

На правах рукописи



Аминин Дмитрий Львович

Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазид

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени доктора биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор
Стоник Валентин Аронович

Официальные оппоненты:

Попов Сергей Владимирович
доктор биологических наук, доцент,
Институт физиологии Коми научного
центра Уральского отделения РАН,
заведующий отделом молекулярной
иммунологии и биотехнологии

Одинцова Нэлия Адольфовна
доктор биологических наук, профессор,
Национальный научный центр морской
биологии ДВО РАН, главный научный
сотрудник лаборатории клеточных
технологий

Сорокина Ирина Васильевна
Доктор биологических наук,
Новосибирский институт органической
химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
ведущий научный сотрудник лаборатории
фармакологических исследований

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт
физиологически активных веществ
Российской академии наук

Защита состоится «29» июня 2018 г. В 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте по адресу: www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В. В

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы отмечается существенный рост острых и хронических инфекционных заболеваний различной природы, включая бактериальные, грибковые, протозойные и вирусные инфекции. Снижение иммунитета населения и вторичные иммунодефицитные состояния человека могут возникать вследствие различных причин, таких как техногенные катастрофы, травмы, ожоги, злокачественные новообразования, осложнения после хирургических операций, проведение лучевой противоопухолевой терапии, применение химиотерапевтических средств, в том числе цитостатиков и стероидных гормонов и ряда других. На фоне снижения иммунологической реактивности пациентов применение даже высокоэффективных антибиотиков последнего поколения не всегда дает хороший клинический результат, а напротив, может вызвать дальнейшее понижение сопротивляемости организма. В связи с этим, поиск и создание новых высокоэффективных таргетных иммуностимулирующих лекарственных средств является важной задачей современной биомедицины.

С древних времен голотурии (или морские огурцы) используются в традиционной восточной медицине для усиления устойчивости человека к различным заболеваниям. Содержащиеся в голотуриях тритерпеновые гликозиды, которые являются характерными метаболитами этих животных, во многом обуславливают их медико-биологическое действие. Установлено, что эти соединения имеют определенное сходство по своему химическому строению с тритерпеновыми гликозидами, содержащимися в легендарном корне женьшень. Недаром распространенное название голотурий на китайском языке звучит как «haishen», что дословно переводится как «морской женьшень». Известно, что тритерпеновые гликозиды голотурий обладают широким спектром биологической активности. Для этих соединений отмечены такие свойства, как цитотоксическая, гемолитическая, антимикробная, ихтиотоксическая, противовоспалительная и некоторые другие активности. Их антипролиферативные, хемопреентивные, проапоптотические и противоопухолевые свойства интенсивно изучаются в настоящее время различными международными группами исследователей США, Германии, Китая, Южной Кореи и России.

Хорошо известно, что тритерпеновые гликозиды голотурий обладают выраженной мембранолитической активностью. Механизм мембранолитического действия этих соединений подробно изучен и заключается в способности гликозидов изменять ионную проницаемость мембран клеток посредством взаимодействия со стеринами мембран (главным образом, с холестерином) и формирования ионопроводящих структур в липидном матриксе. Вследствие образования ионных каналов и пор в мембранах нарушается ионная избирательность клеток и их ионный гомеостаз, усиливается выход из клеток жизненно важных компонентов и ингибируется ряд мембран-ассоциированных ферментов, что в итоге приводит к гибели клеток. Вероятно, именно этим мембранотропным механизмом действия и обусловлены цитотоксическая, гемолитическая и противогрибковая активности тритерпеновых гликозидов.

В то же время в 80–90-х годах прошлого столетия в цикле работ сотрудников ТИБОХ ДВО РАН было продемонстрировано, что тритерпеновые гликозиды дальневосточной промысловой съедобной голотурии *Cucumaria japonica* в низких дозах обладают способностью значительно увеличивать сопротивляемость экспериментальных животных к инфекциям, вызываемым различными патогенными микроорганизмами. Авторы этих исследований предположили, что в основе проявляемых кукумариозидами эффектов лежат их иммуномодулирующие свойства.

Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению физиологической активности тритерпеновых гликозидов голотурий, систематические

исследования специфической иммуномодулирующей активности этих соединений не проводились, а механизм их иммуномодулирующего действия на клеточном и субклеточном уровне был фактически не изучен. Имеющиеся в литературе данные об иммуномодулирующей активности тритерпеновых гликозидов голотурий носят отрывочный характер и не дают четкого представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе стимулирующего эффекта. Практически полностью отсутствуют сведения о мембранных и внутриклеточных молекулярных мишенях действия гликозидов, неизвестны сигнальные пути, обеспечивающие стимулирующие эффекты, и не исследовано фармакокинетическое поведение этих соединений в организме теплокровных.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является выяснение молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2, выделенного из дальневосточной промысловой голотурии *Cucumaria japonica*, и созданного на его основе лекарственного средства кумазид.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- провести сравнительное изучение цитотоксических и иммуномодулирующих свойств ряда тритерпеновых гликозидов голотурий, принадлежащих отрядам *Aspidochirota* и *Dendrochirota*, кукумариозида А₂-2, и препарата кумазид;
- провести исследование безопасности кумазида, включающее определение острой, хронической и кумулятивной активности, определение репродуктивной токсичности, включая мутагенное, эмбриотоксическое и тератогенное действие;
- провести определение специфической активности кумазида, включающее определение влияния препарата на различные системы клеточного и гуморального иммунитета;
- исследовать фармакокинетическое поведение кумазида при нескольких способах введения и изучить локализацию и распределение кумазида в тканях органа-мишени;
- изучить механизмы взаимодействия кукумариозида А₂-2 с иммунокомпетентными клетками мыши и установить внутриклеточные и мембранные мишени иммуномодулирующего действия гликозида.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новое лекарственное средство кумазид, полученное на основе моносulfатированных тритерпеновых гликозидов из голотурии *C. japonica* и холестерина, характеризуется заметным снижением гемолитической и цитотоксической активности, а также острой токсичности по сравнению с исходными гликозидами и ранее созданными ветеринарными препаратами при полном сохранении иммуномодулирующей активности.

2. Кумазид безопасен при внутрижелудочном введении. Кумулятивные токсические свойства кумазида выражены слабо; препарат не оказывает токсического воздействия на состояние внутренних органов животных при исследовании хронической токсичности; кумазид не обладает мутагенными свойствами и репродуктивной токсичностью.

3. Специфическая (иммуностимулирующая) активность кумазида выражается в усилении фагоцитоза и бактерицидной активности лейкоцитов и существенном повышении устойчивости животных к экспериментальным бактериальным инфекциям. Препарат достоверно индуцирует продукцию ряда цитокинов и усиливает исходно сниженную экспрессию мембраноассоциированных маркеров. Кумазид увеличивает количество антителообразующих клеток в селезенке и оказывает радиозащитное действие, существенно стимулируя процессы кроветворения и увеличивая выживаемость сублетально облученных животных, и обладает выраженным противоопухолевым действием *in vivo*.

4. Фармакокинетика кумазида характеризуется быстрым всасыванием препарата при внесосудистых способах введения; скорость выведения препарата зависит от способа его введения и является минимальной при пероральном способе. Кукумариозид А₂-2 в

течение длительного времени не претерпевает метаболических трансформаций в ткани селезенки.

5. Внутриклеточные белки, экспрессия которых регулируется в спленоцитах мыши при действии кукумариозида A_2-2 , представлены белками, принимающими непосредственное участие в регуляции клеточной пролиферации, адгезии и подвижности, а также созревании фагосом и слиянии фагосом и лизосом. Они вовлечены в регулирование движения биомембран, ремоделирование цитоскелета и сигнальную трансдукцию.

6. Мембранными молекулярными мишенями иммуностимулирующего действия кукумариозида A_2-2 являются пуриновые рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающие Ca^{2+} -сигнализацию в мембране макрофагов. Кукумариозид A_2-2 взаимодействует с внеклеточным доменом пуриновых рецепторов и действует по типу аллостерического модулятора, который, связываясь с рецепторами, усиливает ответ клеток на АТФ и частично снимает эффект инактивации рецепторов. Клетки с повышенной плотностью пуриновых P2X1 и P2X4 рецепторов являются клетками-мишенями и принимают участие в Ca^{2+} ответе на действие гликозида.

Научная новизна и практическая ценность работы. В ходе работы было изучено иммуномодулирующее действие серии тритерпеновых гликозидов голотурий. Впервые обнаружено, что зависимость иммуностимулирующей активности гликозидов от их концентрации носит куполообразный характер. Максимальный иммуностимулирующий эффект гликозидов проявляется в наномолярном диапазоне концентраций, что примерно в 100 раз ниже диапазона концентраций их мембранолитического и цитотоксического действия.

Установлено, что кумазид обладает низкой цитотоксической активностью и низкой острой токсичностью при пероральном способе введения. Препарат обладает слабовыраженными кумулятивными свойствами, не оказывает заметного хронического токсического воздействия на лабораторных животных и не проявляет репродуктивную токсичность, включая отсутствие мутагенной активности, эмбриотоксического и тератогенного действия.

Специфическое иммуномодулирующее действие кумазида доказано путем систематических исследований *in vitro* и *in vivo*. Показано, что в низких дозах кумазид стимулирует различные системы клеточного и гуморального иммунитета, а именно: усиливает поглотительную и бактерицидную активность лейкоцитов периферической крови человека, проявляет тенденцию к увеличению пролиферативной активности лимфоцитов крови человека, вызывает достоверное дозозависимое повышение продукции ФНО-альфа мононуклеарными клетками здоровых добровольцев и проявляет тенденцию к стимуляции интерлейкина 6, увеличивает продукцию активных форм кислорода, регистрируемую по люминол- и люцигенинзависимой хемилюминисценции нейтрофилов. Действие кумазида приводит к восстановлению уровня экспрессии CD3-, CD4- и CD8-антигенов лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, экспрессия которых была предварительно подавлена гидрокортизоном. Кроме того, кумазид практически не влияет на выраженность гиперчувствительности замедленного типа у животных к эритроцитам барана, увеличивает в селезенке число антителообразующих клеток к эритроцитам барана, повышает устойчивость животных к некоторым патогенным микроорганизмам и сублетальным дозам радиации, и обладает способностью тормозить рост злокачественных новообразований у экспериментальных животных.

Впервые получены данные по фармакокинетике препарата кумазид при двух способах введения. Рассчитаны параметры скорости его максимального накопления в различных органах и тканях, полумаксимальные концентрации и время выведения из организма. Установлено, что кумазид быстро всасывается при внесосудистых способах введения, а скорость его выведения в значительной степени зависит от способа его введения. Методами MALDI-TOF-MS и MALDI-IMS впервые изучены и определены

фармакокинетические параметры кукумариозида А₂-2 в селезенке мыши. Обнаружено, что кукумариозид А₂-2 локализуется, главным образом, в области серозной оболочки селезенки и, в меньшей степени, в центральной части органа, где располагается красная и белая пульпа.

Изучен молекулярный механизм взаимодействия кукумаиозида А₂-2 с иммунокомпетентными клетками мыши. Впервые обнаружено, что гликозид усиливает пролиферацию спленоцитов и адгезию иммунных клеток на внеклеточный матрикс, увеличивает подвижность макрофагов, их лизосомальную активность, синтез АФК и NO и не взаимодействует с рецепторами к эстрогенам. Методами протеомики впервые установлен ряд белков, экспрессия которых регулируется под действием тритерпеновых гликозидов голотурий. Эти белки принимают непосредственное участие в регуляции пролиферации, адгезии и подвижности клеток, а также созревании фагосом и их слиянии с лизосомами, и вовлечены в ремоделирование цитоскелета и сигнальную трансдукцию.

