

## Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами

А. С. Гудымо, С. В. Мальцев, В. А. Евсеенко, Н. В. Данильченко, В. Ю. Марченко,  
А. Г. Дурыманов, А. Б. Рыжиков

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,  
Российская Федерация, Новосибирская область, 630559, пос. Кольцово

Поступила 10.08.2017 г. Принята к публикации 26.10.2017 г.

В статье описано первое использование сока и экстракта клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами. Для иммунизации использовали концентрацию антигенов 300 мкг/мл каждого субтипа. Адъювант добавлялся в концентрации 10 и 20 мг/мл. Сыворотки крови изучали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментном анализе (ИФА). После двух иммунизаций дозой 7,5 мкг максимальные обратные титры к H1/H3/В-компонентам в РТГА составили 320/80/80 соответственно. Введение интраназального препарата сравнения без адъюванта не привело к сероконверсии, детектируемой в РТГА. В сыворотках крови мышей, иммунизированных интраназально препаратом сравнения без адъюванта, не отмечено достоверного нарастания уровня антител между первым и вторым введением. В группах, иммунизированных интраназально препаратом, содержащим 10 мг/мл (0,5 мг в 1 дозе, объемом 50 мкл) адъюванта, отмечено значимое нарастание уровня антител между однократной и двукратной иммунизацией для всех компонентов, детектированных в ИФА, а средние уровни антител сопоставимы с ответом, полученным на однократное внутримышечное введение дозы препарата, содержащей 5 мкг каждого антигена. Несмотря на разброс значений титров сывороток крови между животными, который мы связываем с невозможностью стандартного внесения 50 мкл препарата в носоглотку мыши, применение экстракта в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей высококонцентрированными гриппозными антигенами показало выраженный гуморальный ответ. Уровень этого ответа после двукратной иммунизации у некоторых животных сравним с ответом на гриппозные вакцины при внутримышечном введении. Полученные данные позволяют рассматривать сок и экстракт клубней цикламена европейского или его синтетические аналоги для дальнейших исследований на морских свинках, хорьках или других животных-моделях с целью разработки эффективного адъюванта для интраназальной вакцинации.

**Ключевые слова:** экстракт; цикламен; вакцина; адъювант; интраназальный; иммунизация; грипп; респираторный; инфекция.

**Библиографическое описание:** Гудымо АС, Мальцев СВ, Евсеенко ВА, Данильченко НВ, Марченко ВЮ, Дурыманов АГ, Рыжиков АБ. Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(4): 233–239.

Вирус гриппа ежегодно привлекает внимание медицинского сообщества и общественности, вызывая локальные вспышки и эпидемии. Помимо гибели людей, тяжелых осложнений и другого ущерба здоровью, заболевание вызывает нетрудоспособность значительного числа людей, а как следствие — экономические потери. В настоящий момент для вакцинации используются как живые, так и инактивированные вакцины. К живым вакцинам относят Flumist («MedImmune», США), широко применяемую в США, Канаде и Ультравак («Микроген», Россия), доля которой невелика. В основе этих вакцин лежит реассортант холодоадаптированного варианта вируса гриппа и актуальных штаммов вируса гриппа A(H3N2), A(H1N1)pdm09 и B. В настоящий момент доступна и четырехвалентная версия Flumist («MedImmune», США), содержащая помимо антигенов A(H3N2), A(H1N1)pdm09, антигены вирусов двух основных групп (линий) гриппа B — Yamagata и Victoria.

Инактивированных вакцин значительно больше. Они представлены несколькими вариантами, различающимися

ся по степени подготовки антигена (цельновирионные, расщепленные, субъединичные), наличию адъюванта и субстрата, на котором культивируются антигены (развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ), культуры клеток). Также в некоторых странах доступны четырехвалентные инактивированные варианты вакцин.

Из-за малых объемов производства применение вакцин от гриппа изначально предполагало защиту людей из групп риска. С появлением технологий массового производства, вакцинация от гриппа стала способом формирования протективной иммунной прослойки, препятствующей эпидемическому процессу, и средством управления заболеваемостью в масштабах государства. В некоторых благополучных странах избежать эпидемий, гибели людей и значительного экономического ущерба не удастся, несмотря на охват населения прививками против гриппа в соответствии с рекомендациями Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

Исследования, проводившиеся в США, показали следующие ориентировочные данные по эффективности

гриппозных вакцин. Для возрастной группы 18–64 лет эффективность инaktivированных тривалентных вакцин варьировала от 16 до 75 %. Для детей возраста 6–24 месяцев — от 7 до 66 %. Применение живых вакцин показало следующие результаты. Для группы возраста 6 месяцев–7 лет — от 57 до 93 %, 18–49 лет — от 8 до 48 %, для взрослых старше 60 лет — в среднем 42 %. Существенный разброс определяется степенью соответствия вакцинных штаммов патогенным циркулирующим вирусам в различные периоды исследований и методикам проведения исследований [1]. По данным, полученным в Нидерландах, с учетом диагностически подтвержденных случаев заболевания гриппом было установлено, что усредненная эффективность современных гриппозных вакцин составляет около 40 % в случае полного соответствия вакцин эпидемическим вирусам и 20 %, если хотя бы один компонент тривалентной вакцины серологически не идентичен [2]. Учитывая повсеместное применение вакцин на основе антигенов, произведенных на РКЭ, и формирующих гуморальный ответ, имеющий низкую нейтрализующую активность в отношении циркулирующих вариантов, требуется по-новому рассмотреть перспективы использования препаратов, полученных на клеточных культурах, а также различные способы доставки антигена [3, 4].

