

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ» (НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, НГУ)

Институт медицины и психологии В. Зельмана НГУ

Кафедра *Клинической биохимии*

Направление подготовки/специальности: 31.05.01 Лечебное дело

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА СПЕЦИАЛИСТА

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Мосалев Кирилл Игоревич

Тема работы: Исследование биологической активности конъюгатов производных
бетулина с фурукумаринами

«К защите допущен»

Заведующая кафедрой клинической биохимии

ФГАОУ ВО НГУ

Руководитель лаборатории ММК

НИИМББ ФИЦ ФТМ

Д.б.н., профессор

Гуляева Л.Ф. /.....

«.....».....20...г

Научный руководитель

старший научный сотрудник

лаборатории МЕЛФА

НИИМББ ФИЦ ФТМ

к.б.н.,

Иванов И.Д./.....

«.....».....20...г.

Содержание

Список используемых сокращений.....	4
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	9
1.1. Характеристика исследуемых генов.....	9
1.1.1 Интерлейкин-1 β	9
1.1.2 Интерлейкин-12.....	10
1.1.3 Фактор некроза опухолей альфа.....	11
1.1.4 Интерлейкин-10.....	11
1.1.5 Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.....	12
1.1.6 Цитохром CYP1A1.....	12
1.1.7 Цитохром CYP1A2.....	12
1.2 Биологическая и фармакологическая активность бетулина и его производных.....	13
1.2.1 Антибиотическая активность и противовирусные свойства бетулиновой кислоты ...	13
1.2.2 Ингибирование фактора NF- κ B и противовоспалительная активность.....	13
1.2.3 Бетулиновая кислота как противодиабетическое средство.....	15
1.2.4 Цитотоксическое действие бетулиновой кислоты в отношении опухолевых клеток.....	15
1.3 Биологическая активность линейных фурукумаринов.....	17
1.4 Использование циклофосамида для индуцирования иммуносупрессии <i>in vivo</i>	18
Глава 2. Материалы и методы.....	19
2.1 Исследуемые соединения.....	19
2.2 Клеточные культуры.....	19
2.3 Модель циклофосамид - индуцированной иммуносупрессии.....	19
2.3 Оборудование.....	20
2.4 Методика оценки относительной экспрессии.....	23
Глава 3. Результаты.....	23
3.1 Соединение 3.....	24
3.2 Соединение 4.....	28
3.3 Соединение 5.....	33
Глава 4. Обсуждение полученных результатов.....	36
4.1 Соединение 3.....	36
4.2 Соединение 4.....	36
4.3 Соединение 5.....	38
Выводы.....	39
Благодарность.....	40

Список цитированной литературы.....	41
-------------------------------------	----

Список используемых сокращений

- АНН – арил-гидрокарбоновая гидроксилаза
- АПК – антигенпредставляющие клетки
- АТФ - аденозинтрифосфат
- БК - бетулиновая кислота
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВПГ – вирус простого герпеса
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЛ – интерлейкин
- ИПЛ - интерстициальное поражение лёгких
- ИФН- γ – интерферон гамма
- к-ДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- М-КСФ- макрофагальный колониестимулирующий фактор
- НЯК – неспецифический язвенный колит
- ПАУ – полиароматические углеводороды
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ТФР- β – трансформирующий ростовой фактор бэта
- ФМА - форбол-12-миристан-13 ацетат
- ФНО – фактор некроза опухоли
- ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2
- АIF – апоптоз-индуцирующий фактор
- АМРК – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа
- Аraf-1 – апоптоз-активирующий фактор 1
- Bcl – регулятор апоптоза
- CD – кластер дифференцировки
- CD95-L (Fas-L) -фактор, запускающий апоптоз в клетке
- CREB (Cyclic-AMP Response Element – binding protein) – транскрипционный фактор
- CYP – номенклатурное обозначение суперсемейства генов цитохрома P450
- ЕРО – эритропоэтин
- IAP – ингибитор апоптоза
- ICAM (InterCellularAdhesionMolecule) - межклеточная молекула адгезии
- IRF1 (Interferon regulatory factor 1) – транскрипционный фактор

LPS – липополисахарид

MAPK – митоген-активированная протеинкиназа

MCP (Monocyte Chemoattractant Protein 1) – хемоаттрактант для моноцитов

MIP (Macrophage Inflammatory Protein) – хемокин

MOMP – проницаемость внешней мембраны митохондрий

NAD - никотинамидадениндинуклеотид

NF- κ B-ядерный фактор «каппа-би»

NK – натуральные киллерные клетки

NRF2 – ядерный фактор 2, подобный эритроидному ядерному фактору 2, продукт гена NFE2L2

p53 – tumor protein p53, продукт гена *TP53*, транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл

PARP – поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы

PDT – фотодинамическая терапия

PUVA – псорален +длинноволновое ультрафиолетовое излучение

RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) – хемоаттрактант для Т-клеток, базофилов и эозинофилов

ROS – активные формы кислорода

Smac – второй митохондриальный активатор каспаз

TLR (Toll-like receptors) - Толл-подобные рецепторы

VCAM (Vascular cell adhesion molecule) - «васкулярная» молекула клеточной адгезии

Введение

Природные тритерпеновые соединения характеризуются широким распространением в природном растительном материале и методически несложными процедурами извлечения. В связи с широким спектром биологического действия, они представляют большой научный и, особенно, фармацевтический интерес [10].

В числе тритерпеноидов и их производных есть достаточно большое количество соединений, обладающих высокой антибиотической [36], противовирусной [20, 49], противовоспалительной [22, 42], антиоксидантной [15], сахароснижающей [27, 23] и противоопухолевой [38] активностями. Активно изучаются фармакологические свойства производных тритерпеноидов лупанового ряда – бетулина, бетулиновой и бетулоновой кислот, об этом свидетельствует растущее число публикаций о синтезе новых производных и изучении их биологической активности (более 1500 за последние пять лет).

Наряду с тритерпеновыми соединениями большое внимание уделяется исследованию производных линейных фурукумаринов, которые играют важную роль в жизнедеятельности растительных и животных организмов, а также обладают высокой биологической активностью. Фурукумарины проявляют фотосенсибилизирующую активность и могут применяться при лечении аутоиммунных и гиперпролиферативных заболеваний кожи [3, 24].

Соединения, содержащие в своём составе фрагменты фурукумаринов и лупановых тритерпеноидов, могут сочетать свойства взятых в комбинацию лекарственных средств, а также усиливать и изменять свойства исходных компонентов. Это представляет значительный интерес с точки зрения возможного усиления, в первую очередь, противовоспалительных, иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств.

Целью настоящей работы является исследование противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств соединений бетулиновой кислоты с фурукумаринами. Оценка предполагаемых свойств производилась с помощью изучения профиля экспрессии генов различных цитокинов, участвующих в воспалительном, противоопухолевом ответе, а также поддержании кроветворения и гомеостаза в норме. В экспериментах различные нетоксические дозы веществ были добавлены к клеточной культуре. Эффект от воздействия соединений был оценён по степени экспрессии генов пяти цитокинов и двух цитохромов культурой клеток U-937. Разное время экспозиции клеточной культуры с соединениями позволило оценить зависимость их эффекта от времени. Одно из соединений, продемонстрировавшее наиболее значимый эффект, было испытано в эксперименте *in vivo* на мышцах линии C57BL/6, обработанных циклофосфаном.

Изучение влияния соединений бетулина на экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов культурой иммунных клеток даёт представление об их влиянии на иммунную систему организма. Цитокины представляют собой группу универсальных полипептидных медиаторов межклеточных взаимодействий. Цитокины являются сигнальными молекулами, обеспечивающими обмен информацией между клетками, в том числе, между клетками иммунной системы. Они способны проявлять биологическую активность как в растворимой, так и в мембранной форме. Цитокины – это самостоятельная система регуляции, наряду с нейроэндокринной системой, эти системы взаимосвязаны и взаимозависимы. В настоящее время известно более 200 пептидов, относящихся к семейству цитокинов, вместе они образуют обширную сеть взаимодействий, влияя на клетки-мишени, в том числе, через влияние на экспрессию других цитокинов.

Целью работы являлось изучение биологических эффектов новых соединений бетулиновой кислоты и фурукумаринов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить токсичность соединений БК с фурукумаринами для клеточной линии U-937;
2. Исследовать влияние соединений на экспрессию генов цитохромов и цитокинов в клеточной линии в различных концентрациях методом ПЦР с детекцией в реальном времени;
3. Исследовать суточную кинетику изменений экспрессии в клеточной линии U-937 методом ПЦР с детекцией в реальном времени;
4. Оценить влияние наиболее перспективного соединения на экспрессию генов в системе *in vivo*: в перитонеальных макрофагах и костном мозге лабораторных мышей, подверженных искусственной иммуносупрессии;
5. Оценить влияние выбранного соединения на качественный состав периферической крови лабораторных мышей, подверженных искусственной иммуносупрессии.

Личный вклад студента заключается в оценке биологических эффектов соединений производных бетулина с фурукумаринами путём проведения серии экспериментов с клеточной линией U-937 и лабораторными животными, последующего выделения клеточной РНК, проведения реакции обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции, а также обработки и интерпретации полученных данных.

За время выполнения работы освоены следующие методы.

Ведение клеточных культур; управление дифференцировкой клеток; индукция клеток различными веществами; выделение клеточной РНК, получение к-ДНК в ходе

реакции обратной транскрипции, полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени, содержание лабораторных животных и их использование в модели искусственной иммуносупрессии, приготовление мазков периферической крови с их последующим анализом; статистическая обработка полученных данных.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Характеристика исследуемых генов

Проанализировав профиль экспрессии генов различных цитокинов культурой иммунных клеток, можно получить сведения о механизмах влияния исследуемого вещества на иммунную систему организма в целом. Наибольший интерес представляют цитокины, находящиеся на главных позициях в цитокиновой сети регуляции функций организма: ИЛ-12, ИЛ-10. Они оказывают влияние на общее состояние иммунной системы организма. Заслуживают внимания ИЛ-1 β и ФНО- α , т.к. они являются одними из самых важных в процессе воспаления, а также ГМ-КСФ – цитокин, регулирующий кроветворение.

Также мы посчитали необходимым изучить влияние соединений на экспрессию генов цитохромов семейства P450. Это обусловлено тем, что изменение в активности цитохромов влияет не только на фармакокинетику других лекарств, но и на состояние организма в целом.

1.1.1 Интерлейкин-1 β

Интерлейкин-1бета (IL-1 β , ИЛ-1 β) – важнейший медиатор воспаления, представляет собой полипептид с молекулярной массой около 18кДа, ген которого находится в составе 2-ой хромосомы. Он, наряду с ИЛ-1 α и ИЛ-1Ra, является важнейшим членом большого семейства цитокинов. ИЛ-1 α – белок, гомологичный ИЛ-1, обладает сходным с ним спектром биологической активности, но является мембранной формой. ИЛ-1Ra (рецепторный антагонист), также обладает структурным сходством с ИЛ-1 β и связывается тем же самым рецептором, но при этом блокирует активность последнего. ИЛ-1 β синтезируется преимущественно в макрофагах и моноцитах. Его продукция осуществляется после взаимодействия Toll-like рецепторов, расположенных на мембране макрофагов, с компонентами бактериальной клеточной стенки (LPS, пептидогликаны, флагеллин, липотейхоевые кислоты) и другими патоген-ассоциированными молекулами (РНК вирусов) [34]. Каскад реакций, происходящих вследствие активации TLR, приводит к активации транскрипционного фактора NF- κ B и ферментов инфламмосомы (в т.ч. каспазы 1), которые расщепляют предшественник ИЛ-1 с образованием его биологически активной формы.

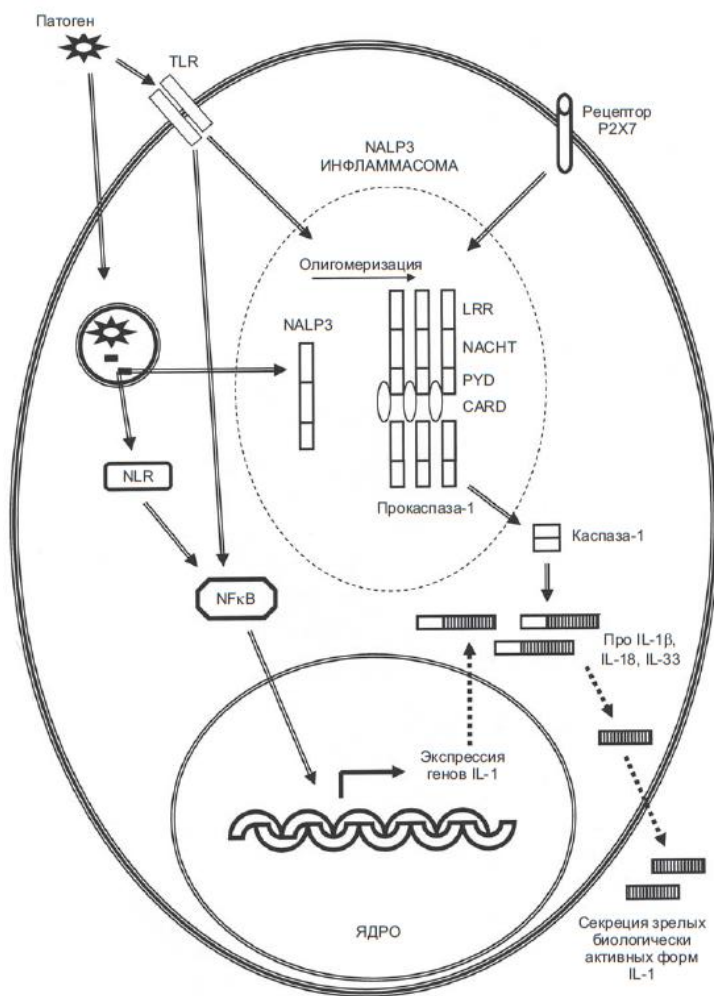


Рис. 1 Схема синтеза и секреции ИЛ-1 β [5].

ИЛ-1 β индуцирует синтез других провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6), низкомолекулярных медиаторов воспаления (NO, простагландины) и хемокинов, усиливает антигенпредставляющую функцию дендритных клеток, активирует матриксные металлопротеиназы [7]. Гиперпродукция ИЛ-1 является важным этапом в патогенезе многих хронических воспалительных заболеваний (ревматоидный артрит, псориаз, НЯК, болезнь Крона и др.) [7].

1.1.2 Интерлейкин-12

Интерлейкин 12 (IL-12, ИЛ-12) - иммуноактивирующий цитокин, состоящий из двух субъединиц – p35 (ММ=22513 г/моль) и p40 (ММ=34699 г/моль), именуемых соответственно α - и β -субъединицами. Он продуцируется активированными клетками воспаления: моноцитами, макрофагами, дендритными клетками, активированными лимфоцитами, а также эндотелиоцитами и кератиноцитами. Рецептор ИЛ-12 – ИЛ-12R, экспрессируется только на активированных Т-лимфоцитах и НК-клетках. Цитокин активирует дифференцировку Т-лимфоцитов, повышает их цитотоксическую активность, усиливает пролиферацию НК-клеток и Т-лимфоцитов и продукцию других цитокинов [47].