Показано, что в основе иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 лежит его способность взаимодействовать, прежде всего, с клеточными мембранами иммунокомпетентных клеток и изменять их физико-химические свойства. Впервые установлено, что это взаимодействие обратимо увеличивает микровязкость биомембран, что сопровождается обратимым изменением мембранного потенциала, деполяризацией биомембран и резким обратимым увеличением концентрации ионов Ca²⁺ в цитоплазме за счет его поступления из внеклеточного пространства. На мембранах макрофагов мыши существуют как минимум два сайта связывания кукумариозида А₂-2 (высокоаффинный и низкоаффинный), характеризующихся различными константами диссоциации. Впервые установлено, что молекулярной мишенью действия кукумариозида А₂-2 являются мембранные пуриnergические рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающие Ca²⁺ проводимость в мембранах макрофагов и активацию клеток. Показано, что кукумариозид А₂-2 действует в качестве аллостерического модулятора пуриновых рецепторов. Связываясь с ними, гликозид усиливает ответ клеток на АТФ и частично снимает эффект десенсibilизации рецепторов. Доказательной базой служат результаты электрофизиологических экспериментов на одиночных макрофагах (пэч-кламп), Ca²⁺-имаджинга, ингибиторного анализа селективными блокаторами, специфическими антителами, нокдаун гена с помощью siРНК, поверхностного плазмонного резонанса, иммуноблотинга и ряда других. Установлено, что в перитонеальной полости мыши присутствует популяция крупных зрелых F4/80+ макрофагов, характеризующихся наличием высокой плотности пуриновых рецепторов P2X1 и P2X4 типа, которые принимают участие в Ca²⁺ ответе на применение кукумариозида А₂-2. На основании полученных данных создана современная концепция молекулярного механизма иммуномодулирующего действия тритерпеновых гликозидов голотурий.

Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2 и кумазида и углубляют существующие представления о влиянии низкомолекулярных биорегуляторов на клетки иммунной системы. Фундаментальные знания, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, дают представление о фармакокинетике и фармакодинамике действия иммуномодулирующего лекарственного средства кумазид и создают методологическую основу для изучения механизма действия новых лекарственных средств, созданных на основе тритерпеновых гликозидов голотурий. Использование лекарственного средства кумазид может быть перспективным для восстановления иммунных реакций при вторичных иммунодефицитных состояниях. Предполагаемое предназначение препарата – пациенты, страдающие различными формами иммунодефицита, вызванного инфекционными заболеваниями (в том числе и вирусными), онкологические больные со сниженным иммунитетом после радиотерапии. Предполагается использовать кумазид для коррекции структурно-функциональных

нарушений иммунитета, индуцированных комплексом неблагоприятных экологических факторов аридной зоны и эколого-профессионального-стресса или вызванных воздействием радиации, химически опасных объектов, промышленных токсичных отходов, травмами, ожогами, осложнениями после хирургических операций с применением химиотерапевтических средств, долговременного применения иммунодепрессантов и т.д.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на XIII Всероссийской молодежной конференции по актуальным проблемам химии и биологии. (МЭС ТИБОХ, Владивосток, Россия, 2010 г.), VI Научно-практической конференции «Фундаментальная наука - медицине» (Владивосток, Россия, 2011), II Международной конференции «Перспективные направления биомедицинских технологий» (Владивосток, Россия, 2012 г.), Конференции по программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальная наука – медицине» (Москва, Россия, 2004–2007 г.г.), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия, 2013 г.), 8th Siena Meeting. “From genome to proteome: integration and proteome completion” (Сиена, Италия, 2008), 9th IST Asia pacific meeting on animal, plant and microbial toxins (Владивосток, Россия, 2011), Symposium on marine enzymes and polysaccharides (Нячанг, Вьетнам, 2012), The 2nd international workshop on marine bioresources of Vietnam (Ханой, Вьетнам, 2013), 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013), FEBS EMBO 2014 Conference (Париж, Франция, 2014), Taiwan-Russia Symposium “Potential of Marine Natural Compounds in Biomedicine” (Тайбэй, Тайвань, 2014), 40th FEBS Congress (Берлин, Германия, 2015), International conference KORUS-2016 “Together to Effectively Acting Medicine” (Владивосток, Россия, 2016), BIT’s 15th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology-Japan 2017 (Осака, Япония, 2017).

Личный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Автором самостоятельно были осуществлены планирование, дизайн и координирование всех экспериментов. При непосредственном участии автора проведено исследование цитотоксической и иммуномодулирующей активности кукумариозида A₂-2, кумазида и ряда тритерпеновых гликозидов, определение мест связывания кукумариозида A₂-2 с биомембранами (байдинг), исследование транспорта Ca²⁺ в макрофагах, создание и использование двугибридной трансгенной дрожжевой системы, содержащей эстрагонные рецепторы человека, проведены исследования микровязкости биомембран, мембранного потенциала клеток, фармакологическое исследование переносчиков, ионных каналов и рецепторов, принимающих участие в Ca²⁺ ответе клеток на действие гликозида, включая ингибиторный анализ низкомолекулярными блокаторами и специфическими антителами, иммуноцитохимическое типирование перитонеальных макрофагов, иммуноблоттинг пуринергических рецепторов, нокаун генов с помощью техники малых интерферирующих РНК. Автором выполнена оценка фармакокинетического поведения кукумариозида A₂-2, оценка противоопухолевой активности гликозида, проведены необходимые расчеты и статистическая обработка данных, построение графического материала, обсуждение всех полученных результатов и создание концепции молекулярного механизма иммуномодулирующего действия кукумариозида A₂-2.

Исследования токсических свойств и безопасности кумазида проводили совместно с ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (г. Томск, д.ф.м., проф. М.В. Белоусов) и ФГБНУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (г. Москва, рук. лабораторией, д.м.н., проф., А.Д. Дурнев). Изучение иммуномодулирующих свойств и специфической активности кумазида проводили совместно с ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России (г. Москва, зав. отделом, д.м.н., проф. Б.В. Пинегин) и ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова СО РАН (г. Владивосток, зам. директора, д.м.н. Т.С. Запорожец). Получение тритий-меченного

кукумариозида А₂-2 проводили совместно с Институтом молекулярной генетики РАН (г. Москва, д.х.н., в.н.с. В.П. Шевченко). Исследование связывания Р2Х4 рецептора с лигандами методом поверхностного плазмонного резонанса было выполнено в лаборатории межмолекулярных взаимодействий ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (г. Москва) совместно с рук. лаб., д.б.н., проф. А.С. Ивановым. Электрофизиологические исследования проводили на базе лаборатории клеточной нейробиологии Института биофизики клетки РАН (г. Пущино) совместно с с.н.с., к.б.н. М.Е. Асташевым. Исследования с помощью конфокальной микроскопии проводили в ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН совместно с к.б.н. Т.Ю. Горпенченко. Протеомные исследования проводили на базе Центра Протеомики (г. Росток, Германия) совместно с проф. М.О. Глокером (M.O. Glocker) и Орегонского Государственного Университета (г. Корваллис, штат Орегон, США) совместно с проф. М.Л. Дейнзером (Deinzer M.L.). Компьютерное моделирование осуществлено к.ф.-м.н., с.н.с., Е.А. Зелепуга (лаб. химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН). Исследование фармакокинетики кукумариозида А₂-2 и его пространственного распределения в селезенке мыши радиоизотопными методами и методами MALDI-TOF MS и MALDI-IMS выполнено совместно с к.х.н., рук. лаб. П.С. Дмитренко (лаб. инструментальных и радиоизотопных методов исследования ТИБОХ ДВО РАН).

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦПК Минобрнауки России (№ 14.132.21.1327), грантов РФФИ (№ 11-04-01084-а, 14-04-01822-а и 16-54-52021 МНТ-а), гранта РФФИ-ДВО (проект по программе Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» №06-И-П12-041), гранта РНФ № 14-25-00037, грантов NATO (LST.NR.CLG.981098 и CBP.NR.CLG.982737), гранта CRDF (RB1-557-VL-02), гранта Дальневосточного отделения РАН (№12-III-B-05-022), грантов Дальневосточного и Уральского отделений РАН (№09-II-УО-05-002 и №12-II-УО-05-009), а также при частичной поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта Научные школы (№ НШ-2150.2003.4).

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 43 работы, в том числе 31 научная статья в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 7 глав в книгах и 5 патентов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из Введения, Литературного обзора, посвященного описанию биологической активности тритерпеновых гликозидов, Экспериментальной части, где описываются биологический материал, приборы, реактивы и основные методы и эксперименты, Обсуждения результатов, где описаны и обсуждены полученные результаты, и Заключение, в котором содержится констатирующая часть диссертации. В конце диссертации приведены Выводы и Список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 310 страницах машинописного текста, содержит 50 таблиц, 90 рисунков и 1 схему. Список литературы включает 484 цитируемых работ.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному консультанту академику РАН Валентину Ароновичу Стонику. Автор выражает признательность сотрудникам ТИБОХ ДВО РАН: к.х.н. А.С. Сильченко и д.х.н. С.А. Авилону за выделение и любезное предоставление серии тритерпеновых гликозидов голотурий, включая кукумариозид А₂-2, 2 фрондозид А и препарат кумазид; к.х.н. рук. лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета В.Н. Давыдовой за помощь при проведении исследований методом проточной цитофлуориметрии; к.х.н. рук. лаборатории инструментальных и радиоизотопных методов исследования П.С. Дмитренко за неоценимую помощь в организации и проведении исследований методом MALDI-TOF MS и MALDI-IMS; к.ф.-м.н. Е.А. Зелепуга за исследования методом компьютерного моделирования; к.б.н. С.Н. Ковальчук и к.б.н. В.Б. Кожемяко за совместную работу по созданию и использованию двухгибридной дрожжевой тест-системы, д.б.н. В.И. Калинину за плодотворную дискуссию и ценные замечания в ходе подготовки

диссертации, и всем сотрудникам лаборатории биоиспытаний и механизма действия БАВ ТИБОХ ДВО РАН.

Автор искренне благодарит к.б.н. Т.Ю. Горпенченко (лаборатория биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, г. Владивосток) за помощь при проведении исследований методом конфокальной микроскопии, к.б.н. М.Е. Асташева (лаборатории клеточной нейробиологии, Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино) за помощь в электрофизиологических исследованиях, д.б.н., профессора А.С. Иванова (рук. лаборатории межмолекулярных взаимодействий ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, г. Москва) за неоценимую помощь в исследованиях методом поверхностного плазмонного резонанса. Автор также выражает глубокую признательность своим немецким коллегам из Университетской клиники Гамбург-Эппендорф (Германия), в частности, доктору Фридману Хонекеру за помощь при работе с линиями опухолевых клеток человека и профессору Михаэлу Глокеру (рук. Центра Протеомики, г. Росток, Германия) за плодотворную помощь в протеомных исследованиях иммунных клеток.

Используемые сокращения. Общие термины.

АТФ – аденозинтрифосфат; АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха; АФК – активные формы кислорода; ИЛ – интерлейкин; ИФН- γ - интерферон- γ ; МП – мембранный потенциал; СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни; ФДА – флуоресцеин диацетат; ФНО- α – фактор некроза опухоли - α ; ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор; ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусная кислота; EC_{50} – полумаксимальная эффективная концентрация; FBS – эмбриональная сыворотка телят; FITC – флуоресцеин изотиоцианат; H&E – гематоксилин-эозин; Kd – константа диссоциации; LD_{50} – полумаксимальная летальная доза; MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид; SA₂-2 – кукумаринозид A₂-2.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основными объектами исследований были тритерпеновый моносульфатированный гликозид кукумариозид А₂-2 (СА₂-2) и лекарственное средство кумазид. Кукумариозид А₂-2 получен из этанольного экстракта дальневосточной голотурии *C. japonica* и любезно предоставлен сотрудниками лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН в.н.с., д.х.н. Авиловым С.А. и н.с., к.х.н. Сильчено А.С. Химическую чистоту препарата подтверждали методами ¹³С ЯМР спектроскопии и ESI масс-спектрометрии и сравнивали с ранее опубликованными данными (Авилов и др., 1990). Препарат кумазид представляет собой комплекс 3-О-{3-О-метил-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-[β-D-ксилопиранозил-(1→2)]-β-D-хиновопиранозил-(1→2)-4-О-натрий сульфат-β-D-ксилопиранозил}-3β-гидрокси-голоста-7,25-диен-16-она и холест-5-ен-3-β-ола в молярном соотношении 1:2 (Стоник и др, 2004). Эмпирическая формула: C₅₉H₉₁O₂₉Na•2C₂₇H₄₆O. Супрамолекулярная масса: 2070 Да. Химические структуры кукумариозида А₂-2 и кумазида представлены на рисунке 1.

