

©Коллектив авторов

ГЕПАТОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

К.И. Мосалев^{1*}, И.Д. Иванов¹, М.В. Тендитник², Э.Э. Шульц³, 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

³Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 9

На модели циклофосфамид (ЦФ)-индуцированной иммуносупрессии у лабораторных мышей линии C57BL/6 исследовали гепатотропные эффекты конъюгата бетулоновой кислоты с 9-(4-метилпиперазин-1-илметил)-2-(1,2,3-триазолил) ореозелона (Соед). Определяли экспрессию генов цитохромов (*CYP 1A1*, *CYP 1A2*, *CYP 3A44*, *CYP 2B10*, *CYP 2C29*, *CYP 17A1*), *PPARA* и цитокинов (*TNF-α*, *IL-1β*, *IL-12α*, *IL-10*), а также относительный уровень белков NF-κB p65, GST-π и NAT-1 в печени животных. Введение животным Соед и ЦФ вызывало достоверное увеличение экспрессии гена *CYP 2B10* в 3,2 раза по сравнению с контрольной группой на шестые сутки после введения. После введения Соед и ЦФ было отмечено повышение уровня мРНК гена провоспалительного *TNF-α* в 2,4 раза по сравнению с группой животных, получавших ЦФ. Введение исследуемого Соед интактным животным способствовало увеличению экспрессии *IL-1β* в 2,5 раза и снижению экспрессии *IL-10* в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой. Повышение экспрессии генов провоспалительных цитокинов в печени животных, получавших Соед, сопровождалось увеличением содержания NF-κB p65 в 1,6 раза, а также увеличением относительного количества белка NAT-1 в 2,7 раза по сравнению с образцами печени контрольных животных.

Ключевые слова: бетулоновая кислота; фурукумарины; печень; белки; цитохромы; цитокины

DOI: 10.18097/PBMC20247001015

ВВЕДЕНИЕ

Бетулоновая кислота (БК) и её производные достаточно широко известны благодаря своим иммуномодулирующим и антиоксидантным свойствам. Некоторые производные БК обладают гепатопротекторным эффектом. Показано, что амиды БК, имеющие в качестве заместителей (C28) пиперидиннитроксидный или пирролидиннитроксидный фрагменты, обладают антицитолитическими свойствами, противодействуя развивающемуся фиброзу печени [1]. В то же время на модели некоторых клеточных линий они оказывали цитотоксический эффект [2].

Лучше всего изучены противовоспалительные свойства БК. Однако установлено, что некоторые модификации, например, введение дополнительного заместителя в положение С9 фурукумарина ореозелона в соединении с БК приводило к потере его противовоспалительной активности [2]. Нами было показано, что соединение БК и фурукумарина 9-(4-метилпиперазин-1-илметил)-2-(1,2,3-триазолил)

ореозелона (Соед) имеет потенциальный имунотропный эффект, повышая экспрессию *ГМ-КСФ* в костном мозге животных, а также восстанавливает относительное содержание Т-лимфоцитов в сыворотке крови после индукции иммуносупрессии [3]. Эта способность Соед делает привлекательной возможность его использования для восстановления функциональности иммунной системы в период между курсами химиотерапии. Не менее важной задачей является защита печени от гепатотоксического воздействия препаратов, используемых в химиотерапии. Для ряда лекарств показано, что их метаболизм связан с гепатотоксичностью. Обнаруженные ранее гепатопротекторные свойства БК [1] остаются неисследованными в отношении взаимодействия БК и системы метаболизма лекарств.

В данной статье рассмотрено влияние Соед на экспрессию генов и белков в печени. Целью работы была оценка гепатотропных эффектов Соед на модели циклофосфамид (ЦФ)-индуцированной иммуносупрессии.

Принятые сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; *CYP* – ген, кодирующий фермент суперсемейства цитохрома P450; DMSO – диметилсульфоксид; *GAPDH* – ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу; GST – глутатион-S-трансфераза; HIF-α – фактор, индуцируемый гипоксией альфа; Ig – иммуноглобулин; IL – интерлейкин; NAT-1 – N-ацетилтрансфераза-1; NF-κB – ядерный фактор каппа-би; *PPAR-α* – альфа-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом; SDS – додецилсульфат натрия; TLR – толл-подобные рецепторы; *TNF-α* – фактор некроза опухолей альфа; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; *β-act* – ген, кодирующий белок бета-актин; AT – антитело; БК – бетулоновая кислота; ВГС – вирусный гепатит С; *ГМ-КСФ* – ген, кодирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ОТ – обратная транскрипция; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РНК – рибонуклеиновая кислота; Соед – соединение; TBS – трис-солевой буфер; ЦФ – циклофосфамид; ЩФ – щелочная фосфатаза.

Известно, что в метаболизме ЦФ принимают участие ферменты суперсемейства CYP450, с помощью которых осуществляется 4-гидроксилирование и активация препарата (рис. 1). Главную роль на данном этапе играют ферменты CYP 2B6 и CYP 2C9 [4]. Одним из метаболитов ЦФ является акролеин. Он не обладает противоопухолевой активностью, однако приводит к побочным эффектам в отношении мочевыводящих путей. Общие побочные эффекты, о которых сообщалось в нескольких исследованиях и клинических испытаниях с использованием ЦФ, включают геморрагический цистит, аменорею, миелосупрессию, алопецию и приступы тошноты и рвоты [5].

Метаболизм БК и её влияние на систему метаболизма лекарств остаются малоизученными. Анализ, выполненный Rendick и Guengerich, показал, что лишь 5–6 цитохромов P450 человека (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 3A4, CYP 2B6, CYP 2C9) участвуют в метаболизме 90–95% ксенобиотиков [6]. Поэтому, нами были оценены в качестве потенциальных участников метаболизма Соед и ЦФ белки-ортологи, кодируемые у мышей генами *CYP 1A1*, *CYP 1A2*, *CYP 3A44*, *CYP 2B10*, *CYP 2C29* [7–12].

Помимо этого определяли экспрессию двух генов, продукты которых участвуют в обмене веществ:

PPARA кодирует фактор транскрипции, регулирующий липидный обмен в печени. PPAR- α активируется в условиях энергетического дефицита и необходим для процесса кетогенеза, ключевого адаптивного ответа на длительное голодание [13];

CYP 17A1 кодирует фермент 17- α гидроксилазу. Он осуществляет гидроксилирование прегненолона и прогестерона с образованием 17-гидроксипрегненолона и 17-гидроксипрогестерона соответственно. Данные молекулы являются предшественниками в синтезе мужских половых гормонов и кортизола соответственно [14]. Однако в последние несколько лет стали накапливаться сведения о роли печёночной 17- α гидроксилазы в углеводном обмене, в частности, в поддержании концентрации глюкозы и кетоновых тел во время голодания [15].

