση της ανθοκυανίνης επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μια διαδικασία μηχανικού φιλτραρίσματος, κατά την οποία ο διαχωρισμός των ουσιών γίνεται σε ημιπερατές μεμβράνες ανάλογα του μοριακού τους μεγέθους. Η HPLC δοκιμασία βασίζεται στην IFU N° 71, μεθόδου 1998, η οποία μετράται σε pH 1, χρησιμοποιώντας χλωριούχο κυανιδίνη 510 nm (Sigma Aldrich) ως πρότυπο αναφοράς.

Όλες οι αναφορές στα υγρά εκχυλίσματα elderberry σε αυτή τη μελέτη αναφέρονται στο ίδιο πατενταρισμένο, τυποποιημένο εκχύλισμα.

Βακτηριακά στελέχη

Στελέχη του *S.pyogenes*, ομάδα C και G στρεπτοκόκκων, και *B catarrhalis* απομονώθηκαν άμεσα από δείγμα ασθενών, καλλιεργήθηκαν σε πλάκες άγαρ αίματος προβάτου (37°C, 5% CO₂) και ανανεώνονταν δύο φορές την εβδομάδα. Τα δείγματα των ασθενών σημάνθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικά αντιβιοτικά αναφοράς (βλέπε συμπληρωματικό αρχείο 1, Πίνακας S1). Για τα πειράματα, καλλιεργήθηκαν βακτήρια σε ένα κατάλληλο ζωμό όλη τη νύκτα στους 37°C με ανακίνηση στις 180 rpm (Unitron, Infors). Υπερ-νύκτα καλλιέργειες αραιώθηκαν 1:50 σε 20 ml φρέσκου BHI (Brain Heart Infusion) ζωμού χρησιμοποιώντας μία φιάλη Erlenmeyer 100 ml και επώστηκαν υπό τις συνθήκες που σημειώνεται παραπάνω έως ότου έφτασαν μία οπτική πυκνότητα του OD₆₀₀ nm 1.0.

Κυτταρική σειρά & ιοί

Madin Darbin κύτταρα νεφρού σκύλου (MDCK) αναπτύχθηκαν σε DMEM (1x DMEM συμπληρωμένο με 10% FCS, 100 U / ml πενικιλίνη, 100 μg / ml στρεπτομυκίνη). Τα ακόλουθα στελέχη του ιού της γρίπης χρησιμοποιήθηκαν: Το ανθρώπινο στέλεχος HPAIV A/Thailand/KAN-1/2004 (KAN-1, H5N1) παρασχέθηκαν στον S. Pleschka από τον P. Ruthavathana, Ταϊλάνδη. Το ανθρώπινο στέλεχος B/Massachusetts/71 (B/Mass) ελήφθη από τη συλλογή στελέχους IV σε Giessen, Γερμανία. Τα KAN-1 και B/Mass πολλαπλασιάστηκαν σε κύτταρα MDCK, το KAN-1 με χαμηλό ορό χωρίς θρυψίνη και το B/Mass με

θρυψίνη (2 µg / ml). Τα στελέχη τιτλοδοτήθηκαν με δοκιμασία εστίασης (βλέπε κατωτέρω).

Δοκιμές της αντιμικροβιακής συμπεριφοράς του υγρού εκχυλίσματος elderberry σε υγρές καλλιέργειες

Τα στελέχη αναπτύχθηκαν στους 37°C σε 180 rpm για 12-16 ώρες.

Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα OD₆₀₀ nm και οι διαφορές ρυθμίστηκαν με τη λήψη διαφορετικού όγκου για να ληφθούν τα ίδια ποσά των βακτηρίων.

Ένα χιλιοστόλιτρο όγκου φρέσκου μέσου εμβολιάστηκε με 50 µl των βακτηρίων επί μία νύκτα και καλλιεργήθηκε σε 1,5 ml σωλήνων Eppendorf. Το υγρό εκχύλισμα Elderberry προστέθηκε σε περιεκτικότητες κατά 5%, 10%, 15% και 20%. Οι παρασκευασμένοι σωλήνες διατηρήθηκαν στους 37°C και 180 rpm για άλλες 16 ώρες. Έξω από τους σωλήνες, αραιώθηκαν 100 µl, καλλιεργήθηκαν σε άγαρ αίματος (Oxoid) και επωάστηκαν στους 37°C εντός ζωμού επί 24 ώρες. Οι μονάδες σχηματισμού αποικίας (CFU) μετρήθηκαν και οι μετρήσεις υπολογίστηκαν εκ νέου με factoring στις προηγούμενες αραιώσεις. Πλάκες βακτηρίων χωρίς εκχύλισμα elderberry ορίστηκαν ως 100% της πιθανής ανάπτυξης. Στοιχεία ανάπτυξης από δείγματα που εκτίθενται σε υγρό εκχύλισμα elderberry συγκρίθηκαν με τα στελέχη που δεν έχουν εκτεθεί στο εκχύλισμα. Κάθε βιολογικό πείραμα επαναλήφθηκε ανεξάρτητα, τουλάχιστον τρεις φορές με δύο επαναλήψεις ανά δοκιμή.

