

А.С. Турмагамбетова<sup>1</sup>, П.Г. Алексюк<sup>1</sup>, М.С. Алексюк<sup>1</sup>,  
И.А. Зайцева<sup>1</sup>, Э.С. Омиртаева<sup>1</sup>, Н.С. Соколова<sup>1</sup>,  
А.П. Богоявленский<sup>1</sup>, В.Э. Березин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии, г. Алматы, Казахстан

## ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ СТИМУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВВЕДЕНИИ ВИРУСНЫХ АНТИГЕНОВ В СОЧЕТАНИИ С ТРИТЕРПЕНОВЫМ САПОНИНОМ

---

---

**Аннотация.** Адьюванты – вещества, усиливающие иммунный ответ при введении антигена в организм. Изучение механизмов стимуляции иммунного ответа с использованием адьювантов позволяет не только лучше понять закономерности развития иммунного ответа при попадании в организм антигена, но и имеет большое практическое значение, поскольку является базой для создания более эффективных вакцинных препаратов. В исследовании проведено изучение механизмов стимуляции иммунного ответа очищенным тритерпеновым сапонином из растения *Saponaria officinalis* при введении вирусного антигена. На модели экспрессии отдельных генов, ответственных за развитие воспалительных реакций (IL-1), врожденного (CXCL1, TNF) и адаптивного (IL10) иммунного ответа, показано, что изучаемый тритерпеновый сапонин как адьювант способен стимулировать все три звена иммунного ответа, начиная с воспалительных реакций с последующей стимуляцией, как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа.

**Ключевые слова:** иммунный ответ, экспрессия гена, иммуностимулятор.

• • •

**Түйіндеме.** Адьюванттар организмге антигенді енгізу кезінде иммундық жауапты күшейтетін заттар болып табылады. Адьюванттарды қолданудағы иммунды жауапты ынталандыру механизмін зерттеу, ағзаға антигеннің енгенінде иммунды жауаптың біркелкі дамуын жақсы түсінуін ғана емес, сонымен қатар жақсы әсерлі вакцинды препараттар жасаудағы негізі болғандықтан үлкен практикалық маңызы зор. Бұл зерттеуде біз вирустық антиген енгізілгенде *Saponaria officinalis* өсімдігінен алынған тазартылған

---

Работа выполнена в рамках грантового проекта АР05130957 (0118РК00171) финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

тритерпен сапонинмен иммундық жауаптың ынталандыру механизмдері зерттелінді. Қабыну реакцияларын (IL-1), туа біткен (CXCL1, TNF) және адаптивті (IL10) иммундық жауапты дамытуға жеке гендердің экспрессиялық моделіне тритерпен сапонин адьювант ретінде иммундық жауаптың барлық үш бөлігін ынталандыруға қабілетті екенін көрсетті, қабыну реакциясынан бастап кейіннен туа біткен және адаптивті иммундық жауаптың ынталандыруына дейін.

**Түйінді сөздер:** иммундық жауап, гендердің экспрессиясы, иммунды ынталандырушы.

• • •

**Abstract.** Adjuvants are substances that stimulate the immune response after introduction of an antigen into the organism. Studying the mechanisms of immune response stimulation with the use of adjuvants allows not only to better understand the patterns of development of the immune response upon ingestion of an antigen, but also has great practical importance, since it is the basis for the creation of more effective vaccine preparations. During the study, it was learned the mechanisms of stimulation of the immune response by purified triterpene saponin from the *Saponaria officinalis* plant with the introduction of a viral antigen. On the model of expression of some genes responsible for the development of inflammatory reactions (IL-1), innate (CXCL1, TNF) and adaptive (IL10) immune response, it was shown that the triterpene saponin as an adjuvant can stimulate all three immune response elements, with inflammatory reactions followed by stimulation, both innate and adaptive immune response.

**Ведение.** В настоящее время известно более 500 вирусов, патогенных для человека. По оценкам экспертов ВОЗ вирусные инфекции являются одной из основных причин смертности среди людей и животных, вызывая до 80% инфекционной заболеваемости [1]. Экономический ущерб от вирусных инфекций ежегодно составляет миллиарды долларов.

