

УДК 612.017.1:616-008

# Дифференциальный анти-ВИЧ-эффект нового препарата на основе гуминовых веществ в различных клетках-мишенях иммунной системы

Г. В. Корнилаева<sup>1</sup>, А. Э. Синявин<sup>1,2\*</sup>, А. Schultz<sup>3</sup>, А. Germann<sup>3</sup>, С. Moog<sup>4</sup>, Н. von Briesen<sup>3</sup>, А. С. Тургиев<sup>1,5</sup>, Э. В. Карамов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>3</sup>Fraunhofer Institut fuer Biomedizinische Technik (IBMT), Joseph-von-Fraunhofer-Weg 1, 66280 Sulzbach, Germany

<sup>4</sup>INSERM U1109, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, 4 Rue Blaise Pascal, Strasbourg 67000, France

<sup>5</sup>ООО «Иммуномика», 107078, Москва, ул. Новая Басманная 12, стр. 2, офис 103

\*E-mail: andreysi93@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.03.2019

Принята к печати 15.04.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-68-76

**РЕФЕРАТ** Исследована эффективность ингибирования ВИЧ-инфекции в индивидуальных пулах иммунных клеток – CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, макрофагах, дендритных клетках – новым препаратом на основе гуминовых веществ. При воздействии нетоксичных концентраций препарата в каждой из этих популяций достигается почти полное (более 90%) ингибирование инфекции. Обнаруженный эффект показывает возможность защиты существенной части функционально значимых для иммунной системы клеток от истощения. Сравнительное изучение подавления инфекции в индивидуальных пулах позволило выявить различия в эффективности препарата в каждой из клеточных популяций. Наиболее чувствительной оказалась инфекция в макрофагах, зараженных вариантом R5 ВИЧ-1: 90 и 50% ингибирование инфекции наблюдалось в присутствии достаточно низких (1.4 и 0.35 мкг/мл) концентраций препарата. Для достижения такого же уровня ингибирования инфекции в дендритных клетках, зараженных тем же штаммом, требовались в 15–19 раз более высокие концентрации препарата. Эффективность препарата в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах была достаточно близка к его эффективности в макрофагах. Препарат оказался универсально эффективным как в отношении Т-, так и М-тропных вариантов ВИЧ-1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** гуминовые вещества, дендритные клетки, макрофаги, подавление ВИЧ-инфекции, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, Т- и М-тропные варианты ВИЧ-1.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; СБФГ – солибилизованная бутанольная фракция гуминовых веществ; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; Мф – макрофаги; ДК – дендритные клетки; МПК – мононуклеары периферической крови; AZT – азидотимидин; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты.

## ВВЕДЕНИЕ

Клетки врожденного иммунитета, такие, как моноциты, макрофаги и дендритные клетки, представляют собой первую линию защиты от патогенов [1–5], и они же являются клетками-мишенями для ВИЧ. Вирусной атаке подвергаются клетки, экспрессиру-

ющие мембранные молекулы CD4, CCR5 и CXCR4, находящиеся, в зависимости от пути проникновения инфекции, в слизистых оболочках, в крови или лимфоидных тканях. Эффективность инфицирования зависит как от уровня экспрессии поверхностных клеточных рецепторов, так и от штамма вируса [6,

7]. На высоком уровне вирус продуцируется главным образом в активированных во время острой инфекции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах [8]. Но и в покоящихся CD4<sup>+</sup> клетках памяти обнаруживается и репликация вируса, и провирусная ДНК в латентно интегрированном или преинтегрированном состоянии [9]. Клетки с интегрированным вирусным геномом представляют часть существующего длительное время резервуара инфекции в организме, где могут сохраняться до 4 лет [9]. Полагают, что покоящиеся CD4<sup>+</sup> клетки памяти подвергаются инфицированию в первую очередь и преимущественно R5-фенотипом вируса [10–12], что может быть связано с экспрессией интегрин LFA-1 [13]. Повышенная способность варианта R5 вируса к репликации может также объяснить их преобладание во время острой или первичной инфекции [14].

В патогенетическом процессе ВИЧ-инфекции участвуют также антигенпрезентирующие клетки – макрофаги и дендритные клетки [15–18], обладающие ВИЧ-специфичными рецепторами, способные активно циркулировать в крови и проникать в различные лимфоидные и нелимфоидные ткани. Дендритные клетки – классические антигенпрезентирующие клетки с экстраординарной способностью распознавать и процессировать антиген [19]. Незрелые дендритные клетки обладают повышенной способностью к фагоцитозу, тогда как у зрелых клеток увеличена способность продуцировать цитокины. При созревании в дендритных клетках экспрессия рецепторов CCR5 уменьшается, а CXCR4 увеличивается, что может привести к инфицированию вирусами с обоими фенотипами [18]. Известно также, что клетки Лангерганса (дендритные клетки кожи) способны захватывать вирус с помощью лектина С-типа – лангерина, без продукции вируса. При созревании дендритных клеток продукция вируса в них снижается в 10–100 раз по сравнению с продукцией в незрелых клетках [17, 20]. Большинство исследователей считают, что дендритные клетки не являются активными продуцентами вируса, но благодаря высокой способности к миграции их основная роль заключается в доставке вируса от сайтов проникновения к CD4<sup>+</sup> Т-клеткам в лимфоидных тканях, что способствует быстрой диссеминации вируса в организме. Макрофаги также проявляют чувствительность к ВИЧ-инфекции [21, 22]. R5-вирусы, обладающие тропизмом к макрофагам, так же хорошо реплицируются в макрофагах периферической крови, как и в CD4<sup>+</sup> лимфоцитах [23]. Способность продуцировать вирус у макрофагов также различается. Часто при инфицировании макрофагов наблюдается низкая интенсивность продукции вируса, который обнаруживается в секвестрированной форме