В начале 2000-х годов компанией «Berna Biotech» (Берн, Швейцария) на европейский рынок была выведена инaktivированная интраназальная вирусомальная противогриппозная вакцина NasalFlu. Эта вакцина была получена путем включения гемагглютинина и нейраминидазы в мембраны липосом, состоящих из фосфатидилхолина и интраназального адъюванта на основе термолабильного токсина *Escherichia coli* (Heat-labile toxin, HLT). Двукратное интраназальное введение адъювантной-HLT вирусомальной вакцины гриппа индуцировало гуморальный иммунный ответ, который сравним с таковым при однократной парентеральной вакцинации. Высокая индукция специфического для вируса гриппа иммуноглобулина А была отмечена в слюне после двух назальных применений. Это показало, что использование HLT в качестве адъюванта для слизистой оболочки необходимо для получения гуморального иммунного ответа, сравнимого с парентеральной вакцинацией [5, 6]. Все серии показали хорошую переносимость и соответствовали необходимым критериям, предъявляемым к гриппозным вакцинам, прошли клинические исследования на взрослых и детях и были разрешены к применению в Швейцарии. В 2000–2001 гг. в Швейцарии было зафиксировано 46 случаев паралича Белла. Несмотря на то, что нормальная встречаемость заболевания составляет от 15 до 40 случаев на 100000 населения, зафиксированные случаи некоторые исследователи связали с применением вакцины NasalFlu [7]. Публикация этих данных в научной литературе и средствах массовой информации привела к исчезновению вакцины NasalFlu и ее производителя — компании «Berna Biotech» (Берн, Швейцария). В тоже время была показана высокая перспективность данного подхода в случае использования безопасных интраназальных адъювантов.

Перспективной группой иммуностимулирующих адъювантов являются тритерпеноидные гликозиды или сапонины, полученные из растительных источников. Характерной особенностью сапонинов является способность к гемолизу. Гидрофобная часть молекулы сапонина интегрируется в клеточную мембрану. Стерическая интерференция этих комплексов вызывает кривизну мембраны, ведущую к образованию пор в мембране. Эти процессы несут

дозозависимый эффект. Для стандартизации медицинских препаратов на основе сапонинов используют гемолитический индекс. Сапонины широко используются в качестве адъювантов в течение многих лет и включены в несколько ветеринарных вакцин. Было показано, что QS21, высокоочищенная фракция из Quil A (*Quillaja saponaria*), является адъювантом для Th1 цитокинов (IL-2 и IFN- $\gamma$ ) и антител изотипа IgG2a, что указывает на Th1-ответ у мышей [8, 9].

Исследовалась возможность использования наноэмульсий гриппозных антигенов для интраназальной вакцинации. Полученные результаты заложены в основу перспективных интраназальных вакцин от гриппа, респираторно-синцитиального вируса, вируса простого герпеса, разрабатываемых компаниями «NanoBio» (США) [10]. Также подтверждают целесообразность этого направления данные об адъювантных свойствах маннатида (Mannatide, гетерополисахарид, выделенный из гемолитического штамма *Streptococcus*) при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами [11]. Особый интерес к интраназальному введению инaktivированных гриппозных антигенов вызван формированием кросс-протективного иммунитета в отношении различных субтипов вирусов гриппа [12].

При выборе потенциальных субстанций на роль интраназального адъюванта учитывались следующие факторы: препарат должен быть зарегистрирован как лекарственное средство, подтвердившее свою безопасность и свободно обращающееся в аптечной сети; иметь очевидный механизм взаимодействия с эпителием. Сок и экстракт клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) содержат тритерпеноидные гликозиды, которые определяют его гемолитические свойства, и широко применяются для лечения синуситов.

Цель исследования — оценка сероконверсии после однократного и двукратного интраназального введения экспериментального препарата, содержащего антигены вируса гриппа, сок и экстракт клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве иммуностимулирующего адъюванта.

Для достижения цели работы предполагалось решить следующие задачи: подготовить экспериментальные и контрольные препараты; провести интраназальную иммунизацию мышей экспериментальными и контрольными препаратами, внутримышечную иммунизацию мышей разными дозами антигена, не содержащими адъювант, согласно схеме иммунизации; получить сыворотки крови мышей, провести их анализ методами РТГА, ИФА и оценить уровень сероконверсии.