Репродукция вирусов, как правило, сопровождается поражением различных органов и систем, вызывая независимо от типа вирусной инфекции в организме-хозяине иммунодефицитное состояние с подавлением специфического и неспецифического клеточного и гуморального иммунитета. Иммунодепрессивное влияние вирусных инфекций приводит к хронизации процесса и развитию тяжелых осложнений.

Изучение механизмов вирусиндуцированного иммунитета привело к пониманию того, что это – комплекс сложных взаимодействий, включающий:

- активацию врожденного неспецифического антигена с помощью TLR-рецепторов;

- переработку и представление антигена в иммуногенной форме на поверхности фагоцитирующих клеток;

- кооперативное взаимодействие различных клеточных элементов - собственно фагоцитов (нейтрофилов, моноцитов и макрофагов), CD4<sup>+</sup> Th1-клеток, активирующих фагоциты к внутриклеточному киллингу возбудителя, и CD8<sup>+</sup> цитотоксических

- T-лимфоцитов, убивающих инфицированные фагоциты и другие клеточные элементы;

- распознавание сформированного иммуногена T- и B-клетками посредством их антигенраспознающих рецепторов;

- внутриклеточный синтез и секреция антител и переключение продукции одного класса иммуноглобулинов (IgM) на другой (IgG, IgA).

Результатом перечисленных событий является нейтрализация и уничтожение чужеродного антигена [3,4]. Разработка новых специфических профилактических препаратов против вирусных инфекций идет в направлении минимизации влияния соединений на организм человека или животных [5-8]. Изучение факторов, оказывающих влияние на различные этапы формирования иммунного ответа и активацию тех или иных звеньев иммунной системы, является основой для развития теорий иммунного ответа при инфекционном процессе. Более того, исследования в этой области создают теоретические предпосылки для создания новых более эффективных иммунотерапевтических препаратов. Изучение механизмов стимуляции специфического и общего противовирусного иммунитета биологически активными соединениями растительного происхождения для разработки новых лекарственных средств, способных повышать резистентность организма к вирусным инфекциям – это важный аспект фундаментальных исследований в области вирусологии и иммунологии, позволяющий в конечном итоге повысить эффективность не только иммунотерапии вирусных инфекций, но и их вакцинопрофилактику [8,9]. Ранее было установлено иммуностимулирующее влияние три-терпеновых сапонинов растительного происхождения на гуморальный и клеточный иммунитет при иммунизации антигенами различной природы

(вирусными, микробными, паразитарными [10-13]. Целью представленных исследований являлось изучение механизмов формирования иммунного ответа при иммунизации животных вирусными антигенами в сочетании с тритерпеновым сапонином растительного происхождения.

**Методы исследования.** В работе использовали штамм вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Вирус выращивали в аллантаоисной полости 10-11 дневных куриных эмбрионов. Титр вируса в аллантаоисной жидкости составлял  $10^7$ - $10^9$  ИД<sub>50</sub>/мл. Инфекционный титр вируса определяли титрованием на куриных эмбрионах [14]. Гемагглютинирующую активность вирусов определяли по стандартной методике [14]. Концентрацию белка определяли по методу Bradford [14]. Концентрацию и очистку вируса проводили ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте сахарозы [15].

Тритерпеновый сапонин выделяли из корневища растения *Saponaria officinalis* методом спиртовой экстракции [16]. Качественные биохимические реакции на наличие основных групп биологических веществ проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [17]. В экспериментах использовали белых беспородных мышей массой 15-25 г., обоих полов. Получение вирусных гликопротеидных антигенов проводили согласно описанной ранее методике [18].