во внутриклеточных вакуолях. Причина ограничения вирусной репликации может быть обусловлена внутриклеточными механизмами неспецифической защиты. Обычно R5-вирусы не проявляют цитопатогенных свойств, но некоторые изоляты, особенно обнаруживаемые на поздних стадиях заболевания, размножаются в макрофагах до высоких титров и могут проявлять цитопатический эффект [24, 25]. Инфицированные макрофаги погибают преимущественно путем некроза. Весьма важно, что эти клетки, участвующие в патогенетическом процессе, могут служить резервуаром для вируса, недоступного в виду отсутствия активной вирусной репродукции и синтеза вирусспецифических белков ни для антиретровирусной терапии, ни для распознавания цитотоксическими лимфоцитами иммунной системы.

В целом, опубликованные данные свидетельствуют о том, что перmissивность иммунных клеток по отношению к ВИЧ во многом зависит от стадии созревания/дифференцировки и функциональной поляризации. При этом может меняться и продукция цитокинов, и рецепторный репертуар. Индуцированное инфекцией истощение пула чувствительных к вирусу иммунных клеток приводит в конечном итоге к негативному влиянию на формирование дальнейшего иммунного ответа.

Современный подход к оценке антивирусной активности каждого нового препарата непременно включает исследования на основных клетках-мишенях, участниках патогенеза ВИЧ-инфекции, таких, как мононуклеары периферической крови, макрофаги, дендритные клетки. Это позволяет получить информацию об эффективности исследуемого вещества в каждой популяции клеток и иметь представление о его возможности влиять на течение патогенетического процесса, и, в конечном итоге, оптимизировать анти-ВИЧ-терапию.

В настоящей работе исследована анти-ВИЧ-активность нового препарата, представляющего собой солюбилизованную бутанольную фракцию гуминовых веществ (СБФГ). Согласно масс-спектрометрическим данным и элементному анализу, содержание углерода и кислорода (% по массе) в данной фракции составляет порядка 52.7 и 37.1% соответственно при невысоком содержании азота и серы (4.3 и 2.1% соответственно) [26, 27]. Следует отметить, что элементный анализ гуминовых веществ, полученных из одного источника и с использованием одних и тех же методов выделения и фракционирования, дает воспроизводимые значения. Данные ВЭЖХ показывают, что препарат характеризуется достаточно высоким содержанием гидрофобных ароматических фрагментов (74%), что также подтверждено с помощью <sup>13</sup>C-ЯМР. Атомное отношение Н/С

составляет 0,8, О/С – 0,53 [28–30]. Известно, что гуминовые вещества образуются в результате распада отмерших организмов и составляют один из самых обширных резервуаров органического углерода. Препараты на основе гуминовых веществ, разработанные и изученные ранее, такие, как, например Олипифат, характеризуются как экологически чистые и безопасные продукты, обладающие многими полезными свойствами. Они стимулируют гемопоэз, проявляют ранозаживляющую, иммуномодулирующую, антиоксидантную, а также противоопухолевую, антибактериальную, противогрибковую и противовирусную активность [31–33].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Получение препарата

В качестве исходного сырья для получения гуминовых веществ использовали лигнинсодержащие материалы (твердые остатки переработки растительного сырья). Материалы подвергали окислительному щелочному гидролизу с последующим отделением жидкой фазы, ее подкислением, отделением полученного осадка, его промывкой и сушкой. Полученный полупродукт подвергали экстракции этилацетатом. Далее проводили экстракцию полученного осадка *n*-бутанолом. Для выделения и солюбилизации биологически активных фракций, обладающих противовирусной активностью, сухой остаток после испарения бутанола очищали многократным переосаждением из щелочного раствора добавлением концентрированной соляной кислоты. Стандартизацию фракций осуществляли по характерным полосам поглощения в инфракрасной области (наличие специфических полос поглощения в интервале от 2 до 10 мкм) и молекулярно-массовому распределению (максимум в области 7000 Да). Выход целевого продукта – солюбилизированной бутанольной фракции гуминовых веществ (СБФГ) – составлял ~40%.

### Физико-химические методы исследования СБФГ

**Элементный состав.** Образцы исследуемого соединения доводили до полного растворения при нагревании до 80–100°C в 2 мл азотной кислоты с добавлением нескольких капель пероксида водорода в течение 3 ч. Полученный раствор анализировали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной аргонной плазмой на приборе ICP-AES-9000 (Thermo Jarrell Ash, США).

**ГХ-МС-анализ.** Навеску СБФГ доводили до полного воздушно-сухого веса и обрабатывали 5 мл толуола в ультразвуковой бане. Экстракты отфильтровыва-

ли, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в токе азота. Часть проб подвергали метилированию. Аликвотную часть образца анализировали с помощью ГХ-МС на комплексе, включающем газовый хроматограф HP5890А, масс-спектрометр HP5988А и систему обработки данных HP59970С (Hewlett-Packard, США). Компоненты пробы идентифицировали с помощью компьютерного поиска и библиотеки масс-спектров Wiley.