## Материалы и методы

### Подготовка препаратов

Дозировку антигена для внутримышечной иммунизации мышей выбирали с целью квалификации антигена, использовавшегося при изготовлении интраназального препарата, и подтверждения его иммуногенных свойств.

Дозировка антигена в интраназальном препарате была обусловлена следующими факторами. Целесообразно использовать то количество антигена, которое входит в применяющиеся инaktivированные гриппозные вакцины, вводимые парентерально. За ориентир были взяты вакцины, содержащиеся в дозе 15 мкг каждого антигена. Исходя из данных о необходимости двукратного интраназального

введения препарата для достижения значимой сероверсии, приведенных в работе R. Gluck [6], была выбрана доза 7,5 мкг каждого антигена.

Концентрация адъюванта была выбрана в соответствии с инструкцией к лекарственному препарату, использовавшемуся как источник сока и экстракта клубней цикламена, рекомендованному для лечения синуситов у детей старше 5 лет и взрослых, т.е. 10 мг/мл (0,5 мг/доза). Для оценки потенциального усиления эффекта была выбрана доза 20 мг/мл (1 мг/доза).

Перед вакцинацией мышей препарат коммерчески доступной трехвалентной инактивированной расщепленной гриппозной вакцины, содержащий антигены штаммов, подобных A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), B/Phuket/3073/2013, натрия хлорид, калия хлорид, натрия гидрофосфата дигидрат, калия дигидрофосфат и воду, сконцентрировали в 10 раз (до итоговой концентрации гемагглютиниона каждого субтипа 300 мкг/мл) при помощи центрифужных мембранных концентраторов с диаметром пор 100 кДа («Millipore», США) в соответствии с инструкцией производителя. Используемая коммерчески доступная вакцина являлась стерильной. Концентрацию антигенов подтверждали в реакции одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД) с использованием стандартов антигенов и сывороток, полученных из Национального института биологических стандартов и контроля, Соединенное Королевство (NIBSC, UK) [13]. Лиофилизат сока и экстракта клубней цикламена европейского свежих 50 мг («FARMA MEDITERRANIA», S. L., Испания) разводили водой для инъекций в объеме 500 мкл. Стерильность адъюванта не проверяли. Адъювант хранили до использования при температуре 4 °С. Активность препарата подтверждали в гемолитической реакции. Реакцию проводили в микропланшетах. Титровали по схеме 50 мкл воды для инъекций + 50 мкл препарата. Во все лунки добавляли 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов петуха в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4. Контроль неспецифического лизиса проводили в 4 лунках, содержащих 50 мкл воды, 50 мкл 0,5 % суспензии эритроцитов петуха в ФСБ, pH 7,4. Через 45 мин фиксировали

разведение, при котором наблюдался полный лизис эритроцитов, и разведение, в котором лизиса не наблюдалось. Гемолитическую реакцию использовали для подтверждения стабильности хранения адъюванта между иммунизациями. В данной реакции индекс использовавшегося адъюванта составил 1:512–1:1024 после регидратации препарата и сохранялся в течение 2 недель. Сведение компонентов проводили непосредственно перед иммунизацией в стерильных условиях.

#### Иммунизация мышей

Работы проводили в соответствии с «Политикой Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ФБун ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора в области работы с лабораторными животными». Самок аутбредных мышей ICR весом 16–18 г получали из вивария ФБун ГНЦ ВБ «Вектор». До начала иммунизации экспериментальные животные находились на адаптационном карантине и стандартном рационе вивария *ad libitum*. Эксперименты включали 10 групп по 4 мыши в каждой (табл. 1).

Внутримышечное введение осуществляли с соблюдением стерильности. Интраназальное введение проводили без предварительной подготовки животных. Наркотизацию животных при внутримышечной и интраназальной вакцинации не проводили.

Иммунизацию трех групп мышей осуществляли путем внутримышечного введения 50 мкл препаратов, содержащих 15, 5 и 1 мкг каждого антигена вируса гриппа соответственно, в бедренную мышцу обеих задних конечностей в объеме 25 мкл на инъекцию (суммарно 50 мкл). Для введения малого объема препарата и четкой дозировки использовали 1-мл шприц с дополнительно надеваемым на поршень пластиковым ограничителем, который не позволял ввести больше забранной из пробирки дозы (25 мкл). Дозу 25 мкл предварительно вносили в пробирку объемом 0,2 мл автоматической пипеткой, откуда 1-мл шприцем, содержащим около 150 мкл препарата без воздушных пузырей, полностью отбирали. Проводили интраназальную иммунизацию 6 групп препаратом, содержа-