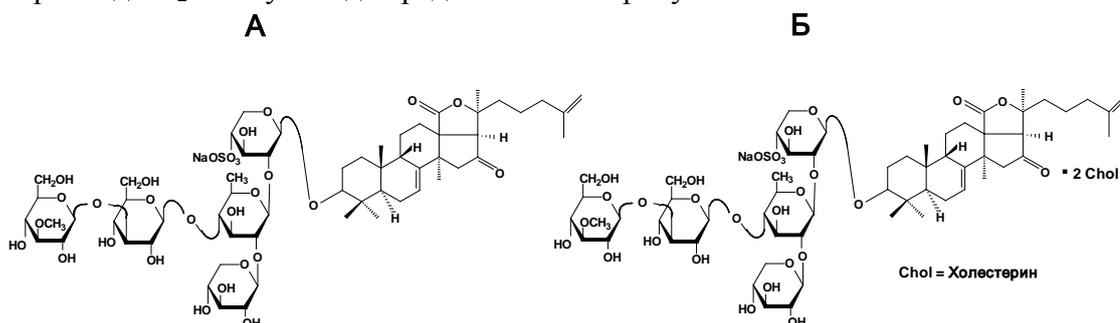


Рис. 1 Химическая структура кукумариозида А₂-2 (А) и кумазида (Б)

Кроме того, в.н.с., д.х.н. Авилов С.А. и н.с., к.х.н. Сильчено А.С. любезно предоставили для исследований образцы фрондозида А из голотурии *C. frondosa* и образцы тритерпеновых гликозидов из голотурий *C. okhotensis*, *E. fraudatrix* и *Actinocucumis typical*.

1. Цитотоксическая активность тритерпеновых гликозидов

Было проведено сравнительное изучение цитотоксических свойств СА₂-2 и ряда тритерпеновых гликозидов голотурий, принадлежащих отрядам Aspidochirota и Dendrochirota. Продемонстрировано, что тритерпеновые гликозиды голотурий проявляют цитотоксическую активность по отношению к различным типам клеток, включая яйцеклетки и эмбрионы морских ежей, опухолевые клетки мыши и человека, клетки иммунной системы и эритроциты. Различными методами установлено, что цитотоксическая активность СА₂-2 является дозозависимой и проявляется в микромолярном диапазоне концентраций независимо от типа клеток (таблица 1, рис. 2), а зависимость эффективности цитотоксического действия гликозида от его концентрации носит линейный характер.

Таблица 1. Влияние кукумариозида А₂-2 на жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мыши, опухолевых клеток репродуктивной сферы человека (PC3, NT2 и 2102EP) и перитонеальных макрофагов (Мф) мыши

Вещество	EC ₅₀ , мкМ				
	АКЭ	PC3	NT2	2102EP	Мф
Кукумариозид А ₂ -2	2,7*; 2,1**; 2,7***	2,0***	1,4***	1,0***	3,0*

* окрашивание трипановым синим; ** оценка активности неспецифической эстеразы; *** МТТ метод

2. Иммуномодулирующая активность тритерпеновых гликозидов

2.1. Влияние на лизосомальную активность

При использовании флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый и техники исследования флуоресцентного изображения клеток, была обнаружена значительная стимуляция лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши в присутствии СА₂-2 в диапазоне концентраций 0,001 – 1,0 мкМ. Дозозависимая кривая активности имеет куполообразный характер. Кукумариозид А₂-2 максимально увеличивал лизосомальную активность при концентрации 0,01 мкМ при инкубировании с монослоем перитонеальных макрофагов в течение 1 ч *in vitro* (рис. 2Б). При понижении или увеличении концентрации индукция лизосомальной активности постепенно уменьшалась. Усиление интенсивности флуоресценции лизосом в присутствии субцитотоксических концентраций гликозида, вероятно, происходит за счет увеличения количества и объема лизосом, а также за счет увеличения кислотности лизосом в перитонеальных макрофагах мыши.

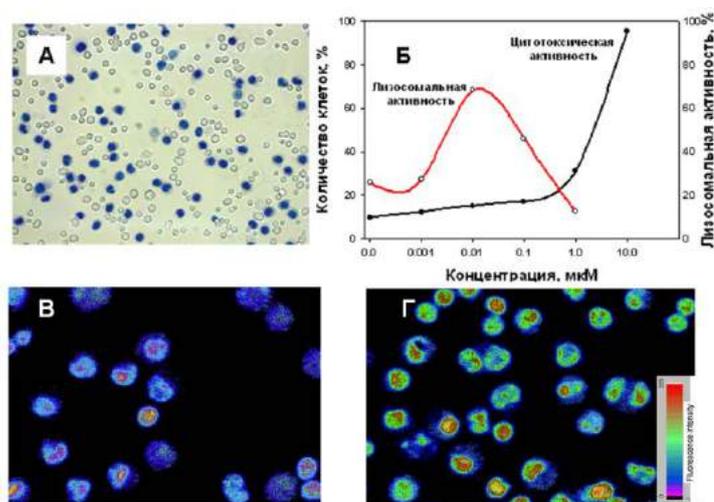


Рис. 2. Цитотоксическая и иммуностимулирующая активности кукумариозида А₂-2 в отношении перитонеальных макрофагов мыши. А – изображение монослоя макрофагов, инкубированных с кукумариозидом А₂-2 (2 мкМ) и окрашенных красителем трипановый синий; Б – дозозависимые кривые цитотоксической и лизосомальной активности кукумариозида А₂-2; В, Г – псевдоцветное изображение флуоресценции лизосом макрофагов, окрашенных акридиновым оранжевым (В – контроль; Г – клетки, выделенные из животных на 4-й день после инъекции кукумариозида А₂-2, 0,02 мкг/мышь)

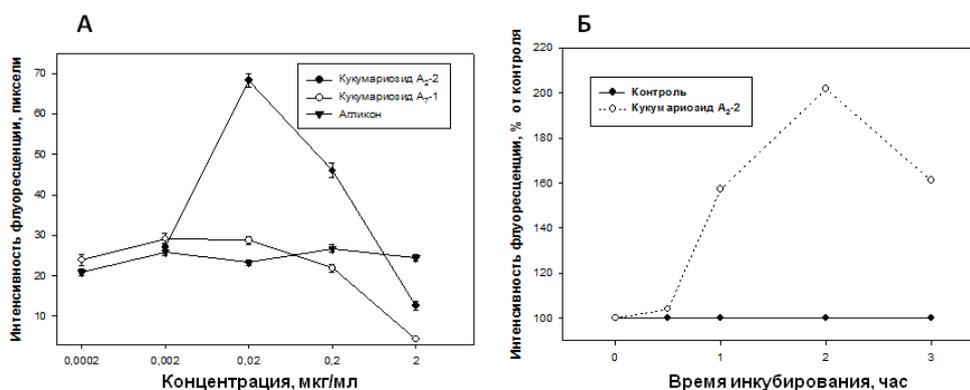


Рис. 3. А – влияние кукумариозидов А₂-2 и А₇-1, а также их агликона на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши. Время инкубирования клеток с гликозидами 1 час. Б – зависимость лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши от времени инкубирования клеток с кукумариозидом А₂-2 *in vitro*. Концентрация гликозида 0,02 мкг/мл

При сравнительном исследовании иммуномодулирующей активности СА₂-2 с трисульфатированным кукумариозидом А₇-1 в диапазоне концентраций 0,0002 – 2,0 мкг/мл было продемонстрировано, что кукумариозид А₇-1 фактически не влиял на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши в низких концентрациях. Более того, при увеличении концентрации этого гликозида в инкубационной среде наблюдали снижение активности лизосом перитонеальных макрофагов, а при концентрации 2,0 мкг/мл отмечено ингибирование базового уровня лизосомальной активности. Агликон был не эффективен во всем исследуемом диапазоне концентраций от 0,002 до 2,0 мкг/мл (рис. 3А).

Исследована зависимость проявления стимулирующей лизосомальной активности СА₂-2 от времени его инкубирования с перитонеальными макрофагами *in vitro*. Достоверное увеличение лизосомальной активности наблюдали уже через 1 час после начала инкубирования, а максимальный стимулирующий эффект гликозида проявлялся через 2 часа после начала инкубирования клеток с гликозидом в концентрации 0,02 мкг/мл. Дальнейшее увеличение времени экспозиции до 3 часов приводило к понижению стимулирующего эффекта (рис. 3Б).

В экспериментах *in vivo* установлено, что введение кукумариозидов мышам стимулирует функции макрофагов уже на 4-й день после применения. Внутривентриальная инъекция тритерпеновых гликозидов в пикограммовых и нанограммовых дозах приводила к увеличению количества и объема лизосом, а также их закислению в мышинных перитонеальных макрофагах, что было зарегистрировано по изменению флуоресценции акридинового оранжевого (рис. 2В, Г).

2.2. Влияние на адгезию, распластывание и подвижность макрофагов

Мы провели исследование влияния СА₂-2, фрондозида А и ряда моносульфатированных тритерпеновых гликозидов из голотурии *C. okhotensis* на адгезию спленоцитов и макрофагов на внеклеточном матриксе, а также на распластывание и подвижность перитонеальных макрофагов мыши с помощью техники молекулярных флуоресцентных зондов, спектрофлуориметрии, конфокальной микроскопии и анализа флуоресцентного изображения клеток.

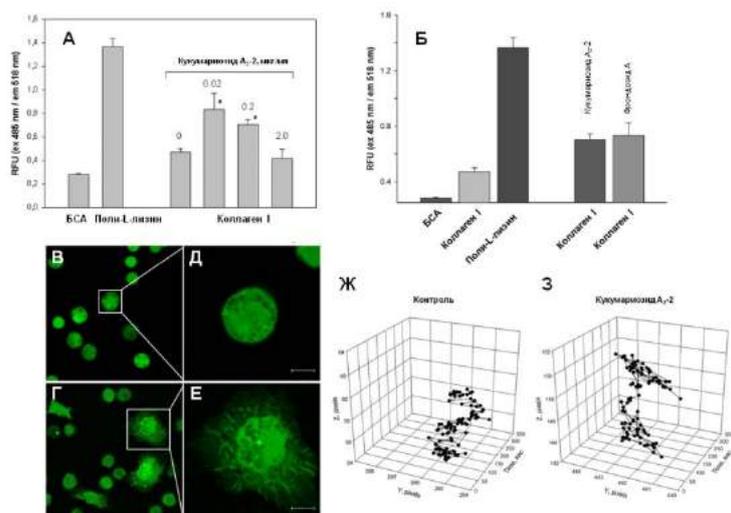


Рис. 4. Влияние кукумариозида А₂-2 на адгезию спленоцитов мыши на внеклеточном матриксе (А, Б); на морфологию перитонеальных макрофагов (окрашивание клеток флуоресцентным зондом 5-CFDA; В, Д – контрольные клетки; Г, Е – стимулированные макрофаги); и на подвижность одиночных макрофагов мышей (окрашивание клеток флуоресцентными зондами 5-CFDA и DAPI, концентрация кукумариозида А₂-2 0,02 мкг/мл); Ж, З - влияние кукумариозида А₂-2 (0,02 мкг/мл) на подвижность одиночного макрофага

Было установлено, что уровень адгезии спленоцитов на поверхность, покрытую коллагеном I, в 1,7 раза превышает уровень адгезии на поверхность, покрытую бычьим сывороточным альбумином (БСА). Присутствие СА₂-2 в инкубационной среде в различных концентрациях увеличивало степень адгезии клеток к коллагеновому матриксу в 1,5–1,6 раза по сравнению с адгезией на коллаген I без дополнительной стимуляции. Максимальная эффективная концентрация гликозида составила 0,02 мкг/мл. Повышение

концентрации CA_2-2 в инкубационной среде до 2 мкг/мл снижало уровень прикрепления клеток до исходных значений (рис. 4А, Б). Кроме того нами было показано, что присутствие фрондозид А в инкубационной среде в концентрации 0,02 мкг/мл так же, как и в случае с CA_2-2 , увеличивало адгезию спленоцитов на коллагеновом матриксе по сравнению с контролем.