ИЛ-12 активирует клеточное звено приобретённого иммунитета. Компоненты бактерий связываются с соответствующими Toll-like рецепторами дендритных клеток, которые в ответ продуцируют ИЛ-12. В свою очередь, ИЛ-12 стимулирует образование ИФН- γ Т-клетками. Под воздействием ИФН- γ усиливается синтез активных форм кислорода в макрофагах, снижается рН их везикул, что способствует элиминации бактерий. Ингибиторами продукции ИЛ-12 являются ИЛ-10, ИЛ-4, ИЛ-13, ТФР- β , ингибитор фосфодиэстеразы пентоксифиллин и простагландин E2 [5, 47].

1.1.3 Фактор некроза опухолей альфа

Фактор некроза опухолей альфа (TNF- α , ФНО- α) - провоспалительный цитокин, продуцируемый в основном активированными макрофагами и лимфоцитами, в активной форме представляющий из себя тример массой 52кДа. Данный пептид был выделен в 1985 году как фактор, образующийся в результате активации иммунной системы и способный вызывать некроз опухолей у мышей. ФНО- α стимулирует в других клетках продукцию ИЛ-1 и ИЛ-6, индукцию апоптоза, образование антител В-клетками, продукцию колониобразующих факторов эндотелиальными клетками и фибробластами, которые участвуют в процессе ангиогенеза, осуществляют ко-стимуляцию Т-клеточной активации и НК-клеток и также обладает общим цитотоксическим действием [9, 33]. Показана роль ФНО в защите от инфекционных заболеваний, особенно вызванных внутриклеточными бактериями (*Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*). Введение фактора некроза опухолей в организм приводило к шоковому состоянию с типичными проявлениями септического шока: олигурией, гипотензией, тахипноэ, метаболическим ацидозом и повреждению тканей [5].

1.1.4 Интерлейкин-10

Интерлейкин 10 (IL-10, ИЛ-10) – иммуносупрессивный цитокин, представляющий собой полипептид, размером 160 аминокислот. ИЛ-10 является ключевым регулятором иммунного ответа, его продуцируют Т-хэлперы 2 типа, регуляторные Т-клетки, CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, CD5+ и CD11+ В-лимфоциты, активированные LPS, моноциты/макрофаги, некоторые субпопуляции дендритных клеток, эозинофилы, тучные клетки [43]. ИЛ-10 ингибирует продукцию NF- κ B в моноцитах, но активирует его в Т-киллерах. ИЛ-10 ингибирует продукцию ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α , ИФН- γ . Длительное воздействие ИЛ-10 на Т-клетки приводит к подавлению продукции ими ИЛ-2, INF- γ и индукции толерантности. Действуя на АПК, ИЛ-10 угнетает экспрессию костимулирующих молекул B7 и презентацию антигенов Т-хелперам первого типа, однако он усиливает антигенпрезентирующую способность АПК по отношению к Т-хелперам второго типа. Таким образом, ИЛ-10 поляризует иммунный ответ в гуморальном

направлении, активируя В-клетки, и предотвращает гиперактивацию воспаления, являясь иммуномодулирующим медиатором [5]. Высокий уровень экспрессии ИЛ-10 коррелирует с более благоприятным прогнозом при посттрансплантационном состоянии, однако его уровень в сыворотке крови значительно повышается при осложнённом (ИПЛ) течении ревматоидного артрита [1].

1.1.5 Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, ГМ-КСФ) – провоспалительный цитокин, по своей структуре являющийся гликопептидом, в состав которого входят 127 аминокислотных остатков. Его ген экспрессируется макрофагами, Т-лимфоцитами, эндотелиальными и эпителиальными клетками. В норме ГМ-КСФ практически не содержится в крови, однако, его содержание возрастает в условиях воспалительной реакции [5, 44]. Экспрессия *ГМ-КСФ* может быть ингибирована ИЛ-10 и ИФН- γ . ГМ-КСФ стимулирует пролиферацию и дифференцировку предшественников гранулоцитов и моноцитов, усиливает функциональную активность зрелых клеток гранулоцитарного, моноцитарного и эозинофильного рядов, а также повышает антигенпрезентирующую активность. Применение ГМ-КСФ в клинике основано на приросте числа зрелых нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов при его введении. Это используется для комбинированной терапии различных опухолей. В комбинации с эритропоэтином ГМ-КСФ участвует в дифференцировке эритроцитов [5].

1.1.6 Цитохром CYP1A1

CYP1A1 (АНН – арил-гидрокарбоновая гидроксилаза) участвует в первой фазе метаболизма ксенобиотиков и лекарственных средств. CYP1A1 индуцируется ароматическими углеводородами. Экспрессия гена *CYP1A1* наряду с генами *CYP1A2/1B1* регулируется гетеродимерным фактором транскрипции, который состоит из арил-гидрокарбонового рецептора, лиганда, активирующего транскрипционный фактор и ядерного переносчика рецептора ароматических углеводов. Участвует в метаболической активации диоксинов, ароматических углеводов, например, ПАУ.

1.1.7 Цитохром CYP1A2

CYP1A2 метаболизирует многие химические соединения - гетероциклические амины, ариламины, нитрозоамины, некоторые лекарства (кофеин). Белки цитохрома P450 представляют собой монооксигеназы, которые катализируют многие реакции, связанные с метаболизмом ксенобиотиков и синтезом холестерина, стероидов и других липидов. Из эндогенных субстратов метаболизирует полиненасыщенные жирные кислоты, например, арахидоновую кислоту до 19-гидрокси-эйкозотетраеновой кислоты. CYP1A2 индуцируется некоторыми полициклическими ароматическими углеводородами [18].

1.2 Биологическая и фармакологическая активность бетулина и его производных

Бетулин [луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол] – пентациклический тритерпеноид лупанового ряда, содержащийся во внешней коре белой березы *Betula pendula*. Бетулиновая кислота, являющаяся его производным, обладает аналогичными биологическими эффектами.

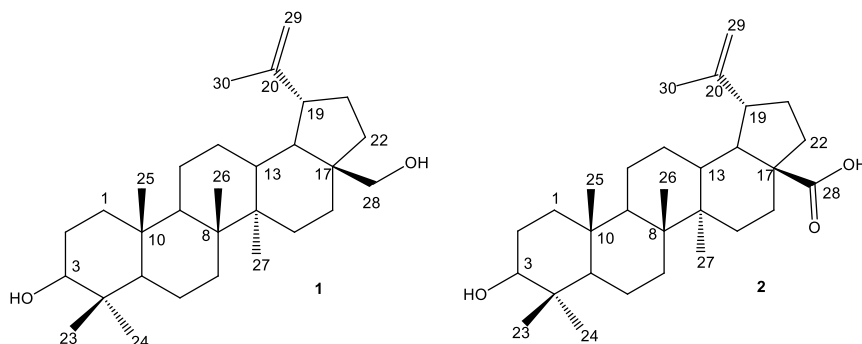


Рис. 2 Строение бетулина (1) и бетулиновой кислоты (2).

1.2.1 Антибиотическая активность и противовирусные свойства бетулиновой кислоты

При добавлении бетулина и бетулиновой кислоты к колониям *P. Aeruginosa* и *S. aureus*, наблюдался выраженный антибиотический эффект, обусловленный накоплением активных форм кислорода, повышением соотношения $NAD^+/NADH$, снижением концентрации глутатиона и фрагментацией бактериальной ДНК [36].

Ярко выражены и противовирусные свойства тритерпеноидов лупанового ряда. Так, при совместном применении бетулина и ацикловира для лечения ВПГ-1 и ВПГ-2 – инфекции наблюдался синергизм [39]. Бетулин также показал высокую антиретровирусную активность, ингибируя в концентрации 6,1 мкг/мл репликацию ВИЧ-1 на 50% [49].

1.2.2 Ингибирование фактора NF-kB и противовоспалительная активность

NF-kB представляет собой семейство из пяти структурно схожих эукариотических факторов транскрипции - p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, и RelB, образующих друг с другом гомо- и гетеродимеры. Они способны запускать экспрессию множества генов, вовлеченных в различные вне- и внутриклеточные процессы: воспаление, антителообразование, созревание В- и Т-лимфоцитов. NF-kB стимулирует выработку белков главного комплекса гистосовместимости, интерлейкинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ФНО, ИФН и др.), хемокинов (CINC, MCP, MIP, RANTES и др.), факторов роста (Г-КСФ, М-КСФ, ГМ-КСФ, эритропоэтин), молекул клеточной адгезии (ICAM, VCAM и др.), белков острой фазы, циклооксигеназы и др.

При некоторых патологических состояниях экспрессия *NF-kB* значительно превышает нормальные уровни. В частности, в атеросклеротических бляшках наблюдается гиперэкспрессия *NF-kB* и контролируемых им генов (*ИЛ-8*, *MCP-1*, *ICAM-1*, *VCAM-1*) [26].

Повышение уровня экспрессии гена *NF-kB* также наблюдается при воздействии аллергенов на клетки бронхиального эпителия *in vitro*, что имеет большое значение в патогенезе бронхиальной астмы [45]. Было обнаружено, что некоторые вирусы (в т.ч. ВИЧ), содержат сайты связывания *NF-kB* в своих промоторах. Кроме того, *NF-kB* индуцирует экспрессию многих протоонкогенов (*Bfl1/A1*, *Bcl-XL*, *Nr13*, *IAP*), что указывает на его роль в канцерогенезе [37].

Бетулин активирует сигнальный путь Nrf2 в макрофагах, связанный с антиоксидантными ферментами, такими как хинин-оксидоредуктазу-1, гемоксигеназу-1, гамма-глутамил цистеин синтетазу. Также, бетулин снижает активность ферментов воспалительного ответа – ЦОГ-2 и NO-синтазы [15] и ингибирует ядерный фактор *NF-kB*.

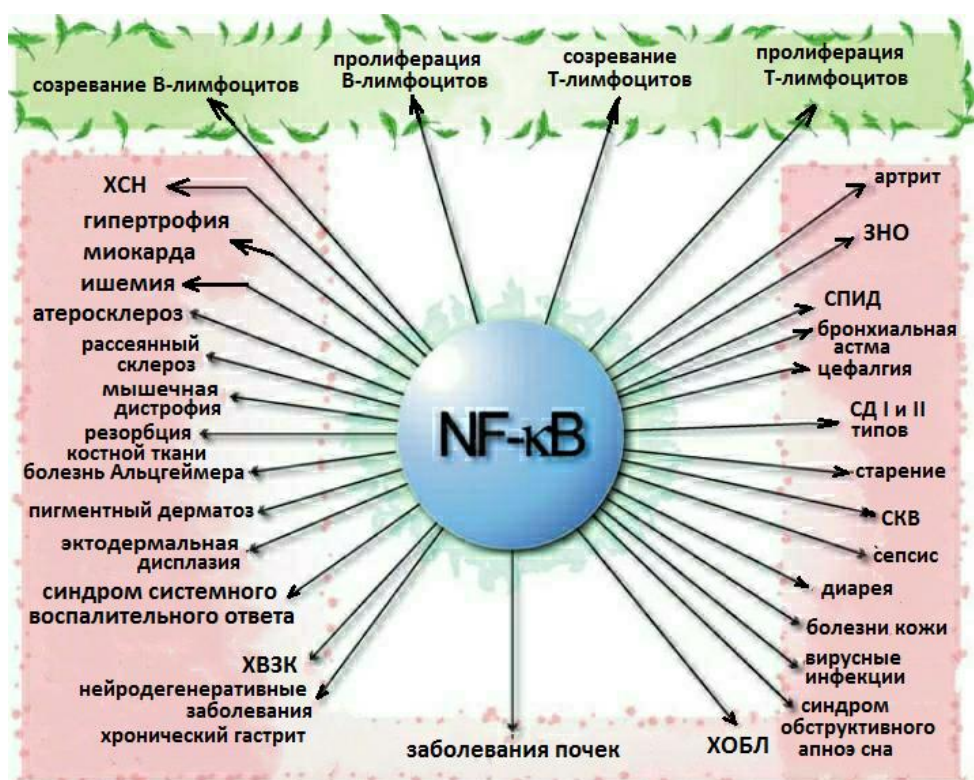


Рис. 3. Роль *NF-kB* в патологических и физиологических состояниях [26].

Один из самых выраженных эффектов бетулиновой кислоты – противовоспалительный, что подтвердилось в исследованиях *in vivo*. Так, Rescio и др. обнаружили, что этот тритерпен подавлял отёк лапы мыши в модели асептического воспаления на 46% (100 мг/кг), отёк уха мыши на 86% (0,5 мг/ухо) [42]. Титриметрическим методом было показано, что процент ингибирования фосфолипазы A2, одного из важнейших ферментов воспалительного ответа, бетулином и бетулиновой кислотой в концентрации 2,5 мМ/л равен 15 и 30%, а в концентрации 5 мМ/л – 30 и 40% соответственно [12].

Доказано противовоспалительное действие бетулиновой кислоты на примере ингибирования синтеза провоспалительных цитокинов перитонеальными макрофагами мышей линии BALB/c, обработанных LPS [11, 22].

1.2.3 Бетулиновая кислота как противодиабетическое средство

Бетулиновая кислота может выступать в роли противодиабетического средства. Она ингибирует альфа-амилазу и альфа-глюкозидазу кишечника, подавляя гидролиз полисахаридов и, таким образом, замедляя всасывание глюкозы в кишечнике и снижая уровень постпрандиальной гликемии. Было показано, что *in vitro*, в концентрации 50 мкг/мл, степень ингибирования альфа-амилазы бетулиновой кислотой составляет $47.4 \pm 4.3\%$ [27]. Активируя AMPK, БК повышает экспрессию белков-переносчиков глюкозы GLUT-1 и GLUT-2, а также стимулирует синтез гликогена. Не менее важный аспект антидиабетического действия этого соединения – ингибирование PTP-1B. При действии PTP-1B молекулы рецептора инсулина дефосфорилируются и не димеризуются, что необходимо для их активации и обеспечения поглощения глюкозы из крови в клетку [23].