Иммунизация животных. 1-мес. белых мышей иммунизировали препаратами вирусных антигенов. Доза антигена составляла 10 мкг/мышь. Иммунизацию животных осуществляли путем внутрибрюшинного введения препаратов. Объем вводимого материала соответствовал рекомендациям международных организаций и не превышал 0,2 мл на одно животное [19]. Контрольной группе животных вводили фосфатно-солевой буферный раствор (плацебо). Перитонеальные макрофаги собирали через 3 сут. после иммунизации методом промывания брюшной полости охлажденной средой 199. Клетки дважды отмывали и ресуспендировали в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в среде культивирования (среда 199).

Суммарную РНК выделяли с помощью набора для экстракции РНК Rneasy Mini Kit («QIAGEN, GmbH», Германия) согласно методическому руководству. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью M-MLV («Promega», США) в 5 мкл реакционной смеси (2,7 мкл пробы, 0,725 мкл воды, 1 мкл 5х буфера для обратной транскриптазы («Promega», США), 0,2 мкл 2 мМ смеси dNTPs, 0,25 мкл 20 ОЕ случай-

ного праймера (9 или 18 нуклеотидов) и 0,125 мкл M-MLV). Реакцию проводили при 37°C в течение 60 мин. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 20 мкл реакционной смеси (4 мкл ДНК матрицы, 8 мкл SybrGreen, по 1 мкл 20 ОЕ прямого и обратного праймеров, вода). 45 циклов ПЦР на термоциклере «PicoReal» проводили при следующих режимах: 94°C – 1 мин., 48°C – 1 мин., 72°C – 3 мин. Пары праймеров подбирали в соответствии с последовательностью исследуемых интерлейкинов (IL-1, IL10) и цитокинов (CXCL1, TNF). Нормализацию экспрессии генов осуществляли с помощью гена актина (таблица 1).

**Таблица 1 - Праймеры, используемые в исследованиях**

Наименование праймеров	Последовательность праймеров (5'-3')	Величина ампликона, п.н.
CXCL1	Gct ggg att cac ctc aag aac (прямой) Agc agt ctgbtct tct ttc tcc (обратный)	196
IL-1	Caа cca аса agt gat att ctc cat g (прямой) Gat cca cac ctc tcc agc tgc a (обратный)	152
IL10	Acc tgg tag aag tga tgc ccc agg ca (прямой) Cta tgc agt tga cta aga tgt caa a (обратный)	448
TNF	Cat ctt ctc aaa att cga gtg аса а (прямой) Tgg gag tag аса agg tac аас cc (обратный)	176
Actin	Aga ggg aaa tcg tgc gtg ac (прямой) Caа tag tga tga cct ggc cgt (обратный)	137

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Microsoft Excel 2010».

**Основные результаты.** Исследования были связаны с изучением влияния препарата тритерпеновой природы на способность стимулировать экспрессию некоторых генов участвующих во всех фазах иммунного ответа.

Первой фазой взаимодействия иммуностимулирующего препарата с иммунной системой является запуск синтеза провоспалительных цитокинов, отвечающих за активацию механизмов ограничения и ликвидации очага повреждения и вызвавших его патогенных факторов, а также репарации повреждённых тканей. Провоспалительные цитокины вызывают воспаление, опосредованное каскадом генных продуктов, которые, как правило, не производятся в здоровом организме. IL-1 является индуктором эндотелиальных молекул адгезии,

которые имеют существенное значение для адгезии лейкоцитов к эндотелиальной поверхности до миграции в ткани и является ярко выраженным провоспалительным цитокином.

Изучена экспрессия гена IL-1 при иммунизации экспериментальных животных очищенными вирусными гликопротеидными антигенами (ГП), очищенным вирусом гриппа и очищенными вирусными ГП в сочетании с тритерпеновым сапонином (рисунок 1). Мышей иммунизировали однократно. Через 3 дня у животных собирали макрофаги и определяли в них уровень экспрессии гена IL-1. Установлено, что уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина повышался при использовании в качестве иммуностимулятора растительного тритерпенового сапонина на 70% по сравнению с уровнем экспрессии данного гена изолированными гликопротеидными антигенами (HA+NA) в форме мицелл и на 10% по сравнению с уровнем экспрессии данного гена очищенными вирусными частицами.