Было установлено, что CA_2-2 индуцирует увеличение клеточного распластывания. Обнаружено, что перитонеальные макрофаги, инкубированные с CA_2-2 в концентрации 0,02 мкг/мл, имели увеличенные геометрические параметры, и их форма сильно варьировала из-за увеличения степени распластывания, удлинения и формирования ламелл и филоподий по сравнению с контрольными клетками (рис. 4В). Гликозид вызывал статистически значимое почти двукратное увеличение площади клеток, их периметра и максимальной хорды.

Было установлено, что воздействие гликозида на макрофаги приводит к значительному увеличению площади клеток и вариабельности площади, а также скорости движения и вращения клеток. Влияние CA_2-2 на скорость и направление движения одиночных перитонеальных макрофагов, регистрируемое в трехмерных координатах, представлена на рисунке 4Ж, 3. На рисунке ясно видно, что подвижность клеток, регистрируемая методом отслеживания изменения позиции центраида во времени, значительно изменяется после инкубирования клеток с CA_2-2 . Увеличивается дистанция и боковые флуктуации в движении, на которые стимулированные клетки передвигаются за определенное время по сравнению с контрольными макрофагами.

2.3. Влияние на формирование АФК, NO и активность iNO синтазы в макрофагах

Установлено, что иммуномодулирующий эффект CA_2-2 сопровождается стимуляцией продукции активных форм кислорода (АФК) в макрофагальных клетках. Инкубирование клеток культуры макрофагов мыши с гликозидом в различных концентрациях приводит к дозозависимому изменению содержания АФК, регистрируемого с помощью зонда DCFDA. Наиболее эффективными стимулирующими концентрациями гликозида были 0,01 и 0,001 мкМ, что превосходит по своей активности ЛПС, взятый в иммуностимулирующей концентрации 0,5 мкг/мл. В то же время CA_2-2 в концентрации 0,1 мкМ оказался практически не эффективным. Более того, если CA_2-2 применяли в концентрации 1,0 мкМ, то было отмечено значительное ингибирование продукции АФК в клетках по сравнению с контрольным уровнем (рис. 5А).

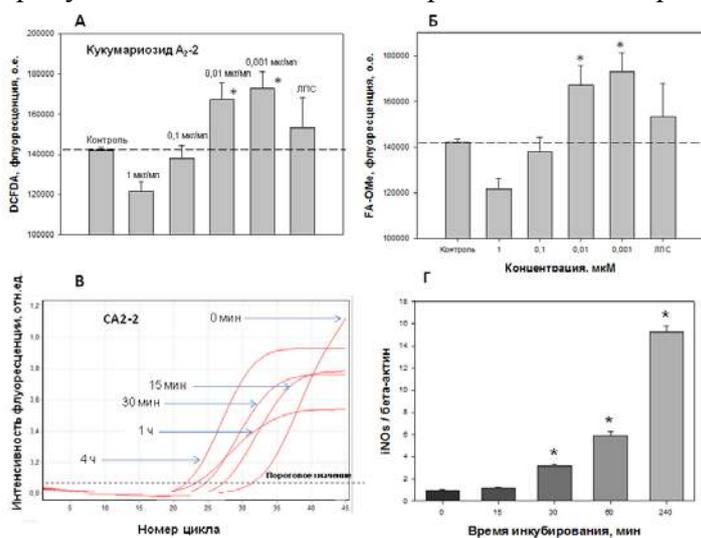


Рис. 5. Влияние кукумериозид A_2-2 на содержание АФК (А), NO (Б) в клетках культуры макрофагов линии RAW 264.7 *in vitro* и на уровень экспрессии гена iNOs (В, Г) в культуре перитонеальных макрофагов мыши. Регистрация экспрессии iNOs методом ПЦР-РВ. Показаны кинетические кривые накопления флуоресцентного сигнала (В) и уровень экспрессии гена iNOs, нормализованный относительно уровня экспрессии гена бета-актина (Г) в зависимости от времени экспозиции клеток с препаратом. Концентрация кукумериозид A_2-2 10 нМ

Установлено, что инкубирование макрофагальных клеток линии RAW 264.7 с ЛПС или с гликозидом в течение 2 час приводит к заметному увеличению уровня NO в цитоплазме клеток, определенного методом спектрофлуориметрии с использованием NO-

чувствительного флуоресцентного зонда FA-OMe. Наблюдали обратнопропорциональную концентрационную зависимость действия CA₂-2 на уровень NO в клетках. Наибольший стимулирующий эффект отмечен для концентрации гликозида 1 нМ, в то время как близкая к цитотоксической доза гликозида (1 мкМ) приводила к ингибированию синтеза NO (рис. 5Б).

Методом ПЦР в реальном времени было оценено влияние CA₂-2 на экспрессию ряда генов клеток мыши, принимающих участие в иммунном ответе на аппликацию гликозида. Показано, что CA₂-2 в иммуностимулирующей концентрации 10 нМ вызывает значительную активацию экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOs) в клетках. Максимальный эффект увеличения экспрессии гена iNOs отмечен через 4 часа после начала инкубирования макрофагов с CA₂-2 (рис. 5В, Г).

Иммуномодулирующие свойства были обнаружены нами и у других тритерпеновых гликозидов голотурий, принадлежащих отряду Dendrochirota: моносульфатированные гликозиды фрэндозид А из *C. frondosa*, фрэндозид А₁, серия охотозидов и кукумариозид А₂-5 из голотурии *C. okhotensis*, серии типикозидов из голотурии *A. typica* и некоторые гликозиды из голотурии *E. fraudatrix* (отряд Aspidochirota). Это свидетельствует в пользу общей закономерности и определенной общности проявления иммуностимулирующих свойств тритерпеновыми гликозидами голотурий.

2.4. Иммуномодулирующая активность препарата кумазид

Результатом исследований иммуностимулирующих свойств гликозидов голотурий стало создание на основе кукумариозид А₂-2 препарата кумазид, представляющего собой комплекс гликозида с холестерином.

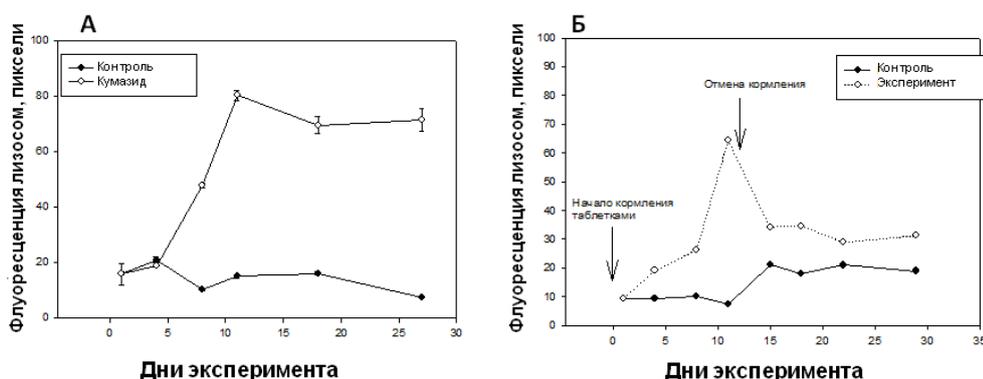


Рис. 6. Зависимость уровня лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши от длительности приема кумазида в таблетированной форме при ежедневном приеме препарата (А) и прекращении приема на 12-й день (Б)

Установлено, что кумазид при пероральном введении стимулировал клеточный иммунитет даже при использовании чрезвычайно низких доз (менее 0,1 мкг активной субстанции на животное). Исследования показали, что лизосомальный компартмент макрофагов мышей резко активировался после пятого дня с начала применения препарата в таблетированной форме, и активация достигала максимума на 10-й день. В течение 4 недель с начала эксперимента при ежедневном приеме препарата макрофаги оставались в активированном состоянии, причем их активность в 3–4 раза превышала таковую в контрольном эксперименте (рис. 6А). После прекращения приема таблеток на 12-ый день эксперимента у мышей наблюдали медленное снижение активности макрофагов, но даже на 30-ый день их активность оставалась более высокой, чем в контрольной группе (рис. 6Б).

3. Изучение безопасности препарата кумазид

3.1. Цитотоксическая и гемолитическая активность кумазида

Существенным преимуществом кумазида перед исходным гликозидом и ранее созданными ветеринарными препаратами является заметное снижение гемолитических, цитотоксических и токсических свойств при полном сохранении иммуномодулирующей активности. В отличие от СА₂-2, для которого полумаксимальная эффективная цитотоксическая концентрация в отношении клеток АКЭ составила порядка 3,0 мкг/мл, ЕС₅₀ для кумазида составила практически в десять раз большую величину – 46 мкг/мл.

3.2. Острая токсичность кумазида

При внутрижелудочном однократном введении мышам и крысам в дозе 5000 мг/кг, в течение 2-х недель эксперимента кумазид не вызывал гибели экспериментальных животных, нарушений координации движений, поведенческих реакций, угнетения дыхания, птоза, нарушений мышечного тонуса. Следовательно, при внутрижелудочном введении ЛД₅₀ кумазида превышает для мышей и крыс 5000 мг/кг. По итогам экспериментов для мышей ЛД₅₀ кумазида при внутрибрюшинном введении составила 84 мг/кг, для крыс ЛД₅₀ кумазида при внутрибрюшинном введении составила 150 мг/кг.

3.3. Кумулятивные свойства кумазида

Кумулятивные свойства кумазида изучали на белых беспородных крысах-самцах. Учитывая невозможность определения ЛД₅₀ кумазида при внутрижелудочном введении, оценку кумулятивных свойств проводили при его внутрибрюшинном введении. По итогам эксперимента коэффициент кумуляции кумазида при внутрибрюшинном введении составляет 0,75. Таким образом, кумазид относится к препаратам со слабовыраженными кумулятивными свойствами (при внутрибрюшинном введении).

3.4. Хроническая токсичность кумазида

Хроническую токсичность изучали на крысах при внутрижелудочном введении препарата в течении 3-х месяцев. Кумазид в диапазоне доз 0,1–10,0 мг/кг не оказывает токсического влияния на общее состояние, динамику массы тела, гемограмму, сердечнососудистую и центральную нервную системы, функциональное состояние печени и почек крыс. Макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов животных, получавших кумазид в хроническом эксперименте, не выявило существенных отклонений от нормы. На основании этих данных и результатов патоморфологического исследования установлено, что кумазид при 3-месячном курсе введения крысам не оказывает заметного токсического действия на подопытных животных и не оказывает отрицательного воздействия на состояние основных внутренних органов экспериментальных животных.