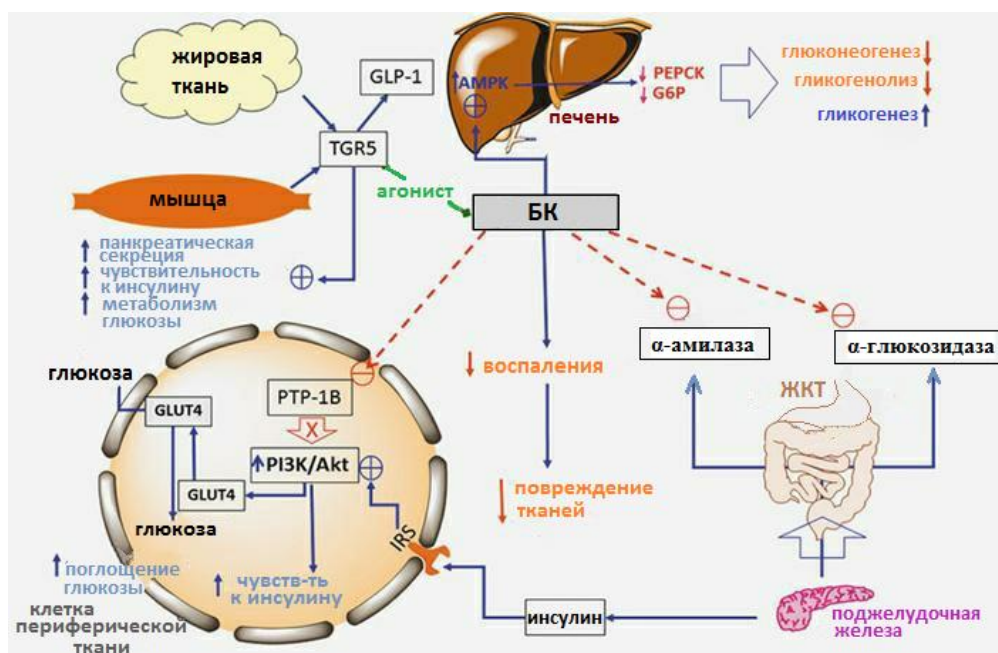


Рис. 4. Влияние бетулиновой кислоты на метаболизм глюкозы [23].

1.2.4 Цитотоксическое действие бетулиновой кислоты в отношении опухолевых клеток

В экспериментах на клеточных линиях различных опухолей было показано, что бетулиновая кислота не имеет избирательного эффекта в отношении конкретной типа опухоли, однако наиболее сильно её противоопухолевые свойства были выражены в отношении злокачественных клеток нейроэктодермального ряда (медуллобластомы,

глиобластомы, меланомы). Общеизвестным является факт отсутствия агрессии БК в отношении нетрансформированных клеток [51, 48].

Противоопухолевое действие бетулиновой кислоты реализуется через индукцию им внутреннего митохондриального пути апоптоза, не зависящего от внешнего, связанного с экспрессией генов *p53* и *CD95/FasL*, что характерно для большинства противоопухолевых препаратов.

Первый этап митохондриального пути апоптоза – снижение потенциала внутренней мембраны митохондрий и переход митохондриальной поры в состояние высокой проницаемости, что ведёт к высвобождению митохондриальных апоптогенных факторов – цитохрома С и АИФ. Последние активируют внутриклеточные ферменты – каспазы 3 и 9, запускающие апоптоз. Наряду с этими событиями происходит снижение экспрессии антиапоптотических факторов *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1* и, наоборот, увеличение проапоптотического *Bax* [46].

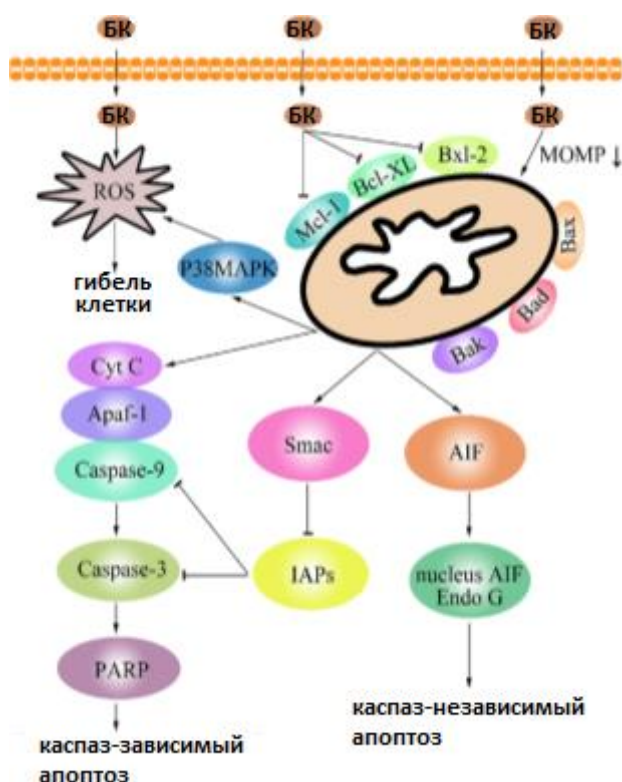


Рис. 5. Индукция апоптоза БК через митохондриальный путь [46].

Ещё один механизм инициации апоптоза опухолевых клеток – ингибирование активности топоизомераз. Эти ферменты изменяют пространственную структуру молекулы ДНК. У эукариот имеется два типа топоизомераз. Первый тип (релаксазы) – обладают эндонуклеазной и лигазной активностью, они способны релаксировать сверхспирализацию ДНК. Топоизомеразы II (гиразы) – формируют супервитки из ДНК-матрицы во время репликации, для того, чтобы комплекс ферментов репликации мог начать синтез

комплементарной цепи ДНК [6]. Недавно было показано, что бетулиновая кислота ингибирует активность топоизомераз I и II в раковых клетках. Опосредованное БК ингибирование топоизомераз в онкотрансформированной линии клеток MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы) приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Одним из механизмов, по которому БК ингибирует действие топоизомеразы I, является активация каспазы-2 [25].

1.3 Биологическая активность линейных фурукумаринов

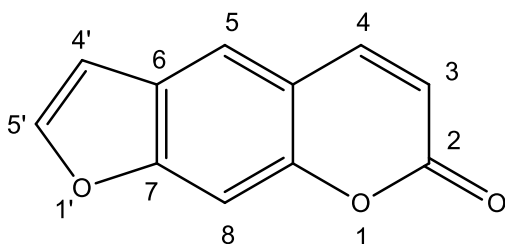


Рис. 6. Структурная формула простейшего фурукумарина - псоралена

Фурукумарины – класс кислородсодержащих гетероциклических органических соединений, обладающих значительным лекарственным потенциалом. Это основано на их способности к образованию фотоаддуктов с ДНК и другими структурами клетки (РНК, белки), а также некоторыми компонентами мембран (фосфолипазами A2 и C, Ca²⁺/кальмодулин-зависимой и с-АМР-зависимой протеинкиназой и эпидермальным ростовым фактором) [6]. Данные свойства позволяют применять их в лечении аутоиммунных и гиперпролиферативных (псориаз, витилиго) заболеваний кожи в комбинации с UVA-терапией. Доказаны противовоспалительные и анальгетические свойства некоторых других производных фурукумаринов (1,2-оксазин – конденсированные фурукумарины). Также они перспективны с фармакологической точки зрения ввиду их высокого терапевтического индекса [28].

Помимо фототерапевтического действия, ряд источников указывает на противоопухолевые свойства фурукумаринов. Имеются сведения о цитотоксической активности псуцеданина и комплексных соединений его производных – ариламидометил-дегидрофурукумаринов в отношении моноцитарных клеток линии U-937, Т-клеточных линий МТ-4 и СЕМ-13 [29]. Доказано свойство растительных фурукумаринов, выделенных из корня *Angelica dahurica*, вызывать апоптоз опухолевых клеток линии НерG2 (гепатома) путём активации каспаз и ингибирования поли-АДФ-рибозо-фосфат полимеразы [31].

Описана способность ряда растительных фурукумаринов ингибировать топоизомеразу I, образуя стабильный комплекс ДНК – топоизомеразы I. При этом ингибирующая активность фурукумаринов не сопровождалась конформационными изменениями в ДНК [16].

Ещё одна точка приложения фурукумаринов – фотодинамическая терапия (PDT), в которой псорален в возбуждённом состоянии может передавать избыточную энергию на молекулярный кислород, который присутствует в клеточной среде, создавая высокоэлектрофильный синглетный кислород, поражающий мишень [24].

Ограничением к применению фурукумаринов является их генотоксичность из-за возможности образования кросс-сшивок одной молекулой псоралена двух цепей ДНК, которые могут послужить причиной развития рака кожи и других онкологических заболеваний [40].

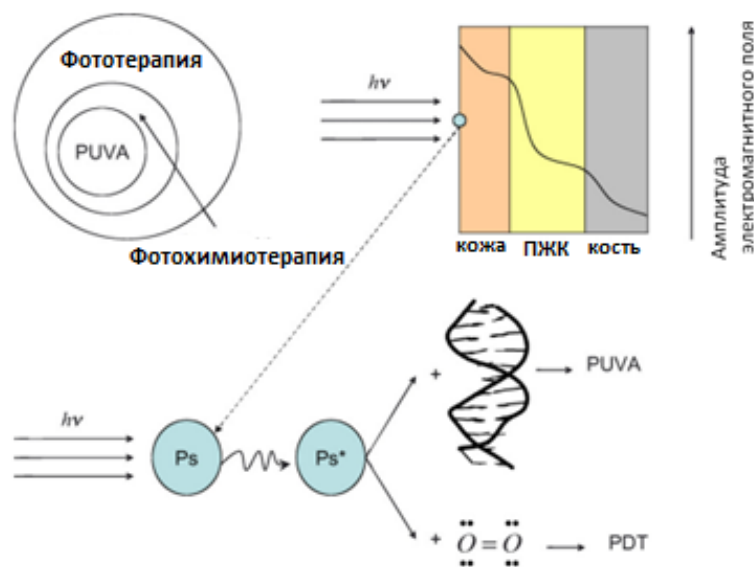


Рис. 7. Фототерапевтическое действие фурукумаринов [24].

1.4 Использование циклофосфида для индуцирования иммуносупрессии

in vivo

Циклофосфамид - противоопухолевое, цитостатическое лекарственное средство. Оно используется для лечения злокачественных новообразований системы крови, мочеполовой и дыхательной систем. После введения в организм происходит его биотрансформация в печени с образованием алкилирующего метаболита. Алкилирование молекул ДНК приводит к образованию поперечных сшивок между ними и их фрагментации репаративными ферментами. Вследствие этого нарушается транскрипция ДНК, происходит блокирование митоза опухолевых клеток [8]. В результате применения противоопухолевых препаратов (в т.ч. циклофосфида) в онкологической практике зачастую наблюдается такое нежелательное явление, как цитостатическая болезнь. Она обусловлена угнетающим воздействием противоопухолевых препаратов на кроветворение и иммунную систему. Это воздействие приводит к развитию вторичного иммунодефицита в организме. Интраперитонеальное введение циклофосфида лабораторным животным используется для создания модели искусственной иммуносупрессии [2]. При интраперитонеальном

введении препарат снижает число перитонеальных макрофагов и выработку ими цитокинов. В последние годы на примерах моделей *in vivo* было обнаружено парадоксальное свойство циклофосфида – повышение экспрессии провоспалительных цитокинов в костном мозге [14].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Исследуемые соединения

Оценка предполагаемых свойств производилась с помощью изучения профиля экспрессии генов различных цитокинов, участвующих в воспалительном, противоопухолевом ответе, а также поддержании кроветворения и гомеостаза в норме. В экспериментах различные вещества, растворённые в 99,9% DMSO, в нетоксических дозах были добавлены к клеточной культуре. При этом концентрация DMSO в клеточной среде не превышала 1%. Для определения диапазона нетоксичных концентраций была использована система визуализации клеток INCellAnalyzer 6500. Эффект от воздействия соединений оценивался по степени экспрессии генов пяти цитокинов и двух цитохромов культурой клеток U-937. Уровни экспрессии оценивались количественно методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Разное время экспозиции клеточной культуры с соединениями позволило оценить зависимость их эффекта от времени. В работе были протестированы следующие вещества: соединение 2-азидоорезелона с бетулиновой кислотой (Соед.3), соединение 2-азидо-9-замещённого орезелона с бетулиновой кислотой (Соед.4) и соединение бетулиновой кислоты с пеуритиницином (Соед.5).

2.2 Клеточные культуры

Исследования проводили на клеточной линии U-937 (лимфома, моноцитарно-макрофагальный ряд, ATCC № CRL-1593.2). Суспензионную культуру U-937 выращивали в среде RPMI, содержащей 10% фетальной сыворотки при температуре 37⁰C, в атмосфере 5% CO₂, до концентрации 1.5-2 x 10⁶ клеток на миллилитр среды, осаждали и вносили свежую среду, содержащую форбол-12-миристан-13 ацетат (ФМА) в концентрации 60 нг/мл. Через двое суток удаляли не осевшие клетки, и инкубировали дифференцировавшиеся в макрофаги (прикрепленные к поверхности плашки) U-937 в свежей среде без ФМА не менее двух суток. Плотность покрытия поверхности чашек составляла, как правило, 30-50%. После этого клеточную культуру обрабатывали исследуемыми соединениями. Выделение РНК производили спустя 2, 6 и 24 часа после обработки.

2.3 Модель циклофосфамид - индуцированной иммуносупрессии

Экспериментальную цитостатическую модель создавали с помощью препарата циклофосфида («Эндоксан», Baxter), растворённого в физиологическом растворе.

Препарат вводился однократно внутривбрюшинно в дозе 200 мг/кг массы тела животного (сублетальная доза) через сутки после однократного внутривбрюшинного введения исследуемого соединения (Соед.4) в дозе 50 мг/кг массы тела животного. На шестой день после введения соединения мышей умерщвляли методом ингаляции двуокиси углерода. После этого из них были выделены перитонеальные макрофаги, образцы костного мозга и образцы периферической крови для приготовления мазков.

Приготовление мазков периферической крови осуществлялось в день умерщвления экспериментальных животных. Для фиксации мазков применялся 95% этиловый спирт, окрашивание мазков проводилось по методике Романовского-Гимзе. В мазках периферической крови экспериментальных животных подсчитывались лейкоцитарная формула, число деформированных эритроцитов (шизоцитов), число полихроматофильных эритроцитов и отмечалось содержание эритробластов. Морфология эритроцитов оценивалась путём подсчёта числа шизоцитов и полихроматофильных эритроцитов на 100 эритроцитов в пяти полях зрения микроскопа в каждом мазке периферической крови (по 15 полей зрения для каждой группы животных).

Табл. 1 Схема эксперимента *in vivo*.

	1-ый день	2-ой день	6-ой день
1-ая группа (Контроль)	0,9%NaCl+DMSO	-	Выделение перитонеальных макрофагов, КМ, фиксация и окрашивание мазков периферической крови
2-ая группа	0,9%NaCl+DMSO	Циклофосфамид (200мг/кг массы тела)	
3-ья группа	р-р Соед4 в DMSO + 0,9%NaCl	Циклофосфамид (200мг/кг массы тела)	
4-ая группа	р-р Соед4 в DMSO + 0,9%NaCl	-	

В работе были использованы 12 самцов мышей линии C57BL/6 возрастом 1 мес массой 19-21 гр. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986). 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*.