Δοκιμασία MTT

Τα MDCK κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε μικροπλάκες 96 σωληναρίων, επωάστηκαν με μέσο DMEM/BA (1x DMEM, 0.2% BA, 100 U ml⁻¹ πενικιλίνη και 0.1 mg ml⁻¹ στρεπτομυκίνη) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος elderberry (όπως περιγράφεται στο Υλικά και Μέθοδοι, σελίδα 6) στους 37 ° C, 5% CO₂ για 12, 24, 36 και 48 h (16 σωληνάκια ανά δείκτη συγκέντρωσης και χρονικό σημείο). Τα μέσα στη συνέχεια αναρροφήθηκαν και τα κύτταρα αφέθηκαν να αναρρώσουν για 60 λεπτά σε DMEM το οποίο στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από 200 µl MTT-mix (DMEM συμπληρωμένο με 10% FCS και αντιβιοτικά που περιείχαν 175 µg/ml MTT = 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan; Sigma). Τα κύτταρα επωάστηκαν περαιτέρω για 90 λεπτά στους 37 ° C και στη συνέχεια σταθεροποιήθηκαν με 4% PFA (σε PBS) για 30 λεπτά σε RT. Τα κύτταρα ξηράθηκαν και οι κρύσταλλοι τετραζολίου διαλύθηκαν με την προσθήκη 200 µl ισοπροπανόλης σε κάθε σωληνάριο. Οι πλάκες ανακινήθηκαν επί 10 λεπτά και αναλύθηκαν φωτομετρικά με διέγερση 560 nm σε ενζυμική συσκευή ανοσοροφητικής δοκιμασίας (ELISA).

Δοκιμασία Focus

Τα MDCK κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε τριβλία των 96 σωληναρίων σε DMEM έως περίπου 90% συρροής πλύθηκαν μία φορά με PBS++ και μολύνθηκαν με τον ιό αραιώσης 50 µl, με αποτέλεσμα την ύπαρξη περίπου 100 εστιών/σωληνάριο σε PBS/BA, για 1 ώρα RT. Το εμβόλιο αναρροφήθηκε και προστέθηκαν 150 µl MC μέσο (1x DMEM, 1.5% Methyl cellulose; Methocel MC, Fluka) για το KAN-1 και Avicel μέσο (1x DMEM, 1.25% Avicel; FMC, Belgium) για το B/Mass, και επωάστηκαν στους 37 ° C, 5% CO₂, για 36 και 48 ώρες. Για την ανίχνευση εστιών των μολυσμένων κυττάρων, τα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν και κατέστησαν διαπερατά χρησιμοποιώντας 100 µl διαλύματος στερέωσης (4% PFA, 1% Triton X-100 σε PBS++) στους 4°C για 60 λεπτά. Το διάλυμα στη συνέχεια απορρίφθηκε, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με PBS++/0,05% Tween20 και επωάστηκαν περαιτέρω με 50 µl αντισώματος No.1 (ποντικού αντι-νουκλεοπρωτεΐνης A γρίπης mAb, BIOZOL BZL 10908) αραιωμένο σε PBS++, 3% BSA, για 1 h σε RT. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλύθηκαν 3 φορές με PBS++, 0.05% Tween 20 και επωάστηκαν με 50 µl του αντισώματος No2 (anti-mouse HRP-antibody) αραιωμένο σε PBS++, 3% BSA, για 1 ώρα σε RT. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλύθηκαν εκ νέου 3 φορές με PBS++, 0.05% Tween 20 και επωάστηκαν σε 40 µl/φρεάτιο "AEC" διάλυμα χρώσης (Sigma) για 45 λεπτά σε RT. Μετά από επαρκή χρώση, το υπόστρωμα απομακρύνθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με dH₂O για να απομακρυνθούν τα άλατα. Για την ανίχνευση του μεγέθους των εστιών (σε διαδικασία παραγωγικής αντιγραφής), οι πλάκες 96 σωληναρίων σαρώθηκαν και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Photoshop.