3.5. Оценка репродуктивной токсичности кумазида

Изучение репродуктивной токсичности препарата кумазид включало выявление возможного эмбриотоксического действия, влияния на постнатальное развитие потомства и генеративную функцию животных. Установлено, что кумазид в дозах 1,0 и 10,0 мкг/кг при внутрижелудочном введении не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием: не повышает показателей спонтанной эмбриональной гибели, не влияет на массу и кранио-каудальный размер плодов, не вызывает аномалий развития внутренних органов и дефектов скелета. Введение кумазида в дозе 10,0 мкг/кг не повышает показателей эмбриональной гибели и не оказывает существенного влияния на постнатальное развитие крысят.

3.6. Оценка мутагенной активности кумазида

В исследовании использовали метод учета индукции генных мутаций у микроорганизмов (тест Эймса) и метод учета хромосомных aberrаций в соматических клетках мышей. Кумазид во всех тестируемых дозах не повышал более чем в 1,5 раза число колоний ревертантов на чашку по сравнению с контролем на индикаторных штаммах сальмонеллы *S. typhimurium* TA 100, TA 98 и TA 97 в вариантах без и в присутствии системы метаболической активации. Это указывает на отсутствие мутагенной активности изученных препаратов в тесте Эймса. Кроме того, кумазид не увеличивает спонтанного уровня хромосомных повреждений в клетках костного мозга самцов и самок мышей. Результаты комплексного исследования позволяют заключить, что кумазид не обладает мутагенными свойствами.

4. Исследование специфической иммунологической активности препарата кумазид

Специфическое иммуномодулирующее действие препарата кумазид доказано путем систематических исследований, как *in vitro*, так и *in vivo*. Исследовали влияние препарата кумазид на факторы врожденного и адаптивного иммунитета.

4.1. Влияние кумазида на люминолзависимую и люцигенинзависимую хемилюминесценцию и на поглотительную активность лейкоцитов

В опытах *in vitro* исследовано влияние кумазида на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами периферической крови человека, регистрируемую по люминол- и люцигенинзависимой хемилюминесценции (ХЛ). В зависимости от дозы препарат оказывал неоднозначное действие: в дозах 0,1 и 1,0 мкг/мл кумазид не оказывал значимого влияния или проявлял тенденцию к незначительному подавлению люминолзависимой ХЛ, отражающей продукцию H_2O_2 , а в дозе 10,0 мкг/мл достоверно повышал как спонтанную, так и зимозаниндуцированную люминолзависимую ХЛ на 30-40%. В дозах 0,1 и 1,0 мкг/мл препарат не оказывал влияния на люцигенинзависимую ХЛ, отражающую продукцию O_2^- , а в дозе 10,0 мкг/мл достоверно повышает как спонтанную, так и зимозаниндуцированную люминолзависимую ХЛ на 50%. Результаты исследования люминолзависимой и зимозаниндуцированной люминолзависимую ХЛ нейтрофилов периферической крови человека представлены на рисунке 7.

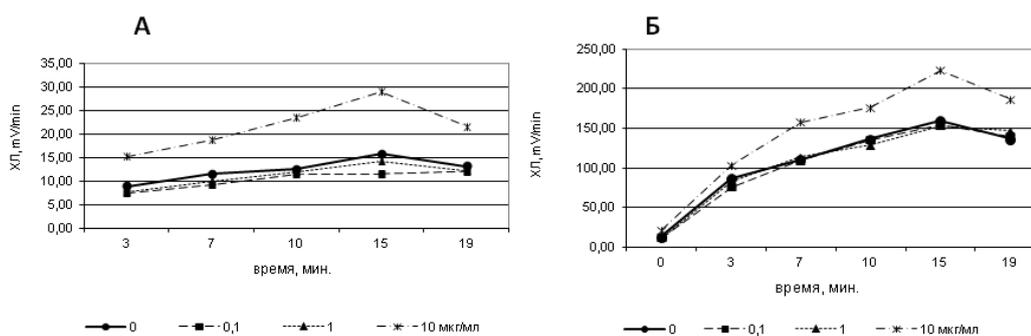


Рис. 7. Влияние кумазида на спонтанную люминолзависимую (А) и на зимозаниндуцированную люминолзависимую ХЛ (Б) нейтрофилов периферической крови человека после предварительной инкубации в течение 30 мин

Препарат в малых дозах (0,1 и 1,0 мкг/мл) проявлял тенденцию к стимуляции поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека и вызывал достоверное повышение фагоцитоза нейтрофилами на 20% и моноцитами на 11% после предварительной 3-х часовой инкубации с препаратом. Кумазид в концентрации 10,0 мкг/мл, после предварительной часовой инкубации, вызывал достоверное повышение бактерицидной активности на 38% (рис. 8).

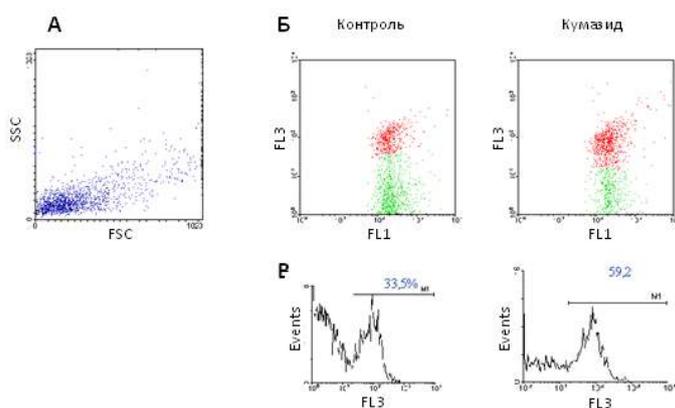


Рис. 8. Влияние кумазида (10,0 мкг/мл) на бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека *in vitro* в отношении бактерий *S. aureus*. А – общая дотограмма фракции фагоцитов; Б и В – дотограммы и гистограммы фагоцитов до и после стимуляции клеток кумазидом. Показаны живые бактерии (зеленое окрашивание) и убитые бактерии (красное окрашивание)

4.2. Влияние кумазида на продукцию цитокинов

Было исследовано влияние кумазида *in vitro* на продукцию ряда цитокинов: фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерферона- γ (ИФН- γ) и интерлейкина-12p70 (ИЛ-12p70) мононуклеарными клетками крови человека (МНК). Данные представлены на рисунке 9. Установлено, что препарат индуцирует продукцию исследуемых цитокинов. Исследованные концентрации препарата, 0,1; 1 и 10 мкг/мл, достоверно повышали продукцию ФНО- α МНК доноров на 43, 70 и 136% соответственно. Даже при самой малой исследованной концентрации (0,1 мкг/мл) препарат вызывал продукцию цитокина на уровне классического индуктора ФНО- α - ЛПС. В отношении цитокина ИЛ-6 кумазид также проявил стимулирующий эффект. Максимальная индукция наблюдалась при использовании концентрации препарата 1,0 мкг/мл. В меньшей степени препарат кумазид оказал влияние на продукцию ИФН- γ в сравнении с ФГА. Только максимальная из исследованных концентраций 10,0 мкг/мл вызывала заметное повышение продукции этого цитокина. ИЛ-12p70 в супернатантах клеток, стимулированных кумазидом в различных концентрациях, выявлен не был.

Таким образом, препарат кумазид обладает выраженной способностью стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6, проявляя тенденцию к стимулированию Th1-цитокина ИФН- γ и не оказывая существенного влияния на продукцию ИЛ-12p70.

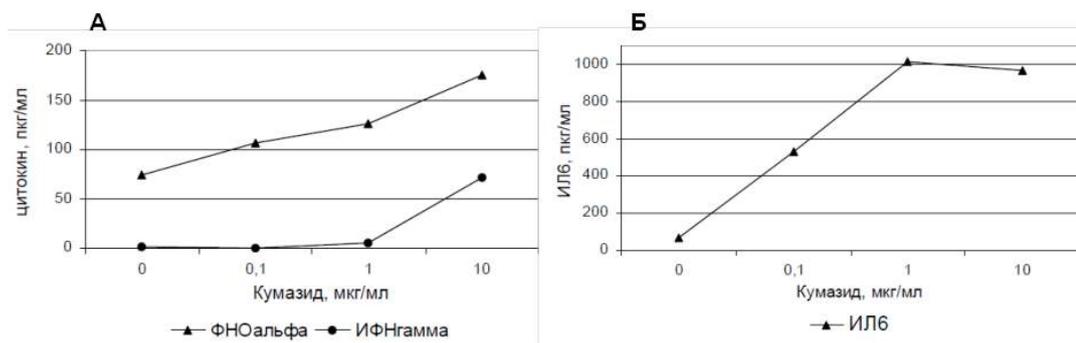


Рис. 9. Продукция фактора некроза опухолей- α , интерферона- γ (А) и интерлейкина-6 (Б) мононуклеарными клетками здоровых добровольцев

4.3. Влияние кумазида на экспрессию мембраноассоциированных белков лимфоцитов

Были проведены исследования влияния кумазида на экспрессию мембраноассоциированных иммунорегуляторных белков лимфоцитов периферической крови (ЛПК) доноров. Полученные нами данные показали, что кумазид при инкубации *in vitro* с ЛПК доноров в течение 60 минут не влиял на уровень экспрессии CD3, CD4, CD8-

антигенов, если они были в норме. Инкубация лимфоцитов с гидрокортизоном вызывала снижение количества клеток, экспрессирующих CD3, в 2,2 раза, CD4 в 1,3 раза, CD8 в 1,2 раза, что отражает эффект иммуносупрессии. Внесение в клеточные суспензии, прединкубированные с гидрокортизоном, кумазида приводило к частичному восстановлению экспрессии CD-антигенов на лимфоцитах. Практически все исследованные концентрации кумазида вызывали увеличение количества мембраноассоциированных маркеров. Наиболее эффективной была концентрация 1,0 мкг/мл, при которой кумазид достоверно увеличивал уровень CD-антигенов в 1,7 (CD3) и 1,5 (CD4) раза ($p < 0,05$) после их подавления иммунодепрессантом (таблица 2).

Таблица 2. Влияние препарата кумазид на экспрессию мембраноассоциированных иммунорегуляторных белков (CD3, CD4, CD8) ЛПК, прединкубированных с гидрокортизоном

Группа	CD3	CD4	CD8
Контроль (итактные клетки)	56,5±7,9	36,3±5,7	26,7±4,5
Гидрокортизон (10^{-5} М)	24,3±5,7	20,5±3,4	18,4±3,7
Кумазид 0,1 мкг/мл	40,2±7,4	26,0±4,3	22,6±4,8
Кумазид 1,0 мкг/мл	42,3±5,8*	30,6±2,4*	24,4±3,9

Обнаружено, что количество лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, экспрессирующих ранние активационные маркеры (CD25, CD71), не превышало 2,2% всех лимфоцитов, а содержание лимфоцитов, экспрессирующих поздний активационный маркер (DR), составляло 8%. Таким образом, активированные Т-лимфоциты в периферической крови здоровых доноров представлены в крайне незначительных количествах. Внесение в культуру ЛПК кумазида в конечной концентрации 1,0 мкг/мл приводило к достоверному увеличению экспрессии CD25-антигена почти в 4 раза, но не изменяло экспрессию HLA-DR-антигена.

4.4. Влияние кумазида на накопление антителообразующих клеток и ГЗТ

Установлено, что кумазид вызывает дозозависимую стимуляцию гуморального иммунного ответа в опытах *in vivo*. Число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке к эритроцитам барана увеличивается в 1,5 раза при введении препарата в дозе 1,0 мкг/мышь, в 2 раза при введении дозы 10,0 мкг/мышь и в 7 раз при введении кумазида в дозе 100,0 мкг/мышь. Результаты пересчета числа АОК на количество ядросодержащих клеток (ЯСК) в селезенке свидетельствуют, что полученный иммуностимулирующий эффект реализуется не за счет увеличения числа ЯСК в селезенках, а за счет увеличения в них количества активных антителопродуцентов (таблица 3).

