

19. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Kulakova S.R., Amirova I.V. Improvement of measures to combat rabies in the Smolensk region. *Veterinariya*. 2011; (4): 24-7. (in Russian)
20. Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characteristics of field isolates of the rabies virus, detected on the territory of the Russian Federation in the period 2008-2011. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(4): 44-9. (in Russian)
21. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Parshikova A.V. Analysis of patterns of epizootic rabies in the European part of the Russian Federation. *Veterinariya i kormlenie*. 2015; (1): 29-34. (in Russian)
22. Shabeykin A.A., Zaykova O.N., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation of rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4-6. (in Russian)
23. Herwijnen R.V., Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Khismatullina V.A., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V. Overview of the epizootic situation of rabies that has developed in the Russian Federation in 2014. *Veterinariya i kormlenie*. 2015; (2): 19-23. (in Russian)
24. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation on rabies for 2015 in the Russian Federation. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016; 56(8): 57-66.
25. Svotina, M.A., Absatirov G.G., Shalmenov M.Sh., Sidorchuk A.A., Gulyukin A.M. Epizootiological characteristics of animal rabies in the West Kazakhstan region. *Biology and Medicine*. 2015; 7(5): 152.
26. Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Polyakova I.V., Metlin A.E. Molecular-genetic characteristics of field isolates of the rabies virus, found in the Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(3): 101-8. (in Russian)
27. Shabeykin A.A., Zaykova O.N., Parshikova A.V., Yuzhakov A.G. Ispol'zovanie GIS-tekhnologii pri otsenke riskov v epizootologicheskom issledovanii. In: «Scientific Perspectives of the XXI Century. Achievements and Prospects of the New Century». *Proceedings of the X International Practical Conference [«Nauchnye perspektivy XXI veka. Dostizheniya i perspektivy novogo stoletiya»]*. Sbornik trudov X Mezhduнародной prakticheskoy konferentsii]. Novosibirsk; 2015: 50-4. (in Russian)
28. Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Khismatullina N.A. Experience in the use of GIS technologies in risk assessment in an epizootic study. In: *Proceedings of the V International Veterinary Congress [Trudy V Mezhduнародного veterinarnogo kongressa]*. Moscow; 2015: 250-2. (in Russian)
29. Gulyukin A.M., Smolyaninov Y.I., Shabeykin A.A. The economic damage caused by Rabies of agricultural animals in Russia. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016; 56(8): 34-8.
30. Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Petrova T.P., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Karimov M.M., et al. The epizootic situation and the fight against rabies in the Kaliningrad region. *Veterinariya*. 2015; (4): 9-13. (in Russian)
31. Makarov, V.V., Sukharev O.I., Gulyukin A.M., Litvinov A.B. Trends in the spread of rabies in Eastern Europe. *Veterinariya*. 2008; (8): 20-2. (in Russian)
32. Khismatullina N.A., Petrova T.P., Gulyukin A.M., Sabirova V.V., Gafarova A.Z., Nasyrov Sh.M., et al. Control of the effectiveness of vaccine prophylaxis for rabies in wild fauna in the Kaliningrad region of the Russian Federation. *Veterinarnyy vrach*. 2012; (6): 8-11. (in Russian)
33. Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Belimenko V.V. Epizootological geoinformation systems. Opportunities and prospects. *Veterinariya*. 2016; (7): 21-4. (in Russian)
34. Belimenko V.V., Gulyukin A.M. Prospects for the use of Geographic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2016; 56(8): 22-5.
35. Belimenko V.V., Gulyukin A.M., Novosad E.V., Shabeikin A.A. Prospects of application of geoinformational systems for veterinary geology. In: *Conference Materials of 7th International Conference on Medical Geology — Medgeo*. Moscow; 2017: 61-2.

Поступила 10.12.17

Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.31:547.918].03:616.921.5+616.98:578.828.6]=092:612.017.1.064

Криворутченко Ю.Л.¹, Носик Д.Н.², Малыгина В.Ю.¹, Лобач О.А.², Андроновская И.Б.¹, Курсанова М.А.¹, Гришковиц В.И.¹

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРИТЕРПЕНОВОГО САПОНИНА ТАУРОЗИДА Sx1 И ЕГО ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ВИЧ-1 И ГРИППОЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ У МЫШЕЙ

¹ Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» Минобрнауки России, 295051, г. Симферополь, Крым;

² Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Тритерпеновый сапонин таурозид Sx1, полученный из листьев плюща крымского *Hedera taurica* Carr. (семейство Araliaceae), был исследован в плане его цитотоксической активности в отношении линий лимфобластоидных клеток MT-4, Jurkat-tat, U937 и моноцитов периферической крови человека. Также была проведена оценка способности сапонина влиять на репликацию ВИЧ-1 *in vitro*. Кроме того, была изучена способность таурозид Sx1 увеличивать выживаемость мышей, зараженных вирусом гриппа A/WSN/1/33(H1N1), и усиливать иммунный ответ животных, иммунизированных коммерческой гриппозной вакциной Гриппол®. Показано, что таурозид Sx1 наполовину подавляет жизнедеятельность клеток линии MT-4 в концентрации 25 мкг/мл, ИК₅₀ 33,3 микроМоль/л (50% ингибирующая концентрация, метилтетразолиевый тест). В концентрации 5 мкг/мл он не проявлял токсических свойств по отношению ко всем исследованным линиям клеток и умеренно ингибировал продукцию р24 ВИЧ в клетках линии Jurkat-tat. В меньших концентрациях таурозид Sx1 также не стимулировал продукцию р24 ВИЧ. Было установлено, что пероральное введение 200 мкг таурозид Sx1 мышам, инфицированным вирусом гриппа, вызывает 1,5-кратное увеличение их выживаемости по сравнению с выживаемостью зараженных мышей в контроле. Пероральное введение сапонина усиливало иммунопотенцирующее действие субъединичной гриппозной вакцины, вводимой внутримышечно. Продукция антител была значительно выше у животных, получавших таурозид Sx1 перорально после первичной или повторной иммунизации. У вакцинированных

Для корреспонденции: Лобач Ольга Александровна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусов иммунодефицита Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, г. Москва. E-mail: victoriola@yandex.ru

мышей, получавших после каждой иммунизации сапонин в дозе 200 мкг в сутки, через 1–3 нед после каждой иммунизации наблюдалось 2–10-кратное усиление выработки вирусспецифических антител к Н1, Н3 и гемагглютинину вируса гриппа типа В. Таким образом, таурозид Sx1 можно рассматривать как малотоксичное иммунопотенцирующее средство, не усиливающее репликацию ВИЧ-1.