Для оценки влияния Соед на органический иммунитет определяли экспрессию генов цитокинов, участвующих в воспалительном ответе (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-12 α* и *IL-10*).

TNF- α — ген, кодирующий фактор некроза опухолей альфа, — провоспалительный цитокин, продуцируемый, главным образом, активированными макрофагами и лимфоцитами. Показана роль *TNF- α* в защите от инфекционных и онкологических заболеваний [16].

IL-1 β — другой важнейший медиатор воспаления. Этот цитокин синтезируется преимущественно в макрофагах и моноцитах. Его продукция может, например, осуществляться после взаимодействия толл-подобных (toll-like) рецепторов (TLR), расположенных на мембране макрофагов, с патоген-ассоциированными молекулами. Каскад реакций, происходящих вследствие активации TLR, приводит к мобилизации транскрипционного фактора NF- κ B и запуску транскрипции гена *IL-1 β* [16, 17].

IL-12 α кодирует одну из субъединиц *IL-12* — провоспалительного цитокина, продуцируемого активированными клетками воспаления: макрофагами, дендритными клетками, активированными лимфоцитами, а также эндотелиоцитами и кератиноцитами. Цитокин активирует дифференцировку Т-лимфоцитов, NK-клеток и повышает их цитотоксическую активность, также *IL-12* индуцирует в восприимчивых клетках выработку других провоспалительных цитокинов [16].

IL-10 — противовоспалительный цитокин, являющийся ключевым регулятором иммунного ответа; его продуцируют Т-хелперы 2 типа и Т-лимфоциты. *IL-10* ингибирует продукцию NF- κ B, а также провоспалительных цитокинов (в том числе *IL-1 β*) в лейкоцитах. В то же время *IL-10* поляризует иммунный ответ в гуморальном направлении усиливая продукцию антител [16, 18].

Помимо экспрессии генов было определено относительное содержание некоторых белков в печени экспериментальных животных.

GST- π (глутатион-S-трансфераза- π) является ферментом 2 фазы метаболизма ксенобиотиков, катализирующим реакцию переноса восстановленного глутатиона на молекулу субстрата. Различные ксенобиотики способны по-разному влиять на выработку GST- π ; в настоящей работе использовали диметилсульфоксид (DMSO) и ЦФ, усиливающие экспрессию данного фермента [19]. GST- π участвует

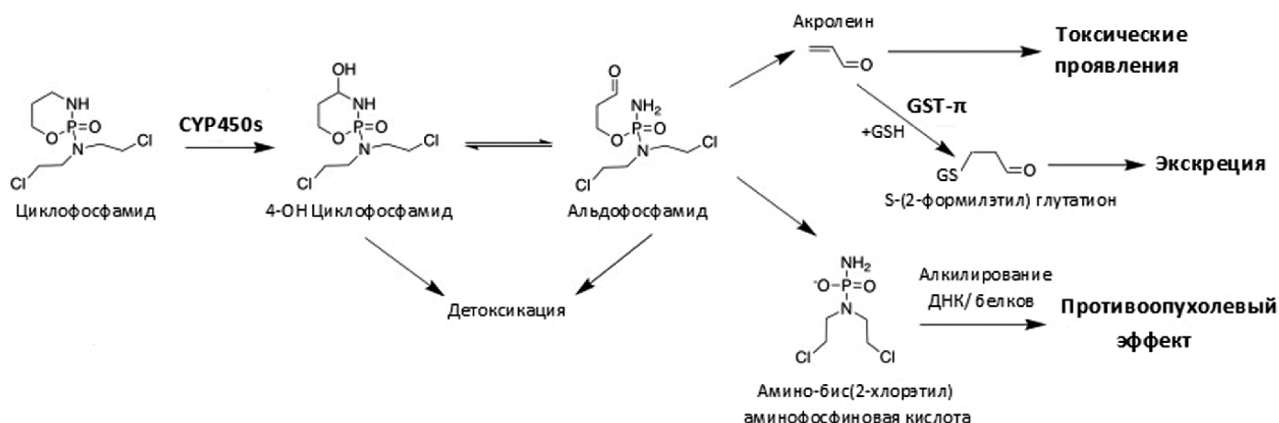


Рисунок 1. Схема метаболизма циклофосфида.

в метаболизме ЦФ на последнем этапе, присоединяя молекулу глутатиона к акролеину, препятствуя развитию акролеин-зависимой токсичности [20].

NF-κB p65 представляет собой фактор транскрипции, образующий гетеродимер с NF-κB p50. В неактивном состоянии он находится в цитоплазме в комплексе с ингибитором κB. При воздействии определённых сигналов, например, при связывании TLRs с компонентами потенциальных патогенов, комплекс NF-κB-ингибитор распадается и NF-κB мигрирует в ядро, запуская экспрессию множества генов, вовлечённых в процессы воспаления и антителообразования. Выработка NF-κB усиливается в ответ на действие главных провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β и TNF-α [16, 21].

NAT-1 является одним из основных ферментов 2 фазы метаболизма ксенобиотиков. Его главная роль заключается в ацетилировании ароматических аминов. В качестве его кофактора выступает ацетил-КоА [22]. Среди его лекарственных субстратов выделяются такие препараты, как дапсон, изониазид и сульфаниламиды [23]. Выбор данного белка для анализа обусловлен тем, что исследуемое Соед имеет в своём составе ароматические и гетероциклические фрагменты, содержащие атом азота.

МЕТОДИКА

Соединение БК и фурокумарина 9-(4-метилпиперазин-1-илметил)-2-(1,2,3-триазалил) ореозелона (рис. 2) синтезировано в лаборатории медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН [3].

Создание экспериментальной модели описано в нашей предыдущей работе.

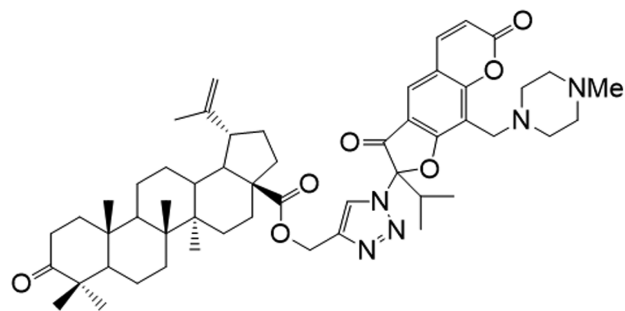


Рисунок 2. Структурная формула Соед.

