

DOI: 10.31082/1728-452X-2020-211-212-1-2-47-54

УДК 571.27:578.72:578.74

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИТНЫХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ TH1 КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Айжан С. ТУРМАГАМБЕТОВА, <https://orcid.org/0000-0002-7878-6133>,Андрей П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, <http://orcid.org/0000-0001-9579-2298>,Павел Г. АЛЕКСЮК, <https://orcid.org/0000-0003-3638-3341>,Мадина С. АЛЕКСЮК, <https://orcid.org/0000-0003-3479-4438>,Владимир Э. БЕРЕЗИН, <https://orcid.org/0000-0002-2220-5758>

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, Республика Казахстан



Турмагамбетова А.С.

Высокая изменчивость вируса гриппа приводит к его быстрой адаптации к лекарственным средствам и вакцинным препаратам, что требует изменения стратегии и тактики борьбы с гриппозной инфекцией. Для создания более эффективных средств профилактики и терапии гриппа требуется более глубокое понимание природы врожденного и адаптивного иммунитета при гриппозной инфекции.

Целью работы являлось изучение изменения уровней основных маркеров специфического Th1 противовирусного иммунитета при введении в организм комбинированного иммуностимулятора на основе биологически активных соединений растительного происхождения.

Материал и методы. Композитные иммуностимуляторы составляли из очищенного пентациклического тритерпеноида растительного происхождения бетулина с очищенными метоксифлавоноидами: нобилетин, гесперидин и гликозид изорамнетина. Определение уровня экспрессии исследуемых генов проводили методом ПЦР. В качестве маркеров Th1 иммунного ответа были выбраны гены IL-1, IL-2, Ccr5.

Результаты и обсуждение. Показано, что иммуностимулирующие композиции на основе сочетания бетулина с метоксифлавоноидами (гликозид изорамнетина, гесперидин и нобилетин) позволяют в значительной степени стимулировать экспрессию отдельных генов Th1 клеточной стадии иммунного ответа. Наибольшая активность стимуляции экспрессии выбранных генов-маркеров установлена для гена IL-2 (11-кратное увеличение активности), наименьшая - для гена хемокина Ccr5 (2,2-кратное повышение активности экспрессии).

Вывод. Полученные результаты показывают, что иммуностимулирующие композиции на основе сочетания очищенного тритерпенового гликозида бетулина с очищенными метоксифлавоноидами могут существенно влиять на структуру специфического иммунного ответа, что имеет большое значение для создания новых профилактических и терапевтических противовирусных препаратов.

Ключевые слова: бетулин, изорамнетин, нобилетин, гесперидин, адаптивный иммунитет, Th1 иммунитет, экспрессия генов.

Для цитирования: Турмагамбетова А.С., Богоявленский А.П., Алексюк П.Г., Алексюк М.С., Березин В.Э. Влияние комбинированных иммуностимулирующих препаратов растительного происхождения на экспрессию некоторых генов Th1 клеточного иммунного ответа // Медицина (Алматы). – 2020. - №1-2 (211-212). - С. 47-54. DOI: 10.31082/1728-452X-2020-211-212-1-2-47-54

Т Ы Ж Ы Р Ы М

ӨСІМДІК ТЕКТІ ОҚШАУЛАНҒАН ИММУНДЫ ҮНТАЛАНДЫРУШЫ ПРЕПАРАТТАРДЫҢ TH1 ЖАСУШАЛЫҚ ИММУНДЫ ЖАУАП БЕРУШІНІҢ КЕЙБІР ГЕНДЕРІНІҢ ЭКСПРЕССИЯСЫНА ӨСЕРІ

Айжан С. ТҰРМАҒАМБЕТОВА, <https://orcid.org/0000-0002-7878-6133>,Андрей П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, <http://orcid.org/0000-0001-9579-2298>,Павел Г. АЛЕКСЮК, <https://orcid.org/0000-0003-3638-3341>,Мадина С. АЛЕКСЮК, <https://orcid.org/0000-0003-3479-4438>,Владимир Э. БЕРЕЗИН, <https://orcid.org/0000-0002-2220-5758>«Микробиология және вирусология ғылыми өндірістік орталығы» ЖШС,
Алматы қ., Қазақстан Республикасы

Тұмау вирусының жоғары өзгергіштігі оның дәрі-дәрмектер мен вакциналарға тез бейімделуіне әкеледі, бұл тұмау инфекциясымен күресу стратегиясы мен тактикасын өзгертуді талап етеді. Тұмаудың алдын алу және емдеудің тиімдірек құралдарын құру үшін тұмау инфекциясы кезіндегі туа біткен және бейімделгіш иммунитет сипатын тереңірек түсіну қажет.

Контакты: Турмагамбетова Айжан Сабиржановна, PhD, внс лаборатории противовирусной защиты, ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы, e-mail: aichyck@mail.ru

Contacts: Aizhan S Turmagambetova, PhD, Leading Researcher of Laboratory of Antiviral Protection, LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Almaty, e-mail: aichyck@mail.ru

Поступила: 14 04 2020

Рецензент: Наровлянский Александр Наумович, доктор биологических наук, руководитель отдела, ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва, e-mail: narovl@yandex.ru

Жұмыстың мақсаты өсімдік текті биологиялық белсенді қосылыстар негізінде біріктірілген иммунды ынталандырғышты ағзаға енгізу арқылы нақты Th1 вирусқа қарсы иммунитеттің негізгі маркерлерінің деңгейіндегі өзгерістерді зерттеу.