2.3 Оборудование

В работе использовалось следующее лабораторное оборудование: помещение для культуральных работ, оборудованное ламинаром, CO₂ – инкубатором, термостатом и

микроскопом; помещение для ПЦР, оборудованное ламинаром, термостатом и микроцентрифугой типа «Эппендорф»; Амплификатор «LightCycler 96» (Roche).

Выделение РНК из клеточных культур было проведено с использованием «TRI-REAGENT» (MRC), согласно протоколу производителя. Для обработки одной лунки (3 см²) с клетками использовали 300 мкл реагента; клеточный лизат дважды экстрагировали 150 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт; (24:1), разделяя фазы центрифугированием в течение 5 минут при 10000g; затем вносили 200 мкл изопропилового спирта, осаждали РНК при 12000g в течение 10 минут; дважды промывали осадок 80% этанолом; подсушивали и растворяли в бидистиллированной воде, содержащей RNA-secure реагент (Ambion). Препараты РНК хранили при -70⁰С, использовали для обратной транскрипции в течение 24-48 часов.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов ОТ М-MuLV–RH («Биолабмикс»), согласно протоколу производителя: на реакцию брали 2-5 мкг суммарной РНК, добавляли праймеры со случайными последовательностями и oligo-dT-праймеры; нагревали в течение 5 минут при 70⁰С и переносили в ледяную баню на 2 минуты; затем вносили смесь остальных реагентов (РНК-зависимую ДНК-полимеразу, ОТ-буфер, дезоксинуклеотидтрифосфаты) инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре; затем переносили в термостат на 37⁰С на 2 часа; по окончании реакцию останавливали прогреванием в течение 15 минут при 85⁰С.

Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили с использованием БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×)» компании «Биолабмикс». Чтобы избежать погрешностей, которые могут возникать 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: 95⁰С – 3 минуты; 45 циклов - (95⁰С – 12 секунд, 58⁰С – 15 секунд, 72⁰С – 20 секунд), измерение флюоресценции), построение кривой плавления. На каждую точку брали по три повтора. В качестве референсных генов использовали GAPDH и RPLPO.

Светооптическое и морфометрическое исследование мазков периферической крови животных было проведено на универсальном микроскопе «Leica DM 4000B» (Германия) при увеличении ×1000.

Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры «Leica DFC 320» (Германия) и компьютерной программы «Leica QWin V3». Подсчет лейкоцитарной формулы осуществлялся с помощью микроскопа PrimoStar (Carl Zeiss, Германия) при увеличении ×1000.

Табл. 2. Названия целевых генов и последовательности олигонуклеотидов, использованных в оценке экспрессии генов.

Ген	Последовательности
GAPDH (Homo sapiens)	F: 5'- GGAGTCAACGGATTTGGTC - 3' R: 5'- TGGGTGGAATCATATTGGAACAT - 3'
<i>ФНО-α</i> (Homo sapiens)	F: 5'- GCTGATCCGATTCCTGAAAC - 3' R: 5'- CTCAGCTTGAGGGTTTGC - 3'
ИЛ-10 (Homo sapiens)	F:5'- CAAGGCGCATGTGAACTC - 3' R:5'- GCTTTGTAGATGCCTTTCTCTTG - 3'
ИЛ-12α (Homo sapiens)	F:5'- ТААССААГААТГАГАГТТГСС - 3' R:5'- ССТГСАТСАГСТСАТААТААС - 3'
RPLP0 (Homo sapiens)	F:5'- AGCCCAGAACAАCTGGTCT - 3' R:5'- АСТСАГГАТТСААТGGTGCC - 3'
ИЛ-1β (Homo sapiens)	F: 5'- ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA - 3' R: 5'- GTCGGAGATTCGTAGCTGGA - 3'
СYP1A1 (Homo sapiens)	F: 5'- CCAGCTGACTTCATCCCTATTC - 3' R: 5'- GAAGATGGTCAAGGAGCACTAC - 3'
СYP1A2 (Homo sapiens)	F: 5'- СТТССАААГТССТGGGATTAC - 3' R: 5'- GAATTGTGCAACCATCACCAG - 3'
ГМ-КСФ (Homo sapiens)	F: 5'- GAGCTAGAAACTCAGGATGGTC - 3' R: 5'- GATACAGGCATGGCAGAAGA - 3'
GAPDH (Mus musculus)	F: 5'- TAGACAAAATGGTGAAGGTCGG - 3' R: 5'- CCTGGAAGATGGTGATGGG - 3'
β – актин (Mus musculus)	F: 5'- CCTGAGGAGCACCTGTG - 3' R: 5'- GGAGAGCATAGCCCTCGTAG - 3'
ИЛ-12 (Mus musculus)	F: 5'- AGTGTGGCACTGATGCTGATG - 3' R: 5'- GTAGCCAGGCAACTCTCGTT - 3'
ИЛ-10 (Mus musculus)	F: 5'- TGGGTTGCCAAGCCTTATCG - 3' R: 5'- СТСТСАСТГСТСАСТГС - 3'
ИЛ-1β (Mus musculus)	F: 5'- TGCCACSTTTTGACAGTGATGA - 3' R: 5'- АТСАГГАСАГСССАГГТСАА - 3'
<i>ФНО-α</i> (Mus musculus)	F: 5'- TCAGTTCTATGGCCCAGACC - 3' R: 5'- ACCACTAGTTGGTTGTCTTTGAG - 3'

2.4 Методика оценки относительной экспрессии

Для сравнения уровня экспрессии в исследуемых образцах использовали метод относительного количественного определения экспрессии гена (метод $-2^{\Delta CT}$). Проводили нормирование полученных значений на эндогенные контроли (внутренний стандарт), которыми являются гены «домашнего хозяйства» GAPDH и RPLPO – это гены, экспрессирующиеся практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Таким образом получали величину ΔCT , которую использовали для дальнейшего расчета ($2^{-\Delta CT}$). При использовании метода была рассчитана эффективность полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени, которые во всех образцах близки к максимальной или равны ей (т.е. $E=2$).

Значимость различий между исследуемыми группами была определена с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни и непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с использованием пакета программ STATISTICA 12.

Глава 3. Результаты

Система визуализации INCellAnalyzer применялась для анализа культур клеток, инкубируемых с разведениями исследуемых соединений. В результате для каждой массы клеток, инкубируемой с определённой концентрацией исследуемого вещества, были получены процентные отношения погибших клеток («некроз»), апоптотических клеток («апоптоз») и живых клеток («живые»).

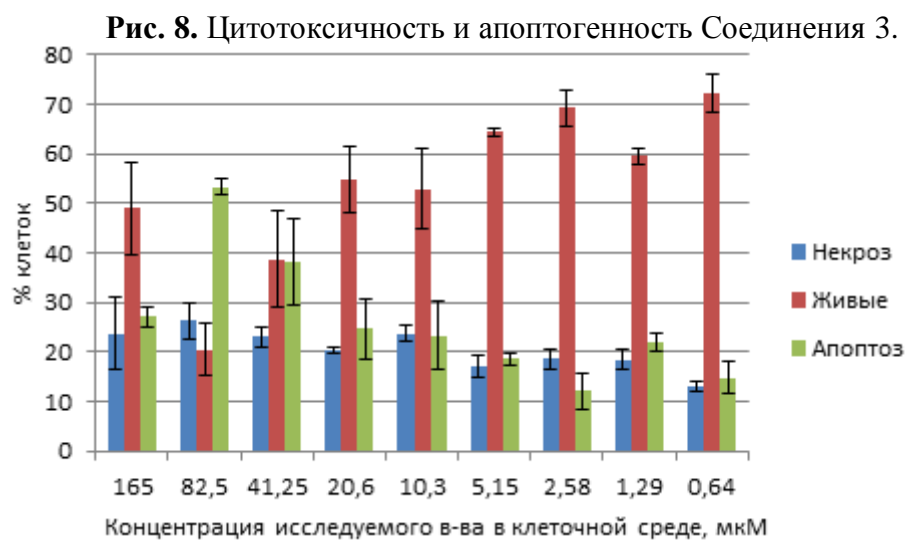


Рис. 9. Цитотоксичность и апоптогенность Соединения 4.

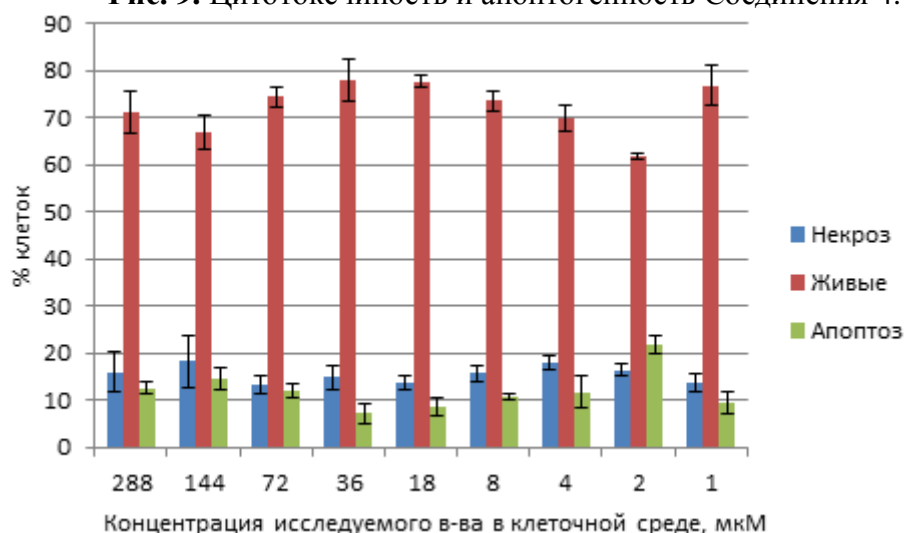
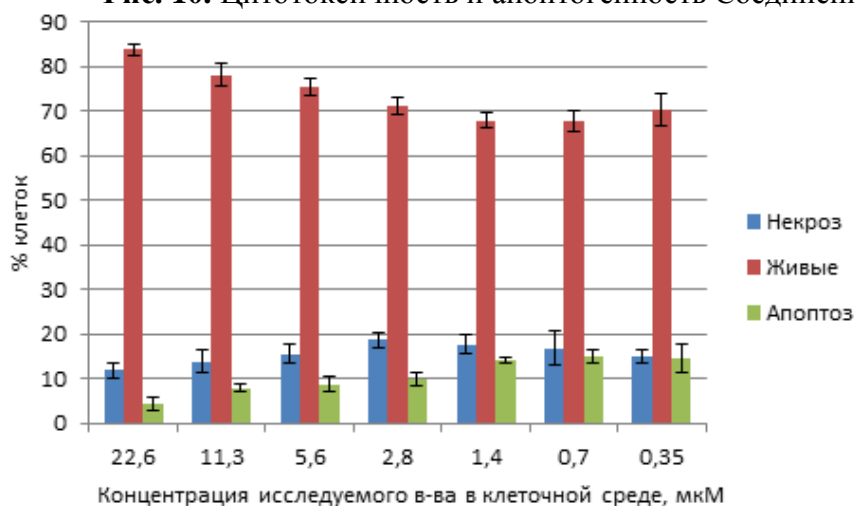


Рис. 10. Цитотоксичность и апоптогенность Соединения 5.



В диапазоне концентраций 0,64 – 165 мкМ цитотоксичность Соед.3 варьирует между 10 и 30%. Для этого вещества были выбраны следующие концентрации: 150мкМ, 50мкМ, 15мкМ. Повышение содержания апоптотических клеток при концентрациях 82,5 мкМ и 41,25мкМ (53,2% и 38,2% соответственно) не имеет тенденции к продолжению, и видимо, является артефактным. Порог токсичности Соед.4 не превышает 20%, поэтому для него были выбраны наибольшие концентрации - 550мкМ, 180мкМ, 60мкМ. Ввиду низкой растворимости Соед.5 в DMSO для него были выбраны наименьшие концентрации - 30мкМ, 10мкМ, 3мкМ.

В результате последующей 2-этапной ОТ-ПЦР были получены следующие результаты.

3.1 Соединение 3

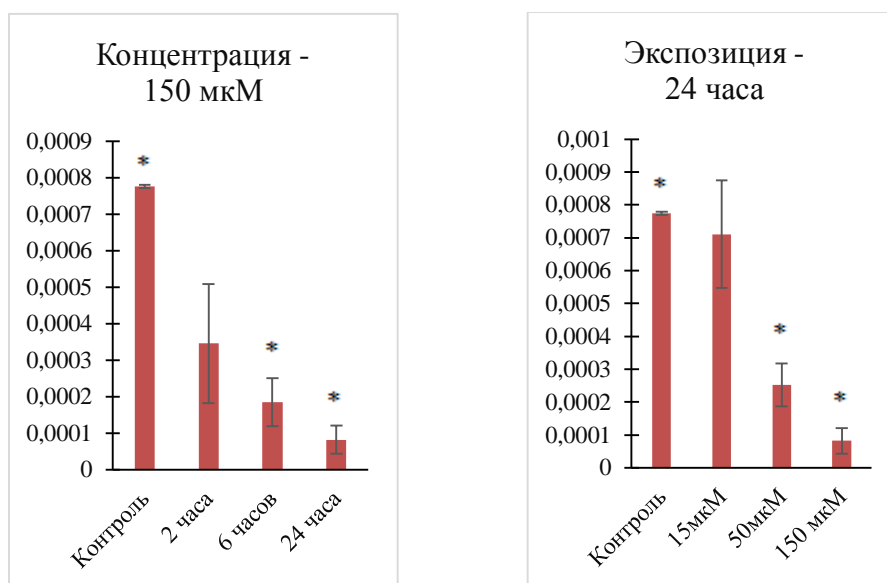
Соед.3 вызывает дозо- и времязависимое снижение экспрессии *ИЛ-1β* и увеличение выработки TNF, а также незначительное усиление выработки CYP1A1 клетками U-937.

Ниже представлены уровни экспрессии генов в образцах в виде таблиц и графиков по отношению к контрольному образцу без вещества, рассчитанные по методу $2^{-\Delta CT}$.

Табл. 3 Уровни экспрессии *ИЛ-1 β* и *ФНО- α* культурой U-937 после обработки Соединением 3.

Образцы \ Гены	<i>ИЛ-1β</i>	<i>ФНО-α</i>
Контроль (без вещества)	7,75E-04 \pm 4,7E-06	0,39E-03 \pm 0,001
2 часа инкубирования с веществом (150мкМ)	3,19E-04 \pm 1,627E-04	5,51E-03 \pm 2,000E-03
6 часов инкубирования с веществом (150мкМ)	1,76E-04 \pm 6,54E-05	7,54E-03 \pm 2,00E-04
24 часа инкубирования с веществом (150мкМ)	7,53E-05 \pm 3,928E-05	7,32E-03 \pm 5,00E-04
24 часа инкубирования с веществом (50мкМ)	2,51E-04 \pm 2,22E-05	0,011 \pm 0,003
24 часа инкубирования с веществом (15мкМ)	7,00E-04 \pm 1,486E-04	0,016 \pm 0,002

Рис. 11 Уровень экспрессии *ИЛ-1 β* после обработки культуры клеток Соед.3.