Таблица 1. Результаты анализа сывороток крови в РТГА

| № группы | Препарат                                  | Доза антигена, мкг | Способ иммунизации | Кратность иммунизации | СГТ (H1)    | СГТ (H3)  | СГТ (B)    |
|----------|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------------|-----------|------------|
| 1        | Антиген                                   | 15                 | Внутримышечно      | 1                     | 57 (20–80)  | 5         | 12 (5–20)  |
| 2        | Антиген                                   | 5                  | Внутримышечно      | 1                     | 20 (10–80)  | 5         | 6 (5–10)   |
| 3        | Антиген                                   | 1                  | Внутримышечно      | 1                     | 14 (10–20)  | 5         | 5          |
| 4        | Антиген                                   | 7,5                | Интраназально      | 1                     | 5           | 5         | 5          |
| 5        | Антиген                                   | 7,5                | Интраназально      | 2                     | 5           | 5         | 5          |
| 6        | Антиген + Адъювант 10 мг/мл (0,5 мг/доза) | 7,5                | Интраназально      | 1                     | 10 (5–80)   | 5         | 5          |
| 7        | Антиген + Адъювант 10 мг/мл (0,5 мг/доза) | 7,5                | Интраназально      | 2                     | 40 (5–320)  | 20 (5–80) | 64 (20–80) |
| 8        | Антиген + Адъювант 20 мг/мл (1 мг/доза)   | 7,5                | Интраназально      | 1                     | 16,8 (5–80) | 5         | 5          |
| 9        | Антиген + Адъювант 20 мг/мл (1 мг/доза)   | 7,5                | Интраназально      | 2                     | 160         | 5         | 80         |
| 10       | Адъювант 10 мг/мл (0,5 мг/доза)           | 0                  | Интраназально      | 2                     | 5           | 5         | 5          |

**Примечание.** Приведены средние геометрические значений обратных титров (СГТ) и интервал значений. Значения в РТГА <10 в расчетах считали равными 5. Данные для группы 9 приведены для 1 животного.

щим 7,5 мкг антигена вируса гриппа и дополнительно экстракт цикламена в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза) и 20 мг/мл (1 мг/доза) (табл. 1). Дозу 50 мкл препарата с помощью автоматической пипетки наносили на носовую ход зафиксированной мыши, пока весь объем не проходил через носоглотку в рот животного. Точного дозирования не предполагалось. Повторную интраназальную иммунизацию проводили через 14 суток. Экспериментальным животным, составляющим группу сравнения отрицательного контроля, интраназально вводили 50 мкл раствора адьюванта с концентрацией 10 мг/мл (0,5 мг/доза).

Кровь у мышей, анестезированных зоветилом, брали из ретроорбитального синуса на 21-е сутки после начала иммунизации. Сыворотку от сгустка отделяли центрифугированием при 1500 об/мин (200g) в течение 10 мин. Сыворотку крови переносили в новые пробирки и хранили в низкотемпературном холодильнике при минус 20 °С.

### Реакция торможения гемагглютинации

Полученную сыворотку крови перед постановкой РТГА в течение 18 ч обрабатывали препаратом нейраминидазы холерного вибриона (receptor destroying enzyme, RDE, производства «Denka Seiken», Япония) согласно инструкции производителя для удаления неспецифических термостабильных ингибиторов, затем прогревали на водяной бане при 56 °С для удаления неспецифических термолabile ингибиторов и инактивации ферментативной активности RDE. Сыворотки крови исследовали в РТГА против 4 гемагглютинирующих единиц антигена вируса соответствующего серотипа. Для определения титра сывороток крови серотипов H1N1 в РТГА использовали 0,5 % суспензию эритроцитов петуха в ФСБ, pH 7,4 и 96-луночный планшет с V-образным дном (Greiner Bio-One GmbH, Германия); для антигена субтипа H3 использовали 1 % суспензию эритроцитов морской свинки [14]. При расчете средних геометрических титров (СГТ), значения в РТГА <1/10 считали равными 5. В качестве антигенов использовали инактивированные бета-пропиолактоном вирусы гриппа штаммов A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), B/Phuket/3073/2013 (International Reagent Resource, США). Также в РТГА использовали комплиментарные этим штаммам хоряковые антисыворотки, предназначенные для контроля иммуногенности существующих гриппозных вакцин (International Reagent Resource, США).

### Иммуноферментный анализ

Инактивированный вирусный антиген (International Reagent Resource, США) разбавляли в 25 раз ФСБ, pH 7,4 (ООО «БиолоТ», Россия), раствор вносили в полистироловые планшеты (SPL Lifesciences, Республика Корея) по 50 мкл в лунку и оставляли на ночь при комнатной температуре до полного высыхания. Планшет с сорбированным антигеном промывали 3 раза ФСБ-Т (ФСБ с добавлением 0,05 % Твин-20). Сыворотки крови вносили в серийных двукратных разведениях, начиная с 1:100 по 100 мкл в лунку и инкубировали 1,5 ч при комнатной температуре. После отмывки от сыворотки планшет заполняли раствором антител козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена («Абсам», США) в разведении 1:20000 и инкубировали при комнатной температуре 40 мин. После очередной промывки заполняли лунки готовым к использованию раствором тетраметилбензидина и оставляли в темноте на 30 мин. Реакцию тормозили 5 % раствором серной кислоты и оптическую плотность

измеряли на планшетном фотометре (Multiscan EX, Thermo Scientific, США) при 450 нм. Титр сыворотки определяли как максимальное разведение, при котором оптическая плотность превышала фоновый сигнал конъюгата в 2 раза.