Материал және әдістері. Оқшауланған иммунды ынталандырушыларды тазартылған метоксифлавоноидтары бар пентациклді тритерпенді бетулиннен құрады: нобилетин, гесперидин және изорамнет гликозиді. Зерттелген гендердің экспрессия деңгейі ПТР әдісі арқылы анықталды. Th1 иммундық реакциясының маркері ретінде IL-1, IL-2 және Ccr5 гендері таңдалды.

Нәтижелері және талқылауы. Метоксифлавоноидтарымен (изорамнетин гликозиді, гесперидин және нобилетин) бетулиннің тіркесіміне негізделген иммунды ынталандырушы композициялар иммундық жауаптың жасушалық сатысында жеке Th1 генінің көрінісін едәуір ынталандыратыны көрсетілді. Таңдалған гендердің экспрессиясын ынталандырудың ең жоғары белсенділігі IL-2 генінде (белсенділіктің 11 есе артуы), ең төмені - Ccr5 химокиндік ген үшін (экспресс белсенділігінің 2,2 есе артуы) байқалды.

Қорытынды. Алынған нәтижелер тазартылған тритерпен бетулин гликозидінің метоксифлавоноидтарымен үйлесуіне негізделген иммунды ынталандырушы композициялар нақты иммундық жауаптың құрылымына айтарлықтай әсер етуі мүмкін, яғни жаңа алдын-алу және емдік вирусқа қарсы препараттарды жасауда үлкен маңызы барын көрсетті.

Негізгі сөздер: бетулин, изорамнетин, нобилетин, гесперидин, бейімделу иммунитеті, Th1 иммунитеті, ген экспрессиясы.

SUMMARY

EFFECT OF THE COMPOSITE IMMUNOSTIMULANTS OF PLANT ORIGIN ON THE EXPRESSION OF SOME TH1 CELL IMMUNE RESPONSE GENES

Aizhan S TURMAGAMBETOVA, <https://orcid.org/0000-0002-7878-6133>,
 Andrey P BOGOYAVLENSKIY, <http://orcid.org/0000-0001-9579-2298>,
 Pavel G ALEXYUK, <https://orcid.org/0000-0003-3638-3341>,
 Madina S ALEXYUK, <https://orcid.org/0000-0003-3479-4438>,
 Vladimir E BEREZIN, <https://orcid.org/0000-0002-2220-5758>

Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Republic of Kazakhstan

The high variability of the influenza virus leads to its rapid adaptation to drugs and vaccines, which requires a change in the strategy and tactics against influenza infection. A deeper understanding of the nature of innate and adaptive immunity for influenza infection is required to create more effective means of influenza preventing and treating.

The aim of the work was to study the changes in the levels of the main markers of specific Th1 antiviral immunity after introduction of a composite immunostimulant based on biologically active compounds of plant origin.

Material and methods. Composite immunostimulants were mixed of purified pentacyclic triterpenoid betulin with purified methoxy flavonoids: nobiletin, hesperidin and isorhamnetin glycoside of plant origin. The expression level of the studied genes was determined by PCR. The genes IL-1, IL-2, and Ccr5 were chosen as markers of the Th1 immune response.

Results and discussion. It was shown that immunostimulants compositions based on a combination of betulin with methoxy flavonoids (isorhamnetin glycoside, hesperidin and nobiletin) can significantly stimulate the expression of studied genes of Th1 cellular stage of the immune response. The highest activity of stimulating in expression of selected marker genes was found for the IL-2 gene (11-fold increase in expression activity), the smallest for the Ccr5 chemokine gene (2.2-fold increase in expression activity).

Conclusions. The results show that immunostimulants compositions based on the combination of purified triterpene betulin glycoside with purified methoxy flavonoids can significantly effect on the structure of a specific immune response, which is of great importance for the creation of new preventive and therapeutic antiviral preparations.

Keywords: betulin, isorhamnetin, nobiletin, hesperidin, adaptive immunity, Th1 immunity, genes expression.

For reference: Turmagambetova AS, Bogoyavlenskiy AP, Alexyuk PG, Alexyuk MS, Berezin VE. Effect of the composite immunostimulants of plant origin on the expression of some Th1 cell immune response genes. *Meditsina (Almaty) = Medicine (Almaty)*. 2020;1-2(211-212):47-54. (In Russ.). DOI: 10.31082/1728-452X-2020-211-212-1-2-47-54

Иммунный ответ – это комплексный процесс, включающий переработку и представление антигена в иммуногенной форме на поверхности фагоцитирующих клеток, мобилизацию врожденного иммунитета, развитие специфического иммунного ответа и деструкцию чужеродного антигена [1].

Первая линия защиты должна обеспечивать элиминацию патогена. Однако это происходит не всегда. В таких случаях запускается вторая линия защиты, связанная с развитием адаптивного иммунного ответа, включающего индуктивную и продуктивную (эффекторную) фазы. Индуктивная фаза состоит в формировании исполнительных

механизмов адаптивного иммунитета и реализуется в первые 7 суток после появления патогена в организме. В этот период основную роль в иммунной защите играет врожденный иммунитет. По мере развития эффекторных механизмов адаптивного иммунитета они берут на себя основную нагрузку в защите организма. Одновременно с активацией факторов врожденного иммунитета происходит событие, иллюстрирующее связь между врожденным и адаптивным иммунитетом [2].

