

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

**К.И. Мосалев^{1*}, И.Д. Иванов¹, С.М. Мирошниченко¹,
М.В. Тендитник², Н.П. Бгамова³, Э.Э. Шульц⁴, В.А. Вавилин¹**

¹Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2; *эл. почта: mosalevki@mail.ru

²Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины,
630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

³Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Федерального исследовательского центра “Институт цитологии и генетики СО РАН”, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

⁴Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 9

Изучена иммуномодулирующая активность одного из соединений бетулоновой кислоты с фурукумарином (2-азидо, 9-N-метилпиперазинометил ореозелом) (далее Соед). Экспериментальной моделью служили самцы мышей линии C57BL/6 (возраст 3 месяца), подверженные воздействию цитостатического средства — циклофосфида (ЦФ), контролем — интактные особи. Исследовали экспрессию *IL-12*, *IL-10*, *IL-1β*, *TNF-α*, *TGF-β*, *M-CSF*, *GM-CSF* в костном мозге, *IL-12*, *IL-10* во взвеси перитонеальных клеток (место введения Соед). Поверхностные маркеры Т-лимфоцитов (CD3, CD4 и CD8) во фракциях мононуклеарных клеток (МНК) венозной крови определяли с помощью проточной цитометрии с использованием антител. Для оценки воздействия ЦФ и Соед на тимус были выполнены его гистологическое и морфометрическое исследования. Выявлено стимулирующее влияние Соед на экспрессию гена *GM-CSF* (повышение относительной экспрессии в среднем в 3 раза). Соед вызывает локальное повышение экспрессии *IL-12* в клетках брюшной полости и восстанавливает относительное содержание Т-лимфоцитов в крови мышей, обработанных ЦФ, воздействуя главным образом на CD3⁺CD4⁺ лимфоциты. Показано, что исследуемое вещество снижает плотность ткани коркового и мозгового вещества тимуса у группы мышей, которым введён ЦФ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что Соед оказывает стимулирующее влияние на клеточное звено иммунитета и способствует поддержанию числа Т-лимфоцитов в крови за счёт их миграции из центральных органов иммунной системы.

Ключевые слова: бетулоновая кислота; фурукумарины; цитокины; костный мозг; тимус; Т-лимфоциты

DOI: 10.18097/PBMC20236904219

ВВЕДЕНИЕ

Около 20 лет назад были обнаружены потенциальные иммуотропные свойства бетулоновой кислоты [1]. С тех пор данное вещество и его производное бетулоновая кислота (БК) занимают одно из ведущих мест в ряду перспективных биологически активных веществ естественного происхождения. Они обладают доказанной, противовоспалительной [2], антиоксидантной [3] и противоопухолевой [1, 3] активностями.

Другим классом соединений, имеющим выраженные иммуотропные свойства, являются фурукумарины (псоралены), играющие защитную роль в организме растений. Псоралены проявляют фотосенсибилизирующую активность и уже достаточно

давно нашли своё место в клинической практике в лечении аутоиммунных и гиперпролиферативных заболеваний кожи [4, 5]. Благодаря достижениям органической химии стал возможен синтез соединений, содержащих в своём составе БК и фурукумарины [1, 6].

Одним из важных направлений в фармакологии является поиск лекарственных средств, влияющих на цитокиновую систему, обеспечивающую взаимодействие между различными клетками иммунной системы. Известно более 200 полипептидов, относящихся к семейству цитокинов, вместе образующих обширную сеть взаимодействий. Большой интерес представляют цитокины, регулирующие процесс воспаления: *IL-12*, *IL-10*, *IL-1β* и *TNF-α* [7]. Многие цитокины не только регулируют защитные реакции организма на внедрение патогенов,

Принятые сокращения: БК – бетулоновая кислота; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ГДХ – ген “домашнего хозяйства”; КОЕ – колониеобразующая единица; ЛПС – липополисахарид; МНК – мононуклеарные клетки; РНК – рибонуклеиновая кислота; Соед – соединение 2-азидо-9-замещённого ореозелона и бетулоновой кислоты; СПИД – синдром приобретённого иммунодефицита; у.е. – условные единицы; ЦФ – циклофосфамид; ЭТДА – этилендиаминтетраацетат; CD – кластер дифференцировки; COX-2 – циклооксигеназа-2; DMSO – диметилсульфоксид; FITC – флуоресцеина изотиоцианат; *GAPDH* – ген глицеральдегидфосфатдегидрогеназы; *GM-CSF* – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; *IL* – интерлейкин; *iNOS* – индуцибельная синтаза оксида азота (NO); *M-CSF* – моноцитарный стимулирующий фактор; *NF-κB* – ядерный фактор каппа-би; *NK* – клетки-натуральные киллеры; *PE* – фикоэритрин; *TGF-β* – трансформирующий ростовой фактор-β; *TNF-α* – фактор некроза опухолей-α; *β-act* – ген, кодирующий белок β-актин.

но и поддерживают гомеостаз, являясь полипотентными биологически активными соединениями. Например, колониестимулирующие факторы GM-CSF и M-CSF — стимуляторы пролиферации и дифференцировки предшественников клеток периферической крови, а также TGF- β .

Помимо цитокиновой системы регуляции, при исследовании новых соединений целесообразно изучение сдвигов в клеточном звене иммунитета, а именно в популяциях Т-лимфоцитов. При воздействии стрессовых факторов, инфекций (особенно вирусных) наиболее важная роль отводится Т-клеточному иммунному ответу [8]. Важно также иметь представление о процессах, происходящих под воздействием новых соединений в центральных органах иммунной системы — костном мозге и вилочковой железе (тимусе).

Ввиду иммуотропных свойств БК и фурукумаринов представляется целесообразным синтез их комбинированных соединений. Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния на иммунную систему одного из таких веществ — соединения БК и 2-азидо-9-замещённого ореозелона (Соед).