*-достоверность различий между группами равна 95%

Рис. 12 Уровень экспрессии *ФНО* после обработки культуры клеток Соед.3.

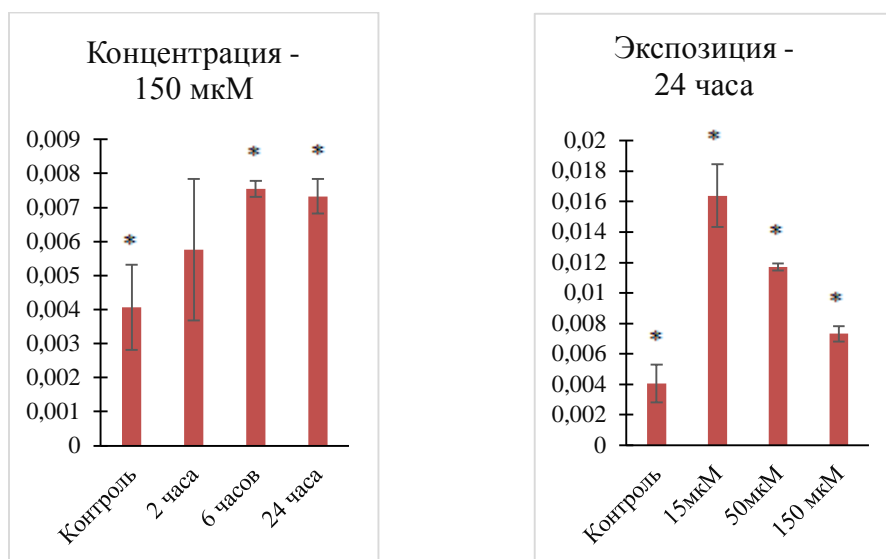


Табл. 4. Уровни экспрессии *GM-KSF*, *CYP 1A1*, *CYP 1A2* после обработки культуры клеток Соед.3.

Образцы \ Гены	<i>GM-KSF</i>	<i>CYP 1A1</i>	<i>CYP 1A2</i>
Контроль (без вещества)	2,42E-04±1,959E-04	2,80 ±0,257	5,73E-05±8,45E-06
2 часа инкубирования с веществом (150мкМ)	6,59E-05±1,720E-05	3,77 ±1,268	1,35E-04±5,37E-05
6 часов инкубирования с веществом (150мкМ)	8,34E-05±1,6E-06	4,19 ±0,771	4,57E-05±3,011E-05
24 часа инкубирования с веществом (150мкМ)	1,79E-04±9,37E-05	4,24 ±0,108	8,07E-05±2,97E-06
24 часа инкубирования с веществом (50мкМ)	1,91E-04±1,393E-04	3,94±0,192	5,92E-05±2,800E-05
24 часа инкубирования с веществом (15мкМ)	7,15E-04±1,124E-04	4,59±1,046	1,75E-05±3,12E-06

*-достоверность различий между группами равна 95%

Рис. 13. Уровень экспрессии *CYP1A1* после обработки культуры клеток Соед.3.

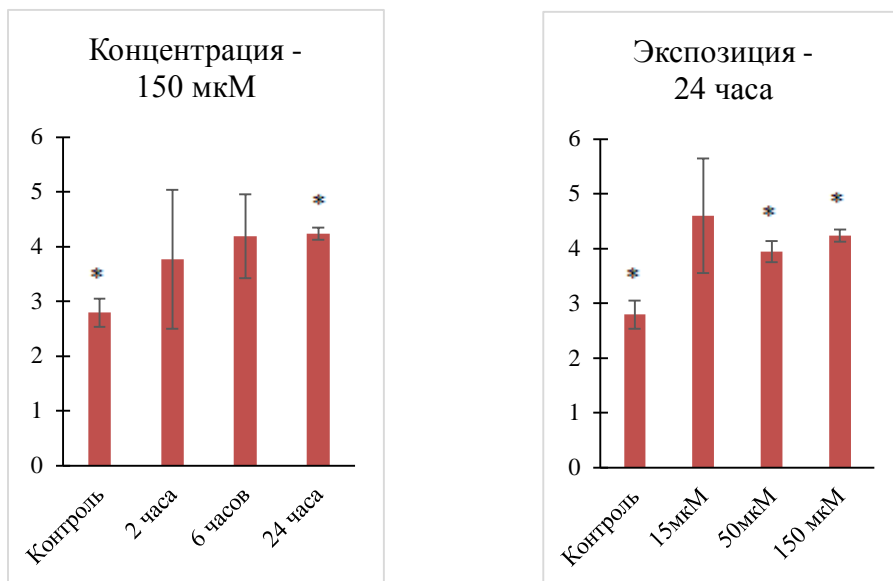
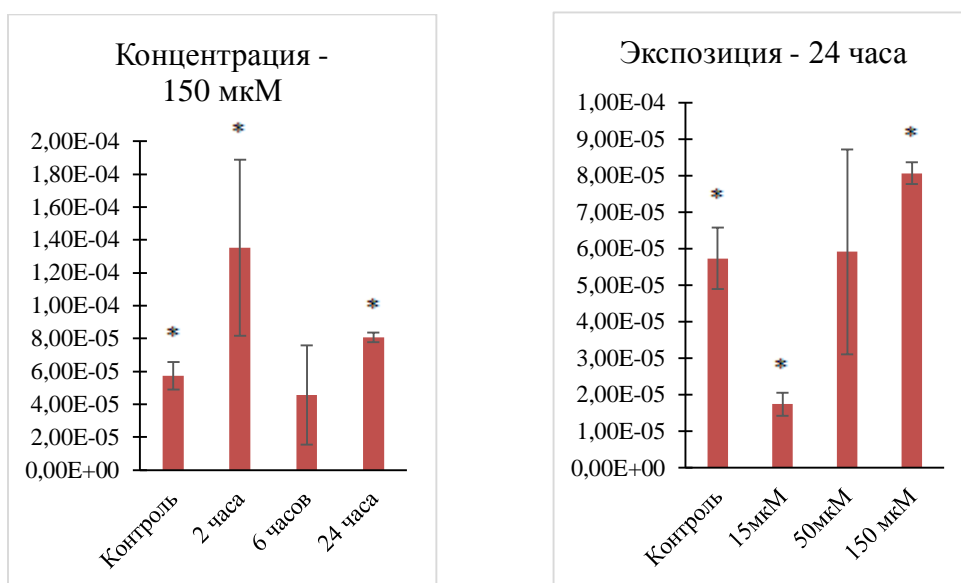
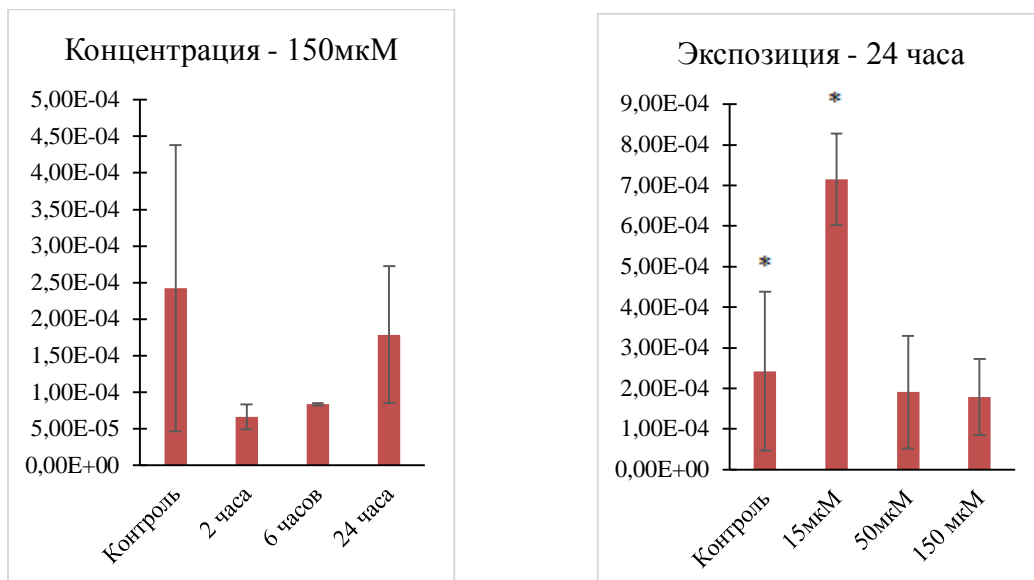


Рис. 14. Уровень экспрессии *CYP1A2* после обработки культуры клеток Соед.3.



*-достоверность различий между группами равна 95%

Рис. 15. Уровень экспрессии *GM-KSF* после обработки культуры клеток Соед.3.



3.2 Соединение 4

После обработки культуры клеток Соединением 4 наблюдались дозо- и времязависимое увеличение экспрессии *ИЛ-12*, *TNF* и снижение выработки *ИЛ-10*.

Табл. 5. Уровни экспрессии целевых генов культурой клеток U-937 после обработки Соед.4.

Образцы	Гены	
	<i>ИЛ-12</i>	<i>ИЛ-10</i>
Контроль (без вещества)	0,10±0,022	1,77E-05±1,87E-06
2 часа инкубирования с веществом (550μкМ)	0,13±0,025	1,85E-05±2,42E-06
6 часов инкубирования с веществом (550μкМ)	0,16±0,010	8,96E-06±9,00E-07
24 часа инкубирования с веществом (550μкМ)	0,22±0,020	2,50E-06±1,476E-06
24 часа инкубирования с веществом (60μкМ)	0,16±0,009	8,94E-06±3,550E-06
24 часа инкубирования с веществом (180μкМ)	0,12±0,007	8,86E-06±8,81E-07

*-достоверность различий между группами равна 95%

Рис. 16. Уровень экспрессии *ИЛ-12a* культурой клеток U-937 после обработки Соед.4.

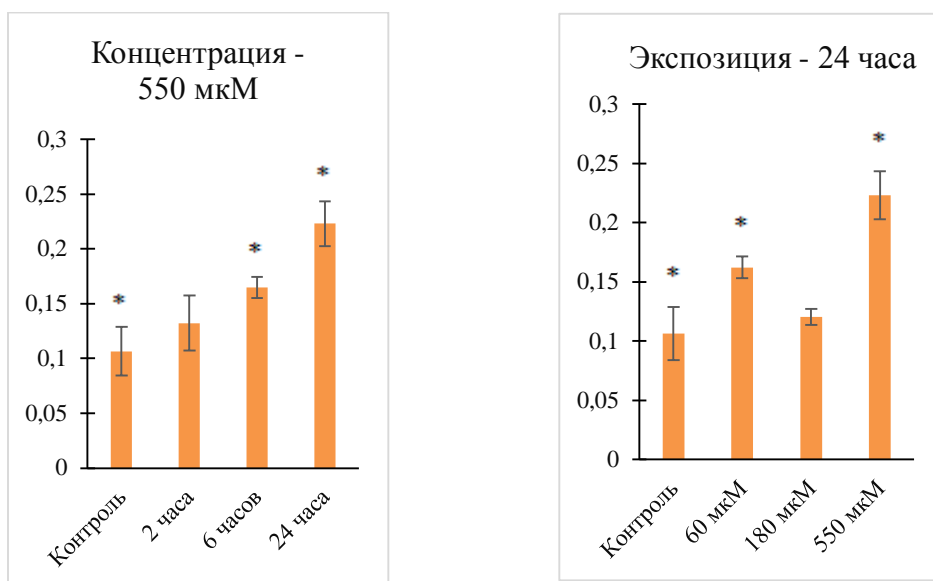
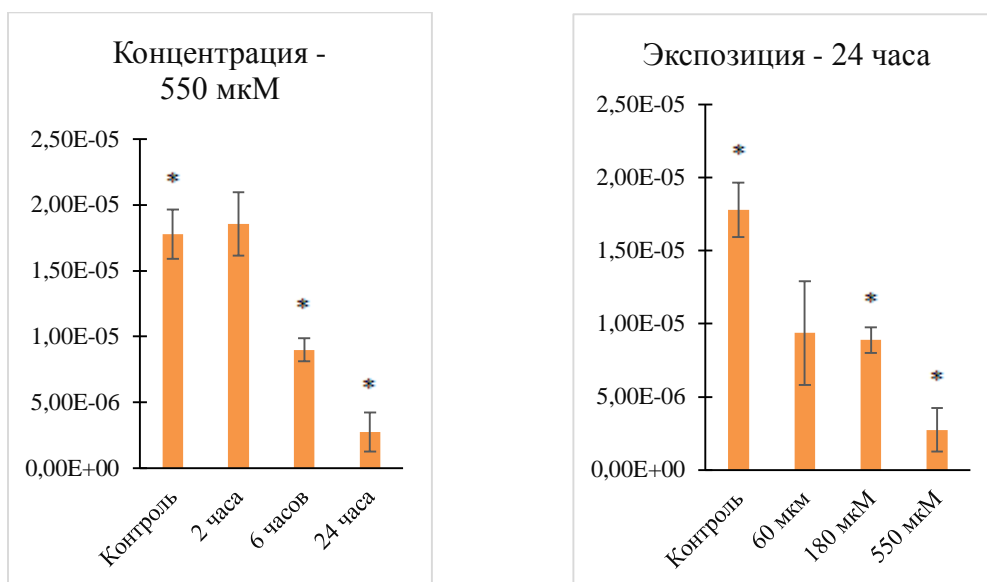