Дендритные клетки, как и макрофаги, присутствующие в барьерных тканях, поглощают патогены или их фрагменты и транспортируют их в региональный лимфатический узел. В процессе перемещения в гранулах данных клеток происходит расщепление поглощенных антигенов на фрагменты, взаимодействующие с молекулами МНС-II, и транспорт образовавшихся комплексов на клеточную поверхность. Это необходимо для запуска адаптивного иммунитета, поскольку Т-лимфоциты способны распознавать антиген только в комплексе с молекулой МНС. Таким образом, дендритная клетка вовлекает в реакцию Т-лимфоциты, ответственные за запуск других клеток адаптивного иммунитета [3].

В лимфатических узлах происходит взаимодействие дендритных клеток с Т-лимфоцитами, распознающими антигенные пептиды в составе молекул МНС на мембране дендритной клетки. Это взаимодействие облегчается локализацией дендритных клеток и Т-лимфоцитов в одной и той же зоне лимфатического узла (Т-зоне), обусловленной влиянием одних и тех же хемотаксических сигналов. Дендритные клетки проникают в Т-зоны лимфоидным, а рециркулирующие Т-лимфоциты - гематогенным путем. TCR распознает антигенный пептид в составе молекул МНС с участием корецепторов CD4 (Т-хелперы) и CD8 (цитотоксические Т-клетки или Т-киллеры). Этому способствует стерическое сродство взаимодействующих рецепторов. Таким образом, для запуска адаптивного иммунитета необходима предварительная активация клеток врожденного иммунитета [4].

При активации Т-клетки начинают экспрессировать гены своего ростового фактора - IL-2 и его рецептора. В результате аутокринного действия IL-2, Т-клетки активированных клонов пролиферируют. Пролиферации, индуцированной антигеном, подвергаются также Т-киллеры и В-лимфоциты. На следующем этапе CD4⁺ Т-клетки дифференцируются на основные разновидности Т-хелперов, из которых наиболее изучены Th1- и Th2-клетки. Эти клетки различаются, главным образом, спектром синтезируемых цитокинов, отвечающих за развитие двух важных ветвей иммунного ответа - клеточного, направленного на элиминацию внутриклеточных патогенов, и гуморального, играющего основную роль в борьбе с внеклеточными патогенами и макропаразитами. Окончательная дифференцировка Т-хелперов происходит в Т-зонах вторичных лимфоидных органов. Th1-клетки мигрируют из Т-зон в очаги воспаления, в том числе в места проникновения патогенов, вызывающих иммунный ответ. Th2-клетки, как правило, взаимодействуют с В-лимфоцитами. Запуск Th1-зависимого иммунного ответа происходит, если клетка фагоцитировала микроорганизм или вирус, но не смогла убить и расще-

пить. В этом случае фагоцит (макрофаг) получает стимулирующие сигналы со стороны Т-хелперов типа Th1 [4, 5].

Особую роль играет третий вариант реакции адаптивного иммунитета - ответ цитотоксических Т-лимфоцитов. Презентацию антигенного пептида этим Т-клеткам тоже осуществляют дендритные клетки, но с участием молекул МНС-I. Цитотоксические клетки, предназначенные для защиты от вирусов и других внутриклеточных патогенов (присутствуют в цитозоле), в меньшей степени зависят от Т-хелперов. Контактные взаимодействия цитотоксических Т-клеток с Т-хелперами не играют такой важной роли, как для эффекторных клеток при развитии двух других рассмотренных выше форм ответа. Аксессуарная функция Th1-клеток в реакциях цитотоксичности состоит, главным образом, в снабжении Т-киллеров необходимым для экспансии их клонов ростовым цитокином IL-2 [6].

В настоящее время существует острая необходимость в преобразовании накопленных знаний об адаптивном иммунитете в эффективные терапевтические меры. Необходимы дополнительные исследования для понимания временных особенностей развития адаптивного ответа на грипп в зависимости от времени терапевтического вмешательства, что будет способствовать устранению таких недостатков, как низкая эффективность и развитие лекарственной устойчивости.

Скорость развития клинических симптомов при гриппе и их выраженность обусловлены не только самим патогеном, но также и способностью факторов иммунной системы оказывать эффективное воздействие на инфекционный агент, подавлять репродукцию вируса и элиминировать инфекцию из организма. Большое значение в борьбе с инфекцией также имеет способность иммунной системы к формированию длительного адаптивного иммунитета против конкретного вирусного штамма.

Активацию факторов адаптивного иммунитета можно осуществлять путем применения специфических иммуностимуляторов с доказанной безопасностью, иммунотропной активностью и клинической эффективностью. Одним из способов оказывать влияние на иммуномодулирующую способность биологически активных соединений является изменение структуры молекулы и формы ее пространственной организации. Так, изменение надмолекулярной организации и пространственной структуры иммуностимулятора может значительно повышать его иммуностимулирующую активность, возможно, за счет улучшения сродства к рецепторам клеток врожденного иммунного ответа. Применение иммуностимуляторов на основе биологически активных соединений растительного происхождения, не содержащих в своем составе дополнительных компонентов (минеральные адъюванты, липидные и белковые компоненты и пр.), позволяет сократить нагрузку на организм и уменьшить аллергенность/реактогенность вводимого иммуностимулятора. Возможность для этого дает контролируемый подбор биологически активных молекул с различной структурой (флавоноиды, сапонины, фенольные кислоты и т.д.) и исследование активности основных звеньев адаптивного иммунного ответа при их введении в организм для выяснения зависимости между структурой молекулы и ее способностью стимулировать противовирусный иммуни-

тет. В настоящее время проводятся интенсивное изучение механизмов активации врожденного и специфического противовирусного иммунитета и поиск новых иммуностимуляторов, способных повысить активность иммунного ответа [7, 8].