Ключевые слова: сапонин; цитотоксичность; вирус гриппа; ВИЧ-1; противовирусный эффект; вакцина; иммунопотенцирование.

Для цитирования: Криворутченко Ю.Л., Носик Д.Н., Малыгина В.Ю., Лобач О.А., Андроновская И.Б., Кирсанова М.А., Гришковец В.И. Цитотоксические свойства тритерпенового сапонина таурозид Sx1 и его воздействие на ВИЧ-1 и гриппозную инфекцию у мышей. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 123-129.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-123-129>

Krivorutchenko Yu.L.¹, Nosik D.N.², Maligna V.Yu.¹, Lobach O.A.², Andronovskaja I.B.¹, Kirsanova M.A.¹, Grishkovets V.I.¹

CYTOTOXIC PROPERTIES OF TRITERPENE SAPONIN TAUROSID Sx1 AND ITS EFFECT ON HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND INFLUENZA VIRUS INFECTION IN MICE

¹Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «V. I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferopol, 295051, Republic of Crimea, Russian Federation;

²D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Triterpene saponin Taurosid Sx1 purified from leaves of the plant Crimean Ivy *Hedera taurica* Carr. (Araliaceae) was evaluated for its cytotoxic activity against lymphoblastoid cell lines MT-4, Jurkat-tat, U937, and human peripheral blood monocytes. The ability of saponin to influence HIV-1 replication was studied as well. In addition, the ability of Taurosid Sx1 to increase survival of mice infected with influenza virus A/WSN/1/33(H1N1) and its capacity for strengthening the immune responses in mice immunized with the influenza vaccine Grippol® have been studied. Taurosid Sx1 has been shown to inhibit MT-4 cell line at 25 µg ml⁻¹ concentration, IC50 33,3 µmol l⁻¹ (MTT assay). The saponin concentration of 5 µg ml⁻¹ was non-toxic for all the cell lines studied and demonstrated a moderate inhibitory effect on HIV p24 production in Jurkat-tat cells. In the lower concentrations Taurosid Sx1 did not stimulate HIV p24 production. It was shown that oral administration of 200 µg Taurosid Sx1 to the influenza virus infected mice caused 1.5–fold increase in their survival. Taurosid Sx1 given orally amplified immunopotentiating ability of an intramuscularly administered subunit influenza vaccine. Antibody production was significantly higher in animals fed Taurosid Sx1 after primary or secondary immunization. In mice given 2 doses of vaccine, from 1 to 3 weeks apart, feeding 200 µg saponin resulted in 2 to 10-fold enhancement in production of anti-H1, anti-H3, and anti-influenza type B hemagglutinin antibodies. Thus, Taurosid Sx1 can be considered as low-toxic promising immunopotentiating agent incapable of enhancing HIV-1 replication.

Key words: saponin; cytotoxicity; influenza virus; HIV-1; antiviral effect; vaccine; immunopotential.

For citation: Krivorutchenko Yu.L., Nosik D.N., Maligna V.Yu., Lobach O.A., Andronovskaja I.B., Kirsanova M.A., Grishkovets V.I. Cytotoxic properties of triterpene saponin taurosid Sx1 and its effect on human immunodeficiency virus and influenza virus infection in mice. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(3): 123-129. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-123-129>

For correspondence: Olga A. Lobach, Cand. Sci. Biol., senior researcher of the laboratory of immunodeficiency viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, FGBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: victoriola@yandex.ru

Information about authors:

Krivorutchenko Yu.L., <http://orcid.org/0000-0003-1380-983X>; Nosik D.N., <http://orcid.org/0000-0001-5757-5671>;
Lobach O.A., <http://orcid.org/0000-0001-9351-6433>; Andronovskaja I.B., <http://orcid.org/0000-0001-9053-1785>;
Kirsanova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-5559-0050>; Grishkovets V.I., <http://orcid.org/0000-0003-2815-2893>

Acknowledgments. We are grateful to Britta Wahren and Jorma Hincula from the Swedish Research Institute for Infectious Disease Control, Stockholm, for their help in conducting and interpreting results of the studies of the saponin Tauroside Sx-1 influence on HIV-1 infection in cell cultures.

The research was partially supported by the Research Development Program of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «V. I. Vernadsky Crimean Federal University» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for 2015-2024, Project “Applicable Academic Mobility Support of the Institution Researchers”.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 31 October 2017
Accepted 12 December 2017

Инфекции, вызываемые вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ) и гриппа, являются глобальной угрозой человечеству из-за проблем вакцинопрофилактики и распространения резистентности возбудителей к противовирусным препаратам. У 10–15% пациентов с впервые выявленной ВИЧ-1-инфекцией обнаруживаются мутации вирусного генома, связанные с устойчивостью к ингибиторам обратной транскриптазы и протеазы [1]. В 2003–2009 гг. началось всемирное распространение амантадинустойчивых вирусов гриппа А(H3N2) и А(H1N1), а с 2007 г. – распространение ви-