Таблица 1. Схема эксперимента *in vivo*

Группа	Количество особей, шт.	1 день	2 день	6 день
Контроль	6	1% крахмал + 1% DMSO + H ₂ O (энтерально через зонд)	—	Выведение животных из эксперимента, выделение образцов печени
ЦФ	6	1% крахмал + 1% DMSO + H ₂ O (энтерально через зонд)	ЦФ (200 мг/кг массы тела) внутривенно	
Соед+ЦФ	6	р-р Соед (12 мг/кг массы) в 1% DMSO + 1% крахмал + H ₂ O (энтерально через зонд)	ЦФ (200 мг/кг массы тела) внутривенно	
Соед	6	р-р Соед (12 мг/кг массы) в 1% DMSO + 1% крахмал + H ₂ O (энтерально через зонд)	—	

Экспериментальные животные

В качестве объекта исследований использовали 3-месячных самцов лабораторных мышей *Mus musculus* линии C57BL/6, полученных из вивария Научно-исследовательского института нейронаук и медицины СО РАН. Экспериментальные животные были разделены на группы по 6 особей в каждой группе. Исследуемое соединение растворяли в DMSO, а затем разводили в 1% суспензии крахмала в воде, концентрация DMSO во вводимой смеси составляла 1%. На шестой день после введения соединения мышей умерщвляли методом ингаляции двуокиси углерода и выделяли образцы печени (табл. 1).

Анализ экспрессии генов

Выделение РНК из биологического материала было проведено с использованием TRI-REAGENT (“MRC”, США), согласно протоколу производителя. Для обработки одного фрагмента органа брали 1000 мкл реагента; клеточный лизат дважды экстрагировали 500 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), разделяя фазы центрифугированием в течение 5 мин при 10000 g. Далее вносили 500 мкл изопропилового спирта, осаждали РНК при 12000 g в течение 10 мин, дважды промывали осадок 80% этанолом; подсушивали и растворяли в бидистиллированной воде, содержащей RNA-secure реагент (“Ambion”, США). Препараты РНК хранили при -70°C. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов ОТ М-MuLV-RH (“Биолабмикс”, Россия), согласно протоколу производителя: на реакцию брали 2 мкг суммарной РНК, добавляли праймеры со случайными последовательностями и oligo-dT-праймеры, нагревали в течение 5 мин при 70°C и переносили в ледяную баню на 2 мин. Далее вносили смесь остальных реагентов (РНК-зависимую ДНК-полимеразу, ОТ-буфер, дезоксинуклеотидтрифосфаты), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и переносили в термостат (42°C) на 2 ч. Реакцию останавливали прогреванием в течение 10 мин при 70°C. Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили с использованием БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) (“Биолабмикс”). Были подобраны следующие условия, позволяющие проводить амплификацию выбранных для исследования генов:

ГЕПАТОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ

95°C — 5 мин; 45 циклов — (95°C — 10 с, 15 с при соответствующей температуре отжига, 72°C — 15 с). В качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *β-act* (табл. 2).

Вестерн-блот анализ

Каждый образец печени массой 10 мг гомогенизировали и денатурировали в 1 мл буфера, содержащем 0,0625 М трис-HCl (pH 6,8), 2% додецилсульфат натрия (SDS), 10% глицерин, прогреванием в течение 15 мин при 100°C на термостате. Далее в лизаты добавляли β-меркаптоэтанол (конечная концентрация 2%) и бромфеноловый синий (конечная концентрация 0,0005%).

Разделение белков электрофорезом в полиакриламидном геле проводили по методике Laemmli. На один гель наносили образцы трёх сравниваемых групп (“Контроль”, “ЦФ”, “ЦФ+Соед” или “Контроль”, “ЦФ”, “Соед”) — по три образца из каждой группы на мембрану, две мембраны для исследования содержания одного белка. После проведения электрофореза осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса (прибор Fastblot, “Biometra” (Германия); сила тока — 1,5 мА на 1 см² мембраны).

Затем мембрану отмывали TBS 3 раза по 5 мин и проводили блокировку центров неспецифической сорбции путём инкубации нитроцеллюлозной мембраны в растворе 5% BSA в TBS в течение 1 ч при комнатной температуре. После очередного отмывания TBS 3 раза по 5 мин при 25°C мембрану инкубировали с раствором антител (АТ) против исследуемых мышинных белков. АТ разводили в 1000 раз в растворе TBST, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин, 0,05% Tween-20 и TBS (×1) в течение 1,5 ч при комнатной температуре и помешивании.

В ходе эксперимента использовали первичные АТ: anti-NF-κBp65 (“Millipore” (США); концентрация 1 мг/мл, хозяин — кролик), anti-NAT1 (“BD Transduction Laboratories” (США); концентрация 250 мкг/мл, хозяин — мышь), anti-GST-π (“BD Transduction Laboratories”; концентрация 250 мкг/мл, хозяин — мышь).

Содержание исследуемых белков нормировали на уровень белков β-тубулина, β-актина и гистона H2b. Для этого использовали АТ к соответствующим белкам из коммерческого набора Western blot loading control (“ImgenEx”, США), разведённые согласно протоколу производителя. Затем мембрану отмывали TBS

Таблица 2. Названия целевых генов, последовательности олигонуклеотидов и их температуры отжига, использованные для оценки экспрессии генов