Στατιστική ανάλυση των δεδομένων των πειραμάτων

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν τουλάχιστον τρεις φορές. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο τιμών συγκρίθηκαν με ένα κατά ζεύγος Student t-test. Οι τιμές θεωρήθηκαν σημαντικά διαφορετικές όταν η τιμή p ήταν μικρότερη από 0,05 (p < 0,05).

Βιοασφάλεια

Όλα τα πειράματα που χρησιμοποίησαν μολυσματικό ιό πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους γερμανικούς κανονισμούς που ισχύουν για τον πολλαπλασιασμό των ιών της γρίπης. Όλα τα πειράματα στα οποία μετέχουν ιοί υψηλής παθογονικότητας γρίπης A πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο περιορισμού βιοασφάλειας 3 (BSL3), σε εγκεκριμένο εργαστήριο για τέτοια χρήση από τις τοπικές αρχές (RP, Giessen, Γερμανία).

Αποτελέσματα

Αντιμικροβιακή δράση του υγρού εκχυλίσματος elderberry σε υγρές καλλιέργειες βακτηρίων

Χρησιμοποιήσαμε πειράματα ανάπτυξης σε υγρές καλλιέργειες για να αξιολογήσουμε την αντιμικροβιακή δράση ενός τυποποιημένου υγρού εκχυλίσματος elderberry έναντι των Gram+ βακτηρίων του *S.pyogenes* και της ομάδας O και G στρεπτόκοκκων, καθώς και του Gram- βακτηρίου *B catarrhalis*. Τα CFUs προσδιορίστηκαν 16 ώρες μετά την επίστρωση των βακτηρίων σε άγαρ αίματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του υγρού εκχυλίσματος elderberry (Εικόνα 1). **Η προσθήκη του εκχυλίσματος elderberry σε συγκέντρωση από 10% σε βακτηριακά στελέχη σε υγρό μέσο καλλιέργειας μείωσε την ανάπτυξη τους κατά > 70% σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα δείγματα. Η συγκέντρωση του 20% υγρού εκχυλίσματος elderberry στα μέσα καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη βακτηρίων κάτω από το ένα τοις εκατό των αρχικών τιμών που μετρήθηκαν.**

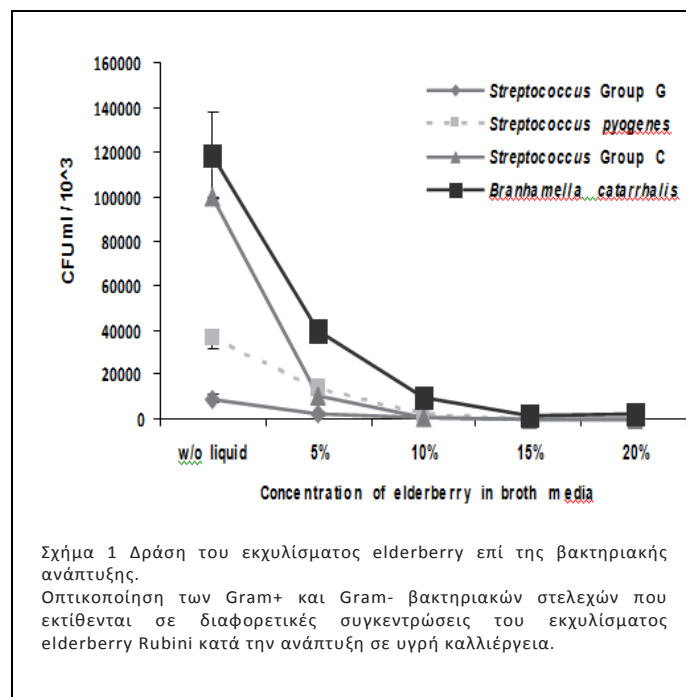
Κάθε βιολογικό πείραμα επαναλαμβάνεται ανεξάρτητα τουλάχιστον τρεις φορές με δύο επαναλήψεις ανά δοκιμή. Τυπική απόκλιση παρουσιάζεται. Η p εμφανίστηκε <0,05 για όλα τα βακτήρια που ελέγχθηκαν.