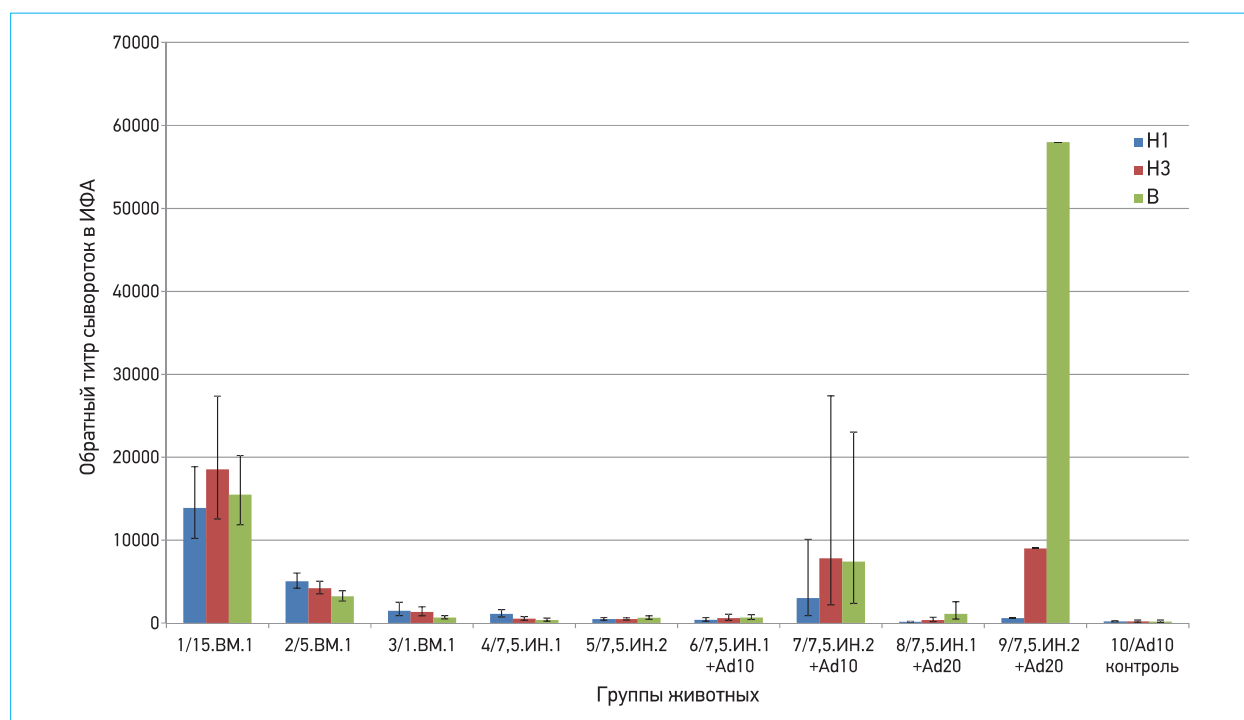
### Статистическая обработка данных

Результаты экспериментов обрабатывали статистически с помощью программы Excel Microsoft. Для данных РТГА определяли среднее геометрическое значений обратных титров. Данные ИФА приведены в диаграмме средних геометрических значений обратных титров с доверительным интервалом (ДИ) (рис. 1). ДИ для средних геометрических был определен следующим образом. Полученные значения титров ИФА логарифмировали по основанию 2, после чего определяли среднее арифметическое значение логарифмов и ДИ<sub>95</sub> при  $p = 0,95$  для них. Максимальное значение ДИ<sub>95max</sub> рассчитывали путем добавления к среднему значению ДИ, а минимальное значение ДИ<sub>95min</sub> — путем вычитания из среднего ДИ. После этого проводили потенцирование среднего арифметического значения максимальной и минимальной величины ДИ путем возведения в степень 2 значений среднего арифметического ДИ<sub>95max</sub> и ДИ<sub>95min</sub>.