Целью работы являлось изучение воздействия комбинированных иммуностимуляторов на основе биологически активных соединений растительного происхождения на уровне экспрессии генов основных маркеров специфического Th1 противовирусного иммунитета (гены IL-1, IL-2, Ccr5) при введении таких иммуностимуляторов в организм животного в сочетании с вирусными антигенами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Очищенные препараты сапонины и метоксифлавоноидов получали из надземных частей растения *Polygonum sp.*, коры растения *Betula sp.* и кожуры плодов растения *Cytrus sp.* Растительные экстракты получали описанным ранее методом [9]. Специфические реакции на метоксифлавоноиды и сапонины ставили известным методом [10, 11].

Фракционирование частично очищенных растительных экстрактов выполняли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографической системе фирмы "Agilent technologies" с использованием полупрепаративной колонки "Zorbax C18", 5μ, 9,4x250 мм. Разделение проводили в градиенте 0,1% трифторуксусная кислота (ТФК) – 80% ацетонитрил (ACN). На аналитическую колонку наносили до 10 мг материала. Контроль за хроматографическим процессом осуществляли спектрофотометрически при 208 нм (поглощение сапонинов и большинства окрашенных полифенольных соединений).

Хроматомасс-спектрометрический анализ осуществляли на хроматомасс-спектрометре Shimadzu LCMS-8040 в режиме положительной ионизации при электрораспылении. Напряжение на конусе распыления 3,0 кВ, температура источника 120°C, температура блока десольватации 275°C, поток конического газа 50 л/ч, поток газа десольватации 600 л/ч. Определение масс спектров выполняли в режиме сканирования 200 – 2000 m/z. Разделение образца проводили на аналитической колонке Zorbax C18 (4,6x150 мм, 5μм), в градиенте 0,1% ТФК и ацетонитрила 0-80%.

В экспериментах использовали эпидемически значимый штамм вируса гриппа человека А/Алматы/8/98 (H3N2). Вирус гриппа выращивали в аллантоисной полости 10-11-дневных куриных эмбрионов (КЭ) в течение 36 ч. при 37°C. Титр вируса в аллантоисной жидкости составлял 108-109 ЭИД₅₀/мл.

Инфекционный титр вируса гриппа определяли титрованием на куриных эмбрионах методом предельных разведений. О наличии вируса судили по реакции гемагглютинирующей активности [12]. Титр инфекционности вируса высчитывали по методу Рида и Менча [12] и выражали в lg ЭИД₅₀/мл.

Концентрацию и очистку вируса проводили описанным ранее методом [13]. Очищенные гликопротеидные (поверхностные) антигены вируса гриппа - гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) получали из очищенного концентрированного вируса методом солиubilизации неионным де-

тергентом с последующим диализом, как описано ранее [14]. Концентрацию белка определяли по методу Bradford с использованием набора M173-KIT Protein Assay Bradford Method. Оптическую плотность определяли при длине волны 595нм [15].

В экспериментах использовали белых беспородных мышей массой 15-25 граммов, обоих полов. Животные содержались и подвергались экспериментальным процедурам в соответствии с международными правилами гуманного обращения с животными. Для пролиферации макрофагов 1-месячным белым мышам внутрибрюшинно однократно вводили комбинированные иммуностимулирующие препараты в сочетании с очищенными гликопротеидными антигенами (НА + NA) вируса гриппа, штамм А/Алматы/8/98 (H3N2). Доза гликопротеидных антигенов вируса гриппа составляла 10 мкг/мышь, доза изучаемых иммуностимулирующих препаратов - 45 мкг/мышь. Объем вводимого материала соответствовал рекомендациям международных организаций и не превышал 0,2 мл на одно животное [16]. Контрольной группе животных вводили фосфатно-солевой буферный (PBS) раствор с очищенными гликопротеидными антигенами вируса гриппа (плацебо).

Забор перитонеальных макрофагов осуществляли на 3 сутки после иммунизации животных методом промывания брюшной полости охлажденной средой 199. Отобранная суспензия клеток была дважды отмыта и ресуспендирована в концентрации 2x10⁶ клеток/мл среды культивирования.

Определение уровня экспрессии исследуемых генов проводили методом ПЦР и/или ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов реагентов и в соответствии с рекомендациями фирм-производителей ("Qiagen", "Promega" и т.п.).

Суммарную РНК из отобранных макрофагов выделяли с помощью набора для экстракции РНК Rneasy Mini Kit («QIAGEN», 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 5x буфера для обратной транскриптазы («Promega», США), 0,2 мкл 2 мМ смеси dNTPs, 0,25 мкл 20 ОЕ случайного праймера (9 или 18 нуклеотидов) и 0,125 мкл M-MLV). Реакцию проводили при 37°C в течение 60 мин.

Полимеразную цепную реакцию (RT-ПЦР) в реальном времени ставили в 20 мкл реакционной смеси (4 мкл ДНК матрицы, 8 мкл SybrGreen, по 1 мкл 20 ОЕ прямого и обратного праймеров, вода). 35 циклов ПЦР на термодиске «PicoReal» проводили при следующих режимах: 94°C – 1 мин, 48°C – 1 мин, 72°C – 3 мин. [17]. Пары праймеров подбирали в соответствии с последовательностью исследуемых интерлейкинов [18], для количественного определения гена Ccr5 были использованы готовые праймеры и зонды, согласно рекомендациям фирмы производителя (Applied Biosystems) (табл. 1). Нормализацию экспрессии генов осуществляли с помощью гена актина.