Η αντιμικροβιακή δράση του υγρού εκχυλίσματος elderberry κατά των οργανισμών των βακτηρίων σε υγρό ζωμό ήταν εμφανής από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με πλάκες άγαρ με τη χρήση της μεθόδου διάχυσης δίσκων. Ενώ υπήρξε ανασταλτική δράση του εκχυλίσματος κατά της ανάπτυξης του *Haemophilus influenzae* χρησιμοποιώντας μεθόδους διάχυσης δίσκου, δεν υπήρξε ανασταλτική δράση κατά της ανάπτυξης των Gram+ βακτηρίων, *Staphylococcus aureus* (MRSA και MSSA) και *Streptococcus mutans* και του Gram- βακτηρίου της *H. parainfluenzae* (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Ανασταλτική δράση υγρού εκχυλίσματος elderberry στη διάδοση της B/Massachusetts/71 (B/Mass) και A Thailand/KAN-1/2004 (KAN-1, H5N1) σε κυτταρική καλλιέργεια με προσδιορισμό μείωσης μεγέθους εστιών και ανάλυση τίτλου των μολυσματικών σωματιδίων

Αρχικά προσδιορίζεται η συγκέντρωση στην οποία το εκχύλισμα θα μπορούσε να ελεγχθεί για αντι-ική δράση χωρίς κυτταροτοξικά αποτελέσματα με την δοκιμασία MTT. Αυτό περιλαμβάνει την υψηλότερη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που εξακολουθεί να είναι ανεκτό σε καλλιέργεια κυττάρων και αναμένεται να δείξει την ισχυρότερη δράση ή όχι, χωρίς έλεγχο κυτταροτοξικότητας. Βρήκαμε ότι σε μια αραιώση 1:

100 του εκχυλίσματος σε μέσα πληρούνται και τα δύο κριτήρια.



MDCK κύτταρα μολύνθηκαν για 1 ώρα με τα στελέχη IV B/Massachusetts/71 (B/Mass) και A/Thailand/KAN-1/2004 (KAN-1, H5N1) σε μία δόση που επιτρέπει την εύκολη ανίχνευση εστίας. Μετά την απομάκρυνση του εμβολίου, τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες με επικάλυψη των μέσων, παρουσία του εκχυλίσματος elderberry στην επιλεγμένη συγκέντρωση. Το υπερκείμενο στη συνέχεια απορρίπτεται και το μέγεθος των εστιών προσδιορίστηκε με δοκιμασία εστίασης.

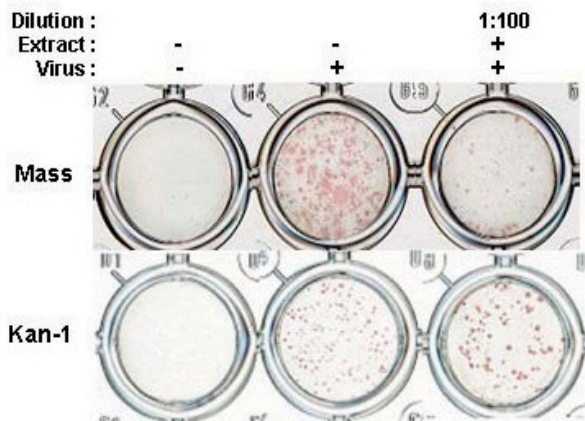
Σε 48 ώρες μετά την μόλυνση (p.i.), η θεραπεία με το εκχύλισμα elderberry παρήγαγε μια σαφή μείωση των εστιών μεγέθους για το B/Mass σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο μάρτυρα (Σχήμα 2A). **Συνοπτικά, η θεραπεία με το υγρό εκχύλισμα elderberry μειώνει την εξάπλωση του ιού σε καλλιέργεια κυττάρων.** Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ τα αποτελέσματα δείχνουν πως το μέγεθος των εστιών KAN-1 στην πραγματικότητα δεν μειώνεται αλλά διευρύνεται σε σύγκριση με τον μάρτυρα, από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι ο αριθμός των εστιών μειώνεται σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο έλεγχο (Εικόνα 2A). Επιπλέον, προσδιορίστηκε η συνολική ποσότητα του ιού που παράγεται μετά την μόλυνση των προ-επεξεργασμένων κυττάρων με προ-επεξεργασμένο ιό και την επώασή τους με την παρουσία του εκχυλίσματος (1: 100). Για τα αντίστοιχα στελέχη του ιού, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι επιτυγχάνεται μια μείωση περίπου 30% (KAN-1) και 25% (B/Mass) (σχήμα 2B).