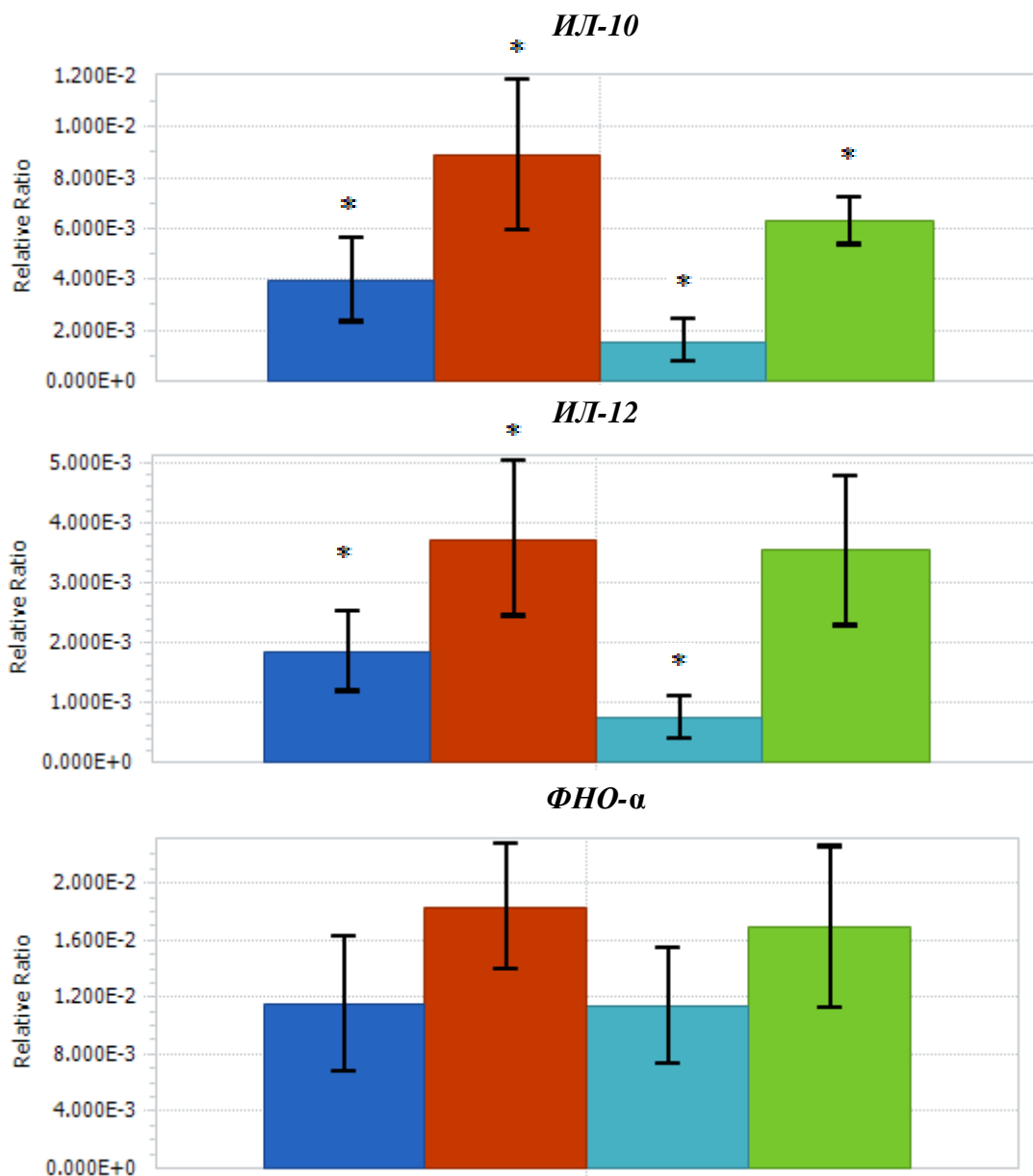
Рис. 17. Уровень экспрессии *ИЛ-10* после обработки культуры клеток Соед.4.



Данное соединение показало способность к стимуляции выработки ИЛ-12 и ИЛ-10 в костном мозге интактных мышей, аналогичную таковой при введении максимально переносимой дозы циклофосфана.

*-достоверность различий между группами равна 95%

Рис. 18. Уровни экспрессии генов цитокинов в костном мозге мышей линии C57BL/6.

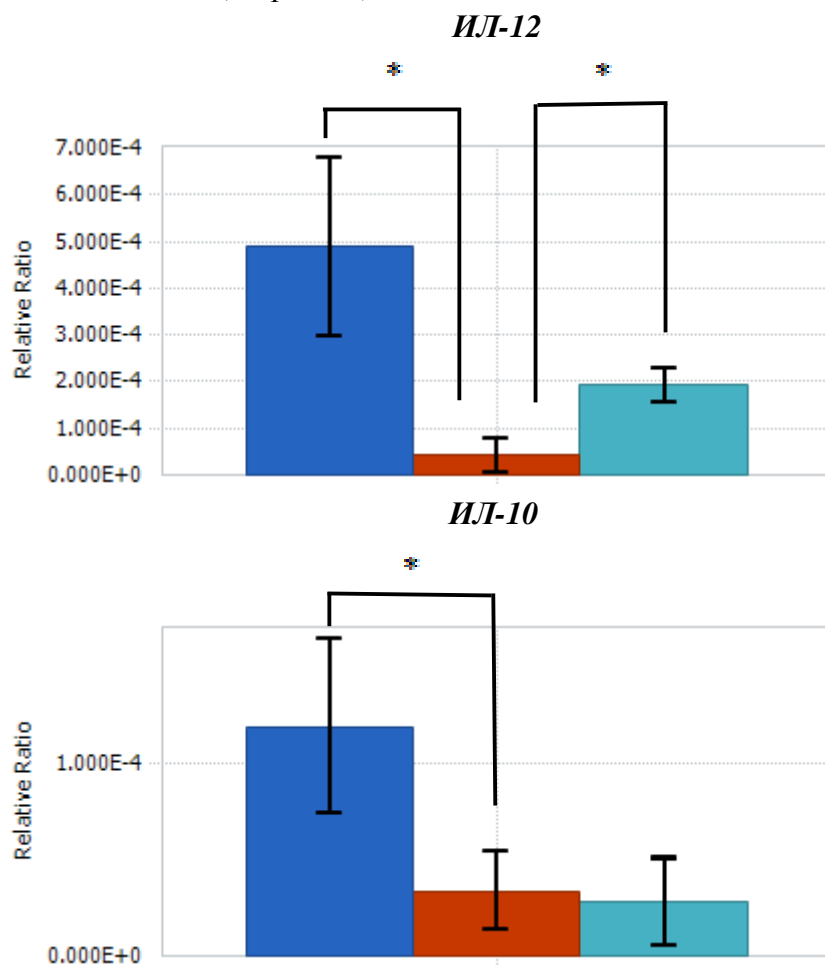


- - Контроль (интактные животные);
- - Группа животных, обработанных циклофосфамидом (200мг/кг массы тела);
- - Группа животных, обработанных Соед.4 (50мг/кг массы тела), затем циклофосфамидом (200мг/кг массы тела);
- - Группа животных, обработанных Соед.4 (50мг/кг массы тела).

*-достоверность различий между группами равна 95%

Соед.4 корригирует вызванную циклофосфаном супрессию выработки ИЛ-12 перитонеальными макрофагами.

Рис. 19. Уровни экспрессии генов *ИЛ-12* и *ИЛ-10* в перитонеальных макрофагах мышей линии C57BL/6 (* - $p < 0,05$).



- - Контроль (интактные животные);
- - Группа животных, обработанных циклофосфамидом (200мг/кг массы тела);
- - Группа животных, обработанных Соед.4 (50мг/кг массы тела), затем циклофосфамидом (200мг/кг массы тела) Соединение 4.

Введение циклофосфамида мышам вызывало угнетение лимфоцитарного роста кроветворения, что отразилось в снижении процентного содержания лимфоцитов в лейкоцитарной формуле. Группа животных, обработанных Соед.4 перед введением циклофосфамида продемонстрировала восстановление относительного содержания лимфоцитов в периферической крови, сравнимое с контролем.

*-достоверность различий между группами равна 95%

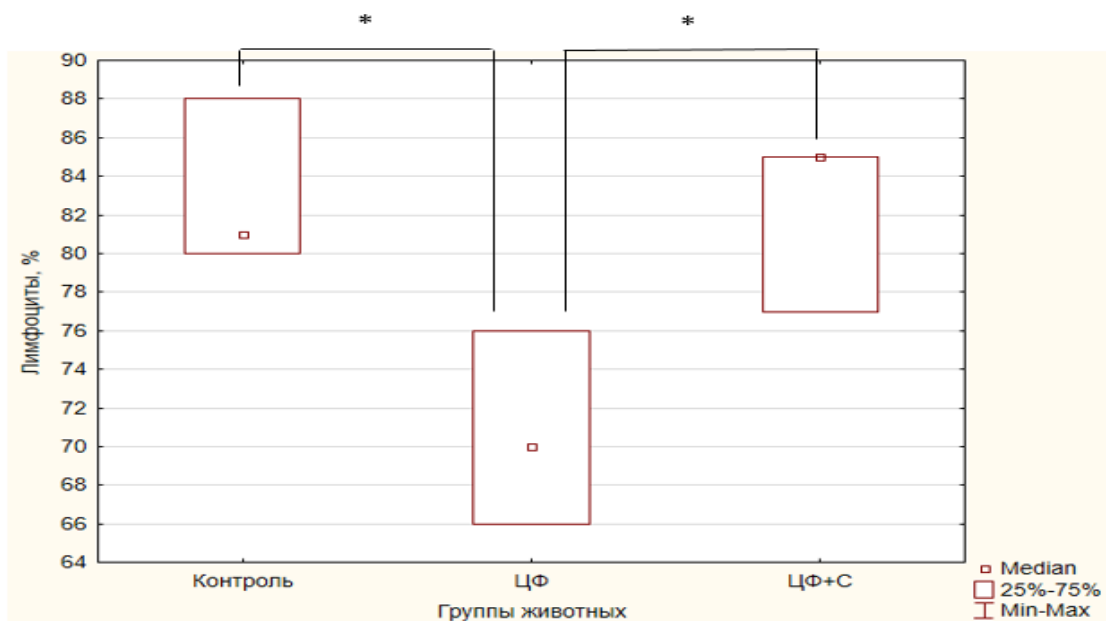


Рис. 20. Относительное содержание лимфоцитов в периферической крови разных групп животных (n=3), * - статистически значимые различия ($p < 0,05$); ЦФ – группа, обработанная циклофосфамидом, ЦФ+С – группа, обработанная Соед.4, затем циклофосфамидом.

При оценке клеток эритроцитарного ростка кроветворения было обнаружено повышение числа дефектных форм эритроцитов (шизоцитов) после введения мышам циклофосфамида ($p=0,002$). Данный эффект частично корригировался у группы мышей, предварительно обработанных Соед.4.

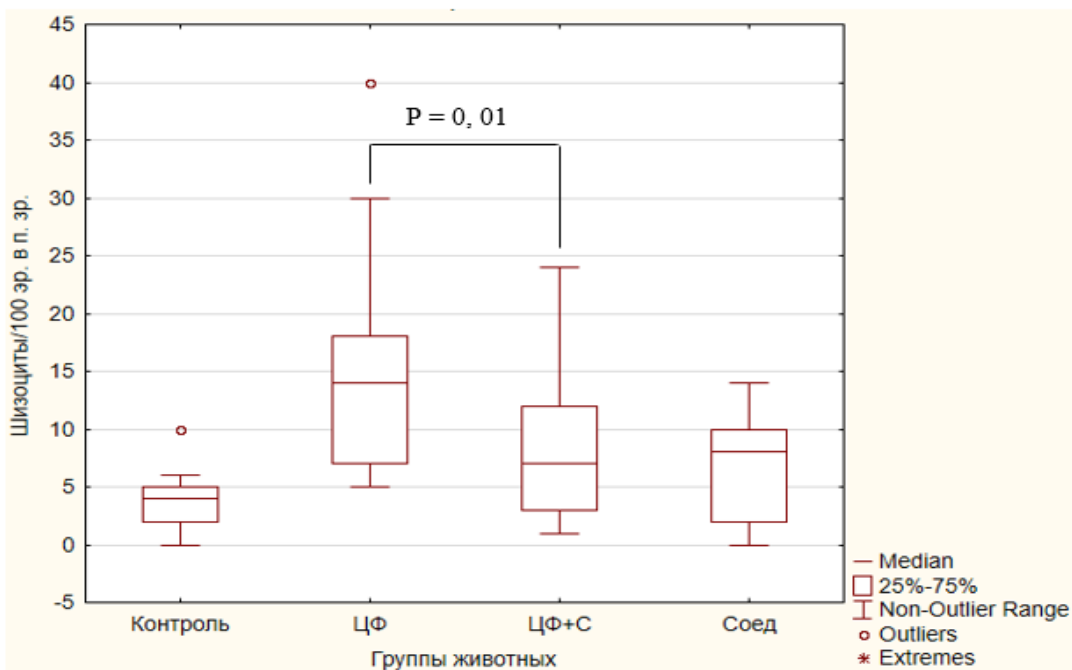


Рис. 21. Влияние циклофосфамида и исследуемого соединения на морфологию эритроцитов периферической крови в мазках крови каждой группы исследованных животных (n=15). ЦФ – группа, обработанная циклофосфамидом, ЦФ+С – группа, обработанная Соед.4, затем циклофосфамидом.

Достоверного увеличения числа незрелых полихроматофильных эритроцитов в мазках крови после применения Соед.4 не обнаружено, однако имеется соответствующая тенденция у животных, обработанных Соед.4 перед введением циклофосфида.

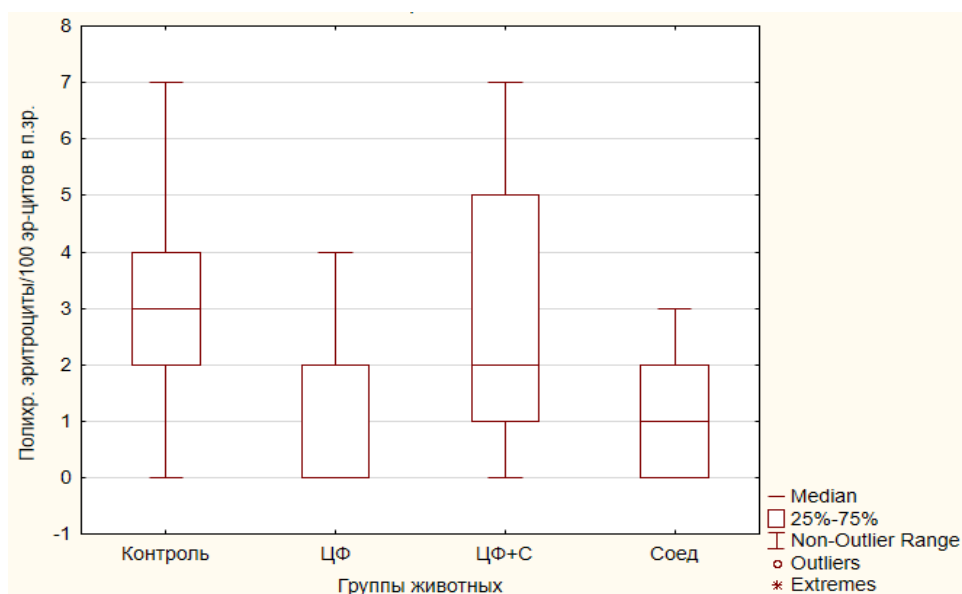


Рис. 22. Содержание полихроматофильных эритроцитов в мазках периферической крови у групп экспериментальных животных (n=15). ЦФ – группа, обработанная циклофосфамидом, ЦФ+С – группа, обработанная Соед.4, затем циклофосфамидом.

В некоторых мазках крови животных, обработанных Соед.4 были обнаружены полихроматофильные эритробласты.

Табл. 6. Обнаруженные в периферической крови исследуемых животных бласты.