Постановку ПЦР в режиме реального времени для наборов TaqMan проводили в 20 мкл реакционной смеси (Fast advanced mix для ПЦР - 10 мкл, TaqMan зонд - 1 мкл, деионизированная вода - 6 мкл) (табл. 1), согласно методическим указаниям фирмы-производителя.

В каждой серии анализов использовали два контрольных образца: положительный контроль (с РНК вируса гриппа), и отрицательный контроль (с деионизированной водой). Смеси для контрольных образцов готовили по той же прописи, что и для исследуемых образцов.

Среднее квадратичное отклонение (*StD*) для отрицательного и положительного контролей и процента выживших клеток для каждой концентрации исследуемого вещества рассчитывали по формуле:

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

где Y_i – результат измерения ОП у каждого объекта группы; n – число объектов в группе; \bar{Y} – среднее арифметическое значение ОП [19].

Таблица 1 - Последовательность использованных в исследовании праймеров

Наименование праймеров	Последовательность праймеров (5'-3')	Величина ампликона, п.н.
Ccr5	Mm01963251_s1 FAM-MGB	153
Rn18s/Rn45s (контроль)	Mm03928990_g1 FAM-MGB	61
IL-1	caa cca aca agt gat att ctc cat g (прямой) gat cca cac tct cca gct gca (обратный)	152
IL-2	ccc aag cag gcc aca gaa ttg aaa (прямой) agt cca cca cag ttg ctg act cat (обратный)	211
Actin (контроль)	aga ggg aaa tcg tgc gtg ac (прямой) caa tag tga tga cct ggc cgt (обратный)	137

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Microsoft Excel». Для табличного и графического изображения полученных результатов использовалась программа Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуностимулирующие комбинированные препараты составляли из очищенного пентациклического тритерпеноида растительного происхождения бетулина в сочетании с очищенными метоксифлавоноидами (нобилетин, гесперидин, гликозид изорамнетина) растительного происхождения (рис. 1). Использовали следующие иммуностимулирующие композиции:

1. Смесь бетулина с гликозидом изорамнетина;
2. Смесь бетулина с гесперидином;
3. Смесь бетулина с нобилетином.