МЕТОДИКА

Исследуемое соединение

Соед (рис. 1) синтезировано в лаборатории медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Для его получения была использована CuAAC-реакция азид-алкин циклоприсоединения пропаргилового эфира бетулоновой кислоты с соответствующим 2-азидофурукумарином в присутствии $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и аскорбата натрия в растворе $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$.

Модель ЦФ-индуцированной иммуносупрессии

Объектом исследований служили самцы лабораторных мышей *Mus musculus* возрастом 3 месяца линии C57BL/6.

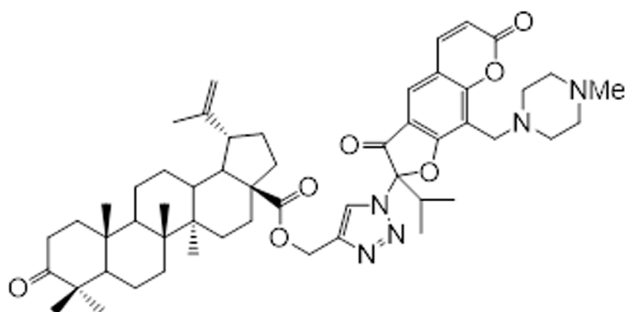


Рисунок 1. Структурная формула соединения 2-азидо-9 замещённого ореозелона с БК

Таблица 1. Схема эксперимента *in vivo*

	1 день	2 день	6 день
1 группа (Контроль)	0,9% NaCl + DMSO	—	Выделение перитонеальных клеток (5 особей в группе), костного мозга (10 особей в группе), образцов тимуса (5 особей в группе) и венозной крови (5 особей в группе)
2 группа	0,9% NaCl + DMSO	ЦФ (200 мг/кг массы тела)	
3 группа	р-р Соед в DMSO + 0,9% NaCl	ЦФ (200 мг/кг массы тела)	
4 группа	р-р Соед в DMSO + 0,9% NaCl	—	

Экспериментальную цитостатическую модель создавали с помощью препарата ЦФ (Эндоксан, “Baxter”, Германия), растворённого в физиологическом растворе. Препарат вводили однократно внутривенно (в/вр) в дозе 200 мг/кг массы тела животного (сублетальная доза) [9] через 1 сутки после однократного в/вр введения исследуемого соединения в дозе 30 мг/кг массы тела животного. Исследуемое соединение растворяли в DMSO, а затем в 0,9% растворе NaCl, концентрация DMSO во вводимом растворе Соед составляла 1%. На шестой день после введения соединения мышей умерщвляли методом ингаляции двуокиси углерода. После этого из них были выделены перитонеальные клетки, образцы костного мозга, тимуса и венозной крови для проточной цитометрии (табл. 1).

Анализ экспрессии генов

Выделение РНК из биологического материала было проведено с использованием TRI-REAGENT (“MRC”, США) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов ОТ M-MuLV-RH (“Биолабмикс”, Россия), для реакции брали 2-5 мкг суммарной РНК, добавляли праймеры со случайными последовательностями и oligo-dT-праймеры. Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили с использованием БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2 \times) (“Биолабмикс”). Во избежании погрешностей, которые могут возникнуть при постановке ПЦР на разных планшетах, и тем самым вносить искажения в конечный результат, были подобраны универсальные условия, позволяющие проводить амплификацию любых выбранных для исследования генов: 95 $^{\circ}\text{C}$ — 3 мин; 45 циклов — (95 $^{\circ}\text{C}$ — 12 с, 57 $^{\circ}\text{C}$ — 15 с, 72 $^{\circ}\text{C}$ — 20 с). В качестве референсных генов использовали GAPDH и β -act. Для сравнения уровней экспрессии генов в исследуемых образцах использовали метод относительного количественного определения экспрессии гена ($2^{-\Delta\text{CT}}$). При использовании метода была рассчитана эффективность полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени, которая во всех образцах была близка к максимальной или равна ей ($E=2$).

В суспензии перитонеальных клеток была исследована экспрессия *IL-12* и *IL-10*. Во фрагментах костного мозга была исследована экспрессия *IL-12*, *IL-10*, *IL-1 β* , *TNF- α* , *TGF- β* , *GM-CSF*, *M-CSF* (табл. 2).

Проточная цитофлуориметрия образцов периферической крови

Выделение лимфоидных клеток из цельной крови проводили с помощью раствора фиколл-верографина с использованием в качестве антикоагулянта

Таблица 2. Целевые гены мыши *Mus musculus* и последовательности олигонуклеотидов, использованных в оценке экспрессии генов

Ген	Последовательности олигонуклеотидов
<i>GAPDH</i>	F: 5'-TAGACAAAATGGTGAAGGTCGG-3' R: 5'-CCTGGAAGATGGTGTATGGG-3'
<i>β-act</i>	F: 5'-CCTGAGGAGCACCTGTG-3' R: 5'-GGAGAGCATAGCCCTCGTAG-3'
<i>IL-12</i>	F: 5'-AGTGTGGCACTGATGCTGATG-3' R: 5'-GTAGCCAGGCAACTCTCGTT-3'
<i>IL-10</i>	F: 5'-TGGGTTGCCAAGCCTTATCG-3' R: 5'-CTCTTCACCTGCTCCACTGC-3'
<i>IL-1β</i>	F: 5'-TGCCACCTTTTGACAGTGATGA-3' R: 5'-ATCAGGACAGCCCAGGTCAA-3'
<i>TNF-α</i>	F: 5'-TCAGTTCTATGGCCAGACC-3' R: 5'-ACCACTAGTTGGTTGTCTTTGAG-3'
<i>TGF-β</i>	F: 5'-TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3' R: 5'-CACAAAGCAGTGAAGCGTAA-3'
<i>GM-CSF</i>	F: 5'-GTTGAATGAAGAGGTAGAAGTC-3' R: 5'-ATCCGCATAGGTGGTAAC-3'
<i>M-CSF</i>	F: 5'-TGAGTCTGTCTTCCACCT-3' R: 5'-GTGTGCCCAGCATAGAAT-3'