	Контроль	Циклофосфан	ЦФ + Соед.4	Соед.4
Бласты в полях зрения	-	-	1	2

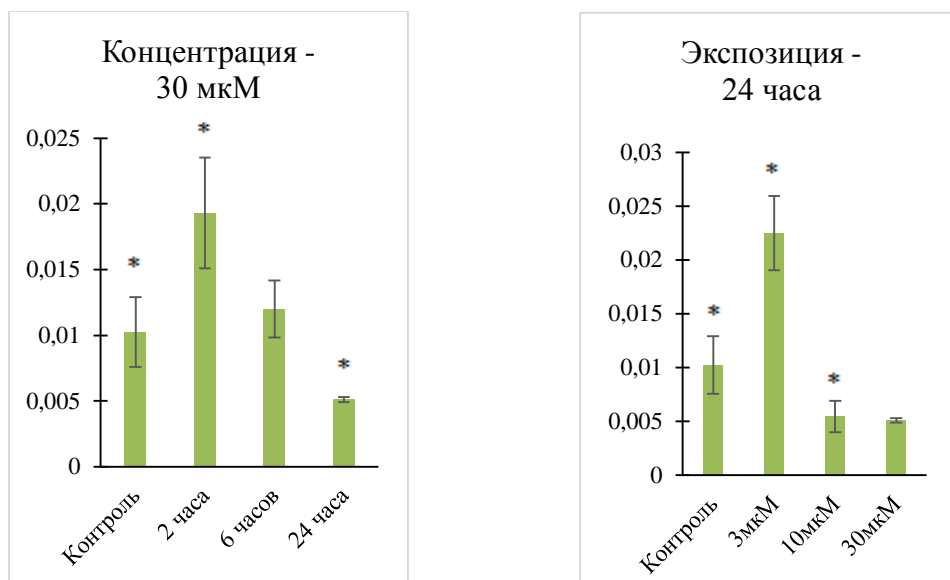
3.3 Соединение 5

Соединение 5 вызывает времязависимое увеличение продукции ИЛ-1 β и ИЛ-10, а также демонстрирует обратный дозозависимый эффект: в низких концентрациях (3мкМ, 10мкМ) оно стимулирует выработку ИЛ-1 β и ИЛ-10, в высоких – угнетает. На экспрессию гена *цитохрома P450 1A1* оно влияет противоположным образом.

Табл. 7 Уровни экспрессии целевых генов культурой клеток после обработки Соед.5.

Образцы \ Гены	<i>ИЛ-1β</i>	<i>ИЛ-10</i>	<i>CYP 1A1</i>
Контроль (без вещества)	0,01 \pm 0,003	0,009 \pm 0,0042	2,50 \pm 0,807
2 часа инкубирования с веществом (30мкМ)	0,02 \pm 0,004	0,03 \pm 0,005	2,84 \pm 0,475
6 часов инкубирования с веществом (30мкМ)	0,01 \pm 0,002	0,02 \pm 0,005	5,22 \pm 1,026
24 часа инкубирования с веществом (30мкМ)	0,005 \pm 0,0002	0,008 \pm 8,19E-05	3,51 \pm 0,678
24 часа инкубирования с веществом (3мкМ)	0,02 \pm 0,003	0,04 \pm 0,004	3,12 \pm 0,806
4 часа инкубирования с веществом (10мкМ)	0,005 \pm 0,0014	0,01 \pm 0,003	5,53 \pm 0,648

Рис. 23. Уровень экспрессии *ИЛ-1 β* после обработки культуры клеток Соед.5.



*-достоверность различий между группами равна 95%

Рис. 24. Уровень экспрессии *ИЛ-10* после обработки культуры клеток Соед.5.

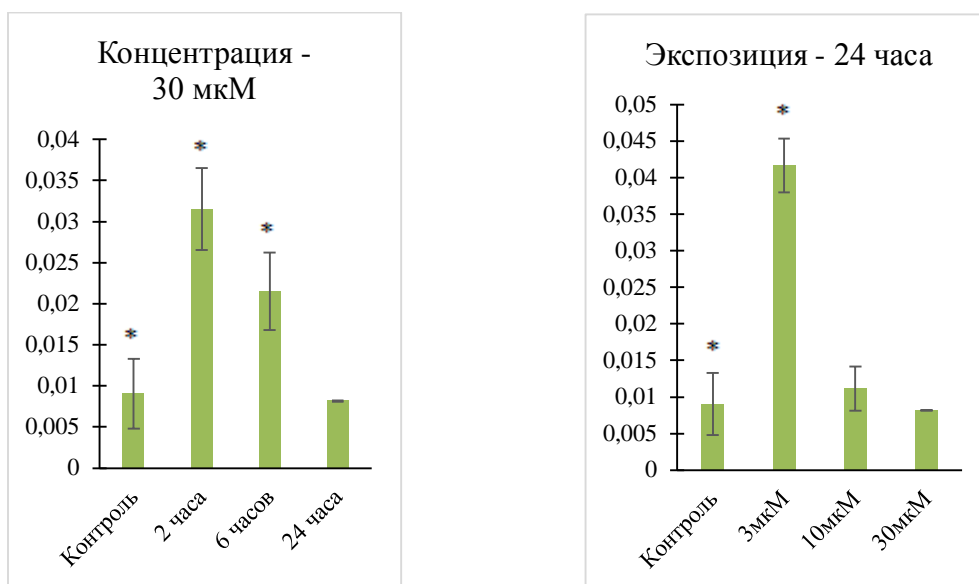
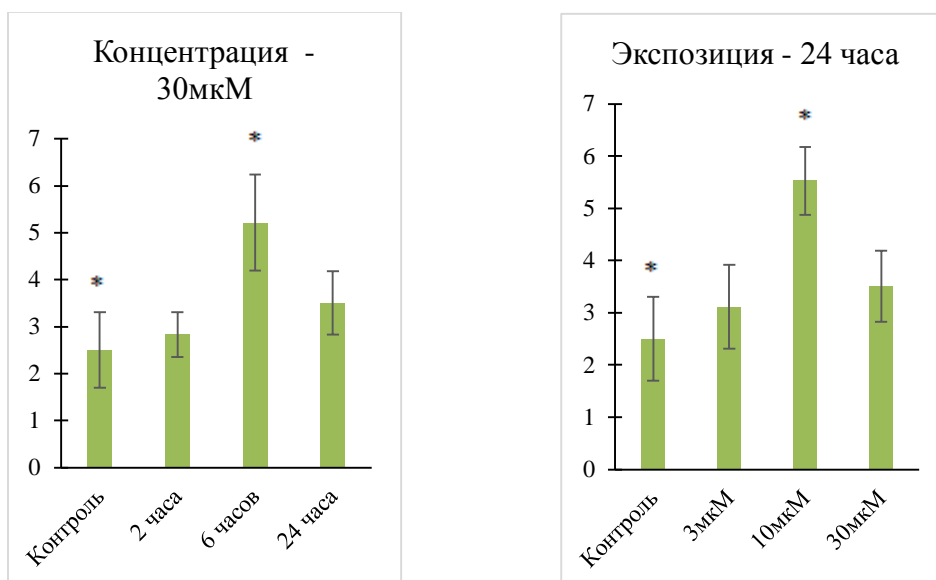


Рис. 25. Уровень экспрессии *CYP1A1* после обработки культуры клеток Соед.5.



*-достоверность различий между группами равна 95%

Глава 4. Обсуждение полученных результатов

4.1 Соединение 3

Влияние Соед.3 на иммунную систему неоднозначно: с одной стороны, оно угнетает выработку ИЛ-1 β клетками моноцитарного ряда, что свидетельствует о противовоспалительной активности данного вещества, однако оно дозо- и времязависимо повышает экспрессию гена другого важнейшего медиатора воспаления – TNF. Вероятно, соединение влияет на активность транскрипционных факторов, участвующих в синтезе м-РНК, кодирующих предшественники этих белков. Усиление транскрипции *ФНО* происходит под влиянием трансаактиваторов, связывающихся с определёнными последовательностями ДНК в составе промотора *ФНО*. Одним из активаторов транскрипции *ФНО* является CREB (Cyclic-AMP Response Element – binding protein), связывающийся с CRE-участком ДНК. CREB активируется под влиянием MAPK [17]. CRE-участок ДНК находится в составе промоторов *ФНО* и *ИЛ-1 β* . В то же время было обнаружено, что связывание CREB с промотором *ИЛ-1 β* угнетает его транскрипцию [41]. Вполне возможно, что Соед.3 активирует продукцию ФНО и угнетает экспрессию *ИЛ-1 β* , воздействуя на CREB. От активности данного фактора транскрипции зависят многие биологические процессы, в т.ч. процесс образования меланина в кератиноцитах. Активирующее влияние фурукумаринов на CREB подтвердилось в экспериментах с усилением меланогенеза в клетках меланомы мышей В16. Так, скопарон достоверно увеличивал содержание меланина в культуре опухолевых клеток и повышал активность тирозиназы – важнейшего фермента меланогенеза. Также была показана зависимость скопарон-индуцированного меланогенеза от активности протеинкиназы А, фосфорилирующей CREB [21]. Помимо образования меланина, CREB участвует в процессе остеогенеза. В экспериментах с культурой остеобластов, фурукумарин остол, выделенный из *Snidium monnieri*, инициировал фосфорилирование CREB, необходимое для участия последнего в экспрессии генов [50]. Эти примеры позволяют предположить влияние фурукумаринового фрагмента молекулы Соед.3 на активность CREB.

4.2 Соединение 4

ИЛ-12 и ИЛ-10 являются почти полными биологическими антагонистами. Существует группа транскрипционных факторов, усиливающих экспрессию гена первого и подавляющих её у гена последнего. Одни из наиболее значимых среди них – IRF-1 и c-Rel [30]. IRF-1 является представителем большого семейства позитивных регуляторов экспрессии, в т.ч. генов *ИЛ-12 α* , *ИФН- γ* и генов других провоспалительных медиаторов. Он способствует классической активации макрофагов (M1-популяция) и индукции клеточного иммунного ответа.

Наряду с этим известен c-Maf – негативный регулятор транскрипции *ИЛ-12a*, выполняющий противоположную IRF-1 функцию: суппрессию клеточного звена иммунитета и формирование M2-популяции макрофагов (альтернативно-активированные) [19]. Вероятно, Соединение 4 влияет на активность этих факторов транскрипции, усиливая активность IRF и подавляя активность c-Maf.

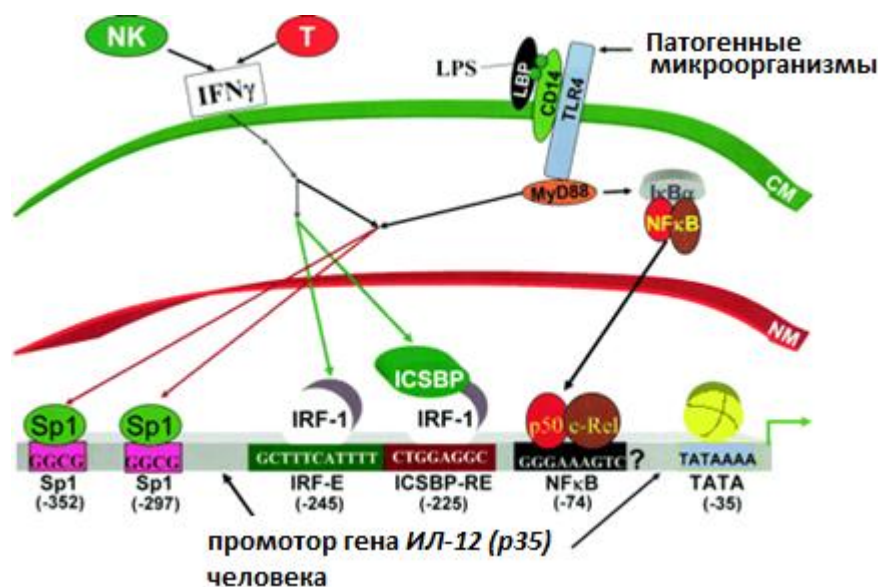


Рис. 26.Схема промотора и активации транскрипции *ИЛ-12a* (*p35*) в макрофаге [30, 48].

ИЛ-12 известен как цитокин, стимулирующий клеточное звено приобретённого иммунитета. ИЛ-10 поляризует иммунный ответ в гуморальном направлении, активируя В-клетки, и предотвращает гиперактивацию воспаления, частично являясь иммуносупрессирующим медиатором. Отсюда следует, что Соединение 4 можно рассматривать в качестве потенциального средства для борьбы с внутриклеточными патогенами (вирусы, микобактерии, хламидии и др.) а также в качестве иммуностимулятора.

В эксперименте с лабораторными животными Соед.4 проявило себя в качестве корректора иммуносупрессивного состояния, вызванного циклофосфаном, усиливая сниженную препаратом продукцию ИЛ-12 в макрофагах мыши. В то же время, введение Соед.4 спровоцировало снижение инициированного препаратом роста продукции цитокинов в костном мозге, вероятно, это объясняется нежелательным лекарственным взаимодействием. Однако, в монорегиме оно проявило аналогичное циклофосфамиду действие на экспрессию *ИЛ-12* и *ИЛ-10* клетками костного мозга. Из проведённого эксперимента следует, что *in vivo* исследуемое соединение способно проявлять стимулирующее влияние как на клеточное, так и на гуморальное звено иммунитета.

Активно делящиеся клетки-предшественницы эритроцитов и лимфоцитов более подвержены воздействию циклофосфамида по сравнению с предшественниками других ветвей кроветворения. Цитостатический агент способен значительно снижать число лимфоидных клеток в периферической крови и вызывать структурные неспецифические изменения в морфологии эритроцитов, одним из проявлений которых является шизоцитоз [5]. Угнетая эритропоэз, препарат вызывает снижение незрелых форм эритроцитов в периферической крови, что проявляется снижением числа полихроматофильных эритроцитов в периферической крови. Увеличение относительного содержания лимфоцитов в лейкоцитарной формуле после применения соединения бетулиновой кислоты у мышей, обработанных циклофосфамидом, свидетельствует о стимулирующем влиянии данного соединения на лимфоцитарный росток кроветворения [35]. Эти данные коррелируют с вызванным Соед.4 повышением выработки провоспалительных цитокинов в костном мозге мышей. Имеется тенденция к росту числа полихроматофилов в периферической крови после применения Соед.4 у мышей с индуцированной циклофосфаном иммуносупрессией. Это говорит о повышении регенераторной активности красного костного мозга. В пользу этого также свидетельствует обнаружение полихроматофильных эритробластов в мазках крови у этой группы животных.