Ген	Последовательность праймеров	Температура отжига
<i>GAPDH</i>	F: 5'-TAGACAAAATGGTGAAGGTCGG-3' R: 5'-CCTGGAAGATGGTGATGGG-3'	57–62°C
<i>β-act</i>	F: 5'-CCTGAGGAGCACCTGTG-3' R: 5'-GGAGAGCATAGCCCTCGTAG-3'	57–62°C
<i>IL-12α</i>	F: 5'-AGTGTGGCACTGATGCTGATG-3' R: 5'-GTAGCCAGGCAACTCTCGTT-3'	62°C
<i>IL-10</i>	F: 5'-TGGGTTGCCAAGCCTTATCG-3' R: 5'-CTCTTCACCTGCTCCACTGC-3'	62°C
<i>IL-1β</i>	F: 5'-TGCCACCTTTTGACAGTGATGA-3' R: 5'-ATCAGGACAGCCCAGGTCAA-3'	58°C
<i>TNF-α</i>	F: 5'-TCAGTTCTATGGCCAGACC-3' R: 5'-ACCACTAGTTGGTTGTCTTTGAG-3'	61°C
<i>CYP 1A1</i>	F: 5'-TATCTCGTGGAGCCTCAT-3' R: 5'-ATCTCTTGTTGCTGTG-3'	57°C
<i>CYP 1A2</i>	F: 5'-CCCTTCAGTGGTACAGATG-3' R: 5'-GACAGGTGTGGGTTCTTC-3'	57°C
<i>CYP 3A44</i>	F: 5'-TTGTGGAGGAAGCCAAAAGTTT-3' R: 5'-TGAGAAGAGCAAAGGATCAAAAAGT-3'	57°C
<i>CYP 2B10</i>	F: 5'-CAATGTTTAGTGGAGGAAGTGGCG-3' R: 5'-CACTGGAAGAGGAACGTGGG-3'	60°C
<i>CYP 2C29</i>	F: 5'-CAGATGTCACAGCTAAAGTC-3' R: 5'-TTTAATGTCACAGGTCACTG-3'	57°C
<i>PPARA</i>	F: 5'-AGCAACAACCCGCCTTT-3' R: 5'-GACCTCTGCCTCTTTGTCTTC-3'	57°C
<i>CYP 17A1</i>	F: 5'-GATCGGTTTATGCCTGAGCG-3' R: 5'-TCCGAAGGGCAAATAACTGG-3'	57°C

3 раза по 10 мин при 25°C и выдерживали в растворе АТ против IgG мыши (или кролика), конъюгированных с ЦФ в течение 1 ч при 25°C. Вторичные АТ разводили в TBS в 2000 раз.

В ходе эксперимента использовали следующие вторичные АТ: Goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugated sc-2008 (“Santa-Cruz Biotechnology” (США); концентрация 200 мкг/0,5 мл); Bovine anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated sc-2372 (“Santa-Cruz Biotechnology”; концентрация 200 мкг/0,5 мл).

Затем мембрану снова отмывали в TBS 3 раза по 10 мин при 25°C и окрашивали смесью субстратов щелочной фосфатазы — нафтола AS-MX фосфата (0,2 мг/мл) и Fast Red Salt (1 мг/мл), растворённых в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂ (pH=8,0).

Полученные результаты обрабатывали денситометрически с помощью программы ImageLab (“Bio-Rad”, США).

Статистическая обработка результатов

Значимость различий между исследуемыми группами определяли с использованием пакета программ STATISTICA 12. Статистическую значимость различий оценивали, применяя непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни

Различия в значениях между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Данные по экспрессии генов выражены как среднее нескольких независимых экспериментов \pm среднеквадратическое отклонение ($M \pm SD$). Данные об относительном количестве белка представлены в виде диаграмм типа “boxplot”, на которых отображены медианы (Me), верхние и нижние квартили [Q1–Q3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия генов цитохромов P450 и PPARA в печени под влиянием ЦФ и Соед

Было установлено, что ЦФ и Соед влияют на экспрессию некоторых генов суперсемейства CYP 450 в печени (рис. 3). После введения ЦФ отмечено повышение экспрессии CYP 1A2 в 2,4 раза ($p=0,02$) по сравнению с контрольной группой. Отдельное введение Соед само по себе не вызывало достоверных отклонений в экспрессии ни одного из исследуемых генов цитохромов. В то же время, после введения Соед и ЦФ одного за другим было отмечено достоверное повышение экспрессии гена CYP 2B10 в среднем в 3,2 раза ($p=0,005$) по сравнению с контрольной группой.

После введения ЦФ наблюдалось повышение экспрессии PPARA ($p=0,045$) по сравнению с контрольной группой. Однако достоверных различий в уровнях экспрессии генов PPARA и CYP 17A1 после введения комбинации ЦФ+Соед не обнаружено (рис. 4). Введение животным одного Соед не влияло на уровень мРНК данных генов.

Изменения в экспрессии генов цитокинов в печени под влиянием ЦФ и Соед

Для оценки содержания белков и влияния ЦФ и Соед на экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе, сравнения между группами животных проводили следующим образом: “ЦФ”/“ЦФ+Соед”, “Контроль”/“Соед”. Оценка влияния изучаемых субстанций на экспрессию генов цитокинов показала, что у животных группы “ЦФ” происходит незначительное повышение экспрессии гена IL-1 β , а также снижение