ЭДТА натрия из расчёта 1,8 мг ЭДТА на 1 мл крови. Верхний слой клеток (лимфоциты) отбирали, разводили в среде RPMI и с помощью центрифугирования (1500 об./мин) в течение 20 мин отмывали от остатков фиколла. Полученные клетки использовали для иммунофенотипирования Т-лимфоцитов, используя антитела к CD3FITC (“BioLegend Inc.”, США), CD4PE, CD8APC (“Abcam”, Великобритания). К 50 мкл каждого образца клеток крови добавляли по 0,5 мкл моноклональных антител в присутствии 1% альбумина. Анализ окрашенных лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlexS-100 (“Beckman Coulter”, США).

Гистологическое исследование

Объектом исследования служил тимус лабораторных животных. Для световой микроскопии фрагменты тимуса фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обезживали в серии спиртов восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике. Полученные срезы толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое и морфометрическое исследование тимуса проводили на универсальном микроскопе Axio Imager.M2 (“Carl Zeiss”, Германия) при увеличении $\times 50$ и $\times 100$ в проходящем свете.

Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Zeiss AxioCam 208 color (“Carl Zeiss”) и компьютерной программы ZEN Image Analysis Software. Анализировали по 1 фрагменту тимуса от каждого животного в группе ($n=5$). Морфометрию проводили с использованием полуавтоматической программы обработки изображений ImageJ. Ввиду акцидентальной инволюции тимуса у животных после введения ЦФ, анализ препаратов тимуса в группах “ЦФ” и “ЦФ+Соед” проводили при увеличении $\times 100$, а в группах “Контроль” и “Соед” при увеличении $\times 50$.

Вычисляли относительный объём коркового и мозгового вещества тимуса и определяли корково-мозговой индекс. Оценивали плотность ткани коркового и мозгового вещества тимуса путём измерения среднего значения интенсивности освещения светового поля (в у.е.) в 3 секторах для мозгового и 5 секторах для коркового веществ.

Для оценки регенераторного эффекта исследуемого соединения на структуру вилочковой железы проводили взвешивание тимуса и определение отношения веса органа к массе тела животного (“органного индекса”) $((m \text{ тимуса}, g)/(m \text{ животного}, g) \times 100)$.

Статистический анализ

Значимость различий между исследуемыми группами была определена с использованием пакета программ STATISTICA 12.

Нормально распределённые данные выражены как среднее нескольких независимых экспериментов \pm среднеквадратическое отклонение ($M \pm SD$). Ненормально распределённые данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q_1 – Q_3]. Статистическую значимость различий оценивали, применяя непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на двукратное сравнение. Результаты считали статистически значимыми при достижении уровня значимости различий $p < 0,025$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Относительная экспрессия генов

После обработки животных ЦФ было отмечено закономерное увеличение экспрессии генов противовоспалительного *TGF- β* , стимулирующего дифференцировку клеток и обладающего противоопухолевым действием [7], и *GM-CSF*, направленное на усиление регенераторной активности костного мозга в ответ на цитостатическое воздействие.

Введение животным Соед приводило к 3-кратному повышению уровня экспрессии *GM-CSF* в сравнении с интактными животными. Однако после воздействия ЦФ вслед за Соед экспрессия *GM-CSF* в костном мозге была ниже в сравнении с группой “ЦФ”. *GM-CSF* — цитокин, стимулирующий гранулоцитарный и моноцитарный ростки кроветворения. Согласно данным таблицы 3, цитостатик и Соед оказывают противоположное действие на экспрессию *M-CSF* и *GM-CSF*. Хотя, изменения экспрессии *M-CSF* носят лишь характер тенденции. Влияния исследуемого вещества на экспрессию *IL-12*, *IL-10*, *IL-1 β* , *TGF- β* и *TNF- α* в костном мозге обнаружено не было.

После введения Соед отмечено увеличение относительной экспрессии *IL-12* клетками брюшной полости в 4 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 4). Это косвенно может свидетельствовать о его иммуноактивирующем эффекте, а также о его способности привлекать в место введения клетки, продуцирующие *IL-12*.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Таблица 3. Относительная экспрессия генов цитокинов ($2^{-\Delta Ct}$) в костном мозге животных после обработки ЦФ и Соед (n=10)

	Контроль	ЦФ	ЦФ+Соед	Соед	p (Контроль/Соед); p (ЦФ/ЦФ+Соед)
<i>IL-12</i>	0,035 [0,028; 0,092]	0,054 [0,031; 0,145]	0,051 [0,024; 0,093]	0,042 [0,029; 0,054]	0,970; 0,734
<i>IL-10</i>	0,043 [0,037; 0,054]	0,033 [0,02; 0,043]	0,036 [0,022; 0,050]	0,032 [0,023; 0,065]	0,713; 0,734
<i>IL-1β</i>	0,0004 [0,0001; 0,0020]	0,0001 [0,00001; 0,0015]	0,0004 [0,0002; 0,0010]	0,00076 [0,00039; 0,0016]	0,473; 0,653
<i>TNF-α</i>	0,020 [0,019; 0,044]	0,027 [0,019; 0,029]	0,024 [0,012; 0,029]	0,029 [0,023; 0,032]	0,990; 0,521
<i>GM-CSF</i>	0,00028 [0,00016; 0,00033]	0,0013 [0,00039; 0,00230]	0,00058 [0,00038; 0,00072]	0,0015 [0,00085; 0,00190]	0,021; 0,162
<i>M-CSF</i>	0,00017 [0,000018; 0,000500]	0,00005 [0,000022; 0,000330]	0,000066 [0,000023; 0,000410]	0,000019 [0,000014; 0,000270]	0,273; 0,850
<i>TGF-β</i>	0,00056 [0,00034; 0,00100]	0,00096 [0,00066; 0,00190]	0,0014 [0,00043; 0,00170]	0,00049 [0,00044; 0,00076]	0,910; 0,713

Примечание. “Контроль” – группа животных, которым введён 0,9% NaCl+DMSO; “ЦФ” – группа животных, которым введён 0,9% NaCl+DMSO, а затем ЦФ; “ЦФ+Соед” – группа животных, которым введено Соед, затем ЦФ; “Соед” – группа животных, которым введён только раствор Соед в DMSO.