**ЯМР-спектроскопию** выполняли с использованием прибора Bruker Avance 400 MHz NMR.

### Клеточные линии

СЕМ-SS – перевиваемая иммортализованная линия, клонированная из Т4-лимфобластоидной клеточной линии человека путем адгезии с помощью поли-*L*-лизина, обладающая повышенной способностью к вирус-индуцированному синцитиеобразованию и фузогенной активностью, широко используется для изучения ВИЧ и его ингибиторов (NIH AIDS Reagent Program № 776, США). Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 10% фетальной сыворотки (Sigma, США), 2 mM *L*-глутамин (Sigma, США).

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из обработанной антикоагулянтом (EDTA) цельной крови серонегативного донора путем седиментационного разделения при центрифугировании в растворе фиколла (GE Healthcare Worldwide, США). Для заражения вирусом использовали стимулированные митогеном МПК, полученные путем 3–4-дневного культивирования с 5 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА, Sigma, США). Зараженные клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10% фетальной сыворотки, 100 мкг/мл гентамицина и 50 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 (IL-2, Sigma, США).

Макрофаги (Мф) человека получали путем адгезии моноцитов из пула МПК (концентрация  $1-2 \times 10^6$  клеток/мл) после 2 ч инкубации при 37°C с последующей дифференцировкой клеток в течение 7–8 дней в присутствии 0,2 мкг/мл GM-CSF (Invitrogen, США) в ростовой среде указанного состава.

Дендритные клетки (ДК) получали путем культивирования моноцитов человека в течение 7 дней в присутствии 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4, Sigma, США) (фракция моноцитов выделена из МПК с помощью MACS (magnetic cell separation system CD14<sup>+</sup>; Miltenyi Biotec., ФРГ)). Антигенпрезентирующая функция ДК и моноцитов протестирована путем оценки способности стимулировать аллогенную пролиферацию Т-клеток.

TZM-bl – перевиваемая клеточная линия, полученная из клеток HeLa генно-инженерным путем, экспрессирующая CD4, CXCR4, CCR5 и содержащая Tat-зависимый репортерный ген люциферазы под контролем длинных концевых повторов (LTR) ВИЧ-1 (NIH AIDS Reagent Program № 8129, США).

293T/17 – эпителиальные клетки почки человека, полученные из клеточной линии 293T. Линия 293T/17 характеризуется высокой способностью к трансфекции и используется для получения высоких титров инфекционных ретровирусов (ATCC® CRL-11268).

**Вирусы.** Клетки заражали следующими штаммами ВИЧ-1:

ВИЧ-1/BRU – референсный штамм с фенотипом X4, активно реплицирующийся в Т-лимфобластоидных клеточных линиях, чувствительный к действию AZT (азидотимидин).

ВИЧ-1/AR216 – выделенный от ВИЧ-инфицированного пациента клинический изолят X4-фенотипа, адаптированный к Т-клеточным линиям, обладающий высокой устойчивостью к AZT.

ВИЧ-1/Ba-L – М-тропный штамм R5-фенотипа.

ВИЧ-1/SF-162 – М-тропный штамм R5-фенотипа.

ВИЧ-1/QH0 – М-тропный штамм R5-фенотипа, выделенный от пациента в Тринидад и Тобаго.

Биологическую активность вирусных стоков оценивали с помощью титрования по TCID<sub>50</sub>.

### Получение env-псевдовирусов ВИЧ-1

Псевдовирусы получали по описанной ранее методике [34]. Клетки 293T/17 высевали в концентрации  $2 \times 10^6$  на флакон Т-75 в 20 мл среды DMEM. После инкубации в течение 24 ч клетки трансфицировали 4 мкг плазмиды, экспрессирующей ген *env*, кодирующий белок оболочки соответствующего подтипа ВИЧ-1, и 8 мкг плазмиды pSG3ΔEnv без гена *env*, несущей недостающие гены для сборки псевдовируса ВИЧ-1. Для трансфекции использовали реагент Fugene 6 (Promega, США). После 4 ч инкубации среду для трансфекции заменяли свежей ростовой средой. Содержащие псевдовиром супернатанты собирали через 48 ч и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Все плазмиды получены из международного репозитория по программе NIH AIDS Reagent Program.

### Антиретровирусный TZM-bl-анализ

Анализ нейтрализации env-псевдовирусов проводили с использованием клеток TZM-bl по методу Montefiori [35] – модифицированной версии Wei и соавт. [36]. Свежие трипсинизированные клетки засеивали в 96-луночные планшеты в концентра-

ции  $1 \times 10^4$  клеток/лунка в 100 мкл среды DMEM с 5 мкг/мл DEAE-декстрана. К клеткам добавляли различные разведения исследуемого соединения и инкубировали в течение 45–90 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Далее клетки инокулировали 150000 RLU (относительные люминесцентные единицы) соответствующего псевдовируса. После 48 ч инкубации клетки промывали средой и лизировали, а затем с помощью люминометра Victor X3 (Perkin Elmer) определяли количество люциферазы в сравнении с контролем. Значения 50% ингибирующей концентрации рассчитывали с помощью GraphPad Prism 6 с использованием функции log (ингибитор) в сравнении с нормированным ответом.

### Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста, суть которого заключается в измерении способности живых клеток превращать хорошо растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в нерастворимые внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза. Эффективность такого превращения отражает общий уровень дегидрогеназной активности клеток и в известных пределах прямо пропорциональна концентрации живых клеток [37]. Согласно принятым критериям высокотоксичными считаются вещества, ТД<sub>50</sub> которых составляет от 1 до 10 мкг/мл, токсичными – от 11 до 20 мкг/мл, от 21 до 50 мкг/мл умеренно токсичными, от 51 до 100 мкг/мл – слаботоксичными. Вещества с ТД<sub>50</sub> более 100 мкг/мл относят к категории нетоксичных.