русов А(H1N1), резистентных к ингибитору нейраминидазы озельтамиву [2]. Высокая антигенная изменчивость вируса и непротективный характер иммунитета, возникающего при ВИЧ-инфекции, явились основными препятствиями при конструировании анти-ВИЧ-вакцин [3]. Вакцинопрофилактика гриппа, напротив, применяется широко. Однако почти ежегодное возникновение иммунологически изменённых вариантов вирусов и необходимость предсказания структуры новых протективных антигенных детерминант создают трудности при производстве гриппозных вакцин. В итоге за последние

20 лет существенно изменились способы получения антигенов и состав адъювантов для гриппозных вакцин. Были лицензированы новые адъюванты, такие как вирусомы – везикулы с антигенами вирусов, покрытыми фосфолипидной бислоидной мембраной, и адъюванты на основе сквалена, ненасыщенного углеводородного производного витамина А. К последним относятся термообратимая система масло-в-воде, адъюванты MF59 и AS03, состоящие из витамина Е, сквалена и сурфактанта полисорбата 80 [4]. В этот же период в России была разработана конъюгированная гриппозная вакцина Гриппол, содержащая в качестве адъюванта линейный синтетический полиэлектролит полиоксидоний [5].

Проблемы вакцинопрофилактики и устойчивости вирусов к химиопрепаратам стимулировали поиск новых веществ, обладающих противовирусной и иммуномодулирующей активностью. В отношении биологически активных веществ природного происхождения традиционными источниками получения антимикробных и иммуномодулирующих средств являются высшие растения. Экстракты некоторых растений имеют антибактериальные и противовирусные свойства. Так, было показано, что экстракты африканского растения *Combretum adenogonium Steud.* Ex A. Rich (семейство Combretaceae) могут подавлять рост бактерий при минимальной ингибирующей концентрации 0,3–5,0 мг/мл и снижать активность протеазы ВИЧ-1 при 50% ингибирующей концентрации (ИК₅₀) 24,7–26,5 мкг/мл. Эти экстракты содержали флавоноиды, терпеноиды, алкалоиды, танины и сапонины [6]. Сапонины являются амфифильными гликозидами, которые могут создавать комплексы с холестерином и изменять свойства углеводов клеточных мембран. Некоторые сапонины лизируют эритроциты и опухолевые клетки. Их цитотоксичность и антипролиферативное действие изучаются в плане использования для лечения онкологических заболеваний [7]. Сапонины имеют противовоспалительные, антифунгальные и другие свойства, делающие их перспективными объектами для создания лекарств. Отдельные сапонины подавляют репродукцию вирусов. Например, сапонин глицирризин из *Glycyrrhiza glabra* L. подавляет репликацию ВИЧ-1 путём частичного блокирования адсорбции вируса на CD4⁺-клетки [8]. Некоторые сапонины усиливают иммунный ответ на микробные антигены. Так, на основе тритерпеновых сапонинов из мыльного дерева *Quillaja saponaria* Molina созданы иммуностимулирующие комплексы ISCOMs (смесь целевых антигенов, сапонинов, холестерина, фосфолипидов) и ISCOMATRIX, не включающие антигенов. В качестве адъювантов они увеличивают выработку антиген-специфических антител и усиливают Th1-, Th2- и CD8-T-клеточные иммунные ответы. Активным компонентом *Quillaja*-сапонинов является гликозид QS-21. Этот сапонин токсичен, что ограничивает его использование в вакцинах. Однако адъюванты на основе *Quillaja*-сапонинов интенсивно изучаются в процессе клинических испытаний вакцин против гриппа, гепатита С, папилломавирусной и других инфекций [9].

Ранее нами были исследованы некоторые сапонины таурозиды из крымского плюща *Hedera taurica* Carst. Было показано, что таурозиды H₂, St-K и I усиливают образование у мышей антител, специфичных к gp160 и gp120 ВИЧ-1. Вместе с тем таурозиды H₂ и St-K стимулировали репродукцию ВИЧ-1, а таурозид I – её снижал [10]. Другой сапонин таурозид Sx1 подавлял рост грибов рода *Candida* и усиливал устойчивость мышей к кандидозной

инфекции [11]. Это позволило рассматривать таурозид Sx1 как потенциальное антифунгальное средство, однако стимуляция репродукции ВИЧ-1 другими таурозидами поставила вопрос о безвредности таурозида Sx1 при его введении ВИЧ-инфицированным пациентам.

Целью настоящей работы явилось изучение цитотоксических свойств таурозида Sx1, его воздействия на репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток, течение экспериментальной гриппозной инфекции и развитие иммунного ответа при вакцинации мышей вакциной Гриппол.

Материал и методы

Сапонин. Тритерпеновый сапонин таурозид Sx1 с формулой 3-O-a-L рамнопиранозил(1->2)-a-L-арабинопиранозид хедерагина был выделен из крымского плюща *Hedera taurica* Carst. (Araliaceae), как описано ранее [12].

Вакцина Гриппол. Использовали субъединичную вакцину Гриппол (ФДУП НВО «Микроген», Москва), включающую гемагглютинины вируса гриппа A/VR-116 (H1N1), подобного вирусу A/New Caledonia/20/99, и NYMC X-157 (A/New York/55/2004), подобного вирусу A/California/7/2004 (H3N2), а также штамма B/Jiangsu/10/2003, подобного вирусу B/Shanghai/361/2002.

Вирусы. Использовали ВИЧ-1-LAI, полученный в Шведском институте по контролю инфекционных заболеваний (Стокгольм) с исходной инфицирующей дозой 20 ТЦД₅₀. Вирус гриппа A/WSN/1/33 (H1N1), адаптированный к мышам путём серийных пассажей, представлял собой аллантоисную жидкость с концентрацией вируса 200 ЛД₅₀ [13].