εκχυλίσματος elderberry είναι μια σημαντική παράμετρος για την αντιμικροβιακή περαιτέρω δυνητική θεραπευτική αντιμετώπιση των παθογόνων βακτηρίων.

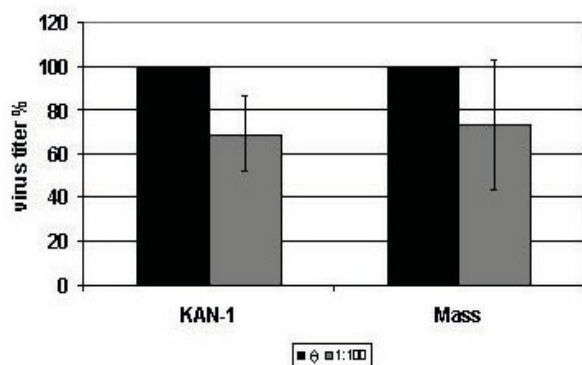
Η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος της κουφοξυλιάς (*S. nigra* L.) αποδείχτηκε κατά την ανάπτυξη των 13 κοινών νοσοκομειακών Gram+ και Gram- παθογόνων (π.χ. *S. aureus* (MRSA), *Bacillus* πιστο- EUS, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*) χρησιμοποιώντας την τεχνική διάχυσης δίσκου [19]. Αξιοπερίεργο είναι, ότι οι συγγραφείς ανέφεραν πως όλα τα νοσοκομειακά στελέχη, συμπεριλαμβανομένου του *S.aureus*, σε επεξεργασία με υδατικό εκχύλισμα των φύλλων σε 10-πλάσια αραιώση απέτυχε να δείξει οποιαδήποτε ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη, ενώ 100-πλάσιες αραιώσεις του αλκοολικού λυοφιλιωμένου, συμπυκνωμένου εκχυλίσματος των ανθέων ή μούρων ανέστειλαν όλα τα βακτήρια που δοκιμάστηκαν [19]. Στα δεδομένα μας, *S.aureus* (MRSA και MSSA) δεν αναστέλλονται χρησιμοποιώντας υγρό εκχύλισμα elderberry Rubini στις δοκιμασίες διάχυσης δίσκου. Αυτό υποδηλώνει έντονα ότι, το εκχύλισμα elderberry που παρασκευάζεται με διήθηση μεμβράνης που χρησιμοποιείται στη μελέτη μας, σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα που παρασκευάζονται με την μέθοδο του Hearst and Colleagues [19], μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετικό. Εμείς εικάζουμε ότι οι λόγοι για τις διαφορετικές αντιμικροβιακές δράσεις των δύο εκχυλισμάτων elderberry μπορεί να εξαρτώνται από τις χημικές συνθέσεις τους ή διαφορετικές συγκεντρώσεις των αντιβακτηριακών ενώσεων εντός των εκχυλισμάτων. Και οι δύο μελέτες δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα των καρπών της κουφοξυλιάς που παράγονται με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης μπορεί να είναι χρήσιμα ως εναλλακτικά ή συμπληρωματικά φάρμακα για την δυνητική εξουδετέρωση της εξάπλωσης ορισμένων ειδών βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού. Τέλος, συμπληρωματικές έρευνες απαιτούνται για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των εκχυλισμάτων elderberry ενάντια στα βακτήρια.

Δοκιμασίες αναστολής συγκυτίων έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα elderberry έχουν ισχυρή αντι-ιική δράση έναντι του ιού της ανοσοανεπάρκειας των αιλουροειδών (FIV) in vitro [20]. Επίσης, τα φλαβονοειδή στα μούρα του *S.nigra* L. συνδέονται και προλαμβάνουν τη μόλυνση H1N1 τύπου IV in vitro [6]. Επιπλέον, ο τύπος του ιού της γρίπης A και B που συνδέεται με το alpha2,3- και το alpha2,6-συνδεδεμένο υποκαταστάτη των γλυκοπρωτεϊνών του σιαλικού οξέως ως υποδοχέα αυτών, που είναι καθοριστικοί παράγοντες για τη μόλυνση μέσω της ιογενούς αιμοσυγκολλητίνης (HA) πρωτεΐνης, και του alpha2,6-συνδεδεμένου σιαλικού οξέως στοχοποιείται από την L. αγλουτινίνη του *S. Nigra*. [21]. Συνεπώς, με σκοπό να διαλευκανθεί η αντι-ιική δυναμική ή μη του

A



B



Σχήμα 2 Δράση του εκχυλίσματος elderberry στη διάδοση της IV.