### Результаты и обсуждение

В ходе проведения эксперимента отмечалось патологическое влияние адьюванта при интраназальном применении на организм мыши. В частности, после иммунизации препаратом, содержащим адьювант в концентрации 20 мг/мл (1 мг/доза), через 1–3 ч наблюдалось беспокойное поведение мышей, чихание, покраснение носа, взъерошенная шерсть на голове. Отдельные животные этой группы переставали питаться и практически не двигались. Наблюдалось развитие отека головы, одышка. Гибель наступала в течение двух-трех суток после применения препарата. В то же время другие мыши этой группы проявляли только беспокойное поведение; чихания, покраснения носа, отека и гибели не происходило. Мы связываем это с возможным попаданием препарата в бронхи с последующим поражением и развитием отека легкого, затруднением дыхания, приводившего к гипоксии и гибели животного. При применении препарата, содержащего адьювант в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза), наблюдались те же признаки, но гибель животных не происходила. Из 8 мышей, иммунизированных данным препаратом, погибла только одна мышь.

Результаты РТГА представлены в таблице 1. Данные для группы 9 представлены титрами сыворотки одного животного и статистической обработке не подвергались. Одно животное этой группы погибло на 3-и сутки после первой вакцинации, 2 животных погибло после второй вакцинации на 2-е и 3-и сутки. Наиболее выраженный ответ отмечен для компонента A(H1N1)pdm09. Максимальный титр 1/320 определен в сыворотке крови животного после двукратной интраназальной иммунизации препаратом, содержащим 7,5 мкг каждого антигена и адьювант в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза). Наименьшим был ответ на A(H3N2) компонент, только в одной группе сыворотки тормозили гемагглютинацию, максимальный титр составил 1/80. Максимальный ответ на компонент В отмечен в группах 7 и 9, он составил 1/80. Анализ средних геометрических титров групп 4 и 5 показывает, что прироста сывороточных титров у животных, иммунизированных интраназально препаратом без адьюванта, между первой и



**Рис. 1.** Результаты анализа сывороток крови в ИФА. Группы маркированы как «номер группы/доза (мкг). путь введения (BM — внутримышечно, ИН — интраназально). кратность иммунизации (1 или 2) + адъювант в концентрации (10 мг/мл (0,5 мг/доза) или 20 мг/мл (1 мг/доза))».

второй вакцинацией в РТГА не наблюдалось или фиксировалось снижение значений. В группах 6, 7 и 8, 9 отмечен прирост для всех субтипов.

Результаты, полученные в ИФА, свидетельствуют о наличии дозозависимого эффекта для всех компонентов в группах 1, 2 и 3, в которых животные иммунизировались внутримышечно. В сыворотках крови мышей групп 4 и 5, иммунизированных интраназально препаратом сравнения без адъюванта, не отмечено достоверного нарастания уровня антител между первым и вторым введением. В группах 6 и 7, иммунизированных интраназально препаратом, содержащим 10 мг/мл (0,5 мг/доза) адъюванта, отмечено значимое нарастание уровня антител между однократной и двукратной иммунизацией для всех компонентов, а средние уровни антител сопоставимы с ответом, полученным на однократное внутримышечное введение препарата, содержащего 5 мкг каждого антигена (антитела детектировали в ИФА). Группы 8 и 9, иммунизированные препаратом, содержащим 20 мг/мл (1,0 мг/доза) адъюванта, анализу не поддаются из-за гибели 3 из 4 животных группы 9 в ходе эксперимента.

Полученные данные свидетельствуют о том, что предлагаемое применение интраназальной двукратной иммунизации позволяет получать гуморальный ответ у некоторых животных, сравнимый с ответом после внутримышечной иммунизации. Разброс значений, с нашей точки зрения, обусловлен индивидуальным иммунным статусом мышей линии ICR и качественным введением препарата в носоглотку мыши, не предполагавшим точной дозы введения. На мышинной модели невозможно обеспечить стандартное введение препарата интраназально в объеме 50 мкл. Меньший объем требовал концентрирования исходного коммерческого препарата более чем в 10 раз, что неизбежно приводило бы к агрегации и искажению вводимой дозы. Важным фактором, с нашей точки зрения,

обусловившим высокие титры сыворотки крови у некоторых животных, является высокая концентрация каждого антигена — 300 мкг/мл. Для дальнейшего анализа перспективности описанного подхода необходимо проведение исследований на более крупных животных, например, морских свинках или хорьках, которым возможно полноценное интраназальное введение спрея. Кроме того, необходимо исключить попадание препарата в бронхи и нижние дыхательные пути модельных животных. Продолжительное использование сока и экстракта клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) при терапии синуситов у человека, подтвердившее безопасность его применения, позволяет нам сфокусироваться на иммуногенности и протективности разрабатываемых нами препаратов [15].

## Выводы

Несмотря на существенный разброс значений титров сывороток крови животных, который мы связываем с невозможностью стандартного внесения 50 мкл препарата в носоглотку мыши, применение сока и экстракта клубней цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адъюванта при интраназальной иммунизации мышей высококонцентрированными гриппозными антигенами показало выраженный гуморальный ответ. Уровень этого ответа после двукратной иммунизации у некоторых животных сравним с ответом на гриппозные вакцины при внутримышечном введении.