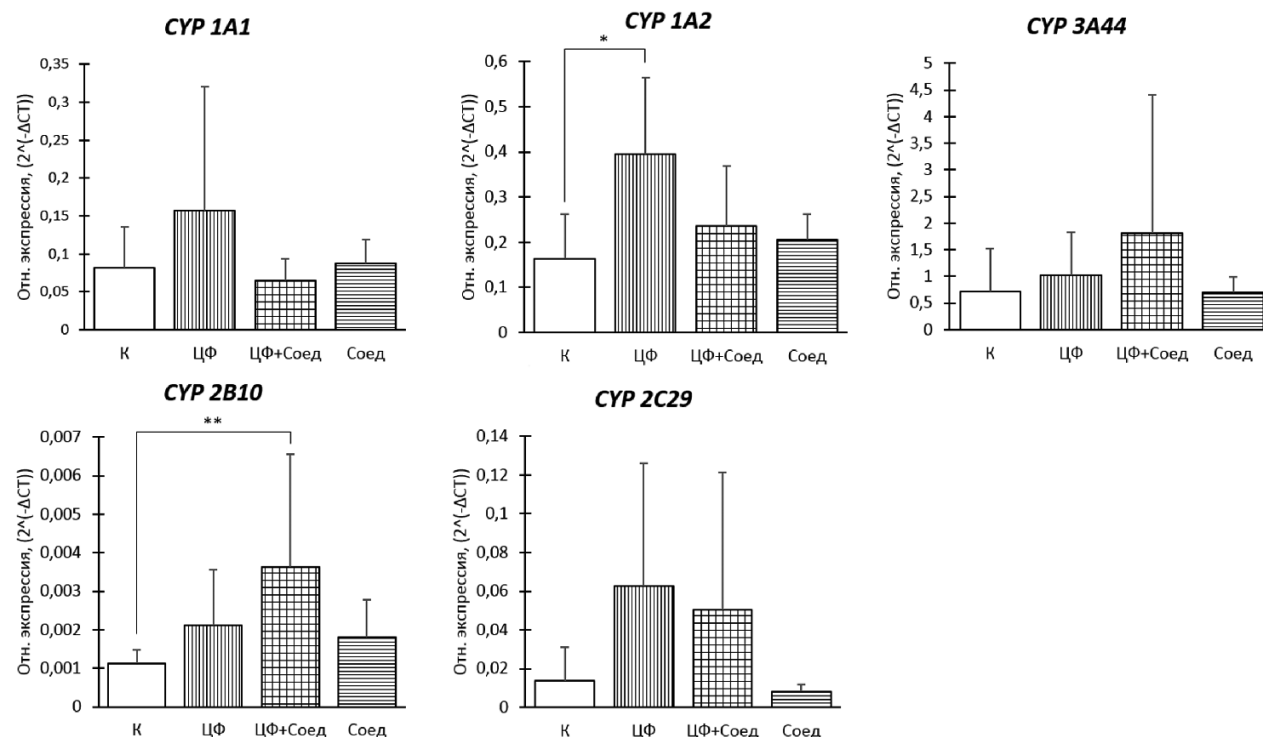


Рисунок 3. Относительная экспрессия (2^{-ΔCT}) генов ферментов суперсемейства CYP в печени животных после обработки ЦФ и Соед (n=6). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

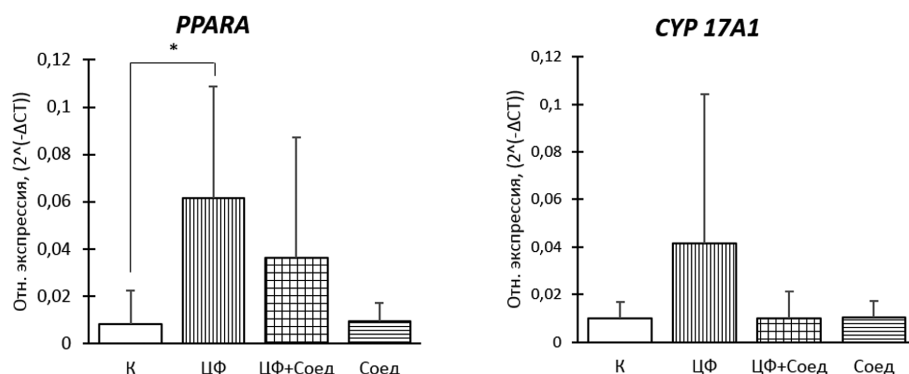


Рисунок 4. Относительная экспрессия генов *PPARα* и *CYP 17A1* ($2^{-\Delta CT}$) в печени животных после обработки ЦФ и Соед (n=6). * – достоверные различия между группами.

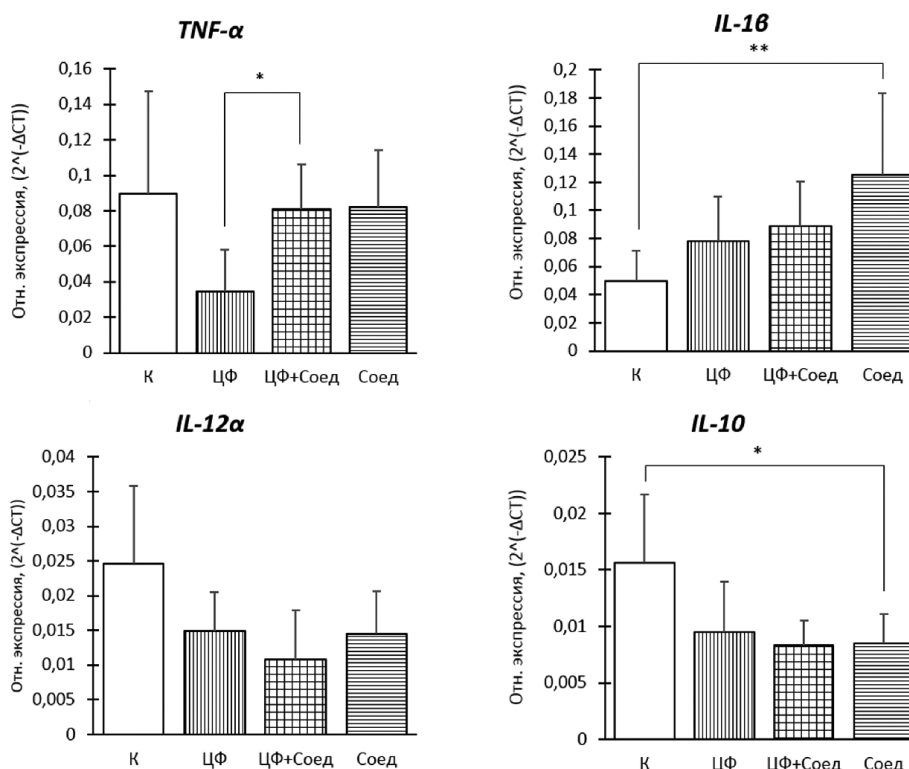


Рисунок 5. Относительная экспрессия генов цитокинов ($2^{-\Delta CT}$) в печени животных после обработки ЦФ и Соед (n=6). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

экспрессии генов *TNF-α*, *IL-12α* и *IL-10* (рис. 5). Предположительно, данные изменения обусловлены влиянием DMSO, введённого накануне особям из данной группы.

После введения ЦФ вслед за Соед было отмечено повышение уровня мРНК гена провоспалительного *TNF-α* в 2,4 раза по сравнению с группой “ЦФ” ($p=0,022$). В то же время введение исследуемого Соед интактным животным способствовало подъёму экспрессии *IL-1β* в 2,5 раза ($p=0,008$) и снижению экспрессии *IL-10* в 1,8 раз ($p=0,031$) по сравнению с контрольной группой (рис. 5).