### Определение анти-ВИЧ-активности

При исследовании антивирусной активности клетки в течение 2 ч инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в 96-луночных планшетах (Corning, США) с СВФГ в различных концентрациях (10, 1, 0.1 и 0.01 мкг/мл) и затем заражали вирусом с множественностью инфекции 100 TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infection Dose 50). После инкубации в течение 24 ч несвязавшийся вирус удаляли путем низкоскоростного центрифугирования планшета, а осадок клеток ресуспендировали в свежей ростовой среде. За развитием инфекции наблюдали в течение 5 сут, оценивая цитопатический эффект (цитоллиз, образование синцития). Уровень ингибирования инфекции оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) на основе моноклональных антител к коровому антигену р24 ВИЧ-1. Основной высококонсервативный коровый антиген р24 является признанным маркером ВИЧ-инфекции. В работе мы использовали сертифицированные коммерческие тест-системы Bio-Rad (США) и «Вектор-Бест» (Россия).

### Статистическая обработка результатов

Экспериментальные данные получены в трех независимых повторностях, результаты рассчитывали как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Значимость различий между выборками оценивали с использованием теста Колмагорова–Смирнова, одностороннего теста ANOVA и поправки Бонферрони (Origin Pro 2016G, OriginLab Corporation) для экспериментов более чем с 2 подгруппами. Показатели полумаксимальной ингибирующей концентрации (ИД<sub>50</sub>) и 50% цитотоксической концентрации (ТД<sub>50</sub>) рассчитывали, исходя из кривых доза-эффект с помощью программ Origin Pro 2016G Softwear и Sigma Plot 12.5 Softwear. Различия считали статистически значимыми при рассчитанной величине  $p < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Характеристика химического состава СБФГ

Исследования элементного состава СБФГ выполняли в двух параллельных повторах. Оказалось, что СБФГ – это полиэлементное вещество с повышенным содержанием Р и Na (6000 и 10 029 мкг/мл соответственно). Важно отметить практически полное отсутствие тяжелых металлов в исследуемом веществе.

По данным ГХ-МС-анализа в составе СБФГ наиболее представлены жирные и смоляные кислоты. Среди жирных кислот преобладают гексадекановая, октадеценная и докозановая кислоты (по 1.2 мкг/г). В меньшей степени в СБФГ содержатся октадекановая, эйкозановая и тетракозановая кислоты (по 0.4 мкг/г). Среди смоляных кислот в анализируемом образце обнаружены три компонента, относящиеся к ряду C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> (1.6 мкг/г), из которых один компонент можно точно отнести к абиетиновой кислоте (0.6 мкг/г). Остальные являются изомерными структурами в пределах данной брутто-формулы. Две другие смоляные кислоты имеют брутто-формулу: C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>. Наиболее характерный пик на масс-хроматограмме соответствовал дегидролевопимаровой кислоте (18 мкг/г).

С помощью ЯМР-спектроскопии фрагментный состав СБФГ был сопоставлен с составом гуминовых кислот угля (табл. 1). Содержания карбонильных, карбоксильных и сложнэфирных фрагментов в СБФГ сходны с содержанием в гуминовых кислотах угля. Содержание фенольных групп в СБФГ немного выше (11% против 7–9%). Традиционными являются высокие показатели величины соотношений C<sub>COO-H</sub>/C<sub>COO-R</sub> и C<sub>Ar-OH</sub>/C<sub>Ar-OR</sub>, которые отображают степень гидролизованности структуры. Особенностью СБФГ является высокое содержание ароматических

Таблица 1. Фрагментный состав СБФГ

Фрагмент	Содержание С, %
C <sub>C=O</sub>	3
C <sub>COO-H</sub>	10
C <sub>COO-R</sub>	2
C <sub>Ar-OH</sub>	11
C <sub>Ar-OR</sub>	7
C <sub>Ar-R</sub>	21
C <sub>Ar-H</sub>	27
C <sub>O-Alk-O</sub>	0
C <sub>-CH-OH</sub>	3
C <sub>-CH2-OH</sub>	6
C <sub>CH3O</sub>	15

фрагментов, при этом ароматическая часть структуры содержит большое количество незамещенных и О-замещенных фрагментов.

#### Изучение цитотоксических свойств СБФГ

Цитотоксические свойства СБФГ оценивали, культивируя клетки в присутствии различных концентраций этого вещества в течение 3–4 дней, с последующим определением жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста.

Исследование цитотоксичности в трех независимых экспериментах показало, что СБФГ является нетоксичным препаратом, причем как в отношении перевиваемой Т-клеточной линии СЕМ-SS, так и в отношении первичных клеток (МПК) (табл. 2).