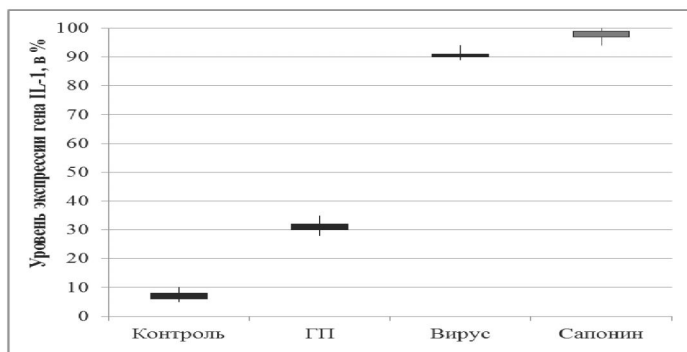


Рисунок 1 - Активность экспрессии гена IL-1, отвечающего за развитие воспалительных реакций в организме

Показано, что активность воспалительного процесса значительно повышается при иммунизации экспериментальных животных тритерпеновыми сапонинами растительного происхождения, тем самым стимулируя следующую фазу иммунного ответа – врожденный иммунитет. В последующих исследованиях было проведено изучение активности экспрессии отдельных генов, отвечающих за развитие врожденного иммунного ответа при иммунизации экспериментальных животных вирусными антигенами в сочетании с тритерпеновым

сапонином в качестве иммуностимулятора. Экспериментальных животных иммунизировали: (1) цельным очищенным вирусом гриппа, (2) мицеллами очищенных гликопротеидных антигенов, (3) очищенными гликопротеидными антигенами в смеси с очищенным сапонином выделенным из растения *S. officinális*. Через 72 ч. после иммунизации у животных собирали макрофаги и определяли в них уровень экспрессии генов отвечающих за развитие врожденного иммунного ответа (TNF и CXCL1). Установлено, что уровень экспрессии генов в значительной мере увеличивался при использовании в качестве иммуностимулятора тритерпенового сапониона растительного происхождения. Уровень экспрессии генов TNF и CXCL1, по сравнению с контролем (плацебо), увеличивался на 74% и 79%, соответственно, при иммунизации экспериментальных животных вирусными антигенами в сочетании с иммуностимулятором сапонином, что было на 20% выше, по сравнению с иммунизацией цельным очищенным вирусом гриппа и на 60% выше, чем при иммунизации изолированными гликопротеидными антигенами (HA+NA) в форме мицелл (рисунок 2).

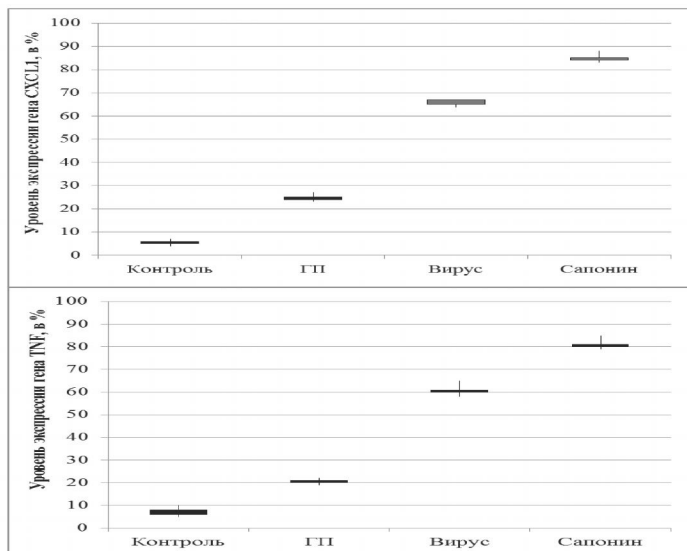


Рисунок 2 - Активность экспрессии генов CXCL1 и TNF, отвечающих за развитие врожденного иммунитета