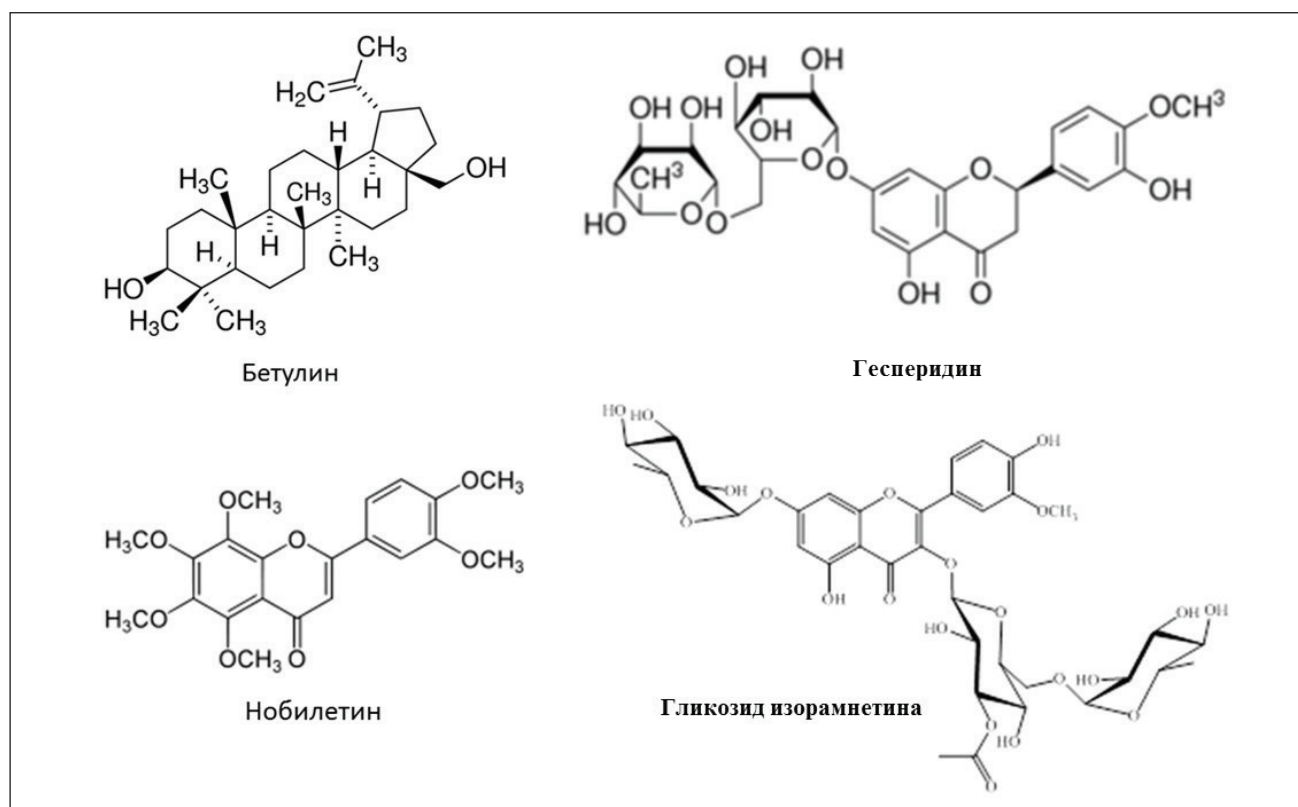


Рисунок 1 - Структурная формула исследуемых соединений

Метоксифлавоноиды отличались между собой не только количеством и расположением метокси-групп, но также и наличием или отсутствием углеводного компонента в молекуле. Например, нобилетин, содержащий в своей структуре 6 метокси-групп, не имеет ни одного остатка сахара. Гесперидин имеет одну метокси-группу в В-кольце и 2 остатка сахара, присоединенные к 7 углероду А-кольца. Гликозид изорамнетина в своей структуре содержит, как и гесперидин, одну метокси-группу в В-кольце, однако имеет 3 сахарных остатка, два из которых присоединены к 3 углероду С-кольца и один - к 7 углероду А-кольца.

Изучено влияние полученных иммуностимулирующих композиций на экспрессию генов Th1 клеточного иммунного ответа. В качестве маркеров Th1 иммунного ответа были выбраны гены IL-1, IL-2, Ccr5 (рис. 2). Для изучения экспрессии генов указанных маркеров проводили однократную иммунизацию белых беспородных мышей комбинированными иммуностимулирующими препаратами в сочетании с очищенными гликопротеидными антигенами (НА + NA) вируса гриппа H3N2.

Результаты проведенных экспериментов показали, что иммуностимулирующие комбинированные препараты, приготовленные на основе пентациклического тритерпеноида бетулина в сочетании с очищенными метоксифлавоноидами нобилетином, гесперидином и гликозидом изорамнетина, способны существенно усиливать экспрессию генов цитокинов, относящихся к Th1 клеточному иммунитету: Ccr5 (С-С рецептор хемокина 5 типа, интегральный мембранный белок), IL-1 и IL-2.

Установлено, что сочетание бетулина с гликозидом изорамнетина усиливало экспрессию гена IL-1 в 3,5 раза, а сочетание бетулина с гесперидином или нобилетином при-

водило соответственно к 3,2-кратному и 3,3-кратному повышению активности экспрессии данного гена.

Смесь бетулина с гесперидином или нобилетином существенно (11-кратно) стимулировала экспрессию гена IL-2, тогда как сочетание бетулина с гликозидом изорамнетина практически не влияло на экспрессию гена IL-2.

При оценке влияния иммуностимулирующих композиций на активность экспрессии гена Ccr5 показано, что иммунизация животных гликопротеидными антигенами вируса гриппа в сочетании со смесью бетулин + гликозид изорамнетина приводит к 2,2-кратному повышению активности экспрессии данного гена, а композиция бетулин + нобилетин увеличивает активность экспрессии гена в 1,7 раза.

Полученные данные показывают, что изученные иммуностимулирующие композиции на основе сочетаний очищенного пентациклического тритерпеноида растительного происхождения бетулина с очищенными метоксифлавоноидами гесперидином, гликозидом изорамнетина и нобилетином могут быть использованы для повышения активности экспрессии генов Th1 клеточной стадии иммунного ответа. При этом наличие или отсутствие гликозидной составляющей и количество метокси-групп в молекуле метоксифлавоноида не оказывают существенного влияния на данную стадию иммунного ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований показано, что иммуностимулирующие композиции, приготовленные на основе сочетания пентациклического тритерпеноида бетулина с метоксифлавоноидами (гликозид изорамнетина, гесперидин и нобилетин), позволяют в значительной степени изменять активность экспрессии генов Th1 клеточной