Клетки. Использовали лимфобластные клетки линии МТ-4, Jurkat-tat, моноцитарную линию U937 и лимфоциты периферической крови человека (ЛПК). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки коров, 2 мкМ L-глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 МЕ/мл стрептомицина и 10 Е/мл интерлейкина-2 в присутствии сапонина или без него при 37°C в 5% CO₂.

Изучение цитотоксического действия таурозида Sx1 на клетках линии МТ-4. Токсичность сапонина определяли с помощью метилтетразолиевого теста (МТТ-тест). Он позволяет количественно оценить способность оксидоредуктаз митохондрий живых клеток восстанавливать жёлтый 3-[4,5 диметил-2-тиазолил]-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ, «Sigma», США) до пурпурного формазана [14]. В лунки 96-луночных планшетов («Costar», США) вносили по 2,5×10⁴ клеток и добавляли таурозид Sx1 в разных концентрациях. Планшеты инкубировали 3 дня при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем в лунки добавляли по 25 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в фосфатном буферном растворе) и инкубировали еще 3–4 ч. Далее образовавшийся формазан растворяли детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН, «Panreac», Испания): 20% раствор ДСН вносили по 50 мкл в лунки и оставляли на 15–17 ч при 37°C и 5% CO₂. Окрашивание раствора определяли по оптической плотности при длине волны 570 нм на планшетном спектрофотометре Мультикан. Токсичность разных концентраций сапонина выражали в процентах к принятому за 100% контролю интактных клеток.

Определение выживаемости клеток. Выживаемость определяли путём окрашивания клеток красителем трипановым синим. В лунки 96-луночных планшетов вносили по 10⁵ клеток исследуемых линий и добавляли по 50 мкл раствора таурозида Sx1 до конечных концентраций 0,5, 1 и 5 мкг/мл. Клетки инкубировали 3, 7 и 11 дней при

37°C и 5% CO₂, после чего учитывали их выживаемость. Для этого к клеткам добавляли раствор трипанового синего и с помощью камеры Горяева подсчитывали количество живых (неокрашенных) и мёртвых (окрашенных) клеток.

Изучение действия сапонина на ВИЧ-1 в культуре клеток Jurkat-tat. Исследование проводили, как описано ранее [10]. Клетки Jurkat-tat заражали вирусом ВИЧ-1-LAI в дозе 20 ТЦД₅₀/мл. Аликвоты вируса и растворов сапонина по 50 мкл, а также 100 мкл суспензии, содержащей 10⁵ клеток, вносили в лунки одновременно. Сапонин добавляли до конечной концентрации 0,5, 1 и 5 мкг/мл. На 3-й и 7-й дни культивирования жидкость из лунок отбирали для определения концентрации р24 ВИЧ-1 с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). После отбора жидкости на 3-й день в лунки добавляли сапонин для поддержания его постоянной концентрации.

Твердофазный ИФА для определения р24 ВИЧ-1. ИФА проводили, как описано ранее [10]. 96-луночные планшеты сенсibilizировали поликлональными кроличьими анти-р24 ВИЧ-1-антителами. В качестве стандарта белка р24 использовали разведения лизата вируса, откалиброванные по стандартному антигену для ИФА фирмы «DuPont». Пробы вносили в планшеты и инкубировали в течение ночи, затем добавляли моноклональные антитела к р24, меченные пероксидазой хрена. Далее анализ выполняли по стандартной схеме.

Изучение действия таурозидов Sx1 на развитие гриппозной инфекции у мышей. Использовали самцов мышей линии BALB/c 10–12-недельного возраста массой 16–18 г. Их заражали вирусом гриппа А/WSN/1/33 (H1N1) интраназально под эфирным наркозом, как описано ранее [13]. В носовые ходы вводили по 50 мкл разведённой аллантоисной жидкости с содержанием вируса 10 ЛД₅₀. Таурозид Sx1 вводили перорально по терапевтической схеме. Мышей поили водными растворами сапонина дважды в день по 20 мкл/введение в течение 72 ч после заражения. Животные получали сапонин в дозах 20, 200 или 2000 мкг/мышь/сут. Мышам контрольных групп (контроль вируса) после заражения вводили дистиллированную воду. Результаты учитывали в течение 14 дней после заражения по количеству выживших животных.

Изучение влияния таурозидов Sx1 на формирование иммунитета у мышей при вакцинации вакциной Гриппол. Мышей линии BALB/c массой 25–30 г иммунизировали однократно внутримышечным введением 0,1 мл вакцины, разведённой 1:10 изотоническим раствором хлорида натрия. Таурозид Sx1 вводили перорально дважды в день в течение 3 дней после иммунизации по 20 мкл раствора с концентрацией 5 мкг/мл сапонина (200 мкг/мышь/день). Животным контрольной группы перорально вводили дистиллированную воду. Для определения титров антигемагглютининовых антител на 4, 14 и 21-й день у мышей брали кровь из хвостовой вены. Через 4 мес (120-й день после иммунизации) кровь снова забирала для выявления остаточных титров антител и проводили ревакцинацию. Через 5 дней кровь забирала для определения вторичного иммунного ответа. Титры антител определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с формализированными эритроцитами кур, используя следующие диагностические для РТГА: А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Нью-Йорк/55/04 (H3N2), В/Хабаровск/14/05 (Институт им. Пастера, Санкт-Петербург).

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью *t*-теста Стьюдента для непарных выборок, используя программу Microsoft Office Excel 2007. Определяли средние значения и ошибку средних ($M \pm m$). Достоверными считали различия при значениях $p < 0,05$.

Результаты

Цитотоксичность таурозидов Sx1 изучали на клетках линий МТ-4, Jurkat-tat, U937 и ЛПК человека. Действие на клетки МТ-4 сапонина в концентрациях 0,078–50,0 мкг/мл оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки в присутствии сапонина культивировали в течение 3 дней. Результаты изучения действия таурозидов Sx1 на клетки МТ-4 представлены на рис. 1.