ИД<sub>50</sub> – 50% ингибирующая доза, при которой инфекция подавляется на 50%; ТД<sub>50</sub> – цитотоксическая доза, при которой 50% клеток утрачивают жизнеспособность; индекс селективности, рассчитывается

Таблица 2. Антивирусная активность, цитотоксичность и индекс селективности СБФГ в перевиваемых и первичных CD4<sup>+</sup> Т-клетках

Клетки	Штамм ВИЧ	Ингибирование репродукции ВИЧ, мкг/мл			Цитотоксичность, ТД <sub>50</sub> , мкг/мл	Индекс селективности
		ИД <sub>90</sub>	ИД <sub>50</sub> ± SEM	R <sup>2</sup>		
СЕМ-SS	HIV-1 <sub>BRU</sub>	5.4	0.8 ± 0.3	0.87	708	865
	HIV-1 <sub>AR216</sub>	26.0	4.6 ± 0.55	0.79		
МПК	HIV-1 <sub>BRU</sub>	5.3	0.9 ± 0.2	0.91	631	701
	HIV-1 <sub>AR216</sub>	11.5	1.04 ± 0.38	0.85		

Таблица 3. Ингибирование вирусной репликации в клетках TZM-bl, МПК, макрофагах и дендритных клетках, инфицированных штаммами ВИЧ-1/SF-162, ВИЧ-1/QH0 и ВИЧ-1/Ba-L

Клетки	Вирусы	Ингибирующая концентрация, мкг/мл			
		ИД <sub>90</sub>	ИД <sub>80</sub>	ИД <sub>50</sub>	R <sup>2*</sup>
МПК	ВИЧ-1/SF-162	5.8	3.0	0.9 ± 0.25	0.89
	ВИЧ-1/QH0	60.0	20.0	9.8 ± 2.9	0.72
Макрофаги	ВИЧ-1/Ba-L	1.4	0.9	0.35 ± 0.1	0.78
Дендритные клетки	ВИЧ-1/Ba-L	21.0	12.0	6.8 ± 1.3	0.76
TZM-bl	Псевдовирус SF-162	24.0	-	5.0 ± 0.7	0.85
	Псевдовирус QH0	60.0	-	5.0 ± 1.2	0.87

\*R<sup>2</sup> приведен для значений ИД<sub>50</sub>.

как отношение ТД<sub>50</sub> к ИД<sub>50</sub>. Значения R<sup>2</sup> приведены для ИД<sub>50</sub>. Представлены средние данные, вычисленные по результатам изучения цитотоксических свойств и антивирусной активности СБФГ в трех независимых экспериментах.

#### Исследование антивирусной активности СБФГ на перевиваемых и первичных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, зараженных чувствительным и устойчивым штаммами ВИЧ-1

Результаты определения ингибирования экспериментальной ВИЧ-инфекции свидетельствуют о том, что СБФГ способен эффективно подавлять инфекцию как AZT-чувствительного (HIV-1/BRU), так и AZT-резистентного штаммов вируса (HIV-1/AR216) и в перевиваемых, и в первичных клетках (табл. 2). При этом для 50% подавления инфекции AZT-чувствительного штамма и в перевиваемых, и в первичных клетках требуется практически одинаковая концентрация препарата – менее 1 мкг/мл.

Ингибирование инфекции AZT-резистентного штамма несколько отличается в разных клеточных культурах: эффективность СБФГ в большей степени проявляется в МПК, тогда как для снижения инфекции на 50% в клетках СЕМ-SS концентрация должна быть более высокой. Следует также отметить достаточно высокие значения индекса селективности (600–800), характеризующего перспективность исследуемого препарата, при использовании донорских лимфоцитов (МПК). Эта клеточная модель более предпочтительна, чем перевиваемые клеточные культуры. Ограниченное применение МПК в экспериментальных исследованиях обусловлено рядом причин, основными из которых являются отсутствие стандартизации и вероятность индивидуальной устойчивости к ВИЧ-инфекции (во избежание последней мы использовали для заражения смесь МПК от трех серонегативных доноров).

#### Изучение антивирусных свойств СБФГ в МПК, макрофагах и дендритных клетках

Дальнейшее исследование антивирусной активности СБФГ проводили на клетках МПК, макрофагах (Мф) и дендритных клетках, которые заражали М-тропными штаммами ВИЧ-1: ВИЧ-1/SF-162, ВИЧ-1/Ba-L и ВИЧ-1/QH0 (табл. 3).

Проведенные исследования позволили оценить эффективность СБФГ в пулах разных иммунных клеток и получить данные, свидетельствующие о различной (дифференциальной) эффективности препарата в этих клетках.

Наиболее чувствительной к действию СБФГ оказалась инфекция в макрофагах, зараженных вариантом R5 ВИЧ-1/Ba-L: 90 и 50% ингибирование инфекции наблюдается при достаточно низких концентрациях препарата (табл. 3), тогда как для достижения того же уровня ингибирования инфекции в дендритных клетках, зараженных тем же самым штаммом, требуются в 15–19 раз более высокие концентрации препарата. Как показали наши исследования, подавление инфекции на 90% в МПК, зараженных штаммом SF-162 (фенотип R5), резистентным к нейтрализации антителами, происходит в присутствии 6.0 мкг/мл СБФГ. Следует отметить, что почти такая же концентрация препарата требовалась для 90% ингибирования штаммов ВИЧ-1 фенотипа X4 (табл. 2). Это наблюдение подчеркивает универсальность СБФГ как анти-ВИЧ-агента в отношении вирусов обоих фенотипов (R5 и X4). Однако наши исследования показывают, что встречаются штаммы ВИЧ-1, проявляющие большую устойчивость к действию СБФГ. Так, для ингибирования штамма ВИЧ-1/QH0 требуется в 10 раз более высокая концентрация СБФГ в клетках МПК. Наиболее вероятным объяснением этого факта может быть наличие геномных различий у разных штаммов и предсуществующих мутаций, обусловленных естественным полиморфизмом ВИЧ-1.