Учитывая гибель подавляющего числа экспериментальных животных после интраназального введения препарата, содержащего адъювант в концентрации 20 мг/мл (1 мг/доза), целесообразно в дальнейших исследованиях использовать препараты с адъювантом в концентрации 10 мг/мл (0,5 мг/доза). Для получения объективных дан-

ных по иммуногенности и безопасности препаратов, содержащих сок и экстракт клубней цикламена европейского, целесообразно использовать животных, имеющих сходное с человеческим строение носоглотки.

Полученные данные позволяют рассматривать сок и экстракт клубней цикламена европейского или его синтетические аналоги как адъювант для разработки интраназальных вакцин от острых респираторных вирусных заболеваний.

## Литература

- Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(1): 36–44.
- Darvishian M, Dijkstra F, van Doorn E, Bijlsma MJ, Donker GA, de Lange MM, et al. Influenza vaccine effectiveness in the Netherlands from 2003/2004 through 2013/2014: The importance of circulating influenza virus types and subtypes. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169528.
- Raymond DD, Stewart SM, Lee J, Ferdman J, Bajic G, Do KT, et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat Med*. 2016; 22(12): 1465–9.
- Lee J, Boutz DR, Chromikova V, Joyce MG, Vollmers C, Leung K, et al. Molecular-level analysis of the serum antibody repertoire in young adults before and after seasonal influenza vaccination. *Nat Med*. 2016; 22(12): 1456–64.
- Glück R. Intranasal immunization against influenza. *J Aerosol Med*. 2002; 15(2): 221–8.
- Glück U, Gebbers JO, Glück R. Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. *J Virol*. 1999; 73(9): 7780–6.
- Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med*. 2004; 350(9): 896–903.
- Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 2011; 72(6): 435–57.
- Vajdy M, Srivastava I, Polo J, Donnelly J, O'Hagan D, Singh M. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol Cell Biol*. 2004; 82(6): 617–27.
- Hamouda T, Chepurinov A, Mank N, Knowlton J, Chepurnova T, Mys A, et al. Efficacy, immunogenicity and stability of a novel intranasal nanoemulsion-adjuvanted influenza vaccine in a murine model. *Hum Vaccin*. 2010; 6(7): 585–94.
- Ren ST, Zhang XM, Sun PF, Sun LJ, Guo X, Tian T, et al. Intranasal immunization using mannate as a novel adjuvant for an inactivated influenza vaccine and its adjuvant effect compared with MF59. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169501.
- Quan FS, Compans RW, Kang SM. Oral vaccination with inactivated influenza vaccine induces cross-protective immunity. *Vaccine* 2012; 30(2): 180–8.
- Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. Методические указания. МУ 3.3.2.1758 – 03 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28.09.2003).
- WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization, 2004. Available from: <https://goo.gl/k1qjv7>.
- Синуформе®, «Фарма Медитеррания СЛ.», Испания, ЛС-000026, Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. Available from: <https://goo.gl/97qYZo>.

## Об авторах

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Российская Федерация, Новосибирская область, 630559, пос. Кольцово.

Гудымо Андрей Сергеевич. Аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Мальцев Семён Владимирович. Научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Евсеенко Василий Александрович. Заведующий лабораторией зоонозных инфекций отдела зоонозных инфекций и гриппа, канд. биол. наук.

Данильченко Наталья Викторовна. Младший научный сотрудник лаборатории серологических методов анализа отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Марченко Василий Юрьевич. Заведующий лабораторией гриппа отдела зоонозных инфекций и гриппа, канд. биол. наук.

Дурыманов Александр Гаврилович. Старший научный сотрудник лаборатории серодиагностики гриппа отдела зоонозных инфекций и гриппа.

Рыжиков Александр Борисович. Заведующий отделом зоонозных инфекций и гриппа, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Гудымо Андрей Сергеевич; [gudymo\\_as@vector.nsc.ru](mailto:gudymo_as@vector.nsc.ru)

## Cyclamen europaeum (*Cyclamen purpurascens*) extract as adjuvant for nasal immunization of mice with influenza antigens

A. S. Gudymo, S. V. Maltsev, V. A. Evseenko, N. V. Danilchenko, V. Y. Marchenko, A. G. Durymanov, A. B. Ryzhikov

Federal Budgetary Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo 630559, Novosibirsk region, Russian Federation