Таким образом, показано, что активность врожденного иммунного ответа можно значительно повысить путем включения в состав вирусного антигена растительного иммуностимулятора тритерпеновой природы, в данном случае тритерпенового сапонина полученного из растения *Saponaria officinalis*. Стимуляция врожденного иммунитета приводит к активации механизмов следующего этапа иммунного ответа организма, а именно приобретенного иммунитета, который включается только после запуска каскада реакций врожденного иммунитета. После перенесенного инфекционного заболевания или в результате вакцинации возникает приобретенный адаптивный иммунитет, который является наиболее продолжительной иммунной реакцией организма, сохраняющейся иногда на всю жизнь. Таким образом, в иммунитете возникают специфичность ответа на чужеродный антиген и обучаемость, или память – более быстрая и энергичная защитная реакция при повторной встрече с инфекцией. При этом реакции приобретенного иммунитета опираются на предшествующие механизмы врожденного иммунитета.

Для изучения воздействия иммуностимулирующего сапонина на активность адаптивного иммунитета, животных иммунизировали как описано ранее. Через 3 сут. после иммунизации у животных собирали макрофаги и определяли в них уровень экспрессии гена IL10 (рисунок 3).

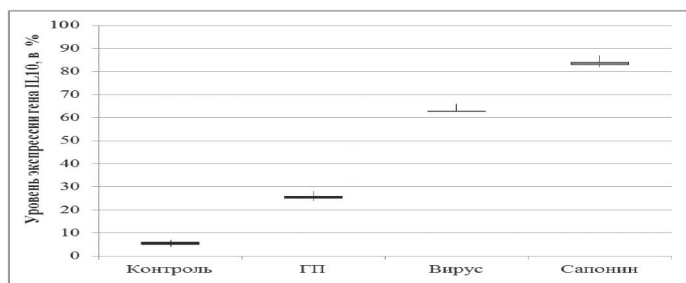


Рисунок 3 - Активность экспрессии гена IL10, отвечающего за развитие адаптивного иммунитета

Показано, что экспрессия гена IL10, отвечающего за реакции адаптивного иммунитета, в значительной степени активизируется при введении в организм вирусных антигенов в смеси с растительным



сапонином. Происходит увеличение активности экспрессии гена IL10 на 78% по сравнению с контролем. При иммунизации вирусными антигенами в форме гликопротеидных мицелл зафиксировано увеличение активности экспрессии гена IL10 на 20% по сравнению с контролем. Иммунизация очищенными вирусными частицами приводила к повышению экспрессии данного гена на 58% по сравнению с контролем.

**Заключение.** По результатам проведенных исследований показано, что тритерпеновый сапонин выделенный из растения *Saponaria officinalis* в качестве иммуностимулятора способен стимулировать все три звена иммунного ответа, начиная с воспалительных реакций и затем активируя, как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ. Механизм иммуностимулирующего действия тритерпеновых сапонинов выделенных из разных видов растений различается. Первый шаг к пониманию механизмов стимуляции различных звеньев иммунного ответа биологически активными соединениями и возможности влиять на запуск тех или иных каскадных механизмов иммунного ответа, заключается в исследовании механизма действия данных соединений поодиночке и в виде композиций. Биологически активные растительные соединения в виде композиции могут проявлять синергистический или антагонистический эффект по отношению друг к другу. Изучение иммуностимулирующих эффектов различных композиций, созданных из разных классов растительных соединений (фенолы, сапонины, флавоноиды и т.д.), создают теоретические предпосылки для создания новых более эффективных иммунотерапевтических и адъювантных препаратов, позволяющих в конечном итоге повышать эффективность иммунотерапии и иммунопрофилактики вирусных инфекций.

### Список литературы

- 1 Nelson K., Williams C. Infection disease epidemiology: theory and practice. – Burlington: Jones and Bartlett Learning, USA, 2014. - 940 p.
- 2 World Health Organization (WHO), World Health Statistics 2011. [Электронный ресурс]: Режим доступа: Available from: [http://www.who.int/whosis/whostat/EN\\_WHS2011\\_TOC.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2011_TOC.pdf).
- 3 Галактионов В.Г. Иммунология. - М.: Изд-во МГУ им. Ломоносова, 1998. - 480 с.