Несмотря на разницу в концентрациях, во всех вирус-клеточных системах при воздействии СБФГ достигается 90% подавление инфекции, что означает защиту существенной части клеток-мишеней, подвергающихся вирусной атаке. Обнаруженные различия в уровне ингибирования инфекции в разных пулах иммунных клеток, не зависящие от фенотипа вируса, говорят, вероятно, о различиях в биодоступности препарата. Неодинаковое проникновение лекарственных препаратов в различные клетки (ткани) – давно известный факт. Следствием этого может быть концентрация препарата, недостаточная (субоптимальная) для ингибирования вируса. Неполное подавление репликации вируса приводит к возникновению условий, благоприятных для селективного отбора резистентных форм. Это необходимо учитывать в доклинических исследованиях новых препаратов и более детально изучать ингибиторы репликации вируса с использованием пулов индивидуальных иммунных клеток, участвующих в патогенезе ВИЧ.

Известно, что при ВИЧ-инфекции наблюдается прогрессирующее уменьшение субпопуляций иммунных клеток, что неизбежно приводит к снижению функций иммунитета, среди которых можно выделить наиболее существенные: антигенпрезентирующую, стимулирующую Т-клеточные пролиферативные реакции, регулирующую выработку антител В-клетками. При этом снижается также скорость обновления клеточных популяций. Механизмы гибели иммунных клеток во время острой и хронической инфекции полностью не установлены, но известно, что они, скорее всего, включают прямое инфицирование, апоптоз и действие ЦТЛ. Наши исследования показали возможность почти полного подавления ВИЧ-инфекции (более 90%) с помощью СБФГ, что означает возможность сохранения функциональности иммунной системы. Очень важным результатом данного исследования является также особенно высокая эффективность СБФГ в ингибировании ВИЧ-инфекции в макрофагах. Макрофаги, как и Т-клетки памяти, служат резервуарами вируса, наличие которых составляет главную причину невозможности полной эрадикации вируса и необходимости пожизненной анти-ВИЧ-терапии.

Известно, что субпопуляция Т-хелперов фенотипа 17 (Th17), продуцирующих интерлейкин-17, наиболее чувствительна к заражению ВИЧ и, как следствие, подвержена быстрому истощению [38]. Интерлейкин-17 играет ключевую роль в поддержании непроницаемости слизистых кишечника [39]. Утрата IL-17 приводит к деструкции слизистого барьера и увеличению транслокации микробов, что, в свою очередь, приводит к ВИЧ-ассоциированной иммунной гиперактивации [40–43]. Новые знания

об участии фенотипически различных, значимых для патогенеза ВИЧ-инфекции субпопуляций иммунных клеток, открывают новые возможности для оценки анти-ВИЧ-потенциала новых соединений.

### Исследование воспроизводимости анти-ВИЧ-эффекта препарата СБФГ

В исследовании эффективности СБФГ немаловажно было понять, не изменяется ли эффективность препарата в сериях, полученных в разное время. Было проверено шесть серий и показано, что разные препараты действуют практически одинаково, дозозависимо ингибируя ВИЧ-инфекцию в сходных концентрациях с высоким индексом селективности в различных вирус-клеточных системах оценки и с различными вариантами ВИЧ-1: ВИЧ-1/BRU и TZM-bl-псевдовирус (табл. 4, 5 и рисунок).

В трех независимых экспериментах по ингибированию одноциклового инфекции в клетках TZM-bl, зараженных псевдовиром, *env*-последовательности которых соответствуют различным стадиям инфекции/путям заражения и относятся к трем различным подтипам (A, B, C) и двум циркулирующим рекомбинантным формам ВИЧ-1, показано, что СБФГ активно ингибирует инфекцию. Экспрессионные векторы для получения псевдовиром выбраны из стандартной панели контрольных штаммов ВИЧ-1 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program; NIH ARRRP), которые используются в качестве эталонных для оценки нейтрализующих антител и исследования анти-ВИЧ-активности соединений. При этом значения 50% ингибирующей дозы ( $ID_{50}$ ) составляют: для Q769.d22 – 0.62–0.75 мкг/мл; для WITO4160.33 – 0.49–0.55 мкг/мл; для CE1176\_A3 – 0.95–1.13 мкг/мл; для 703357.c02 – 0.91–0.98 мкг/мл и для VJOX002000.03.2 – 0.99–1.19 мкг/мл (рисунок).

Таблица 4. Сравнительная оценка эффективности шести серий СБФГ в экспериментальной ВИЧ-инфекции – СЕМ-SS/ВИЧ-1-BRU

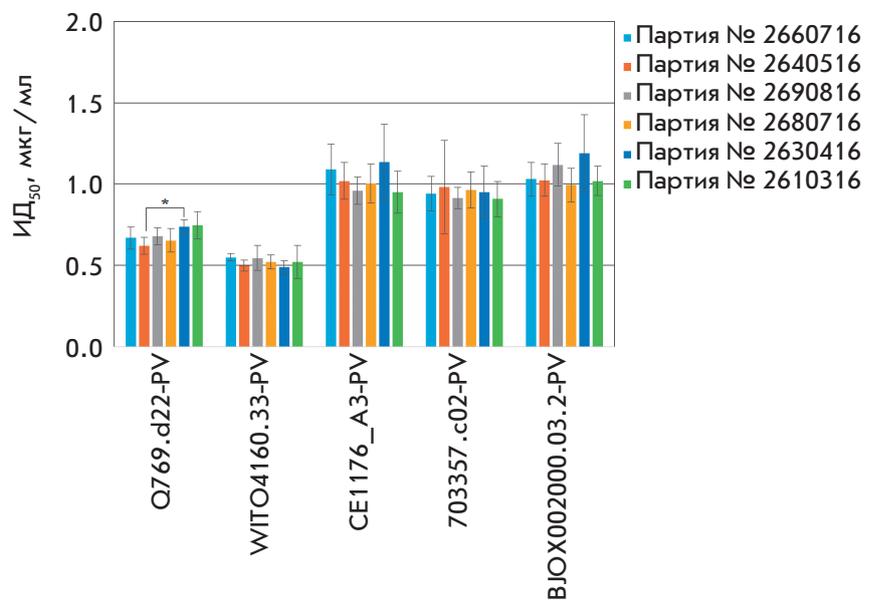
СБФГ, серия, №	Цитотоксичность $TD_{50} \pm SEM$ , мкг/мл	Ингибирующая концентрация, мкг/мл		Индекс селективности
		$ID_{90}$	$ID_{50} \pm SEM$	
2660716	1100.0 ± 123	0.90	0.31 ± 0.012	3548
2640516	1251.0 ± 380	1.10	0.36 ± 0.001	3475
2690816	985.0 ± 210	0.95	0.34 ± 0.021	2897
2680716	1230.0 ± 138	1.00	0.38 ± 0.01	3242
2630416	1150.0 ± 226	0.95	0.35 ± 0.023	3285
2610316	1159.0 ± 195	0.94	0.31 ± 0.15	3738