Анализ жизнеспособности клеток МТ-4 по оценке активности митохондриальных оксидоредуктаз показал, что в концентрации 6,25 мкг/мл (8,3 мкМ) и менее сапонин нетоксичен. Токсический эффект был выражен при концентрации таурозидов Sx1 25 мкг/мл (33,3 микроМоль/л). Число клеток, сохранивших жизнеспособность в присутствии 25 мкг/мл таурозидов Sx1 (43,0 ± 0,9%), было достоверно ниже числа клеток, выживших при промежуточной концентрации сапонина 12,5 мкг/мл (73,6 ± 2,7%; $p < 0,01$). Поскольку добавление 25 мкг/мл таурозидов Sx1 приводило к подавлению жизнеспособности 57% клеток, было решено считать, что ИК₅₀ таурозидов Sx1 для клеток МТ-4 составляет 33,3 микроМоль/л. Отсутствие токсичности у таурозидов Sx1 в концентрациях ниже 6 мкг/мл было подтверждено при определении выживаемости клеток линий Jurkat-tat и U937, а также ЛПК с помощью окрашивания трипановым синим. При добавлении к этим клеткам сапонина в концентрациях 0,5, 1 и 5 мкг/мл количества выживших клеток в опыте и контроле не различались. Результаты оценки жизнеспособности клеток разных типов при инкубации в присутствии 5 мкг/мл таурозидов Sx1 приведены в табл. 1.

С помощью ИФА было изучено влияние таурозидов Sx1 в концентрациях 0,5–5,0 мкг/мл на продукцию заражёнными клетками Jurkat-tat белка р24 ВИЧ-1. На 3-й день наблюдения изменений в продукции р24 ВИЧ-1 не происходило, однако, к 7-му дню добавление к клеткам 5 мкг/мл таурозидов Sx1 снижало выработку р24 ВИЧ-1 на 35% ($p < 0,01$). В меньших концентрациях сапонин такого эффекта не давал (табл. 2).

Итак, в нецитотоксической концентрации 5 мкг/мл таурозид Sx1 снижал выработку вирусного белка, но не мог блокировать репликацию ВИЧ-1 полностью.

Влияние таурозидов Sx1 на вирусную инфекцию на изменённом уровне изучали на модели гриппа. Мышей BALB/c интраназально заражали вирусом А/WSN/1/33 (H1N1). Затем в течение 3 сут перорально вводили са-

Таблица 1

Влияние таурозидов Sx1 в концентрации 5 мкг/мл на выживаемость ЛПК, клеток линий Jurkat-tat и U937

Тип клеток	Концентрация жизнеспособных клеток, млн/мл					
	3-й день		7-й день		11-й день	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Jurkat-tat	0,50	0,54	1,3	1,8	1,27	1,39
U937	0,28	0,21	0,38	0,41	0,42	0,49
ЛПК	0,18	0,15	0,83	0,63	1,29	1,25

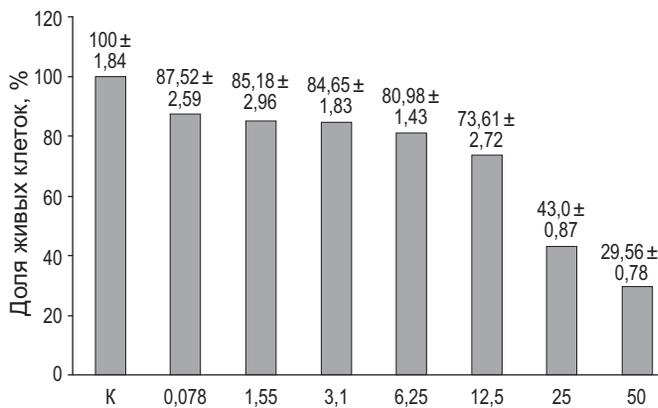


Рис. 1. Влияние сапонина таурозида Sx1 на жизнеспособность клеток линии МТ-4, определяемую по активности дегидрогеназ митохондрий (МТТ-тест). Различия уровней жизнеспособности клеток при концентрациях сапонина 12,5 и 25,0 мкг/мл достоверны ($p < 0,01$).

По оси ординат – выживаемость клеток (в %) по отношению к контролю (К).

понин по 20–2000 мкг/сут. Результаты оценивали по выживаемости животных в течение 14 сут (рис. 2).

Как показано на рис. 2, к 7-му дню наблюдений введение таурозида Sx1 не приводило к значимым изменениям выживаемости животных по сравнению с контролем. Однако к 14-му дню в дозе 200 мкг/мышь/сут таурозид Sx1 проявлял протективный эффект – в 1,5 раза снижал долю погибших мышей ($55,0 \pm 7,6\%$) по сравнению с контролем ($84,2 \pm 6,5\%$; $p = 0,031$). В дозе 2000 мкг/мышь/сут сапонин такого действия не оказывал (на рис. 2 не показано).

Наличие у таурозида Sx1 протективного эффекта при экспериментальном гриппе явилось основанием для изучения его влияния на формирование иммунного ответа у мышей при иммунизации субъединичной вакциной Гриппол. Для оценки этого влияния одновременно с внутримышечной инъекцией вакцины мышам перорально вводили сапонин в дозе 200 мкг/день. Сапонин вводили в течение 3 дней после иммунизации. Ревакцинацию проводили на 120-й день эксперимента. Динамика изменений титров антигемагглютининовых антител, специфически реагирующих в РТГА с входящими в состав вакцины гликопротеинами вирусов гриппа, приведена на рис. 3.