Таблица 4. Относительная экспрессия генов цитокинов ($2^{-\Delta Ct}$) во взвеси перитонеальных клеток животных после обработки ЦФ и Соед (n=5)

	Контроль	ЦФ	ЦФ+Соед	Соед	p (Контроль/Соед); p (ЦФ/ЦФ+Соед)
<i>IL-12</i>	0,020 [0,011; 0,046]	0,015 [0,005; 0,037]	0,073 [0,073; 0,084]	0,094 [0,064; 0,096]	0,022; 0,144
<i>IL-10</i>	0,035 [0,0250; 0,0470]	0,024 [0,0052; 0,0490]	0,038 [0,0300; 0,0570]	0,045 [0,0390; 0,0950]	0,296; 0,296

Таблица 5. Результаты проточной цитометрии образцов крови экспериментальных животных (n=5). Представлены значения относительного содержания CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в сыворотке (%), а также отношение содержания CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов

	Контроль	ЦФ	ЦФ+Соед	Соед	p (Контроль/Соед); p (ЦФ/ЦФ+Соед)
CD3 ⁺	42,20 [33,8; 51,8]	26,85 [26,6; 27,4]	40,15 [33,3; 47,0]	43,60 [36,1; 45,9]	0,936; 0,005
CD3 ⁺ CD4 ⁺	22,85 [20,0; 30,2]	6,85 [6,1; 7,7]	26,15 [21,2; 33,0]	35,60 [33,0; 44,1]	0,689; 0,005
CD3 ⁺ CD8 ⁺	30,90 [26,5; 44,4]	14,90 [11,7; 17,8]	41,05 [36,0; 53,0]	48,70 [45,7; 51,0]	0,173; 0,005
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0,73 [0,68; 0,74]	0,48 [0,43; 0,52]	0,58 [0,53; 0,68]	0,72 [0,67; 0,96]	0,109; 0,019

Проточная цитофлуориметрия образцов периферической крови

В результате проведения проточной цитометрии взвеси МНК клеток были получены данные об относительном содержании фракций Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺) (табл. 5), а также рассчитано соотношение CD4⁺/CD8⁺.

Число клеток в пробах крови животных после обработки ЦФ значительно ниже, чем у интактных особей. ЦФ снижает абсолютное число лейкоцитов крови, действуя главным образом на лимфоцитарный росток кроветворения, а именно на Т-лимфоциты [9].

Установлено, что Соед способно восстанавливать относительное содержание CD3⁺ лимфоцитов (Т-лимфоцитов), которое было снижено после введения

цитостатика. У группы “ЦФ+Соед” содержание Т-лимфоцитов в крови в среднем в 1,6 раз больше, чем у животных из группы “ЦФ”. При этом Соед главным образом стимулирует рост субпопуляции CD3⁺CD4⁺ клеток. В группе “ЦФ+Соед” содержание CD3⁺CD4⁺ клеток (“Т-хелперов”) в среднем в 5,6 раз больше, чем в группе “ЦФ”. В то же время содержание CD3⁺CD8⁺ в той же группе после введения Соед увеличилось только в 3,2 раза (рис. 2).

Направленность действия в отношении “Т-хелперов” видна и по возрастанию соотношения CD4⁺/CD8⁺ после введения исследуемого вещества. Примечательно, что животные, которым было введено только Соед, имеют приблизительно такое же отношение CD4⁺/CD8⁺ и содержание CD3⁺ в крови, что и контрольные особи (табл. 5).