4.3 Соединение 5

После обработки культуры U-937 низкими концентрациями (3, 10мкМ) Соед.5 наблюдалась стимуляция продукции ИЛ-1 β и ИЛ-10, в то время как высокие концентрации подавляли выработку того и другого цитокинов. В течение двух часов после обработки Соединением 5 резко увеличилась продукция обоих цитокинов, однако затем последовал спад активности их экспрессии. Синхронность изменений в продукции двух противоположных по функциям цитокинов можно объяснить изменениями в активности смежных активаторов их транскрипции. Таковым является AP-1 – важный индуктор транскрипции этих белков [20]. Вреязависимое снижение их транскрипции, по-видимому, объясняется отрицательной обратной связью в ответ на избыток цитокинов в клеточной среде. Параллельное усиление транскрипции *CYP1A1* происходило в ответ на присутствие в молекуле Соединения 5 пеурутинина - ароматического полициклического углеводорода, индуцирующего экспрессию *CYP1A1*. Доказано, что клетки макрофагального ряда способны вырабатывать ингибиторы ИЛ-1 β для предотвращения гиперактивации воспаления, а также, в ряде случаев способны снижать продукцию провоспалительных медиаторов в ответ на повторную стимуляцию некоторыми антигенами [32]. Обработка человеческих моноцитов IFN- γ и IL-10 или длительное взаимодействие с микробными компонентами изменяет антигенный рецепторный профиль иммунных

клеток. Например, происходят изменения в TLR и MD2, а также в сигнальных молекулах, таких как MyD88 [13]. Эти изменения в количестве рецепторов и регуляции передачи сигналов приводят к неодинаковой продукции эффекторных молекул, таких как воспалительные и противовоспалительные цитокины.

Выводы

1) Соединение 2-азидоорезелона и бетулиновой кислоты (Соед.3), соединение 2-азидо, 9-замещенного орезелона с бетулиновой кислотой (Соед.4), а также соединение бетулиновой кислоты и пеуритинина (Соед.5) обладают приемлемыми для исследований на культурах клеток диапазонами токсичности. Это позволило в ходе трёхэтапного эксперимента оценить их биологическую активность.

2) Способность соединения 2-азидоорезелона и бетулиновой кислоты (Соед.3) активировать продукцию ФНО при одновременном подавлении выработки ИЛ-1 β говорит о разнонаправленности его влияния на иммунную систему организма. Целесообразно его дальнейшее исследование на предмет иммуносупрессирующей и противоопухолевой активностей.

Соединение 2-азидо, 9-замещенного орезелона с бетулиновой кислотой (Соед.4) оказывало угнетающий эффект на продукцию ИЛ-10 иммунными клетками и усиливало экспрессию гена его антагониста - ИЛ-12. Это свойство позволило испытать его на модели искусственной иммуносупрессии.

Обратные дозо- и времязависимые эффекты Соед.5 на экспрессию *ИЛ-1 β* и *ИЛ-10* могут объясняться активностью факторов транскрипции и наличием отрицательной обратной связи, препятствующей дальнейшему усилению экспрессии генов этих цитокинов. С точки зрения фармакологии, Соед.5 не является перспективным, ввиду его низкой растворимости в органических растворителях (99,9% DMSO) и воде.

3) В результате анализа суточной экспрессии генов цитокинов, было обнаружено, что соединения могут оказывать на неё как прямые, так и обратные времязависимые и дозозависимые эффекты.

4) Соед.4 способно усиливать, предварительно угнетённую циклофосфаном, экспрессию *ИЛ-12* в перитонеальных макрофагах мыши, а также индуцировать выработку цитокинов (*ИЛ-12* и *ИЛ-10*) в костном мозге. Это говорит о его стимулирующем влиянии как на клеточное, так и на гуморальное звено иммунитета. Перед проведением дальнейших исследований следует учитывать возможность нежелательных взаимодействий его с лекарственными средствами.

5) Соед.4 оказывает стимулирующее влияние на лимфопоэз и способствует коррекции нарушений эритропоэза, вызванных циклофосфамидом.

Благодарность

Автор выражает благодарность руководителю лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики (МЕЛФа) д.м.н., члену-корреспонденту РАН, Вавилину Валентину Андреевичу (НИИМББ ФИЦ ФТМ), Ключовой Любове Сергеевне (лаборатория БЧС НИИМББ ФИЦ ФТМ) и сотруднику НИИ Региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, д.б.н., Колдышевой Елене Владимировне за неоценимую помощь в работе.

Список цитированной литературы

1. Бестаев Давид Владимирович, Новиков А. А., Александрова Е. Н., Божьева Л. А., Глухова С. И., Насонов Е. Л. Уровень цитокинов у больных ревматоидным артритом: связь с поражением легких // Научно-практическая ревматология. 2014. №4. С. 16-20.
2. Борсук О. С., Масная Н. В., Чурин А. А., Шерстобоев Е. Ю. Доклинические исследования препаратов природного происхождения в условиях цитостатического воздействия // Биомедицина. 2010. №2. С. 17-22.
3. Дымшиц Г. М., Саблина О. В. Молекулярные основы современной биологии. Учебное пособие // Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, 2012, с. 251.
4. Ильичев А. В., Лебединская Е. А., Фадеева Е. В., Лебединская О. В., Ахматова Н. К., Четвертных В. А., Годовалов А. П., Мелехин С. В., Киселевский М. В., Мальдов Д. Г. Действие стимфорте на мононуклеарные лейкоциты и лимфоидные органы мышей на фоне введения циклофосфана // Медицинская иммунология. 2011. №2. С. 3.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины// СПб : ООО «Издательство Фолиант», 2008. – с.70-79, 104-120, 144 – 151, 235-243, 326-333.
6. Липеева А.В., Шульц Э.Э., Шакиров М.М., Багрянская И.Ю., Толстиков Г.А. Исследование растительных кумаринов XIII. Синтез 2,3,9-тризамещенных фурукумаринов// Журнал органической химии. 2013. Т. 49. № 3. С. 416-424.
7. Насонов Е.Л., Елисеев М.С. Роль интерлейкина 1 в развитии заболеваний человека// Научно-практическая ревматология, №1, 2016, Р. 60-77.
8. Регистр лекарственных средств России РЛС Пациент 2001. - Москва, Регистр Лекарственных Средств России, 2020. с. 1458.
9. Соснина А.В., Великая Н.В., Варакин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований// Новосибирск: ЗАО «Офсет», 2014. С. 128.
10. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Толстиков А.Г., Флехтер О. Б. Терпеноиды ряда лупана - биологическая активность и фармакологические перспективы// Биоорганическая химия. 2006. Т.32. №1. С. 37-49.
11. Ханчич Олег Алексеевич, Кузнецова Светлана Алексеевна, Скворцова Галина Павловна, Калачева Галина Сергеевна, Зайбель Ирина Александровна,. Изучение состава этанольного экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств// Химия растительного сырья, № 1, 2010, С. 137-141.

12. Bernard P, Scior T, Didier B, Hibert M, Berthon JY. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors// *Phytochemistry*. 2001; 58: P. 865-874;
13. Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide// *Blood*. 2002. 99(9): 3427-3431.;
14. Bracci Laura, Moschella Federica, Sestili Paola, LaSorsa Valentina, Valentini Mara, Canini Iren, Baccharini Sara, Maccari Sonia, Ramoni Carlo, Belardelli Filippo and Proietti Enrico. 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// *Clinical cancer research*; 2007. 13(2 Pt 1): 644-53.
15. Ci X, Zhou J, Lv H, Yu Q, Peng L, Hua S. Betulin exhibits anti-inflammatory activity in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice through an AMPK/AKT/Nrf2-dependent mechanism// *Cell Death Dis*. 2017; №5. P. 2798.
16. Diwan, R. and Malpathak, N. Furanocoumarins: Novel topoisomerase I inhibitors from *Ruta graveolens* L.// *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, vol. 17, P. 7052-7055.
17. Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *CurrDirAutoimmun*. 2010. №11. P. 27–60.
18. Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function// *Trends Pharmacol Sci*. 2016; №8. P. 625–640.;
19. Homma Y, Cao S, Shi X, Ma X, J Interferon. The Th2 transcription factor c-Maf inhibits IL-12p35 gene expression in activated macrophages by targeting NF-kappaB nuclear translocation// *Cytokine Res*. 2007. №9. P. 799-808.
20. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease// *Crit Rev Immunol*. 2012. №1. P. 23–63.
21. Jeong-yeh Yang , Jeung-hyun Koo , Young-gil Song, Kang-beom Kwon, Ju-hyung Lee, Hee-sook Sohn , Byunghyun Park, Eun-chung Jhee, Jin-woo Park. Stimulation of melanogenesis by scoparone in B16 melanoma cells. // *Acta Pharmacologica Sinica* 2006 Nov; 27 (11): 1467–1473;
22. José Fernando Oliveira Costa, José Maria Barbosa-Filho, Gabriela Lemos de Azevedo Maia, Elisalva Teixeira Guimarães, Cássio Santana Meira, Ricardo Ribeiro-dos-Santos, Lain Carlos Pontes de Carvalho, Milena Botelho Pereira Soares. Potent anti-

inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia// International Immunopharmacology, Vol. 23, 2014, P. 469-474

23. José Luis Ríos, Salvador Máñez. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid// *Planta Med* 2018; №1. P. 8-19;

24. Juan Jose Serrano-Perez, Remedios Gonzalez-Luque, Manuela Merchan, Luis Serrano-Andres. The family of furocoumarins: Looking for the best photosensitizer for phototherapy// *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 199. 2008. P. 34–41.

25. Kikuchi T., Akazawa H., K. Tabata, A. Manosroi, J. Manosroi, T. Suzuki, T. Akihisa, 3-O-(E)-p-coumaroyltormentic acid from *Eriobotrya japonica* leaves induces caspase-dependent apoptotic cell death in human leukemia cell line// *Chem. Pharm. Bull.* 2011. № 59. P. 378–381.

26. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease// *J Mol Med*. 2004. 82(7). P. 434–448.

27. Kumar S, Kumar V, Prakash O. Enzymes inhibition and antidiabetic effect of isolated constituents from *Dilleniaindica*// *Biomed Res Int* 2013; №3. P. 488-492.

28. Lipeeva A.V, Baev D.S., Dolgikh M. P., Tolstikova T. G., Shults E. E. Rapid Access to Oxazine Fused Furocoumarins and in vivo and in silico Studies of their Biological Activity// *Medicinal Chemistry*. 2017. №13. P. 625.

29. Lipeeva A.V., M.A. Pokrovsky, D.S. Baev, M.M. Shakirov, I.Y. Bagryanskaya, T.G. Tolstikova, A.G. Pokrovsky, E.E. Shults. Synthesis of 1H-1,2,3-triazole linked aryl(arylamidomethyl)-dihydrofurocoumarin hybrids and analysis of their cytotoxicity// *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. №4. P. 119-128.

30. Liu, Jianguo et al. “Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein// *The Journal of biological chemistry*. Vol. 53. 2004. P. 609-617.;

31. Luo K, Sun J, Chan J, Y, -W, Yang L, Wu S, Fung K, -P, Liu F: Anticancer Effects of Imperatorin Isolated from *Angelica dahurica*: Induction of Apoptosis in HepG2 Cells through both Death-Receptor- and Mitochondria-Mediated Pathways// *Chemotherapy* 2011; vol. 57. P. 449-459.

32. Madej MP, Töpfer E, Boraschi D, Italiani P. Different Regulation of Interleukin-1 Production and Activity in Monocytes and Macrophages: Innate Memory as an Endogenous Mechanism of IL-1 Inhibition// *Front Pharmacol*. 2017; 8: 335.

33. Marion F. Gruber, Theresa L. Gerrard, Production of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) by human monocytes is differentially regulated by GM-CSF, TNF α , and IFN- γ // Cellular Immunology, Vol. 142, № 2, 1992. P. 361-369.
34. Medzhitov Ruslan. Toll-like receptors and innate immunity. Nature Reviews Immunology// 2001; №1. P. 135-145
35. O'Connell KE, Mikkola AM, Stepanek AM, et al. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research// Comp Med. 2015;65(2): 96-113.
36. Oloyede H.O.B., Ajiboye H.O., Salawu M.O., Ajiboye T.O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid// Microbial Pathogenesis, 2017, vol. 111, P. 338-344.
37. Pahl H.L Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors// Oncogene 1999. Vol. 18. P. 6853–6866;
38. Pyo J. S., Roh S. H., Kim D. K., Lee J. G., Lee Y. Y., Hong S. S., Kwon S. W., Park J. H. Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry // Planta Med. – 2009. V. 75. P. 127–131.
39. Sechi, Mario & Casu, Fabio & Campesi, Ilaria & Fiori, Stefano & Mariani, Alberto. Hyperbranched molecular structures with potential antiviral activity: derivatives of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic Acid// Molecules. 2006. №11. P. 968-977.
40. Santana L., E. Uriarte, F. Roleirab, N. Milhazesc and F. Borgesc. Furocoumarins in Medicinal Chemistry. Synthesis, Natural Occurrence and Biological Activity.Current// Medicinal Chemistry, 2004, №11, P. 3239-3261
41. Rafael L. Perez , Jeffrey D. Ritzenthaler , and Jesse Roman, .Transcriptional Regulation of the Interleukin-1 β Promoter via Fibrinogen Engagement of the CD18 Integrin Receptor// Respir Cell Mol Biol. 1999. №5. P. 1059-1066.
42. Recio MC, Giner RM, Máñez S, Gueho J, Julien HR, Hostettmann K, Ríos JL. Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from Diospyrosleucomelas// Planta Med 1995. Vol. 61. P. 9-12;
43. Rutz S., Ouyang W. Regulation of Interleukin-10 Expression. In: Ma X. (eds) Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases// Advances in Experimental Medicine and Biology. 2016. vol 941. P. 43-47.
44. Shi, Y., Liu, C., Roberts, A. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know// Cell Res. 2006. vol. 16. P. 126–133.

45. Stacey MA, Sun G, Vassalli G, Marini M, Bellini A, Mattoli S The allergen Der p1 induces NF-kappaB activation through interference with IkappaB alpha function in asthmatic bronchial epithelial cells// *Biochem Biophys Res Commun.*1997. vol. 236. P. 522–526.

46. Sun Y.F., Song C.K., Viernstein H., Unger F., Liang Z.S. Apoptosis of human breast cancer cells induced by microencapsulated betulinic acid from sour jujube fruits through the mitochondria transduction pathway // *Food Chem.* 2013. №1. P. 138.

47. T. van der Heijden, I. Bot, J. Kuiper. The IL-12 cytokine family in cardiovascular diseases// *Division of BioTherapeutics, LACDR, Leiden University, Leiden, The Netherlands.* – 2017. P.566.

48. Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M.//*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999. V. 289. P. 1306-1312.;

49. Zhang H.-J., Tan G.T., Hoang V.D., Hung N.V., Cuong N.M., Soejarta D.D., Pezzuto J.M., Fong H. U.-S.//*J. Nat. Prod.* 2003. V. 66. P. 263-268.;

50. Zhang ZR, Leung WN, Li G, et al. Osthole Enhances Osteogenesis in Osteoblasts by Elevating Transcription Factor Osterix via cAMP/CREB Signaling In Vitro and In Vivo. *Nutrients.* 2017;9(6): 588.

51. Zuko V., Supino R., Righetti S.C., Cleris K., Marchesi E., Gambacorti C., Formelli F.//*Cancer Lett.* 2002. V. 175. P. 17-25.