Относительное содержание исследуемых белков в печени животных, обработанных ЦФ и Соед

Введение ЦФ и Соед не оказывало значимого влияния на содержание GST-π (рис. 6). В то же время введение Соед способствует повышению содержания

NF-κB p65 в среднем в 1,6 раз (“Контроль”/“Соед”: $p=0,012$), а также увеличивает количество белка NAT-1 в 2,7 раз (“Контроль”/“Соед”: $p=0,0122$) в образцах печени животных. Значимого увеличения относительного количества исследуемых белков у группы “ЦФ” по сравнению с контрольной группой обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Введение ЦФ вызывает закономерный рост экспрессии генов *CYP 450* [4]. Однако в данной работе увеличение экспрессии гена основного метаболитора ЦФ (*CYP 2B10*) оставалось на уровне тенденции. В литературе имеются данные о половом различии в экспрессии *CYP 2B10*: у самцов мышей его экспрессия ниже, чем у самок [24]. Тем не менее при однократном введении препарата

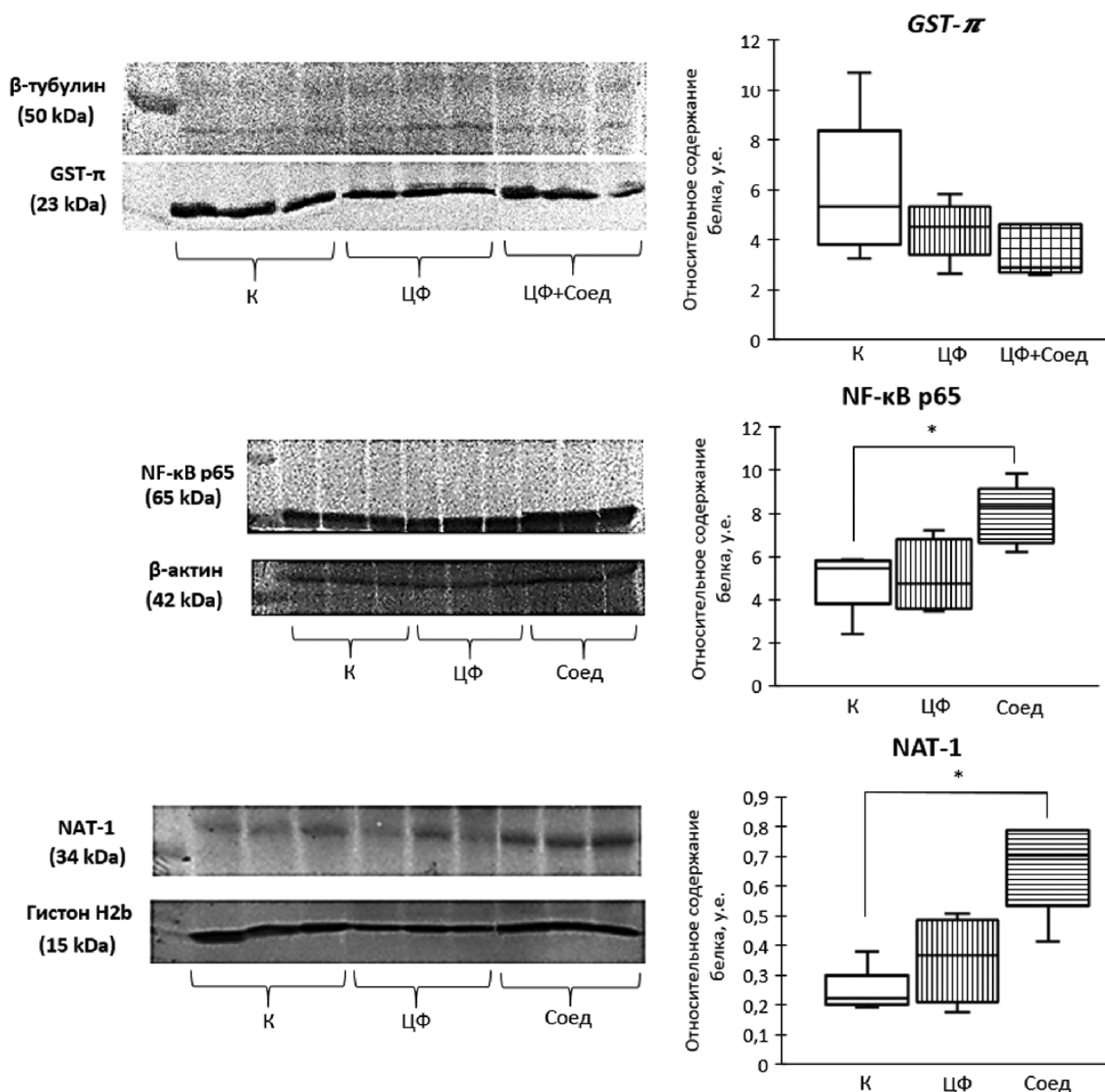


Рисунок 6. Относительное содержание белков (у.е.) в печени животных после обработки ЦФ и Соед (n=6). * – достоверные различия между группами.

значения экспрессии в группе “ЦФ+Соед” спустя пять дней после введения были достоверно выше, чем в контрольной группе. Это свидетельствует о влиянии Соед на экспрессию гена *CYP 2B10* и о возможном его влиянии на весь метаболизм ЦФ. В случае подтверждения повышения активности данного фермента можно утверждать, что данное Соед способствует ускорению метаболизма ЦФ и более быстрому наступлению терапевтического эффекта. В то же время Соед не влияет на выработку фермента GST-π, участвующего в восстановлении акролеина — метаболита ЦФ. Следовательно, после введения данного Соед вместе с ЦФ не следует ожидать усиления вышеуказанных побочных эффектов, ассоциированных с накоплением акролеина в организме.

В последние несколько лет накопились сведения о роли агонистов PPAR-α в стимуляции апоптоза клеток рака молочной железы, а также подавлении неоангиогенеза посредством ингибирования HIF-α и VEGF в клетках опухоли. Некоторые из них уже введены в химиотерапевтические схемы [25]. Повышение экспрессии *PPARA* под влиянием ЦФ может говорить о дополнительных путях реализации его противоопухолевого эффекта. С другой стороны, оно может отражать реакцию тканей органа на введение ЦФ, вызывающего повреждение печени и способствующего окислительному стрессу.

В группе “ЦФ” было отмечено неожиданное снижение экспрессии *TNF-α*, незначительное повышение экспрессии *IL-1β*, а также отсутствие изменений в выработке NF-κB p65 в печени

экспериментальных животных по сравнению с контрольными особями. Известно, что введение ЦФ в высоких дозах приводит к кратному приросту экспрессии вышеуказанных генов и синтезу белка [26, 27]. В данном случае снижение экспрессии воспалительных медиаторов можно объяснить влиянием DMSO, введённого мышам за сутки до ЦФ. Показано, что DMSO подавляет выработку TNF- α и NF- κ B [28] и обладает гепатопротекторным эффектом [29].