Введение таурозида Sx1 к 21-му дню иммунизации приводило к достоверному 4–7-кратному увеличению выработки антител, специфичных ко всем типам гемагглютининов, 10-кратное повышение титров анти-

Н1-антител наблюдалось на 14-й день ($p < 0,05$) и 2,5-кратное повышение титров антител к гемагглютинуину вируса типа В – на 4-й день после первичной иммунизации ($p < 0,05$). К 120-му дню после вакцинации уровни антител в опытных и контрольных группах мышей сравнялись. Введение сапонина на 120-й день при ревакцинации приводило к существенному усилению накопления анти-Н1- и анти-Н3-антител на 5-й день после ревакцинации соответственно в 3,2 и 2,8 раза по сравнению с контролем. Стимуляции вторичного иммунного ответа к гемагглютинуину вируса гриппа В не наблюдалось.

Обсуждение

Для оценки цитотоксических свойств растительных экстрактов и сапонинов широко используется МТТ-тест [7]. С его помощью было определено, что для лимфобластоидных клеток МТ-4 ИК₅₀ таурозида Sx1 является концентрация 25 мкг/мл, или 33,3 микроМоль/л. В дозах 6,25 мкг/мл (8,3 микроМоль/л) и менее этот сапонин токсического действия не оказывал. Изучение выживаемости клеток с помощью окрашивания трипановым синим показало, что таурозид Sx1 в концентрациях 5 мкг/мл и ниже также нетоксичен для клеток линий Jurkat-tat, U937 и ЛПК человека. Оказалось, что цитотоксические концентрации таурозида Sx1 из *Hedera taurica* Cav. (Araliaceae) близки соответствующим концентрациям тритерпеновых сапонинов из таких растений, как *Albizia procera* (Fabaceae/Mimosoideae), *Albizia julibrissin* Durazz. (Fabaceae/Mimosoideae) и *Lysimachia thysiflora* L. (Myrsinaceae/Primulaceae). Сапонины из этих растений проявляли цитотоксические и антипролиферативные свойства в отношении трансформированных и нормальных клеток в концентрациях 9,13 мкг/мл (50% снижение выживаемости фарингеальных раковых клеток линии HEPG2), 10 мкг/мл (ингибирование 80,8% фарингеальных раковых клеток линии Bel-7402) и 25 мкг/мл (подавление выживаемости 50,1% клеток меланомы линии НТВ-140 и 68,3% клеток нормальных фибробластов линии HSF) соответственно [15, 16].

Ранее было показано, что другие тритерпеновые сапонины из крымского плюща по-разному влияют на репродукцию ВИЧ-1 в культурах клеток: таурозид Н₁ и таурозид St-K стимулировали продукцию белков ВИЧ-1, а таурозид I – её снижал [10]. В настоящем исследовании установлено, что таурозид Sx1 в концентрации 5 мкг/мл на 1/3 снижает выработку р24 ВИЧ-1, а в меньших концентрациях не влияет на продукцию вирусного белка. Это позволяет отнести таурозид Sx1 к сапонинам, не стимулирующим репродукцию ВИЧ-1. Было продемонстрировано, что таурозид Sx1 оказывает выраженное фунгицидное действие на грибы рода *Candida*, вызывающие микозы у больных СПИДом [11]. Полученные в настоящей работе результаты указывают на то, что введение таурозида Sx1 в качестве антифунгального средства не представляет угрозы для ВИЧ-инфицированных пациентов. Неспособность таурозида Sx1 активировать ВИЧ-1 представляет интерес в плане безопасности его возможного введения как в терапевтических, так и в профилактических целях. Это тем более важно, что некоторые вещества, способные усиливать иммунный ответ и рассматриваемые сегодня как потенциальные адъюванты для вакцин, стимулируют репликацию ВИЧ-1. К ним, в частности, относятся не только определённые сапонины, но также мурамилдипептид (МДП) и многие химические производные МДП [17].

Таблица 2.

Производство белка р24 ВИЧ в культуре инфицированных клеток Jurkat-tat в присутствии сапонина таурозида Sx1

Концентрация сапонина, мкг/мл	Концентрация белка р24 ВИЧ-1, нг/мл	
	3-й день наблюдений	7-й день наблюдений
Контроль	3,17 ± 0,25	14,76 ± 0,37
5,0	3,49 ± 0,11	9,54 ± 0,95*
1,0	3,29 ± 0,19	10,28 ± 1,84
0,5	3,35 ± 0,32	12,57 ± 0,42

Примечание. * - разница между контролем и опытом достоверна ($p < 0,01$).

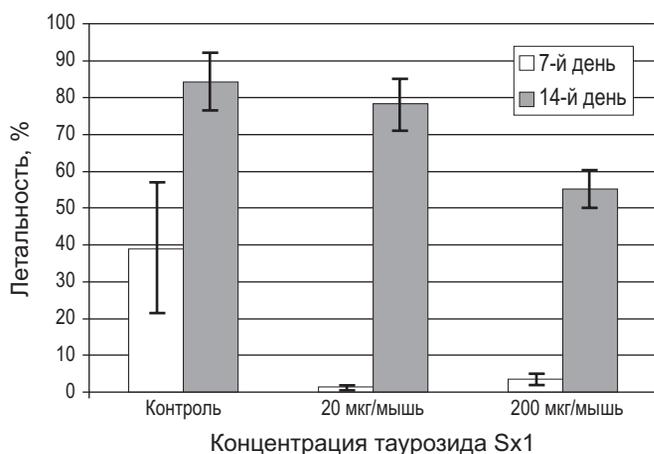


Рис. 2. Влияние перорального терапевтического введения таурозида Sx1 на динамику гибели мышей, инфицированных вирусом гриппа А/WSN/1/33 (H1N1).

У животных, получавших сапонин в дозе 200 мкг/мышь, на 14-й день летальность была достоверно ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе заражённых мышей (сапонин не вводили). По оси абсцисс – дозы таурозида Sx1, вводившегося заражённым животным в опытных группах; в контроле сапонин мышам не вводили.