Таблица 3. Влияние препарата кумазид на гуморальный иммунный ответ мышей

Доза препарата, мкг/мышь	АОК/селезенка (m±sd)		АОК/10 ⁶ ЯСК селезенка (m±sd)		Кол-во животных
	абсолютн. количество клеток	ИМ	абсолютн. количество клеток	ИМ	
0	308 ± 37	1,00	1,67± 0,20	1,00	12
0,1	300 ± 38	0,97	1,42 ± 0,18	0,85	10
1	504 ± 75*	1,64	2,42 ± 0,36*	1,45	10
10	654 ± 110*	2,12	3,27 ± 0,55*	1,96	10
100	2270 ± 278*	7,37	11,58 ± 1,42*	6,94	10

ИМ –индекс модуляции

Показано, что кумазид практически не влияет на выраженность гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана (ЭР).

4.5. Влияние кумазида на антиинфекционную резистентность мышей

Мы исследовали влияние профилактического введения препарата кумазид на выживаемость и среднюю продолжительность жизни неинbredных мышей с экспериментальной инфекцией, индуцированной сублетальными дозами микроорганизмов *S. typhimurium*, *Y. pseudotuberculosis* или *L. monocytogenes*. Защитный эффект кумазида выявлен на модели инфекционного процесса, вызванного грамотрицательными бактериями иерсиниями *Y. pseudotuberculosis*, при однократном введении препарата за 3 дня до заражения. Выживаемость мышей составила в этом случае 50% (в контроле – 0%), а средняя продолжительность жизни животных увеличилась с 8,7 до 13,5–13,8 дней в зависимости от используемой дозы. В то же время кумазид был практически неэффективен в экспериментах с заражением животных сублетальными дозами грамотрицательной бактерии сальмонелла *S. typhimurium* и грамположительной бактерии листерии *L. monocytogenes*. Результаты исследования устойчивости мышей к стафилококковой инфекции представлены в таблице 4. Видно, что во всех использованных дозах (0,1, 1,0 и 10,0 мкг/кг) кумазид защищает мышей от стафилококковой инфекции, вызванной введением сублетальных доз грамположительной бактерии золотистый стафилококк *S. aureus*. Наиболее эффективной защита была при дозе 1 мкг/кг. При введении препарата в этой дозе количество выживших животных достигало 67% животных из группы (в контроле – 16,0% выживших животных), что приближается к действию положительного контроля – глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП, 100 мкг/мышь).

Таким образом, защитный эффект кумазида, выявленный на модели инфекционного процесса, индуцированного микроорганизмами с преимущественным внутриклеточным паразитированием (*Y. pseudotuberculosis* и *S. aureus*), дает основание предполагать наличие стимулирующего действия препарата в отношении фагоцитирующих клеток (нейтрофилов и клеток системы мононуклеарных фагоцитов).

Таблица 4. Влияние кумазида на устойчивость мышей линии СВА×ВL к стафилококковой инфекции, индуцированной *S. aureus*

Препарат	Доза, мкг/кг	Кол-во погибших мышей	% выживших	Продолжительность жизни, сут.	Кратность увеличения продолжительности жизни
Физ. р-р (отриц. контроль)	–	10	16,0	1,4	–
Кумазид	10	6	40,9	2,8	2,0
	1,0	4	66,7	5,2	3,7
	0,1	7	33,3	2,6	1,8
ГМДП (положит. контроль)	100	3	74,9	7,2	5,1

4.6. Исследование радиозащитного действия кумазида

В качестве экспериментальной модели радиационного поражения использовали сублетально облученных мышей. Однократное гамма-облучение животных в сублетальной дозе 6,5 Гр приводило к практически полной гибели всех животных в течение 30 дней наблюдения со средней продолжительностью жизни в 15 дней.

Исследование количественного и качественного состава клеточных элементов периферической крови мышей показало, что после облучения резко уменьшается количество лейкоцитов и нейтрофилов и увеличивается доля лимфоцитов по сравнению с

этими же показателями периферической крови интактных необлученных мышей. Четырехкратное введение кумазида по профилактической схеме способствует более быстрому восстановлению количества лейкоцитов, сопровождающемуся увеличением относительного содержания и абсолютного количества лимфоцитов. Достоверное восстановление содержания лейкоцитов и лимфоцитов наблюдалось на 9 и 17 дни, а нейтрофилов – на 9-й день после облучения (Таблица 5). На 9-й день после облучения наибольшую эффективность препарат кумазид проявлял в дозе 0,1 мкг/кг ($p < 0,05$).

Таблица 5. Влияния профилактического введения кумазида (4х кратное введение) на количество лейкоцитов и клеточный состав периферической крови сублетально облученных мышей

Группа животных	Лейкоциты ($10^9/л$)		Лимфоциты (%)		Нейтрофилы (%)	
	Дни после облучения					
	9	17	9	17	9	17
Кумазид 0,01 мкг/кг	1,8±0,5*	4,9±0,2	61±5,3	43±5,0	39±4,8	52±4,6
Кумазид 0,1 мкг/кг	2,5±0,6*	5,7±0,8*	80±5,6*	54±3,7*	40±3,1*	44±3,1
Кумазид 1,0 мкг/кг	0,6±0,2	5,0±0,3	71±4,1	42±3,9	28±3,1	56±3,0
Контроль 2 (облученные мыши)	0,8±0,4	4,0±0,8	64±5,5	43±2,8	35±3,5	52±4,2
Контроль 1 (интактные мыши)	5,0±1,0		44±2,2		56±2,1	

Исследование влияния профилактического введения кумазида на массу и клеточность кроветворных (костный мозг бедренной кости) и лимфоидных (тимус, селезенка) органов сублетально облученных мышей показало, что препарат ускоряет восстановление этих показателей почти до нормы. К 17-му дню эксперимента после облучения кумазид достоверно восстанавливал вес тимуса почти до нормы и существенно увеличивал вес селезенки. На 9-й день после облучения наибольшую достоверную эффективность по восстановлению уровня клеточности в тимусе и селезенке препарат проявлял в дозе 1,0 мкг/кг ($p < 0,01$); клеточность костного мозга достоверно увеличилась на 4-й день. При однократном введении кумазида в дозе 1 мкг/кг за 4 суток до облучения отмечено увеличение эндогенных колоний в селезенке сублетально облученных мышей до $26,9 \pm 1,3$ (в контроле – $22,0 \pm 1,4$), а также увеличение выживаемости и средней продолжительности жизни животных. Увеличение численности полипотентных стволовых кроветворных клеток, формирующих эндогенные колонии, является определяющим фактором для повышения выживаемости облученных животных (Чертков, Гуревич, 1984).

4.7. Противоопухолевая активность кумазида

Было показано, что СА₂-2 и кумазид обладают достоверным противоопухолевым действием, которое проявляется наиболее выражено при «профилактической» (препарат вводится до инокуляции опухоли) и «комбинированной» (препарат вводится до и после инокуляции опухоли) схемах применения, что может быть связано с иммуномодулирующими свойствами тритерпенового гликозида. В опытах *in vivo* с использованием метода МРТ установлено, что кумазид в дозе 0,2 мкг/мышь подавляет рост солидной формы карциномы Эрлиха. Оптимальным условием торможения роста опухоли являются эксперименты, полученные для группы животных, получавшим препарат перорально по «комбинированной» схеме в течение 14 дней (ежедневно, 7 дней до прививки опухоли и 7 дней после). Объем опухоли у животных в этой группе практически не изменился за три недели эксперимента по сравнению с размерами опухоли на начальной стадии экспериментов. На аксиальном томографическом изображении (рис. 10А, Б) отчетливо видна инокулированная солидная опухоль и задержка ее развития у животных, получавших кумазид, уже на 14-й день эксперимента. Отчетливо видно увеличение размера опухоли у контрольных животных и очевидная задержка развития

опухоли у экспериментальных мышей, которым вводили кумазид по «комбинированной» схеме.

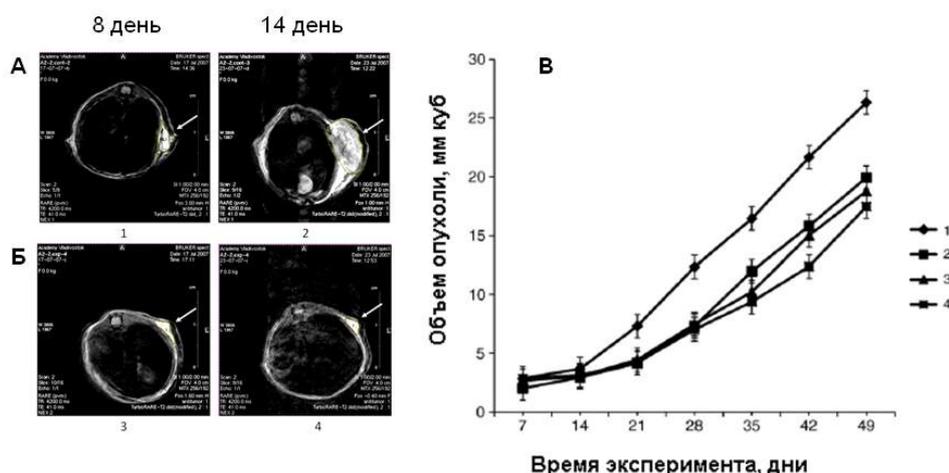


Рис. 10 Влияние препарата кумазид в дозе 0,2 мкг/мышь на рост солидной формы карциномы Эрлиха при пероральном «комбинированном» способе введения. **А** – контроль; **Б** – кумазид, «профилактическая» схема введения. Показано аксиальное МРТ-изображение на 8-й и 14-й день развития опухоли. Стрелки указывают на локализацию опухоли. **В** – влияние кумазида, 5-фторурацила и их сочетанного применения на динамику развития солидной формы карциномы Эрлиха мышей. **1** – контроль; **2** – кумазид; **3** – 5-фторурацил; **4** – совместное применение кумазида + 5-фторурацила

Показано, что сочетанное применение кумазида с другими противоопухолевыми препаратами приводит к синергизму в их противоопухолевом действии. Так, внутрибрюшинная инъекция препарата 5-фторурацил в дозе 50 мкг/кг на второй и третий день после прививки опухоли приводила к уменьшению размера карциномы Эрлиха до $10,2 \pm 0,15 \text{ мм}^3$, что составляет 38% от размера опухоли у контрольных животных на 35-й день после инокуляции. Сочетанное применение кумазида и 5-фторурацила приводило к усилению подавления роста опухоли. При совместном действии обоих препаратов, а именно при «профилактическом» введении препарата кумазид и последующем введении 5-фторурацила на 2-й и 3-й дни после прививки опухоли, рост солидной опухоли был достоверно подавлен на 43%. Синергизм сочетанного противоопухолевого действия был наиболее четко выражен на сорок второй день эксперимента (рис. 10В).

5. Фармакокинетические исследования кумазида

Фармакокинетические исследования являются важным этапом создания новых лекарственных препаратов. Они позволяют оценить скорости поступления биологически активных субстанций в различные органы и ткани (и скорости выведения этих веществ), подобрать разовую и курсовую дозы, а также временной режим применения разрабатываемых препаратов.

5.1. Исследование фармакокинетики ^3H -кумазида

Для изучения фармакокинетики меченного тритием кумазида суспензию препарата в воде в дозе 100 мкг на животное (5 мг/кг) вводили однократно мышам линии Balb/c. Препарат вводили двумя способами: внутрибрюшинно или перорально. Через определенные промежутки времени после введения препарата мышам забивали и определяли содержание кумазида в органах и крови животных. Фармакокинетические параметры ^3H -кумазида в различных органах и тканях мышей после однократного внутрибрюшинного введения представлены в таблице 6.