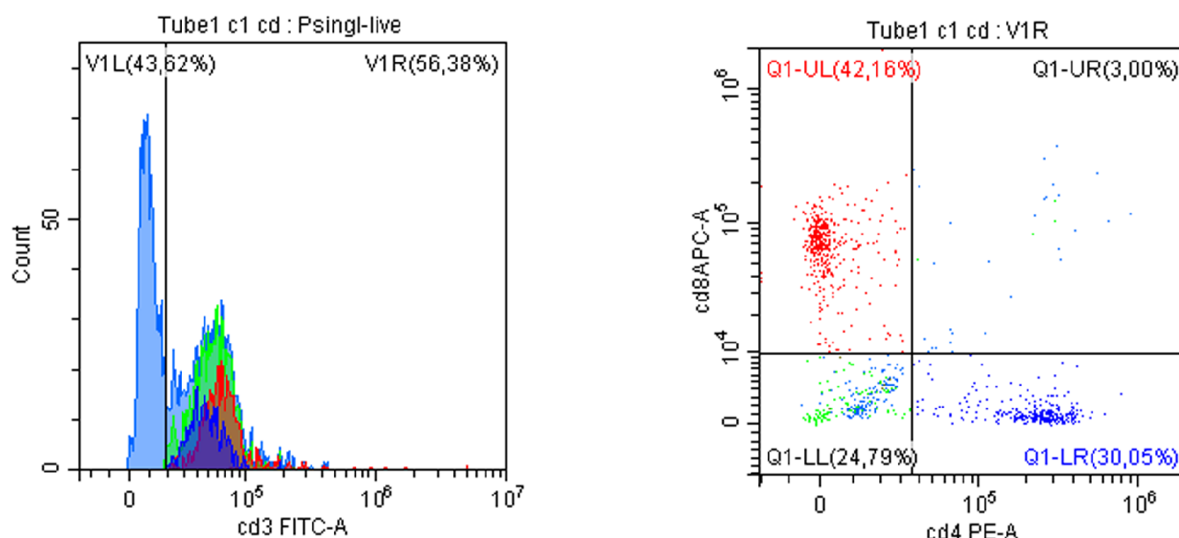


Рисунок 2. Фракционирование мононуклеарных клеток с помощью меченых FITC anti-CD3, PE anti-CD4, APC anti-CD8 антител. Слева – общий выход CD3⁺ клеток (56,38% живых клеток, 43,62% дебриса). Справа – красным цветом отображена субпопуляция CD3⁺CD8⁺ клеток (цитотоксические Т-лимфоциты, “Т-киллеры”), синим цветом отображена субпопуляция CD3⁺CD4⁺ клеток (“Т-хелперы”). Пример анализа методом проточной цитометрии образца крови животного после введения Соед. Цветная версия рисунка доступна в электронной версии журнала.

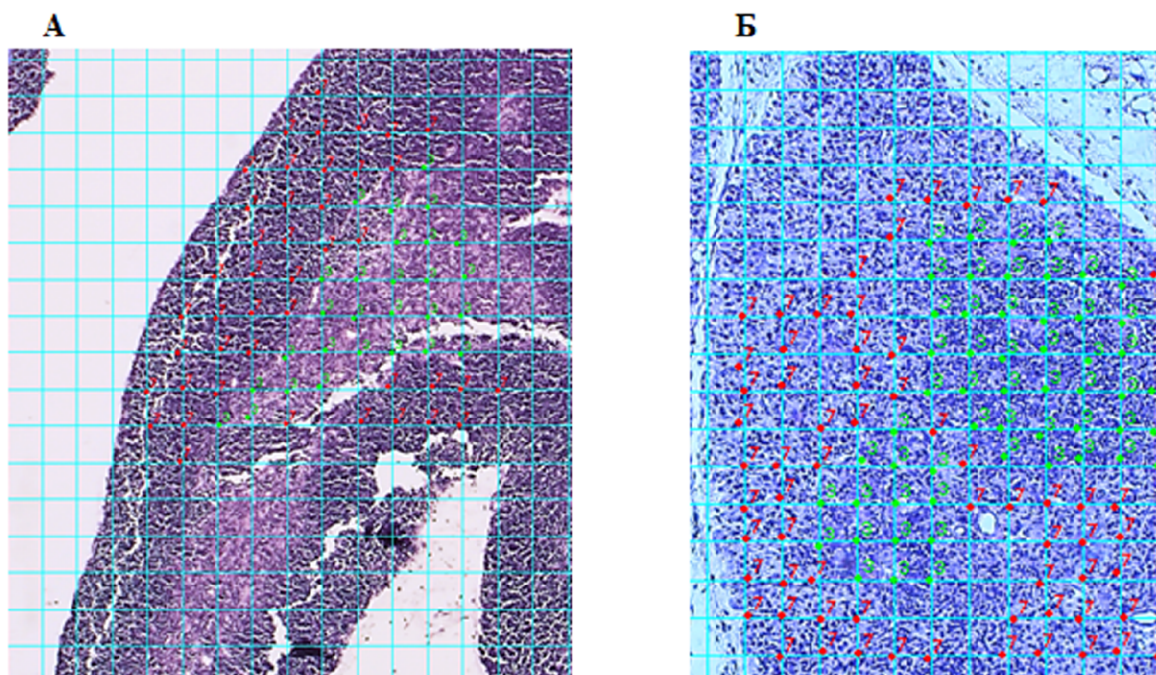


Рисунок 3. Структура тимуса мышей линии C57BL/6 (слева – группы “Контроль”, увеличение $\times 50$, справа – группы “ЦФ”, увеличение $\times 100$). Пример анализа соотношения коркового и мозгового вещества тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. .

Гистологическое исследование тимуса

После воздействия ЦФ наблюдали атрофию коры тимуса, нечёткость её контуров, снижение плотности расположения клеток как в корковом, так и в мозговом веществе тимуса (рис. 3). Анализ корково-мозгового отношения тимуса показал, что ЦФ снижает объёмную плотность коркового вещества тимуса. В то же время, было установлено, что исследуемое соединение не способствует восстановлению объёмной доли коркового вещества тимуса после обработки цитостатиком, однако в монорежиме оно его снижает ($p=0,017$) (табл. 6).

В таблице 6 приведены значения интенсивности освещения (в у.е.) светового поля у коркового и мозгового веществ тимуса (в 10 полях зрения для каждого препарата). Плотность ткани обратно пропорциональна интенсивности её освещения, таким образом, чем выше интенсивность, тем ниже плотность. По-видимому, за счёт снижения плотности расположения клеток освещённость коркового и мозгового вещества тимуса у группы “ЦФ” была выше (соответственно плотность ткани ниже), чем у группы “Контроль”. Однако у группы животных “ЦФ+Соед” было отмечено достоверное

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Таблица 6. Соотношение объёмных долей коркового и мозгового вещества тимуса животных после обработки ЦФ и Соед. Анализ плотности коркового и мозгового вещества тимуса у групп экспериментальных животных (n=5)

	Контроль	ЦФ	ЦФ+Соед	Соед	p (Контроль/Соед); p (ЦФ/ЦФ+Соед)
Корково-мозговой индекс	3,28 [2,73; 7,65]	1,50 [1,19; 2,08]	1,50 [1,09; 1,86]	2,93 [2,32; 4,28]	0,017; 0,169
Плотность коркового в-ва, у.е.	1,73 [1,62; 1,83]	1,84 [1,72; 1,99]	2,00 [1,81; 2,17]	1,62 [1,48; 1,80]	0,026; 0,011
Плотность мозгового в-ва, у.е.	2,10 [2,00; 2,27]	1,66 [1,60; 1,80]	1,81 [1,66; 1,99]	2,06 [1,90; 2,29]	0,361; 0,003

повышение средней интенсивности освещения коркового и мозгового веществ по сравнению с группой “ЦФ”. Следовательно, у группы “ЦФ+Соед” плотность тканей корковой и мозговой зоны тимуса ещё ниже, чем у группы “ЦФ”.