В работе показано, что таурозид Sx1 усиливает резистентность мышей BALB/c к инфекции, вызванной вирусом гриппа А(H1N1). Пероральное терапевтическое введение таурозида Sx1 в дозе 200 мкг/мышь/сут в 1,5 раза увеличивало выживаемость заражённых животных. Протективный эффект таурозида Sx1 был подобен иммунопотенцирующему действию сапонина из *Quillaja saponaria*. Так, сообщалось, что пероральное введение мышам 10 мг *Quillaja*-сапонина в комбинации с внутрибрюшинным введением антирабической вакцины увеличивало выживаемость заражённых вирусом бешенства животных до 90–100% по сравнению с мышами, которых иммунизировали вакциной без сапонина (выживаемость 25%) или вовсе не иммунизировали (выживаемость 0%). Авторы связывали эффект комбинированного введения сапонина и вакцины с усилением выработки противовирусных антител [18].

Ранее было установлено, что введение мышам тритерпеновых сапонинов таурозидов I и St-K при иммунизации животных экспериментальной вакциной на основе gpr160 ВИЧ-1 усиливает выработку антител, специфичных к gpr120 и gpr160 [10]. Наличие у таурозида Sx1 протективного действия при экспериментальном гриппе, адъювантных свойств у таурозидов I и St-K и данные об иммунопотенцирующем действии *Quillaja*-сапонина при бешенстве у вакцинированных мышей явились основанием для изучения в рамках данной работы влияния таурозида Sx1 на формирование иммунного ответа у мышей, иммунизированных вакциной Гриппол. Было установлено, что пероральное введение таурозида Sx1 в дозе 200 мкг/мышь/день после внутримышечной иммунизации и реиммунизации вакциной Гриппол стимулирует продукцию антител, специфичных ко всем типам гемагглютининов вирусом гриппа, представленных в вакцине. Наиболее сильно эффект проявлялся усилением выработки анти-N1-антител (10-кратное повышение титров на 14-й день, 4-кратное на 21-й день после первичной иммунизации и 3,2-кратное повышение титров после реиммунизации). Наименее выраженным было

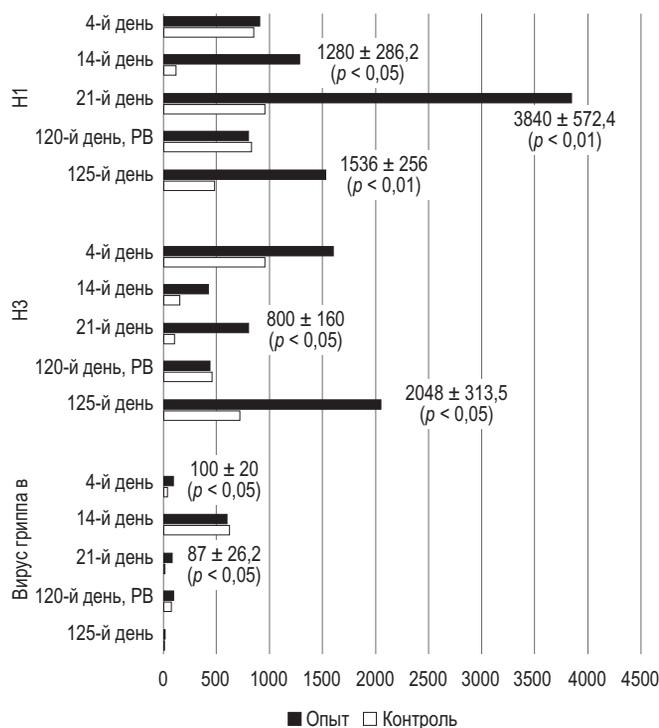


Рис. 3. Влияние таурозида Sx1 на динамику изменений титров антител, специфичных к гемагглютинаинам вирусов гриппа H1, H3 и вируса типа В, у мышей, внутримышечно иммунизированных вакциной Гриппол, при пероральном введении сапонина в дозе 200 мкг/день (опыт) после вакцинации и ревакцинации (РВ).

По оси ординат – типы вирусных гемагглютининов, к которым были специфичны исследуемые антитела, и сроки наблюдения. По оси абсцисс – обратные титры антигемагглютининовых антител; цифрами у столбцов обозначены обратные титры антител в опытной группе, достоверно превышающие ($p < 0,05$) значения титров в контроле (сапонин не вводили).

усиление выработки антител к гемагглютинуину вируса типа В (2-кратное повышение титров на 4-й день и 4,4-кратное на 21-й день после первичной иммунизации, отсутствие эффекта после реиммунизации). Таким образом, таурозид Sx1 можно рассматривать как потенциальный иммуномодулятор, усиливающий протективный иммунный ответ как в условиях гриппозной инфекции, так и при иммунизации гриппозной вакциной.

Выводы

1. Цитотоксической концентрацией тритерпенового сапонина таурозида Sx1 из *Hedera taurica* Carr. (Araliaceae), подавляющей жизнеспособность клеток лимфобластной линии МТ-4 на 57% (ИК₅₀), является концентрация 25 мкг/мл (33,3 мкМ). В концентрации 5 мкг/мл и менее сапонин нетоксичен для трансформированных клеток линий МТ-4, Jurkat-tat, U937 и ЛПК человека.

2. Таурозид Sx1 в концентрации 5 мкг/мл на 35% снижает продукцию белка р24 ВИЧ-1 в клетках Jurkat-tat и не стимулирует репродукцию вируса в меньших дозах, что свидетельствует о потенциальной безопасности введения сапонина таурозида Sx1 ВИЧ-инфицированным лицам.

3. Пероральное введение таурозида Sx1 в дозе 200 мкг/день в 1,5 раза увеличивает выживаемость заражённых гриппом мышей и усиливает иммунный ответ на вну-

тримышечное введение вакцины Гриппол, увеличивая выработку антигемагглютининовых антител различной специфичности в 2–10 раз.