A) Δοκιμασία μείωσης του μεγέθους εστιών. MDCK κύτταρα μολύνθηκαν με τα δύο στελέχη του ιού όπως υποδεικνύεται και επώαστηκαν για 48 ώρες με την παρουσία του εκχυλίσματος (1: 100). Οι εστίες ανιχνεύθηκαν σε επίπεδο ανοσοχημικό.

B) Προ-επεξεργασμένα κύτταρα MDCK μολύνθηκαν με προ-επεξεργασμένο ιό και πολλαπλασιάστηκαν επί 48 ώρες με την παρουσία του εκχυλίσματος. Ως έλεγχος χρησιμοποιήθηκαν μη επεξεργασμένα κύτταρα σε λοίμωξη από τον ιό. Ο μέσος όρος των τριών ανεξάρτητων πειραμάτων δίδεται, και ως ποσοστό του ελέγχου (μαύρο) ορίζεται στο 100%. Τυπική απόκλιση υποδεικνύεται (KAN-1: $p < 0.07$, Mass: $p < 0.03$).

Σχολιασμός

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η δυνητική αντιμικροβιακή δράση ενός τυποποιημένου υγρού εκχυλίσματος elderberry έναντι διαφόρων παθογόνων βακτηρίων και ιών, που όπως είναι γνωστό προκαλούν λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος στον άνθρωπο. Δείξαμε ότι η διάδοση του *S. pyogenes*, της ομάδας C και G στρεπτοκόκκων, και της *B.catarrhalis* μειώθηκαν μετά την επίδραση εκχυλίσματος elderberry υγρής επεξεργασίας. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις του υγρού

ειδικού εκχυλίσματος elderberry, χρησιμοποιήθηκε στις έρευνες μας ενάντια σε ένα τύπου-B IV (B/Mass), καθώς και σε ένα άλλο τύπου γρίπης ιδιαίτερα παθογόνου IV (KAN-1, H5N1) που απομονώθηκε από τον άνθρωπο.

Αποδείξαμε ότι η επεξεργασία των IV-μολυσμένων κυττάρων με το υγρό εκχύλισμα elderberry μειώνει την εξάπλωση του B/Mass σε συγκεντρώσεις που είναι μη-τοξικές και ως εκ τούτου θα πρέπει να επηρεάζει σαφέστατα τους μηχανισμούς πολλαπλασιασμού του ιού της γρίπης B. Είναι ενδιαφέρον ότι, η KAN-1 έδειξε επίσης μια μείωση στον αριθμό εστιών, και παράλληλα προκάλεσε διεύρυνση του μεγέθους των. Προς το παρόν, αυτό δεν έχει διευκρινιστεί. Παρ'όλα αυτά, αμφότερα τα στελέχη του ιού δείχνουν μειωμένους τίτλους όταν προ-επεξεργασμένα κύτταρα MDCK μολύνθηκαν με τα προ-επεξεργασμένα στελέχη, και τα οποία έπαυσαν να επωάζονται, στην παρουσία του εκχυλίσματος για 48 ώρες. Η διαφορά στην επίδραση του εκχυλίσματος στον πολλαπλασιασμό των δύο στελεχών του είδους ενδέχεται να αντανακλά τους διαφορετικούς τρόπους σχετικά με τους παράγοντες ή τους μηχανισμούς που μπλοκάρει το εκχύλισμα τους ιούς και, συνεπώς, το εκχύλισμα συμπεριφέρεται να έχει διαφορετική ανασταλτική δυναμική προς τους διάφορους τύπους IV. Κοιτάζοντας τις διάφορες θεραπευτικές αγωγές, η προ-κατεργασία των κυττάρων είχε μόνο μια μέτρια επίδραση στη μείωση του τίτλου KAN-1 σε μια μόνο κυκλική αντιγραφή (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το υγρό εκχύλισμα elderberry μπλοκάρει τους παράγοντες στην κυτταρική επιφάνεια που απαιτούνται από τον KAN-1 (και, ως εκ τούτου όμως, ίσως και για άλλα IV) για την ουσιαστική μόλυνση των κυττάρων MDCK. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα προ-επεξεργασμένων ιών και ότι τα κύτταρα επωάστηκαν περαιτέρω με την παρουσία του αραιωμένου εκχυλίσματος. Από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα άλλων ερευνών που δείχνουν ανασταλτική δράση του υγρού εκχυλίσματος elderberry κατά της γρίπης A και B του ιού [8,9], μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα του elderberry έχει κοινό μοριακό στόχο και για τα δυο ιικά γένη. Ενώ αυτός ο στόχος θα μπορούσε να είναι συγκεκριμένος ή μη, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι **τα φλαβονοειδή συστατικά των καρπών φαίνεται να παρουσιάζουν ένα συγκεκριμένο αποτέλεσμα αναστολής της νευραμινιδάσης [4], και προσδένονται στο κυτταρικό τοίχωμα του ιού της γρίπης [5]**. Περαιτέρω έρευνα στην αποσαφήνιση της εξειδικευμένης δράσης του υγρού εκχυλίσματος elderberry Rubini θα επιτρέψει μια καλύτερη κατανόηση του τρόπου δράσης της και ως εκ τούτου των δυναμικών εφαρμογών της. Όσον αφορά τη χρησιμότητα του υγρού εκχυλίσματος