Согласно литературным данным, под воздействием ЦФ происходит “запустение” тимуса, снижение числа пролиферирующих лимфоцитов коркового вещества и заполнение его структур соединительной тканью [9]. В нашем эксперименте это нашло подтверждение в виде снижения корково-мозгового индекса у животных, обработанных ЦФ, и уменьшения плотности тканей коркового и мозгового вещества под влиянием ЦФ.

В результате подсчёта органного индекса тимуса было обнаружено, что после введения ЦФ масса тимуса уменьшилась приблизительно в 3 раза по сравнению с контрольной группой. Влияния Соед на вес тимуса после инъекции ЦФ не отмечено (рис. 4). Введение Соед также не оказывало значимого влияния на массу тимуса у мышей, не обработанных ЦФ.

Плотность тканей тимуса у животных из группы “ЦФ+Соед” ниже, чем у животных из группы “ЦФ”. С учётом данных проточной цитометрии, можно предположить, что эффект данного Соед направлен на поддержание числа циркулирующих в крови Т-лимфоцитов, в том числе и за счёт их усиленного выхода из тимуса (главным образом из корковой зоны тимуса, ввиду снижения корково-мозгового соотношения под действием Соед). В костном мозге мышей Соед увеличивало содержание

мРНК GM-CSF. GM-KSF продуцируется различными клетками организма: нейтрофилами, макрофагами, эозинофилами, стволовыми клетками и др. Экспрессия данного фактора усиливается под действием медиаторов воспаления (IL-1, IL-6 и TNF- α). Рецепторы к GM-KSF экспрессируются на поверхности гемопоэтических клеток (КОЕ гранулоцитов) [7]. Биологическая роль GM-KSF заключается в стимуляции роста и дифференцировки клеток гемопоэза, главным образом, миелоидного ряда, в меньшей степени — моноцитарного. Этот цитокин увеличивает функциональную активность (окислительный метаболизм, цитотоксичность) нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, повышает их количество в периферической крови, препятствует апоптозу их предшественников [7]. В ходе эксперимента эффекты ЦФ и Соед на экспрессию GM-KSF были схожими. В некоторых работах было показано, что после воздействия ЦФ на организм, клетки костного мозга в ответ на резкое снижение числа лейкоцитов периферической крови, усиливают экспрессию GM-KSF [10]. Следует предположить, что она угнетается после воздействия на организм Соед и ЦФ ввиду снижения числа клеток, продуцирующих данный цитокин. После обработки Соед, его влияния на экспрессию генов IL-1 β , IL-12, TNF- α и IL-10 обнаружено не было. Первые три гена кодируют провоспалительные цитокины, которые продуцируются главным образом макрофагами в ответ на компоненты вирусов и бактериальных ЛПС; ген IL-10 кодирует цитокин, подавляющий воспалительную реакцию. В литературе встречается достаточно мало сведений о выработке данных цитокинов в костном мозге под воздействием цитостатиков, но упоминается о компенсаторном усилении их продукции [10].

Соед увеличивает содержание Т-лимфоцитов в крови, повышает отношение CD4⁺/CD8⁺ после воздействия Соед на обработанные ЦФ особи. Следовательно, его эффект направлен на поддержание числа CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов в кровотоке. На это также указывает то, что данное вещество способствует выходу Т-лимфоцитов из “депо” — вилочковой железы. У группы “ЦФ+Соед” плотность тканей корковых и мозговых зон была ещё ниже, чем у группы “ЦФ”. В корковом веществе тимуса находятся главным образом незрелые и пролиферирующие Т-лимфоциты, мигрировавшие из костного мозга. Они проходят последовательные этапы селекции, в ходе которых клетки, имеющие рецепторы к аутоантигенам, элиминируются

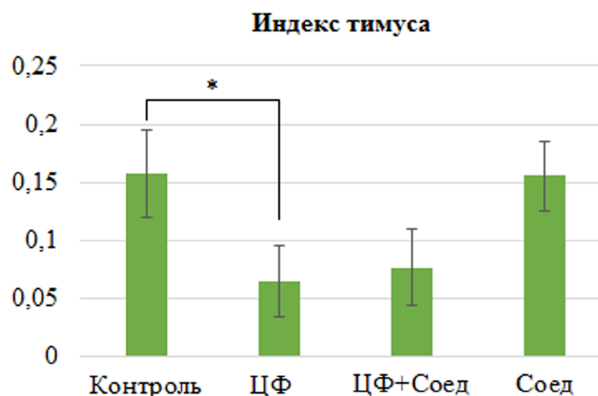


Рисунок 4. Органный индекс тимуса у групп экспериментальных животных ((масса тимуса, г)/(масса животного, г)×100). * – достоверные различия между группами ($p < 0,025$).