Таблица 6. Фармакокинетические параметры ³Н-кумазида в различных органах и тканях мышей линии Balb/c после однократного внутривнутрибрюшинного введения

Параметры	Органы				
	Кровь	Сердце	Желудок	Печень	Почки
T_{max}, час	0,637	0,045	0,459	0,025	0,015
C_{max}, мкг/г	62,631	85,256	87,316	57,931	79,169
T_{1/2}, час	15,110	9,045	16,101	11,575	22,239
AUC, мкг*час/мл	1543,55	10489,8	5622,68	6227,38	5367,4
Cl, мкг/час	94,25	18,65	28,26	28,99	26,79
MRT, час	24,001	122,993	63,934	107,473	67,781
Vss, мл	1705,9	528,2	859,7	846,9	808,9

Указаны средние значения (n=5)

Из данных таблицы видно, что максимальные концентрации препарата были обнаружены в желудке и сердце, хотя средние значения концентраций кумазида в различных органах колебались в небольшом пределе от 57,9 мкг/г в печени до 87,3 мкг/г в желудке. Для печени и почек максимальная концентрация препарата достигается быстрее всего (0,025 час и 0,015 час соответственно). Значения среднего времени удерживания препарата в организме (MRT) колебались в пределах 24–123 час в зависимости от исследуемого органа. В тоже время, самый длительный период полувыведения препарата был отмечен в почках (22,2 часа), в то время как для остальных органов он колебался в диапазоне от 9,1 часа (сердце) до 16,1 часа (желудок).

Установлено, что при однократном пероральном введении мышам ³Н-кумазид всасывался довольно быстро: максимальная концентрация ³Н-кумазида (C_{max}) в желудке достигалась за 0,33 часа (T_{max}), а в крови через 0,67 часа. Наибольшую концентрацию наблюдали в желудке и сердце. Радиоактивно-меченые продукты были обнаружены в крови в течение непродолжительного времени: среднее время удерживания в организме (MRT) колебалось для различных органов в пределах 0,38–1,75 часа. Анализ площади под кривой и «концентрация—время» (AUC) показал, что этот параметр достигает наибольшего значения в желудке (7560); площадь под кривой возросла примерно в 4,5 раз по сравнению с кровью (1680). Полученные данные позволяют высказать предположение о нелинейности кинетики ³Н-кумазида, возможно, вследствие его быстрого связывания и быстрого насыщения в тканях желудка.

Следовательно, кумазид быстро всасывается при внесосудистых способах введения его мышам. Самое быстрое время достижения максимальной концентрации наблюдается при внутривнутрибрюшинном способе введения. Очевидно, это происходит благодаря непосредственному быстрому контакту препарата с органами в момент внутривнутрибрюшинной инъекции. При пероральном способе введения максимальную концентрацию в органах детектировали за более длительный период, что, вероятно, обусловлено первоначальной сорбцией препарата в желудке. Время выведения препарата из организма мышей зависит от способа введения препарата. Минимальные значения были отмечены при однократном пероральном способе введения. При внутривнутрибрюшинном способе время выведения увеличивается в несколько раз по сравнению с пероральным способом введения.

5.2. Исследование фармакокинетического поведения кукумариозида А₂-2 в селезенке мыши

Данное исследование было проведено с целью описания фармакокинетического поведения кукумариозида А₂-2 в одном из органов-мишеней – в селезенке мыши. В задачу входила экспериментальная проверка стабильности препарата и исследование динамики изменений содержания гликозида с течением времени в гомогенате и целостной ткани селезенки мышей линии Balb/c, а также изучение пространственного распределения

гликозида на поверхности срезов ткани селезенки с помощью методов радиоспектроскопии, MALDI-MS и MALDI-IMS.

Выяснено, что скорость выведения ^3H -кукумариозида A_2-2 из селезенки была умеренной. Рассчитанные значения таких фармакокинетических параметров как клиренс (Cl) и период полувыведения препарата ($T_{1/2}$) составили 21,5 мл/мин и около 90 мин соответственно. Среднее время пребывания препарата (MRT) в организме мышей было равным 135 мин. Зависимость содержания ^3H -кукумариозида A_2-2 в селезенке от времени показаны на рис. 11А. Методом MALDI-MS показано, что при однократном внутрибрюшинном введении CA_2-2 накапливался в гомогенате ткани селезенки уже в первые 30 мин после введения, а минимальные значения концентрации гликозида были зарегистрированы через 3 часа. Установлено, что CA_2-2 выводился из ткани с умеренной скоростью. Значения фармакологических параметров $T_{1/2}$ и MRT составили 80 мин и 140 мин соответственно. Эти данные сопоставимы с фармакокинетическими параметрами для ^3H -кукумариозида A_2-2 , полученными с использованием радиоактивно-меченного препарата (рис. 11Б).

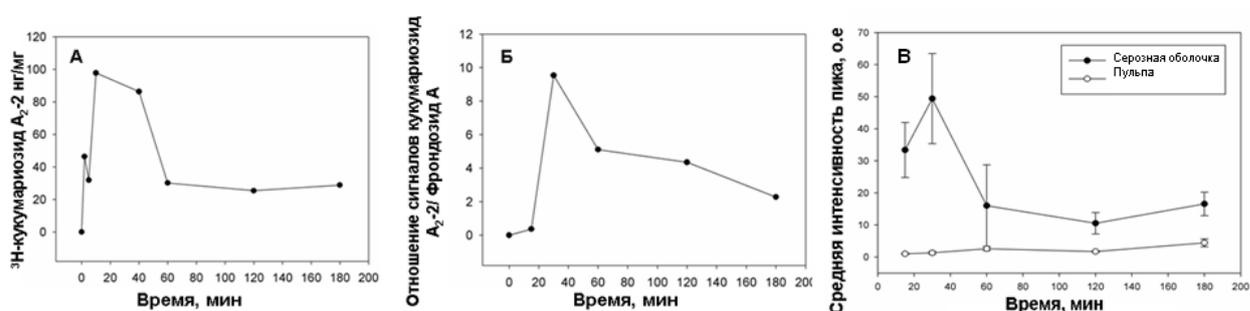


Рис. 11. Зависимость концентрации кукумариозида A_2-2 в селезенке мышей линии Balb/c от времени после однократной внутрибрюшинной инъекции гликозида в дозе 5 мг/кг. Содержание гликозида определялось: А – радиоспектроскопически, Б – методом MALDI-TOF-MS и В – методом MALDI-IMS

Нами обнаружено, что CA_2-2 проявляет стабильность и практически не претерпевает метаболитических превращений в тканях селезенки. Стабильность CA_2-2 наблюдалась как при нахождении в самом органе после внутрибрюшинного введения препарата животным, так и при инкубировании раствора гликозида в гомогенате ткани селезенки. На протяжении 24 часов не наблюдали появления продуктов химической трансформации и метаболитов кукумариозида A_2-2 .

5.3. Оценка пространственного распределения кукумариозида A_2-2 в ткани селезенки мыши методом MALDI-IMS

Мы провели исследование пространственного распределения кукумариозида A_2-2 в ткани селезенки с помощью метода MALDI-IMS. Были получены реконструкции графического изображения масс-спектров локализованного в ткани гликозида, который с уверенностью можно было детектировать при m/z 1295,2. Изображения, полученные при различных разрешениях прибора, свидетельствуют о том, что гликозид концентрируется главным образом в области серозной оболочки, и его распределение носит практически равномерный характер.

Затем была проведена оценка распределения CA_2-2 в органе-мишени во времени. Отмечено, что максимальный по интенсивности сигнал гликозида регистрируется уже в первые 15–30 мин после введения препарата в области серозной оболочки. Затем на протяжении 60–180 мин наблюдалось постепенное уменьшение интенсивности пика CA_2-2 в области серозной оболочки и его незначительное перераспределение в область красной

и белой пульпы. Зависимость распределения СА₂-2 в срезах селезенки мышей от времени после однократного внутрибрюшинного введения представлены на рис. 11В и 12.

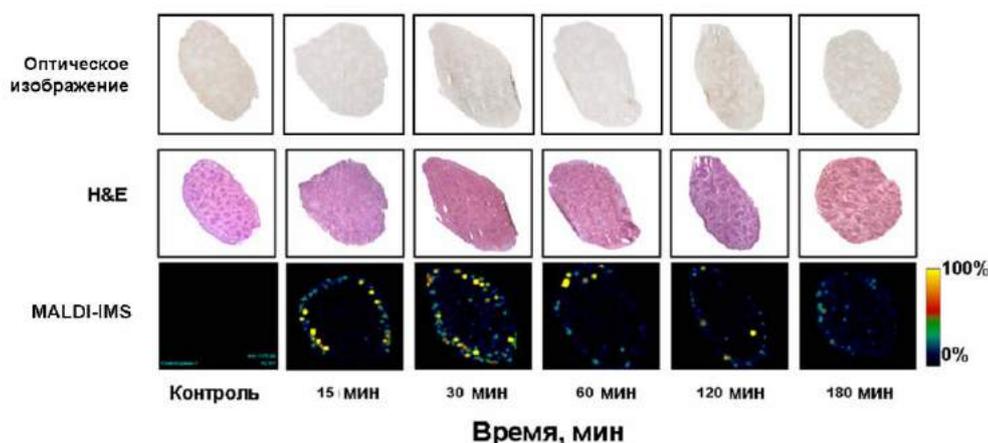


Рис. 12. Изображение распределения кукумариозида А₂-2 в срезах селезенки мышей после однократного внутрибрюшинного введения, полученное методом MALDI-IMS. Верхняя строка – оптические изображения срезов селезенки, взятые для анализа. В средней строке представлены срезы селезенки, окрашенные гематоксилином-эозином. Нижняя строка – пространственное распределение гликозида в ткани селезенки в зависимости от времени после инъекции

Таким образом, три различных экспериментальных подхода, используемые в данном исследовании, позволили нам оценить динамику распределения и элиминации СА₂-2 в селезенке мыши. Метод MALDI-IMS делает возможным достаточно быстро и точно локализовать в ткани участок накопления препарата при сохранении пространственной целостности самой ткани.

6. Исследование фармакодинамики

В данном разделе представлены результаты изучения фармакодинамики взаимодействия кукумариозида А₂-2 с иммунокомпетентными клетками мыши и установления внутриклеточных и мембранных мишеней иммуномодулирующего действия гликозида.

6.1. Протеомный анализ белков с помощью двумерного гель-электрофореза и масс-спектрометрии

Мы использовали методологический подход, основанный на анализе протеома клеток селезенки, для того чтобы на молекулярном уровне изучить механизм иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2 в сравнении с другим тритерпеновым гликозидом голотурии – фрондозидом А. Эксперименты по анализу экспрессии белков с помощью протеомного подхода были проведены на клетках селезенки мыши методом двумерного электрофореза (2D-PAGE) и последующего анализа структуры белков методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS).

С помощью дифференциального анализа изображения 2D-гелей белков, выделенных из контрольных и инкубированных с гликозидами клеток, было обнаружено, что общее число белковых пятен, полученных на гелях из экстрактов клеточных культур, составляло порядка 1000. В результате дифференциального анализа изображений контрольных и экспериментальных (стимулирование клеток СА₂-2) гелей было выявлено порядка 21 белковых пятна, отличающихся уровнем экспрессии. Из них 9 пятен принадлежало белкам, экспрессия которых была блокирована или снижена (даун-регуляция), а 12 пятен соответствовало сверхэкспрессированным белкам (ап-регуляция) в результате стимуляции кукумариозидом А₂-2 (рис. 13). Примерами таких

дифференцированно экспрессированных белков являются NSFL1 cofactor p47 (пятно **961**) and hnRNP K (пятно **1047**). Оба белка даун-регулированы в стимулированных спленоцитах. Белки Septin-2 (пятно **473**), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 (пятно **1312**) и GRB2-related adaptor protein 2 (пятно **1912**) были сверхэкспрессированы в гликозид-стимулированных спленоцитах.