elderberry στις in vivo δοκιμασίες, θα πρέπει να βρεθεί μια εξισορροπιστική μορφή μεταξύ της συγκέντρωσης και του χαμηλού ιξώδους για την παροχή των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων. Για πρακτικούς λόγους θα πρέπει να καθοριστεί η βέλτιστη οδός χορήγησης και να αποφασιστεί με ποια στρατηγική να συνεχιστεί η εξέταση για τη δυναμική του εκχυλίσματος. Ένας συνδυασμός του υγρού εκχυλίσματος με πρόσθετα συστατικά με στόχο την αύξηση της αποτελεσματικότητας του θα μπορούσαν επίσης να εφαρμοστούν, εφόσον είναι δυνατόν διάφορα φυσικά συστατικά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με το εκχύλισμα για ποικίλες θεραπευτικές εφαρμογές [22].

Συμπέρασμα

Το υγρό εκχύλισμα elderberry Rubini είναι δραστικό έναντι παθογόνων βακτηρίων στον άνθρωπο καθώς και έναντι των ιών της γρίπης, εφόσον και οι δυο αυτές ομάδες είναι κλινικά σημαντικά παθογόνες, και για τις οποίες απαιτούνται νέες και εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Επιπλέον, η βακτηριακή επιμόλυνση κατά την διάρκεια αυτών των μολύνσεων από τους ιούς της γρίπης περιπλέκει περισσότερο την κατάσταση του ασθενή. Επομένως, θα ήταν χρήσιμο να απευθύνεται ταυτοχρόνως και στους δυο «εχθρούς». Έτσι λοιπόν, οι θεραπευτικές ιδιότητες που, όπως δείχθηκε, έχει το υγρό εκχύλισμα elderberry, μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι πρόσθετες και εναλλακτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από τη γρίπη θα μπορούσαν να παρέχονται από φυσικά προϊόντα.

Πρόσθετο υλικό

Πρόσθετο αρχείο 1: Ευαισθησία των βακτηριακών στελεχών στις ομάδες πενικιλίνη G, δοξυκυκλίνη, κλινδαμυκίνη, κεφαζολίνη, κεφουροξίμη και κεφταζιντίμη. Πίνακας S1.

Ευχαριστίες

Οι συγγραφείς ευχαριστούν τις Νίνα Baumann, Εύα Lenz και Mira Gökyildirim για την εξαιρετική τεχνική βοήθεια και τον Kenneth Jones για την εκδοτική βοήθεια. Το έργο αυτό χρηματοδοτήθηκε από το Γερμανικό Ομοσπονδιακό Υπουργείο Παιδείας και Έρευνας (BMBF) "Pathogenomics Network to the sncRNAomics" έργο Θ (FKZ: 0315437A), με επιχορηγήσεις για την έρευνα του κέντρου LOEWE UGMLC να ΕΔ, Θ, και SP και "Ανθοκυανίνες σε χυμούς φρούτων από μούρα - βιοδιαθεσιμότητα και επίδραση στην εντερική μικροχλωρίδα" έργο ΕΔ (FKZ: 0315379A).