с помощью апоптоза. Мозговое вещество содержит зрелые клетки, готовые покинуть тимус и заселить органы периферической иммунной системы (то есть лимфоузлы). Таким образом, пул циркулирующих Т-лимфоцитов под воздействием Соед пополняется как за счёт юных форм, так и за счёт зрелых Т-лимфоцитов. $CD3^+CD4^+$ -лимфоциты (или “хелперы”) играют главную роль в иммунном ответе на внеклеточные антигены. Они способны активироваться при контакте собственных Т-клеточных рецепторов с антигеном в комплексе с МНС-I, представленными на мембране антигенпредставляющей клетки. После активации Т-хелперы (Th2-субпопуляция), взаимодействуя с помощью $CD4$ и $CD40L$ с В-лимфоцитами, запускают трансформацию последних в плазматические клетки-антителопродуценты. Для полноценного гуморального ответа необходима кооперация $CD3^+CD4^+$ и В-лимфоцита. Кроме этого Т-хелперы (Th1-субпопуляция) посредством выработки $IL-2$, $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$ способствуют активации $CD3^+CD8^+$ (Т-киллеров) — цитотоксических клеток. Таким образом, без достаточного содержания в организме $CD3^+CD4^+$ -клеток невозможна реализация ни гуморального, ни клеточного иммунитета. Одним из самых грозных состояний, сопровождающихся дефицитом “Т-хелперов”, является ВИЧ-инфекция [8]. Возможно, что данное Соед можно рассматривать как потенциальный корректор иммунодефицитных состояний, в том числе и в случае глубокого иммунодефицита.

После в/бр введения Соед отмечено увеличение относительной экспрессии $IL-12$ клетками брюшной полости в 4 раза по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует о его иммуноактивирующем эффекте, так как данный цитокин является стимулятором клеточного звена приобретённого иммунитета [7]. Возможно, что данный эффект обусловлен привлечением в брюшную полость макрофагов, которые являются основным продуцентом этого цитокина. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными о повышении экспрессии $IL-12$ культурой клеток U-937 в ответ на воздействие Соед [11]. Помимо этого, было показано, что Соед снижает экспрессию гена противовоспалительного цитокина $IL-10$ в клетках U-937. Этот эффект не был отмечен на модели перитонеальных клеток животных, по-видимому, ввиду неоднородного клеточного состава смыва брюшной полости.

В последние несколько лет доказана противовоспалительная активность БК. Это подтверждено исследованиями на культурах клеток, где БК ингибировала продукцию медиаторов воспаления, например $IL-1\beta$, $IL-6$, iNOS, простагландинов (путём подавления активности COX-2). Было установлено, что большая часть из этих эффектов обусловлена ингибированием ядерного транскрипционного фактора NF- κ B [2].

В целом, гибридное соединение БК и фурукумарина сохраняет противовоспалительные свойства, присущие БК. Однако, в работе [6]

показано, что введение дополнительного заместителя в положение С9 фурукумарина ореозелона в соединении с БК (исследуемое Соед) приводило к потере его противовоспалительной активности. Это согласуется с полученными нами сведениями об отсутствии снижения экспрессии провоспалительных цитокинов под воздействием данного вещества [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Гибридное соединение бетулоновой кислоты и фурукумарина стимулирует экспрессию $GM-KSF$ в костном мозге, что указывает на его стимулирующее действие в отношении клеток-предшественниц миелоидного ряда (КОЕ).

2. Данное соединение оказывает стимулирующий эффект на Т-лимфоцитарный росток кроветворения, особенно выражено это влияние на $CD3^+CD4^+$ -лимфоциты (“Т-хелперы”). Оно повышает отношение $CD4^+/CD8^+$ и восстанавливает относительное содержание Т-лимфоцитов в периферической крови после обработки ЦФ.

3. Данное соединение повышает экспрессию $IL-12$ в клетках перитонеального лаважа, что может указывать на стимуляцию клеточного звена приобретённого иммунитета, а также на то, что данное соединение привлекает макрофаги в место его введения.

Направленность действия исследуемого вещества в отношении клеточного звена приобретённого иммунитета подтверждается усилением экспрессии гена лейкоцитарного гемопоэтического фактора ($GM-KSF$) в костном мозге, увеличением содержания Т-лимфоцитов в крови животных в состоянии искусственной иммуносупрессии и локальным увеличением экспрессии гена $IL-12$ в месте введения соединения. Данное соединение стоит рассматривать в качестве кандидата на роль потенциального иммуностимулятора при первичных и вторичных иммунодефицитных состояниях (СПИД, состояние после химиотерапии, длительная терапия глюкокортикоидами и др.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта № 122032200236-1 с использованием оборудования ЦКП “Протеомный анализ”, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных осуществлялось в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 33216-2014 и “Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях”. Опубликование материала