Таблица 5. Панель псевдовирусов ВИЧ-1, использованных для инфицирования клеток TZM-bl (одноцикловая инфекция)

Изолят	Происхождение, страна	Подтип	Стадия инфекции	Способ заражения
Q769.d22-PV	Кения	A	Острая/начальная	Половой
WITO4160.33-PV	США	B	II	Половой
CE1176_A3-PV	Малави	C	I/II переданный «вирус-основатель»	Половой
703357.c02-PV	Тайланд	CRF01_AE	I/II	Половой
BJOX002000.03.2-PV	Китай/Пекин	CRF07_BC	I/II	ПИН*

\*Потребители инъекционных наркотиков.

**Рисунок.** Оценка эффективности СБФГ в условиях одноцикловой инфекции с использованием клеток TZM-bl и пяти псевдовирусных вариантов ВИЧ. Не выявлено статистически значимых различий в ингибировании псевдовирусов протестированными партиями СБФГ, за исключением ингибирования псевдовируса Q769.d22-PV партиями № 2640516 и № 2630416 (\*) при  $p < 0.05$



### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные данные, можно сказать, что СБФГ эффективно ингибирует экспериментальную ВИЧ-инфекцию, обладает защитным эффектом против различных подтипов и циркулирующих рекомбинантных форм вируса. Надежность метода фракционирования, использованного для получения стандартизированных фракций гуминовых кислот, подтверждена экспериментами с шестью различными сериями препарата.

На Международном съезде по гуминовым веществам в 1988 году ряд ученых предсказывали большое будущее соединениям гуминовой природы в лечении разнообразных болезней [44]. К настоящему времени накоплено достаточно знаний об уникальных свойствах гуматов, обладающих противовос-

палительным и ранозаживляющим, противогрибковым и бактерицидным, и даже противоопухолевым действием. Несмотря на такие уникальные свойства, нельзя сказать, что в последующие годы проводились масштабные научно-исследовательские исследования гуматов. В итоге лишь две компании (американская и российская) создали лекарственные препараты на основе гуминовых веществ со всеми необходимыми доклиническими и клиническими испытаниями их безопасности и эффективности [30]. Данная работа дополняет имеющиеся знания терапевтических свойств таких уникальных природных соединений, как гуматы. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ ERA\_Net RUS plus № 16-54-76005.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geissmann F. // Nat. Immunol. 2007. № 8. P. 558–560.
2. Epelman S., Lavine K.J., Randolph G.J. // Immunity. 2014. № 41. P. 21–35.
3. Alvarez-Errico D., Vento-Tormo R., Sieweke M., Ballestar E. // Nat. Rev. Immunol. 2015. № 15. P. 7–17.
4. Wacleche V.S., Tremblay C., Routy J.-P., Ancuta P. // Viruses. 2018. V. 2. № 10. P. 65.