Введение исследуемого Соед способствовало повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов и р65-субъединицы NF- κ B, а также некоторому снижению экспрессии гена противовоспалительного IL-10, что говорит об однозначном иммуноактивирующем эффекте данного вещества. Данный профиль экспрессии может играть благоприятную роль при некоторых заболеваниях. Например, показано, что повышение экспрессии TNF- α и NF- κ B в опухолевом микроокружении гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) ассоциировано с лучшим клиническим прогнозом у пациентов с данным диагнозом [30, 31]. В свою очередь, IL-1 может эффективно ингибировать репликацию РНК вируса гепатита С (ВГС) и экспрессию вирусных белков, обладая противовирусной активностью. Таким образом, повышение его экспрессии в печени может играть важную роль в элиминации вируса [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1) Применение ЦФ в комплексе с исследуемым Соед способствует повышению экспрессии мРНК гена *CYP 2B10* в печени мышей, что указывает на влияние Соед на экспрессию данного гена, и, предположительно, влияет на метаболизм ЦФ.

2) Исследуемое Соед увеличивает относительное содержание NAT-1 в печени, что указывает на роль NAT-1 в выведении исследуемой субстанции.

3) Введение исследуемого Соед способствовало повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α) и усилению выработки р65-субъединицы NF- κ B. В случае отсутствия токсичности, его применение может быть обосновано при вирусных заболеваниях печени (ВГС) и ГЦК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта №122032200236-1 (FGMU-2022-0004) с использованием оборудования ЦКП “Протеомный анализ”, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Животных содержали в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 33216-2014 и “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других

научных целях”. 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*. Публикация материала одобрена комитетом по биомедицинской этике при Федеральном исследовательском центре фундаментальной и трансляционной медицины (протокол №2 на заседании от 10.01.2024).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сорокина И.В., Баев Д.С., Жукова Н.А., Толстикова Т.Г., Антимонова А.Н., Петренко Н.И., Шульц Э.Э., Григорьев И.А. (2013) Гепатопротекторная активность амидов бетулоновой кислоты, содержащих фрагменты пиперидин- или пирролидиннитроксильных радикалов. *Биоорганическая химия*, **39**(6), 749-752. [Sorokina I.V., Baev D.S., Zhukova N.A., Tolstikova T.G., Antimonova A.N., Petrenko N.I., Shul'ts E.E., Grigor'ev I.A. (2013) Hepatoprotective activity of betulonic acid amides containing piperidine or pyrrolidininitroxide moieties. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **39**(6), 668-670.] DOI: 10.1134/S1068162013060083
2. 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
3. Мосалев К.И., Иванов И.Д., Мирошниченко С.М., Тендитник М.В., Бгатова Н.П., Шульц Э.Э., Вавилин В.А. (2023) Иммуномодулирующая активность соединения бетулоновой кислоты. *Биомедицинская химия*, **69**(4), 219-227. [Mosalev K.I., Ivanov I.D., Miroshnichenko S.M., Tenditnik M.V., Bgatova N.P., Shults E.E., Vavilin V.A. (2023) The immunomodulatory activity of the betulonic acid based compound. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(4), 219-227.] DOI: 10.18097/PBMC20236904219
4. Ramirez D.A., Collins K.P., Aradi A.E., Conger K.A., Gustafson D.L. (2019) Kinetics of cyclophosphamide metabolism in humans, dogs, cats, and mice and relationship to cytotoxic activity and pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.*, **47**(3), 257-268. DOI: 10.1124/dmd.118.083766
5. Джумабаева Б.Т., Бирюкова Л.С. (2015) Видаль специалист: Онкология: Справочник — 12-издание, Видаль Рус, Москва, 384 с. [Jumabaeva B.T., Biryukova L.S. (2015) Vidal specialist: Oncology: Handbook — 12th edition, Vidal Rus, Moscow, 384 p.]
6. Rendic S., Guengerich F.P. (2015) Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chem. Res. Toxicol.*, **28**, 38-42. DOI: 10.1021/tx500444e