Благодарность. Авторы благодарят Бритту Вахрен и Йорму Хинкула, сотрудников Шведского института по контролю за инфекционными заболеваниями, за помощь в проведении и интерпретации результатов исследования действия сапонина таурозиды Sx1 на инфекцию ВИЧ-1 в культуре клеток.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Программы развития ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» на 2015–2024 гг. по проекту «Поддержка академической мобильности работников университета на заявительной основе».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-4, 6-10, 14-16, 18 см. REFERENCES)

- Салтыкова Т.С., Романенко В.В., Минаев О.В. Эпидемиологическая и экономическая эффективность иммунизации взрослого работоспособного населения вакциной «Гриппол® плюс». *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2015; (5): 65-71.
- Криворутченко Ю.Л., Кирсанова М.А., Андроновская И.Б. Антифунгальное действие тритерпенового сапонина таурозиды Sx1 из *Hedera taurica* Carr. в отношении клинических изолятов *Candida* spp. *Проблемы медицинской микологии.* 2015; 17(3): 42-5.
- Гришковец В.И., Толкачёва Н.В., Шашкова А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды из *Hedera taurica*. 10. Структура соединений F4, I и J из листьев крымского плюща. *Химия природных соединений.* 1992; (6): 683-6.
- Малыгина В.Ю., Андроновская И.Б., Криворутченко Ю.Л., Гришковец В.И. Зависимость протективного действия таурозиды Sx1 от доз, способа и схем введения сапонина при экспериментальном гриппе у мышей. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2012; 2(1-2): 98-102.
- Криворутченко Ю.Л., Андроновская И.Б., Чирва В.Я., Пертель С.С., Гришковец В.И., Земляков А.Е. и др. Влияние сапонинов из *Hedera taurica* Carr. и модифицированных мурамилпептидов на репродукцию вируса иммунодефицита человека *in vitro*. *Вопросы вирусологии.* 1997; 42(1): 34-6.
- Pingen M., Nijhuis M., de Bruijn J.A., Boucher C.A., Wensing A.M. Evolutionary pathways of transmitted drug-resistant HIV-1. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66(7): 1467-80.
- Hayden F.G., de Jong M.D. Emerging influenza antiviral resistance threats. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(1): 6-10.
- Cohen Y.Z., Dolin R. Novel HIV vaccine strategies: overview and perspective. *Ther. Adv. Vaccines.* 2013; 1(3): 99-112.
- Di Pasquale A., Preiss S., Da Silva F.T., Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel).* 2015; 3(2): 320-43.
- Saltykova T.S., Romanenko V.V., Minaev O.V. Epidemiological and economic efficiencies of immunization with the commercial influenza vaccine Grippol® plus in the able-bodied adult population. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2015; (5): 65-71. (in Russian)
- Mushi N.V., Mbwambo Z.H., Innocent E., Tewtrakul S. Antibacterial, anti-HIV-1 protease and cytotoxic activities of aqueous ethanolic extracts from *Combretum adenogonium* Steud. Ex A. Rich (Combretaceae). *BMC Complement. Altern. Med.* 2012; 12(1): 163.
- Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem. Rev.* 2010; 9(3): 425-74.
- Huang L., Chen C.H. Molecular targets of anti-HIV-1 triterpenes. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2002; 2(1): 33-6.
- Lee S., Nguyen M.T. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw.* 2015; 15(2): 51-7.
- Krivorutchenko Y.L., Andronovskaya I.B., Hinkula J., Krivoshein Y.S., Ljungdahl-Stahle E., Pertel S.S., et al. Study of the adjuvant activity of new MDP derivatives and purified saponins and their influence on HIV-1 replication *in vitro*. *Vaccine.* 1997; 15(12-13): 1479-86.
- Krivorutchenko Yu.L., Kirsanova M.A., Andronovskaya I.B. Antifungal action of triterpenoid saponin Sx1 from *Hedera taurica* Carr. against clinical isolates of *Candida* spp. *Problemy meditsinskoy mikologii.* 2015; 17(3): 42-5. (in Russian)
- Grishkovets V.I., Tolkacheva N.V., Shashkova A.S., Chirva V.Ya. Triterpene glycosides of *Hedera taurica*. X. The structure of the compounds F4, I and J from Crimean Ivy leaves. *Khimiya prirodnikh soedineniy.* 1992; (6): 683-6. (in Russian)
- Malygina V.Yu., Andronovskaya I.B., Krivorutchenko Yu.L., Grishkovets V.I. Dependence of taurosides Sx1 protective activity on the doses, ways and schemes of the saponin administration in experimental influenza virus infection of mice. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny.* 2012; 2(1-2): 98-102. (in Russian)
- Niks M., Otto M. Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods.* 1990; 130(1): 149-51.
- Melek F.R., Miyase T., Ghaly N.S., Nabil M. Triterpenoid saponins with N-acetyl sugar from bark of *Albizia procera*. *Phytochemistry.* 2007; 68(9): 1261-6.
- Galanty A., Michalik M., Sedek L., Podolak I. The influence of LTS-4, a saponoside from *Lysimachia thyriflora* L., on human skin fibroblasts and human melanoma cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2008; 13(4): 585-98.
- Krivorutchenko Yu.L., Andronovskaya I.B., Chirva V.Ya., Pertel S.S., Grishkovets V.I., Zemlyakov A.E., et al. Effects of saponins derived from *Hedera taurica* Carr. and modified muramylpeptides on the *in vitro* reproduction of human immunodeficiency virus. *Voprosy virusologii.* 1997; 42(1): 34-6. (in Russian)
- Chavali S.R., Barton L.D., Campbell J.B. Immunopotentiality by orally-administered *Quillaja* saponins: effects in mice vaccinated intraperitoneally against rabies. *J. Clin. Exp. Immunol.* 1988; 74(3): 339-43.

Поступила 31.10.17

Принята в печать 12.12.17