The article describes the first attempt to use the juice and extract of *Cyclamen europaeum* (*Cyclamen purpurascens*) tubers as an adjuvant for intranasal immunization of mice with influenza antigens. The concentration of antigens used for immunization was 300 µg/ml for each subtype. The adjuvant was added at the concentration of 10 and 20 mg/ml. Blood serum was studied using the hemagglutination inhibition reaction (HI) and enzyme immunoassay (ELISA). After two immunizations with a dose of 7.5 µg, the maximum inverse titers to the H1/H3/B components in the HI were 320/80/80, respectively. The administration of an intranasal comparator without an adjuvant did not result in seroconversion which can be detected by the HI. The analysis of the blood sera of mice, immunized intranasally by the antigen only, showed no increase in the an-

tibody levels between the first and second injections. For mice immunized intranasally by a preparation containing 10 mg/ml (0.5 mg per 50 µl dose) of adjuvant the ELISA detected a significant growth of antibody levels for all components, and GMT antibody levels were comparable to GMT antibody levels after a single intramuscular injection of 5 µg of each antigen. Despite a significant serum titer dispersion (which the authors explain by the impossibility of ensuring absolute uniformity in administration of 50 µl of substance via the nasal route) the use of the extract as an adjuvant for intranasal immunization of mice with highly concentrated influenza antigens showed a significant humoral response. The level of this response after two immunizations in some animals was comparable to that after intramuscular administration. The obtained data open the possibility of using *Cyclamen europaeum* tuber extract or its chemical analogues in further studies in guinea pigs, ferrets or other animal models in order to develop an efficacious adjuvant for intranasal immunization.

**Key words:** extract; cyclamen; vaccine; adjuvant; intranasal; immunization; influenza; respiratory; infection.

**Bibliographic description:** Gudymo AS, Maltsev SV, Evseenko VA, Danilchenko NV, Marchenko VY, Durymanov AG, Ryzhikov AB. *Cyclamen europaeum* (*Cyclamen purpurascens*) extract as adjuvant for nasal immunization of mice with influenza antigens. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(4): 233–239.

## References

1. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12(1): 36–44.
2. Darvishian M, Dijkstra F, van Doorn E, Bijlsma MJ, Donker GA, de Lange MM, et al. Influenza vaccine effectiveness in the Netherlands from 2003/2004 through 2013/2014: The importance of circulating influenza virus types and subtypes. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169528.
3. Raymond DD, Stewart SM, Lee J, Ferdman J, Bajic G, Do KT, et al. Influenza immunization elicits antibodies specific for an egg-adapted vaccine strain. *Nat Med.* 2016; 22(12): 1465–9.
4. Lee J, Boutz DR, Chromikova V, Joyce MG, Vollmers C, Leung K, et al. Molecular-level analysis of the serum antibody repertoire in young adults before and after seasonal influenza vaccination. *Nat Med.* 2016; 22(12): 1456–64.
5. Glück R. Intranasal immunization against influenza. *J Aerosol Med.* 2002; 15(2): 221–8.
6. Glück U, Gebbers JO, Glück R. Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without *Escherichia coli* heat-labile toxin in adult volunteers. *J Virol.* 1999; 73(9): 7780–6.
7. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med.* 2004; 350(9): 896–903.
8. Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 2011; 72(6): 435–57.
9. Vajdy M, Srivastava I, Polo J, Donnelly J, O'Hagan D, Singh M. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82(6): 617–27.
10. Hamouda T, Chepurinov A, Mank N, Knowlton J, Chepurnova T, Myc A, et al. Efficacy, immunogenicity and stability of a novel intranasal nanoemulsion-adjuvanted influenza vaccine in a murine model. *Hum Vaccin.* 2010; 6(7): 585–94.
11. Ren ST, Zhang XM, Sun PF, Sun LJ, Guo X, Tian T, et al. Intranasal immunization using mannate as a novel adjuvant for an inactivated influenza vaccine and its adjuvant effect compared with MF59. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169501.
12. Quan FS, Compans RW, Kang SM. Oral vaccination with inactivated influenza vaccine induces cross-protective immunity. *Vaccine* 2012; 30(2): 180–8.
13. Methods for quality control indicators of immunobiological medical drugs for influenza prophylaxis and diagnostics. Guidelines. MY 3.3.2.1758 – 03 (approved by Chief State Sanitary Physician of the Russian Federation) (in Russian).
14. World Health Organization (2004) WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Available from: <https://goo.gl/k1qjv7>.
15. Sinuforte®, Farma Mediterranea, S. L., Spain, LS-000026, Russian National register of medical drugs. Available from: <https://goo.gl/97qYzo> (in Russian).

## Authors

Federal Budgetary Research Institution «State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo 630559, Novosibirsk region, Russian Federation.

Gudymo AS. PhD student, Junior Research Scientist of the Laboratory of Molecular and Cellular Immunology of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Maltsev SV. Research Scientist of the Laboratory of Molecular and Cellular Immunology of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Evseenko VA. Head of the Laboratory of Zoonotic Diseases of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza. Candidate of Biological Sciences.

Danilchenko NV. Junior Research Scientist of the Laboratory of Serological Test Methods of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Marchenko VY. Head of the Laboratory of Influenza of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza. Candidate of Biological Sciences.

Durymanov AG. Senior Research Scientist of the Laboratory of Influenza Serodiagnostics of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza.

Ryzhikov AB. Head of the Department of Zoonotic Diseases and Influenza. Candidate of Biological Sciences.

**Contact e-mail:** Gudymo Andrey Sergeevich; gudymo as@vector.nsc.ru