одобрено комитетом по биомедицинской этике при Федеральном исследовательском центре фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 20 на заседании от 28.06.2023). Во время опыта животные находились в стандартных условиях вивария в условиях искусственного освещения с соотношением периодов свет/темнота 1:1, в пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой и получали стандартный гранулированный корм ПК 120-3 и воду *ad libitum*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Толстиков А.Г., Флехтер О.Б. (2006) Терпеноиды ряда лупана — биологическая активность и фармакологические перспективы. I. Природные производные лупана (обзорная статья). *Биоорганическая химия*, **32**(1), 42-55. [Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Tolstikov G.A., Tolstikov A.G., Flekhter O.B. (2006) Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **32**(1), 42-55.]
2. Oliveira Costa J.F., Barbosa-Filho J.M., de Azevedo Maia G.L., Guimarães E.T., Meira C.S., Ribeiro-dos-Santos R., Pontes de Carvalho L.C., Pereira Soares M.B. (2014) Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. *Int. Immunopharmacol.*, **23**(2), 469-474. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.09.021
3. Ríos J.L., Máñez S. (2018) New pharmacological opportunities for betulinic acid. *Planta Medica*, **84**(1), 8-19. DOI: 10.1055/s-0043-123472
4. Липеева А.В., Шульц Э.Э., Шакиров М.М., Багрянская И.Ю., Толстиков Г.А. (2013) Исследование растительных кумаринов. XIII. Синтез 2,3,9-тризамещенных фурокумаринов. *Журнал органической химии*, **49**(3), 416-424. [Lipeeva A.V., Shul'ts E.E., Shakirov M.M., Bagryanskaya I.Yu., Tolstikov G.A. (2013) Plant coumarins: XIII. Synthesis of 2,3,9-trisubstituted furocoumarins. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **49**(3), 403-411.] DOI: 10.1134/S1070428013030159
5. Serrano-Perez J.J., Gonzalez-Luque R., Merchan M., Serrano-Andres L. (2008) The family of furocoumarins: Looking for the best photosensitizer for phototherapy. *J. Photochem. Photobiol.*, **199**, 34-41. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2008.04.013
6. Липеева А.В., Долгих М.П., Толстикова Т.Г., Шульц Э.Э. (2020) Исследование растительных кумаринов. 18. Конъюгаты кумаринов с лупановыми тритерпеноидами и 1,2,3-триазолами: синтез и противовоспалительная активность. *Биоорганическая химия*, **46**(2), 115-123. [Lipeeva A.V., Dolgikh M.P., Shults E.E., Tolstikova T.G. (2020) A study of plant coumarins. 18. Conjugates of coumarins with lupane triterpenoids and 1,2,3-triazoles: Synthesis and anti-inflammatory activity. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **46**(2), 125-132.] DOI: 10.31857/S0132342320010194
7. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. (2008) Цитокины. — СПб: "Издательство Фолиант", с. 70-79, 144-151, 235-243. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. (2008) Cytokines. — St. Petersburg: Foliant Publishing LLC, pp. 70-79, 144-151, 235-243.]
8. Sun L., Wang X., Saredy J., Yuan Z., Yang X., Wang H. (2020) Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biology*, **37**, 101759. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101759
9. Гайдай Д.С., Кательникова А.Е., Крышень К.Л., Гайдай Е.А., Гуцин Я.А., Макарова М.Н. (2019) Разработка модели иммуносупрессии у кроликов, вызванной внутривенным введением циклофосфида. *Лабораторные животные для научных исследований*, **2**, 1-13. [Gaidai D.S., Katelnikova A.E., Kryshen K.L., Gaidai E.A., Gushchin Ya.A., Makarova M.N. (2019) Development of a model of immunosuppression in rabbits caused by intravenous administration of cyclophosphamide. *Laboratory Animals for Scientific Research*, **2**, 1-13.] DOI: 10.29296/2618723X-2019-02-02
10. Bracci L., Moschella F., Sestili P., LaSorsa V., Valentini M., Canini I., Baccarini S., Maccari S., Ramoni C., Belardelli F., Proietti E. (2007) Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin. Cancer Res.*, **13**(2), 644-653. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1209
11. Иванов И.Д., Мосалев К.И., Липеева А.В., Шульц Э.Э., Вавилин В.А. (2021) Исследование механизмов противовоспалительной и иммуномодулирующей активности соединений бетулиновой кислоты с фуокумарином. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **84**(6), 28-34. [Ivanov I.D., Mosalev K.I., Lipeeva A.V., Shults E.E., Vavilin V.A. (2021) Studying the mechanisms of anti-inflammatory and immunomodulatory activity of betulinic acid compounds with furocoumarins. *Experimental and Clinical Pharmacology*, **84**(6), 28-34.] DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-6-28-34

Поступила в редакцию: 28. 03. 2023.

После доработки: 10. 07. 2023.

Принята к печати: 14. 07. 2023.

THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF THE BETULONIC ACID BASED COMPOUND

K.I. Mosalev^{1}, I.D. Ivanov¹, S.M. Miroshnichenko¹, M.V. Tenditnik², N.P. Bgatova³, E.E. Shults⁴, V.A. Vavilin¹*

¹Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine,
2 Timakova str., Novosibirsk, 630117 Russia; *e-mail: mosalevki@mail.ru

²Research Institute of Neurosciences and Medicine,
4 Timakova str., Novosibirsk, 630117 Russia

³Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the Federal Research Center
of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
2 Timakova str., Novosibirsk, 630117 Russia

⁴Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
9 Akademika Lavrent'eva av., Novosibirsk, 630090, Russia

The immunomodulatory activity of a betulonic acid-based compound with furocoumarin (BABCF; 2-azido, 9-N-methylpiperazinomethyl oreozelone) has been investigated. Male C57BL/6 mice (aged 3 months) treated with the cytostatic agent cyclophosphamide (CP) and intact individuals served as experimental models. The expression of genes was studied in bone marrow (*IL-12*, *IL-10*, *IL-1β*, *TNF-α*, *TGF-β*, *M-CSF*, *GM-CSF*) or in the suspension of peritoneal cells (*IL-12*, *IL-10*; as the injection site). The surface markers of T-lymphocytes (CD3, CD4, and CD8) in fractions of venous blood mononuclear cells (MNCs) were determined by means of flow cytometry using antibodies. Histological and morphometric studies were performed to assess the impact of CP and BABCF on the thymus. BABCF caused a pronounced (about 3-fold) increase in relative expression of the *GM-CSF* gene. BABCF caused a local increase in the expression of *IL-12* in the peritoneal cavity cells and restored the relative content of T-lymphocytes in the blood of CP-treated mice treated affecting mainly CD3⁺CD4⁺ lymphocytes. This substance reduced the tissue density of the thymic cortex and thymic medulla in CP-treated mice. Thus, results of this study suggest that BABCF exhibits a stimulating effect on the cellular link of immunity and promotes maintenance of the number of T-lymphocytes in the blood due to their migration from the central organs of the immune system.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: betulonic acid; furocoumarins; cytokines; bone marrow; thymus; T-lymphocytes

Funding. The work was carried out within the framework of the Budget Project No. 122032200236-1 using the equipment of the Center for Collective Use “Proteomic Analysis”, supported by funding from the Russian Ministry of Education and Science (agreement No. 075-15-2021-691).

Received: 28.03.2023; revised: 10.07.2023; accepted: 14.07.2023.