7. Ye W., Chen R., Chen X., Huang B., Lin R., Xie X., Chen J., Jiang J., Deng Y., Wen J. (2019) AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Spl. FEBS J., **286**, 4215-4231. DOI: 10.1111/febs.14956
8. Androustopoulos V.P., Tsatsakis A.M., Spandidos D.A. (2009) Cytochrome P450 CYP1A1: Wider roles in cancer progression and prevention. BMC Cancer, **9**, 187. DOI: 10.1186/1471-2407-9-187
9. Chen Y., Zeng L., Wang Y., Tolleson W.H., Knox B., Chen S., Ren Z., Guo L., Mei N., Qian F., Huang K., Liu D., Tong W., Yu D., Ning B. (2017) The expression, induction and pharmacological activity of CYP1A2 are post-transcriptionally regulated by microRNA hsa-miR-132-5p. Biochem. Pharmacol., **145**, 178-191. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.08.012
10. Anakk S., Huang W., Staudinger J.L., Tan K., Cole T.J., Moore D.D., Strobel H.W. (2007) Gender dictates the nuclear receptor-mediated regulation of CYP3A4. Drug Metab. Dispos., **35**(1), 36-42. DOI: 10.1124/dmd.106.011270
11. Wang Q., Tang Q., Zhao L., Zhang Q., Wu Y., Hu H., Liu L., Liu X., Zhu Y., Guo A., Yang X. (2020) Time serial transcriptome reveals CYP2C29 as a key gene in hepatocellular carcinoma development. Cancer Biol. Med., **17**, 401-417. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0335
12. Chen M., Chen M., Lu D., Wang Y., Zhang L., Wang Z., Wu B. (2021) Period 2 regulates CYP2B10 expression and activity in mouse liver. Front. Pharmacol., **12**, 764124. DOI: 10.3389/fphar.2021.764124
13. MacNaul K.L., Moller D.E. (2003) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. In: Encyclopedia of Hormones (Henry H.L., Norman A.W., eds), Academic Press, pp. 178-186. DOI: 10.1016/B0-12-341103-3/00251-5
14. Burris-Hiday S.D., Scott E.E. (2021) Steroidogenic cytochrome P450 17A1 structure and function. Mol. Cell. Endocrinol., **528**, 111261. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111261
15. Milona A., Massafra V., Vos H., Naik J., Artigas N., Paterson H.A.B., Bijmans I.T.G.W., Willemsen E.C.L., Ramos Pittol J.M., Miguel-Aliaga I., Bosma P., Burgering B.M.T., Williamson C., Vernia S., Dhillo W.S., van Mil S.W.C., Owen B.M. (2019) Steroidogenic control of liver metabolism through a nuclear receptor-network. Molecular Metabolism, **30**, 221-229. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.09.007
16. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. (2008) Цитокины. — СПб: ООО "Издательство Фолиант", сс. 70-79, 104-120, 144-151, 235-243, 326-333. [Ketlinsky S.A., Simbirsev A.S. (2008) Cytokines. - St. Petersburg: Foliant Publishing LLC, pp. 70-79, 104-120, 144-151, 235-243, 326-333.]
17. Cogswell J.P., Godlevski M.M., Wisely G.B., Clay W.C., Leesnitzer L.M., Ways J.P., Gray J.G. (1994) NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. J. Immunol., **153**(2), 712-723.
18. Rutz S., Ouyang W. (2016) Regulation of Interleukin-10 Expression. In: Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases (Ma X., ed.). Advances in Experimental Medicine and Biology, **941**, 43-47. DOI: 10.1007/978-94-024-0921-5_5
19. Vedi M., Smith J.R., Hayman G.T., Tutaj M., Brodie K.C., de Pons J.L., Demos W.M., Gibson A.C., Kaldunski M.L., Lamers L., Laudederkind S.J.F., Thota J., Thorat K., Tutaj M.A., Wang S.-J., Zacher S., Dwinell M.R., Kwitek A.E. (2023) 2022 updates to the rat genome database: A findable, accessible, interoperable, and reusable (FAIR) resource. Genetics, **224**(1), iyad042. DOI: 10.1093/genetics/iyad042
20. Devi A., Devaraj H. (2006) Induction and expression of GST-Pi foci in the liver of cyclophosphamide-administered rats. Toxicology, **217**(2-3), 120-128. DOI: 10.1016/j.tox.2005.09.007
21. Ghosh S., Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell, **109**(2), 81-96. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00703-1
22. Oesch-Bartlomowicz B., Oesch F. (2007) 5.08 – Mechanisms of Toxicification and Detoxification which Challenge Drug Candidates and Drugs. In: Comprehensive Medicinal Chemistry II (Taylor J.B., Triggler D.J., eds.), Elsevier, pp. 193-214. DOI: 10.1016/B0-08-045044-X/00124-3.
23. Spielberg S.P. (1996) N-acetyltransferases: Pharmacogenetics and clinical consequences of polymorphic drug metabolism. J. Pharmacokinet. Biopharm., **24**(5), 509-519. DOI: 10.1007/BF02353477
24. Udomsuk L., Jarukamjorn K. (2009) Factors influencing regulation of CYP2B expression. Thai. Pharm. Health Sci. J., **4**(4), 524-531.
25. Qian Z., Chen L., Liu J., Jiang Y., Zhang Y. (2023) The emerging role of PPAR-alpha in breast cancer. Biomed. Pharmacother., **161**, 114420. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114420
26. Mansour D.F., Saleh D.O., Mostafa R.E. (2017) Genistein ameliorates cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by modulation of oxidative stress and inflammatory mediators. Open Access Maced. J. Med. Sci., **5**(7), 836-843. DOI: 10.3889/oamjms.2017.093
27. El-Baz F., Salama A., Sami A., Rania E. (2022) Lutein isolated from *Scenedesmus obliquus* microalga boosts immunity against cyclophosphamide-induced brain injury in rats. Sci. Rep., **12**(1), 22601. DOI: 10.1038/s41598-022-25252-9
28. Essani N.A., Fisher M.A., Jaeschke H. (1997) Inhibition of NF-kB activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-α formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. Shock, **7**(2), 90-96. DOI: 10.1097/00024382-199702000-00003
29. Deol P., Yang J., Morisseau C., Hammock B.D., Sladek F.M. (2019) Dimethyl sulfoxide decreases levels of oxylipin diols in mouse liver. Front. Pharmacol., **10**, 580. DOI: 10.3389/fphar.2019.00580
30. Tan W., Luo X., Li W., Zhong J., Cao J., Zhu S., Chen X., Zhou R., Shang C., Chen Y. (2018) TNF-α is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. eBioMedicine, **40**, 446-456. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.12.047
31. Li H., Wang Y., Zhang M., Hu J., Li Z., Han B. (2019) The high expression of TNF-α and NF-κB in tumor microenvironment predicts good prognosis of patients with BCLC-0-B hepatocellular carcinoma. Transl. Cancer Res., **8**(2), 532-541. DOI: 10.21037/tcr.2019.03.09
32. Zhu H., Liu C. (2003) Interleukin-1 inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by activation of extracellular regulated kinase pathway. J. Virol., **77**(9), 5493-5498. DOI: 10.1128/jvi.77.9.5493-5498.2003

Поступила в редакцию: 20. 12. 2023.
После доработки: 22. 01. 2024.
Принята к печати: 23. 01. 2024.

HEPATOTROPIC ACTIVITY OF A BETULONIC ACID BASED COMPOUND

K.I. Mosalev^{1}, I.D. Ivanov¹, M.V. Tenditnik², E.E. Shults³, 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

³N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS,
9 Akademika Lavrent'eva av., Novosibirsk, 630090 Russia

Using the model of cyclophosphamide (CP)-induced immunosuppression in C57BL/6 mice, the hepatotropic effects of a conjugate of betulonic acid with 9-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-2-(1,2,3-triazolyl) oreozelone (BABC) have been studied. In the liver of treated animals the expression of genes for cytochromes (*CYP 1A1*, *CYP 1A2*, *CYP 3A44*, *CYP 2B10*, *CYP 2C29*, *CYP 17A1*), *PPARA*, and cytokines (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-12 α* , *IL-10*) and the relative levels of NF- κ B p65, GST- π , and NAT-1 proteins were determined. On day six after administration of the compound and CP to animals a significant (3.2-fold) increase in the expression of the *CYP 2B10* as compared to the control group was observed. Treatment of mice with the compound and CP also caused a 2.4-fold increase in the mRNA level of the pro-inflammatory *TNF- α* gene as compared to the group of animals receiving CP. Administration of the studied compound to intact animals was accompanied by a 2.5-fold increase in the *IL-1 β* expression and a 1.8-fold decrease in the *IL-10* expression as compared to the control group. An increase in the expression of pro-inflammatory cytokine genes in the liver of animals treated with the compound was accompanied by an increase in the content of NF- κ B p65 (by 1.6 times), as well as an increase in the relative amount of NAT-1 protein (by 2.7 times) as compared to control animals.

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

Key words: betulonic acid; furocoumarins; liver; proteins; cytochromes; cytokines

Funding. The work was carried out within the framework of the Budget Project No. 122032200236-1 (FGMU-2022-0004) 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: 20.12.2023; revised: 22.01.2024; accepted: 23.01.2024.