Λεπτομέρειες συγγραφέα

¹Institute for Medical Microbiology, Justus-Liebig-University, Frankfurter Strasse 107, 35392 Giessen, Germany. ²Institute for Medical Virology, Justus-Liebig-University, Frankfurter Strasse 107, 35392 Giessen, Germany.

Συνεισφορά των συγγραφέων

Οι MAM, ED, SP και TH σχεδίασαν την μελέτη. Οι CK, MAM και MS διεξήγαγαν τις εργαστηριακές μελέτες. Οι CK, MAM, SP, ED και TH ανέλυσαν τα δεδομένα και συμμετείχαν στην προετοιμασία του χειρογράφου. Ο CI συνέλεξε τα δείγματα των ασθενών. Όλοι οι συγγραφείς διάβασαν και ενέκριναν το τελικό χειρόγραφο.

Αντικρουόμενα συμφέροντα

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε μερικώς από την BerryPharma AG (to S.P. and T.H.).

Received: 12 October 2010

Accepted: 25 February 2011

Published: 25 February 2011

Αναφορές

1. Atkinson MD, Atkinson E: *Sambucus nigra* L. *J Ecol* 2002, 90:895-923.
2. Blochwitz M: *Anatomia sambuci, or, The Anatomy of the Elder cutting out of it plain, approved, and specific remedies for most and chiefest maladies: confirmed and cleared by reason, experience, and history* London: H Brome and T Sawbridge; 1677.
3. Grieve M: In *A Modern Herbal* Edited by: Leyel, C.F 2010.
4. Wright CI, Van Buren L, Kroner CI, Koning MM: Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. *J Ethnopharmacol* 2007, 114:1-31
5. Liu AL, Wang HD, Lee SM, Wang YT, Du GH: Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg Med Chem* 2008, 16:7141-7147.
6. Roschek B Jr, Fink RC, McMichael MD, Li D, Alberte RS: Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry* 2009, 70:1255-1261.
7. Roxas M, Jurenka J: Colds and influenza: a review of diagnosis and conventional, botanical, and nutritional considerations. *Altern Med Rev* 2007, 12:25-48.
8. Zakay-Rones Z, Varsano N, Zlotnik M, Manor O, Regev L, Schlesinger M, Mumcuoglu M: Inhibition of several strains of influenza virus in vitro and reduction of symptoms by an elderberry extract (*Sambucus nigra* L.) during an outbreak of influenza B Panama. *J Altern Complement Med* 1995, 1:361-369.
9. Zakay-Rones Z, Thom E, Wollan T, Wadstein J: Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections. *J Int Med Res* 2004, 32:132-140.
10. Wu X, Cao G, Prior RL: Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr* 2002, 132:1865-1871.
11. Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D: Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res* 2007, 51:675-683.
12. Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S: Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 2004, 52:7846-7856.
13. Netzel M, Strass G, Herbst M, Dietrich H, Bitsch R, Bitsch I, Frank T: The excretion and biological antioxidant activity of elderberry antioxidants in healthy humans. *Food Res International* 2005, 38:905-910.
14. de Pascual-Teresa S, Moreno DA, Garcia-Viguera C: Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci* 2010, 11:1679-1703.
15. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH: The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J* 1985, 4:3021-3024.
16. Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, Hayden FG, Sugaya N, Kawaoka Y: Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004, 364:759-765.
17. Pleschka S, Stein M, Schoop R, Hudson JB: Anti-viral properties and mode of action of standardized *Echinacea purpurea* extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *Virol J* 2009, 6:197.
18. Gupta RK, George R, Nguyen-Van-Tam JS: Bacterial pneumonia and pandemic influenza planning. *Emerg Infect Dis* 2008, 14:1187-1192.
19. Hearst C, McCollum G, Nelson D, Ballard LM, Millar BC, Goldsmith CE, Rooney PJ, Moore JE, Rao JR: Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010, 4:1805-1809.
20. Uncini Manganelli RE, Zaccaro L, Tomei PE: Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *J Ethnopharmacol* 2005, 98:323-327.
21. Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JS: Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res* 2007, 8:73.
22. Anonymous: Anecdotal reports: elderberry extract plus chondroitin and glucosamine sulfate and Thy-mate reduces viral load to non-detectable levels in 10 days. *Posit Health News* 1998, 7-11.