5. Stevenson M. // *J. Neurovirol.* 2015. № 21. P. 242–248.
6. Bagasra O., Hauptman S.P., Lischner H.W., Sachs M., Pomerantz R.J. // *N. Engl. J. Med.* 1992. № 326. P. 1385–1391.
7. Embretson J., Zupancic M., Ribas J., Burke A., Rack P., Tenner-Racz K., Haase A. // *Nature.* 1993. № 362. P. 359362.
8. Klatzmann D., Barre-Sinoussi F., Nugeyre T., Dauquet C., Vilmer E., Griscelli C., Brun-Vezinet F., Rouzioux C., Gluckman C., Chermann J.C. // *Science.* 1984. № 225. P. 59–62.
9. Siliciano J.D., Siliciano R.F. // *J. Clin. Investig.* 2000. № 106. P. 823–825.
10. Brenchley M., Hill B., Ambrozak D., Price A., Guenaga F., Casazza J., Kuruppu J., Yazdani J., Migueles S., Connors M., Roederer M., Couek D., Koup R.A. // *J. Virol.* 2004. № 78. P. 1160–1168.
11. Chun W., Chadwick K., Margolick J., Siliciano R.F. // *J. Virol.* 1997. № 71. P. 4436–4444.
12. Schnittman M., Lane H., Greenhouse J., Justement J., Baseler M., Fauci A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. № 87. P. 6058–6062.
13. Tardif M.R., Tremblay M.J. // *J. Virol.* 2005. № 79. P. 13714–13724.
14. Schweighardt B., Roy A.-M., Meiklejohn A., Grace J., Moretto J., Heymann F. // *J. Virol.* 2004. № 78. P. 9164–9173.
15. Blauvelt A., Asada H., Saville M., Klaus-Kovtun V., Altman D., Yarchoan R., Katz S. // *J. Clin. Investig.* 1997. № 100. P. 2043–2053.
16. Dittmar M.T., Simmons G., Hibbitts S., O'Hare M., Louisirothchanakul S., Beddows S., Weber J., Clapham P.R., Weiss R.A. // *J. Virol.* 1997. № 71. P. 8008–8013.
17. Granelli-Piperno A., Delgado E., Finkel V., Paxton W., Steinman R.M. // *J. Virol.* 1998. № 72. P. 2733–2737.
18. Zaitseva M., Blauvelt A., Lee S., Lapham C., Klaus-Kovtun V., Mostowski H., Manischewitz J., Golding H. // *Nat. Med.* 1997. № 3. P. 1369–1375.
19. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. // *Science.* 2010. № 327. P. 656–661.
20. Bakri Y., Schiffer C., Zennou V., Charneau P., Kahn E., Benjouad A., Gluckman J.C., Canque B. // *J. Immunol.* 2001. № 166. P. 3780–3788.
21. Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Paul W.E., Picker L.J. // *Nat. Med.* 2006. № 12. P. 289–295.
22. Levy J.A. *HIV and the pathogenesis of AIDS.* Copiring. ASM Press, USA, 2010.
23. Gendelman H.E., Orenstein J.M., Baca L.M., Weiser B., Burger H., Kalter D.C., Meltzer M.S. // *AIDS.* 1989. № 3. P. 475–495.
24. Bergamini A., Dini L., Capozzi M., Ghibelli L., Placido R., Faggioli E., Salanitro A., Buonanno E., Cappannoli L., Ventura L., Cepparulo M., Falasca L., Rocchi G. // *J. Infect. Dis.* 1996. № 173. P. 1367–1378.
25. Kwa D., Vingerhoed J., Boeser B., Schuitemaker H. // *J. Infect. Dis.* 2003. № 187. P. 1397–1403.
26. Филов В.А., Резцова В.В., Беркович А.М. // *Рос. биотерапевт. журн.* 2002. Т. 1. № 2.
27. Zhernov Y.V., Kremb S., Helfer M., Schindler M., Harir M., Mueller C., Hertkorn N., Avvakumova N.P., Konstantinov A.I., Brack-Werner R., Schmitt-Kopplin Ph., Perminova I.V. // *N. J. Chem.* 2017. № 41. P. 212–224.
28. Rice J. A., MacCarthy P. A. // *Environ. Sci. Technol.* 1990. № 24. P. 1875–1877.
29. Driver S.J., Perdue E.M. // *Environ. Eng. Sci.* 2015. V. 32. № 1. P. 66–70.
30. Grimalt J.O., Hermosín B., Inmaculada Y.G., Saiz-Jiménez C. // *Sci. Total Environ.* 1989. № 81. P. 421–428
31. Бузлама В.С., Беркович А.М., Бузлама А.В. // *Материалы сателлитного симпозиума «Новый отечественный препарат ОЛИПИФАТ».* М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2002.
32. Нежинская Г.И., Гавровская Л.К., Беркович А.М., Филов В.А. // *Вопросы онкологии.* 2005. Т. 51. № 5.
33. Kornilayeva G., Bercovich A., Pavlova T., Karamov E. // *XV International AIDS Conf.* 2004. 11–16 July, Bangkok, Thailand, abstract book. P. 167.
34. Scultz A., Koch S., Fuss M., Mazzotta A., Sarzotti-Kelsoe M., Ozaki D., Montefiori D., von Briesen H., Zimmermann H., Meyerhans A. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 12. P. 1–10.
35. Sarzotti-Kelsoe M., Bailer R.T., Turk E., Lin C.-L., Bilska M., Greene K.M., Gao H., Todd C.A., Ozaki D.A., Seaman M.S., et al. // *J. Immunol. Methods.* 2014. V. 409. P. 131–146.
36. Wei X., Decker J.M., Liu H., Zhang Z., Arani R.B., Kilby J.M., Saag M.S., Wu X., Shaw G.M., Kappes J.C. // *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 2002. V. 46. № 6. P. 1896–1905.
37. Mossman T. // *J. Immunol. Methods.* 1993. № 65. P. 55–63.
38. Mitsuki Y.Y., Tuen M., Hioe C.E. // *J. Leukoc. Biol.* 2017. V. 101. № 1. P. 339–350.
39. Guglani L., Khader S.A. // *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2010. № 5. P. 120–127.
40. Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W., Asher T.E., Silvestri G., Rao S., Kazzaz Z., Bornstein E., Lambotte O., Altmann D., et al. // *Nat. Med.* 2006. № 12. P. 1365–1371.
41. Dandekar S., George M., Bäuml A.J. // *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2010. № 5. P. 173–178.
42. Gordon S.N., Cervasi B., Odorizzi P., Silverman R., Aberra F., Ginsberg G., Estes J.D., Paiardini M., Frank I., Silvestri G. // *J. Immunol.* 2010. № 185. P. 5169–5179.
43. Vyboh K., Jenabian M.A., Mehraj V., Routy J.P. // *J. Immunol. Res.* 2015. № 6. P. 1–9.
44. Visser S.A. // *Internat. Humic Substances Soc. Meet. Sevilla, Spain, 1988.*