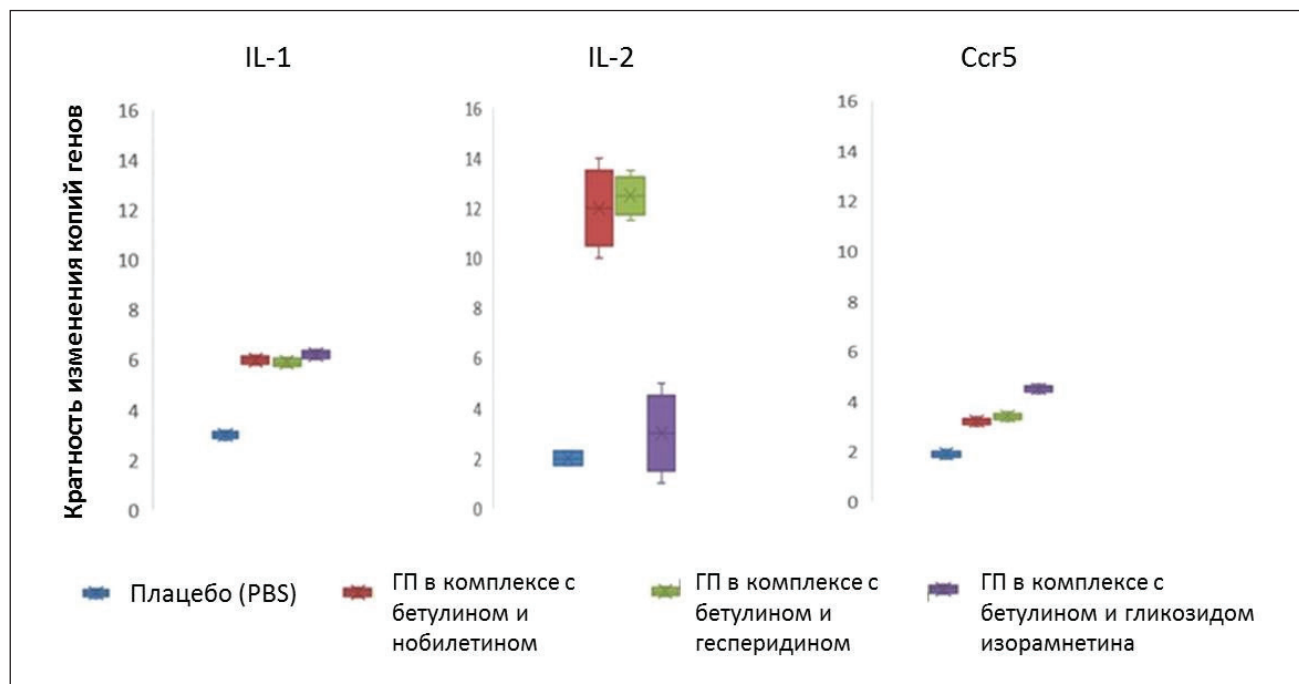


Рисунок 2 – Модуляция экспрессии генов Th1 стадии иммунного ответа при иммунизации мышей гликопротеидными антигенами вируса гриппа (ГП) в сочетании с различными иммуностимуляторами на основе композиций очищенных биологически активных соединений растительного происхождения. Экспрессия генов показана как кратность изменения их копий.

Результаты представляют собой среднее значение данных, полученных в опытах на четырех отдельных животных ($p \leq 0,05$)

стадии иммунного ответа, что может быть использовано для разработки иммуностимулирующих препаратов и способов повышения резистентности организма к вирусной инфекции и имеет большое значение для создания новых профилактических и терапевтических противовирусных препаратов.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Статья опубликована в рамках грантового проекта AP05130957 финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы статьи несут ответственность за достоверность и правильность предоставленных научных сведений в подаваемой рукописи.

Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mohan T., Verma P., D Rao N. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead // *Indian J Med Res.* – 2013. - V. 138. – P. 779–795. PMID: 24434331, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928709/>, [Indexed for MEDLINE]
- McKarns S.C. Innate Immunity and Inflammation // *Comprehensive Toxicology* (Third Edition). – 2018. – V. 11. – P. 74-128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64228-9>.
- McNeela E.A., Mills K.H.G. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2001. – V. 51. – P. 43-54. PMID: 11516778. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00169-7. [Indexed for MEDLINE]
- Chistiakov D.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Regulatory T cells in atherosclerosis and strategies to induce the endogenous atheroprotective immune response // *Immunology Letters.* – 2013. – V. 151. – P. 10-22. PMID: 23411158. doi: 10.1016/j.imlet.2013.01.014. [Indexed for MEDLINE]
- Dietrich J., Nakajima H., Colonna M. Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells // *Microbes and Infection.* – 2000. – V. 2. – P. 323-329. PMID: 10758410. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00294-X. [Indexed for MEDLINE]
- Muraille E., Goriely S. The nonspecific face of adaptive immunity // *Current Opinion in Immunology.* – 2017. – V. 48. – P. 38-43. PMID: 28823577. DOI: 10.1016/j.coi.2017.08.002, [Indexed for MEDLINE]
- 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. – V. 20. – P. 1011-1021. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3943>
- 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. – V. 64. – P. 881–889. PMID: 26752248. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05180. [Indexed for MEDLINE]
- Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk M.S., et al. Adjuvant activity of multimolecular complexes based on *Glycyrrhiza glabra* saponins, lipids, and influenza virus glycoproteins // *Archives of Virology.* – 2019. – V. 164. – P. 1793-1803. DOI 10.1007/s00705-019-04273-2
- Бердимуратова Г.Д., Муzychкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Тулгенова А.У. Биологически активные вещества

Вклад авторов

Богоявленский Андрей Павлович - разработка концепции и планирование научной работы, составление чернового варианта научной работы, анализ и обработка данных;

Турмагамбетова Айжан Сабиржановна - разработка концепции и планирование научной работы, составление чернового варианта научной работы, анализ и обработка данных;

Березин Владимир Элеазарович - внесение интеллектуально значимых исправлений в содержание работы, курирование работы;

Алексюк Павел – постановка экспериментальной части работы, получение первичных данных, их анализ и обработка;

Алексюк Мадина – постановка экспериментальной части работы, получение первичных данных, их анализ и обработка.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES

- Mohan T, Verma P, D Rao N. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res.* 2013;138:779–795. PMID: 24434331. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928709/>. [Indexed for MEDLINE]
- McKarns SC. Innate Immunity and Inflammation. *Comprehensive Toxicology.* 2018;11:74-128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64228-9>
- McNeela EA, Mills KHG. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2001;51:43-54. PMID: 11516778. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00169-7. [Indexed for MEDLINE]
- Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN. Regulatory T cells in atherosclerosis and strategies to induce the endogenous atheroprotective immune response. *Immunology Letters.* 2013;151:10-22. PMID: 23411158. doi: 10.1016/j.imlet.2013.01.014. [Indexed for MEDLINE]
- Dietrich J, Nakajima H, Colonna M. Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells. *Microbes and Infection.* 2000;2:323-329. PMID: 10758410. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00294-X. [Indexed for MEDLINE]
- Muraille E, Goriely S. The nonspecific face of adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2017;48:38-43. PMID: 28823577. DOI: 10.1016/j.coi.2017.08.002. [Indexed for MEDLINE]
- Son YO, Kook SH, Lee JC. 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;20:1011-1021. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.3943>
- Wei W, Feng L, Bao WR et al. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2016;64:881–889. PMID: 26752248. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05180. [Indexed for MEDLINE]
- Alexyuk PG, Bogoyavlenskiy AP, Alexyuk MS, et al. Adjuvant activity of multimolecular complexes based on *Glycyrrhiza glabra* saponins, lipids, and influenza virus glycoproteins. *Archives of Virology.* 2019;164:1793-1803. DOI 10.1007/s00705-019-04273-2. [Indexed for MEDLINE]
- Berdimuratova GD, Muzychkina RA, Korul'kin DJu et al. *Biologicheski aktivnye veshhestva rastenij. Vydelenie, razdelenie, analiz* [Biologically active substances of plants. Isolation, separation, analysis]. Almaty: Atamura; 2006. 438 p. ISBN 9965-688-97-4.

растений. Выделение, разделение, анализ. - Алматы: Атамұра, 2006. - 438 с.

11 Маркарян А.А. Основные принципы составления и стандартизации комплексных средств растительного происхождения. Проблемы управления здравоохранения. - М.: Изд. Профтек, 2003. - С. 78-81

12 Klimov A., Balish A., Veguilla V., et al. Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection // *Methods Mol Biol.* - 2012. - V. 865. - P. 25-51. PMID: 22528152. DOI: 10.1007/978-1-61779-621-0_3. [Indexed for MEDLINE]

13 Chucholowius H., Rott R. A new method for purification of myxoviruses by zonal centrifugation with two different sucrose density gradients // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1972. - P. 295-297. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36434>

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

15 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing of protein during binding // *Annal. Biochem.* - 1976. - V. 72. - P. 248-254. PMID: 942051. DOI: 10.1006/abio.1976.9999. [Indexed for MEDLINE]

16 Приказ МЗСР РК № 415 от 29 мая 2015 г. «Правила проведения доклинических (неклинических) исследований биологически активных веществ, лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники». http://pharmnews.kz/ru/legislation/prikaz-mzsr-rk-416-ot-29-maya-2015-goda_1151

17 Nian H., Bisson W.H., Dashwood W.M. et al. α -Keto acid metabolites of organoselenium compounds inhibit histone deacetylase activity in human colon cancer cells // *Carcinogenesis.* - 2009. - V. 8. - P. 1416-1423. PMID: 19528666. DOI: 10.1093/carcin/bgp147

18 Le Maitre C.L., Freemont A.J., Hoyland J.A. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human Intervertebral disc degeneration // *Arthritis Res Ther.* - 2005. - V. 7(4). - P. R732-745. PMID: 15987475. DOI: 10.1186/ar1732.

19 Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2013. - 944 с.

11 Markarjan AA. *Osnovnye principy sostavleniya i standartizacii kompleksnyh sredstv rastitel'nogo proishozhdeniya. Problemy upravleniya zdavoohranenija* [Basic principles for the compilation and standardization of complex products of plant origin. Health Management Challenges]. Moscow: Proftek; 2003. P. 78-81

12 Klimov A, Balish A, Veguilla V, et al. Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection. *Methods Mol Biol.* 2012;865:25-51. PMID: 22528152. DOI: 10.1007/978-1-61779-621-0_3. [Indexed for MEDLINE]

13 Chucholowius H, Rott R. A new method for purification of myxoviruses by zonal centrifugation with two different sucrose density gradients. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1972;295-297. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36434>

14 Berezin VE., Zajdes VM, Artamonov AF, Isaeva ES. *Soljubilizacija glikoproteidov obolochechnyh virusov detergentami* [Solubilization of enveloped virus glycoproteins with detergents]. *Biohimija* [Biochemistry]. 1986;5:808-815.

15 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing of protein during binding. *Annal. Biochem.* 1976;72:248-254. PMID: 942051. DOI: 10.1006/abio.1976.9999. [Indexed for MEDLINE]

16 *Prikaz MZSR RK № 415 ot 29 maja 2015 g «Pravila provedenija doklinicheskikh (neklinicheskikh) issledovanij biologicheskii aktivnyh veshhestv, lekarstvennyh sredstv, izdelij medicinskogo naznachenija i medicinskoj tehniki»* [The order of the Ministry of Health and Social Development of the Republic of Kazakhstan No. 415 dated May 29, 2015 "Rules for conducting preclinical (nonclinical) studies of biologically active substances, medicines, medical devices and medical equipment"]. Available from: http://pharmnews.kz/ru/legislation/prikaz-mzsr-rk-416-ot-29-maya-2015-goda_1151

17 Nian H, Bisson WH, Dashwood WM et al. α -Keto acid metabolites of organoselenium compounds inhibit histone deacetylase activity in human colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2009;8:1416-1423. PMID: 19528666. DOI: 10.1093/carcin/bgp147

18 Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human Intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):R732-45. PMID: 15987475. DOI: 10.1186/ar1732.

19 Mironov AN. *Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv* [Guidelines for preclinical studies of drugs]. Part One. Moscow: Grif and K; 2013. 944 p. ISBN: 978-5-8125-17667-0