4 Покровский В. И., Гордиенко С. П., Литвинов В. И. Иммунология инфекционного процесса. - М.: Медицина, 1993. - 306 с.

5 Röttingen J.A., Gouglas D., Feinberg M., et al. New Vaccines against Epidemic Infectious Diseases // N Engl J Med. - 2017. - № 376. - P. 610-613.

6 Santosham M., Steele D. Rotavirus Vaccines — A New Hope // N Engl J Med. - 2017. - № 376. - P. 1170-1172.

7 Ji Y., Wang R., Peng Y. et al. Purification, Preliminary characterization, and immunological activity of polysaccharides from crude drugs of Sijunzi Formula // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. - 2017. - Article ID 2170258. - 8 p. - doi:10.1155/2017/2170258.

8 Son Y.O., Kook S.H., Lee J.C. Glycoproteins and Polysaccharides are the Main Class of Active Constituents Required for Lymphocyte Stimulation and Antigen-Specific Immune Response Induction by Traditional Medicinal Herbal Plants // Journal of Medicinal Food. - 2017. - № 20. - P. 1011-1021. - Режим доступа: <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3943>.

9 Wei W., Feng L., Bao W.R. et al. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2016. - № 64. - P. 881-889.

10 Hjertner B., Bengtsson T., Morein B. et al. A novel adjuvant G3 induces both Th1 and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine // Vaccine. - 2018. - № 36. - P. 3340-3344. - doi:10.1016/j.vaccine.2018.04.054.

11 Berezin V.E., Bogoyavlenskiy A.P., Khudiakova S.S. et al. Immunostimulatory complexes containing *Eimeria tenella* antigens and low toxicity plant saponins induce antibody response and provide protection from challenge in broiler chickens // Veterinary Parasitology. - 2010. - № 167. - P. 28-35.

12 Turmagambetova A.S., Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P. et al. Adjuvant activity of saponins from Kazakhstani plants on the immune responses to subunit influenza vaccine [Электронный ресурс]: // Archives of virology. - 2017. - № 162. - P. 3817-3826., Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3560-5>.

13 Bengtsson K.L., Morein B., Osterhaus A.D. ISCOM technology-based Matrix M™ adjuvant: success in future vaccines relies on formulation // Expert Rev Vaccines. - 2011. - № 10. - P. 401-403.

14 Klimov A., Balish A., Veguilla V., et al. Influenza virus titration,

antigenic characterization, and serological methods for antibody detection // *Influenza Virus*. – 2012. – № 865. – P. 25–51.

15 Березин В.Э., Зайдес В.М., Артамонов А.Ф., Исаева Е.С. Солюбилизация гликопротеидов оболочечных вирусов детергентами // *Биохимия*.- 1986.- № 5.- С. 808-815.

16 Бердимуратова Г.Д., Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю. и др. Биологически активные вещества растений: Выделение, разделение, анализ. - Алматы: Атамұра, 2006. – 438 с.

17 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах. - Алматы: Қазақ университеті, 2004. – 288 с.

18 Vitas A.I., Díaz R., Gamazo C. Effect of composition and method of preparation of liposomes on their stability and interaction with murine monocytes infected with *Brucella abortus* // *Antimicrob Agents Chemother*. – 1996. – № 40. – P. 146–151.

19 WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization. - 2011. – 140 p.

**Турмагамбетова А.С.**, доктор философии (PhD), e-mail: aichyck@mail.ru

**Алексюк П.Г.**, кандидат биологических наук, e-mail: alpagen@bk.ru

**Алексюк М.С.**, доктор философии (PhD), e-mail: madina.a06@gmail.com

**Зайцева И.А.**, научный сотрудник, e-mail: z\_irina67@mail.ru

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

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

**Богоявленский А.П.**, доктор биологических наук, профессор, e-mail: anprav\_63@mail.ru

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