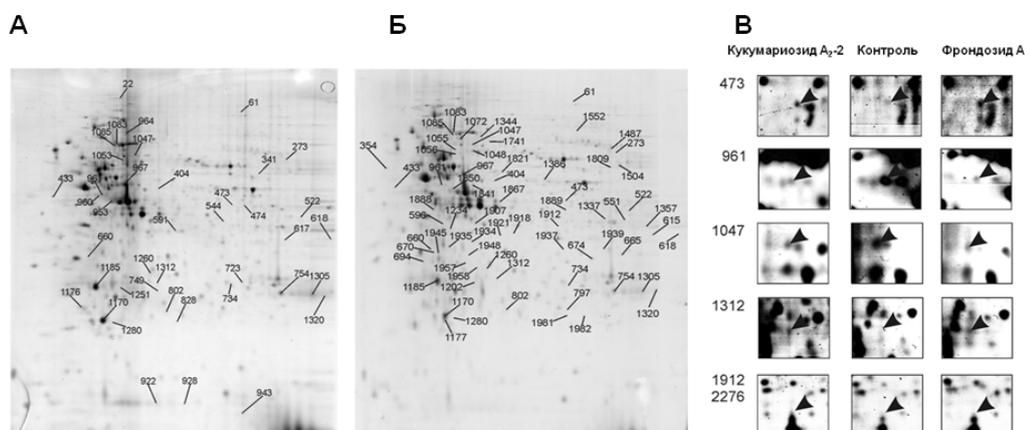


Рис. 13. Изображения 2D-гелей белков спленоцитов мыши линии Balb/c до (А) и после инкубирования с кукумариозидом А₂₋₂ (Б) и увеличенные изображения пятен, соответствующие регулируемым белкам-мишеням в спленоцитах мыши под действием кукумариозида А₂₋₂ и фрондозида А (0,2 мкг/мл), в сравнении с контролем (В)

Сходные результаты протеомного анализа были получены нами в экспериментах по стимулированию спленоцитов мыши фрондозидом А. Поскольку оба соединения, кукумариозид А₂₋₂ и фрондозид А, обладают определенным структурным сходством, то мы предполагали определенное сходство в реакциях иммунных клеток на стимулирующее действие обоих гликозидов. Тем не менее, были обнаружены некоторые различия, которые включали, например, белок SET (пятно **506**), Cofilin-1 (пятно **873**), и Leukocyte elastase inhibitor А (пятна **514**, **517** и **543**). При обработке результатов в случае с изолированными спленоцитами, инкубированными с фрондозидом А, было выявлено порядка 34 пятен белков, экспрессия которых менялась в два и более раза, причем 15 белков соответствовали сверхэкспрессированным белкам, а экспрессия 19 белков была блокирована или снижена. Среди дифференциально экспрессированных белков были обнаружены даун-регулируемые NSFL1 cofactor p47 (пятно **961**) и hnRNP K (пятно **1047**). Кроме того, были найдены сверхэкспрессированные белки Septin-2 (пятно **473**), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 (пятно **1312**) и GRB2-related adaptor protein 2 (пятно **1912**).

В результате проведенных работ по анализу регулируемых белков, мы выбрали два белка (Septin-2 и hnRNP K), экспрессия которых одинаково регулируется как кукумариозидом А₂₋₂, так и фрондозидом А, для их верификации иммуноферментным анализом (ИФА). Было установлено, что стимуляция спленоцитов кукумариозидом А₂₋₂ приводила к достоверному снижению содержания белка hnRNP K в клетках ($p < 0,05$), что согласуется с данными протеомных исследований. Инкубирование клеток с фрондозидом А также приводило к снижению содержания белка hnRNP K, однако полученные ИФА результаты были менее выражены по сравнению с таковыми для А₂₋₂. Кроме того, с помощью ИФА анализа была обнаружена четко выраженная разница между содержанием в клетках белка Septin-2 в контроле и после стимулирования спленоцитов тритерпеновыми гликозидами. В обоих случаях наблюдали достоверное увеличение ($p < 0,01$) этого белка в клетках, что хорошо согласуется с данными по экспрессии белка Septin-2, полученными с помощью протеомных методов исследования (рис. 14).

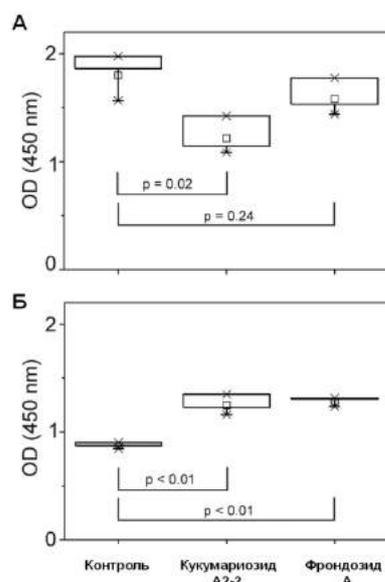


Рис. 14. Влияние кукумариозида А₂-2 и фрондозида А на количественное содержание белков hnRNP К (А) и Septin-2 (Б) в спленocyтocyтах мышей линии Balb/c. Результаты получены с помощью ИФА анализа (sandwich-ELISA) и представлены в виде «box-and-whiskers» диаграммы, указывающей срединные значения (медиана) и значения разброса в выборке

6.2. Функциональный анализ дифференциальной экспрессии белков

Для того, чтобы иметь дополнительное подтверждение результатов иммуностимулирующего влияния тритерпеновых гликозидов на иммунокомпетентные клетки, мы провели функциональный анализ влияния кукумариозида А₂-2 и фрондозида А на пролиферацию спленocyтocyтов в экспериментах *in vitro*.

Ранее полученные нами данные протеомного анализа по дифференциально экспрессирующимся белкам показывают, что тритерпеновые гликозиды голотурий оказывают множественный иммуностимулирующий эффект на спленocyтocyты мышей при их стимуляции *in vitro* и одним из таких эффектов является усиление пролиферации клеток, в частности, спленocyтocyтов.

Таблица 7. Влияние тритерпеновых гликозидов кукумариозида А₂-2 и фрондозида А (0,2 мкг/мл) на уровень включения [³H]-тимидина в ДНК спленocyтocyтов мышей линии Balb/c

Митоген	Индекс стимуляции (ИС) ^{а) б)}		
	Контроль	Фрондозид А	Кукумариозид А ₂ -2
-	1	1,7*	1,7*
	(775,6 ± 94,1)	(1287,0 ± 46,7)	(1331,6 ± 139,9)
ЛПС	4,2**	5,2**	5,3**/***
	(3249,4 ± 136,6)	(4017,2 ± 589,8)	(4140,8 ± 151,2)

^{а)} Включение [³H]-тимидина, где ИС = включение [³H]-тимидина стимулированными клетками / включение [³H]-тимидина контрольными клетками. *Статистически значимые различия между уровнем пролиферации гликозид-стимулированных клеток и контрольных клеток (p<0,05); ** Статистически значимые различия между уровнем пролиферации митоген-стимулированных клеток и контрольных клеток (p<0,05); *** Статистически значимые различия между уровнем пролиферации гликозид+митоген-стимулированных клеток и митоген-стимулированных клеток (p<0,05).

^{б)} Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 5)

Это предположение о стимулировании пролиферации было проверено путем исследования пролиферации спленocyтocyтов мыши, инкубированных с СА₂-2 либо с фрондозидом А. Уровень пролиферации спленocyтocyтов определяли путем измерения

включения [^3H]-тимидина в ДНК клеток в первичной культуре. Мы наблюдали значительное увеличение включения [^3H]-тимидина ($p < 0,05$) после инкубирования спленоцитов с тритерпеновыми гликозидами от 1 (ИС, индекс стимуляции, нормированный к контролю) до 1,7 (ИС, Таблица 7). Бактериальный ЛПС, используемый в качестве положительного контроля, стимулировал пролиферацию спленоцитов в первичной культуре до ИС = 4,2. Кроме того, следует отметить, что оба гликозида достоверно увеличивали включение [^3H]-тимидина в ДНК спленоцитов в присутствии ЛПС.

Таким образом, методами MALDI-TOF-MS был установлен целый ряд белков, одинаковым образом экспрессирующихся в спленоцитах после их инкубирования с тритерпеновыми гликозидами голотурий. Наиболее значимыми белками были признаны NSFL1 cofactor p47 и hnRNP K, так же как и Septin-2, NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 и GRB2-related adaptor protein 2. Результаты поиска функциональной активности этих белков в базах данных показали, что они принимают непосредственное участие в регуляции клеточной пролиферации, клеточной адгезии и клеточной подвижности, а также созревании фагосом и слиянии фагосом и лизосом. Эти белки принимают участие в движении биомембран и проявляют способность к кальций-зависимому связыванию фосфолипидов, вовлечены в ремоделирование цитоскелета и сигнальную трансдукцию.

6.3. Взаимодействие кукумариозида A_2-2 с мембранами иммунокомпетентных клеток

Одним из самых распространенных способов поиска рецепторов и изучения их взаимодействия со специфическими лигандами является радиолигандный (или радиорецепторный) метод. Мы изучали специфику связывания ^3H -кукумариозида A_2-2 с перитонеальными макрофагами мыши, культивируемыми в монослое *in vitro*. Расчет параметров связывания свидетельствует о сложном характере взаимодействия гликозида с макрофагами. Данные, представленные в координатах Скэтчарда, указывают на наличие нескольких мест связывания, а аппроксимирование полученных значений методом линейной регрессии выявляет наличие, как минимум, двух мест связывания ^3H -кукумариозида A_2-2 с клетками. В результате проведенных расчетов установлено, что для связывания гликозида с макрофагами мыши характерны две константы диссоциации: с высокой аффинностью ($Kd_1 \text{ HI} = 3,07 \text{ нМ}$) и низкой аффинностью ($Kd_2 \text{ LO} = 489,6 \text{ нМ}$).

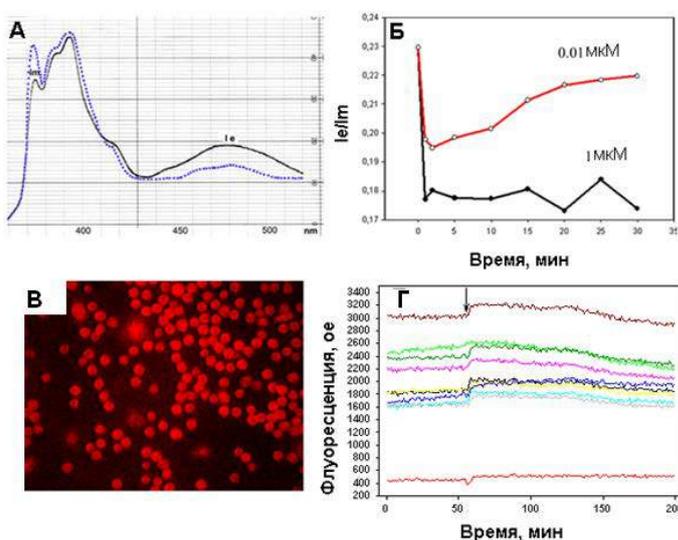


Рис. 15. Влияние кукумариозида A_2-2 на микровязкость биомембран спленоцитов и МП макрофагов мышей. **А** – спектр флуоресценции пирена в клеточных мембранах: контроль (сплошная линия) и после экспозиции с гликозидом (прерывистая линия); **Б** – зависимость степени эксимеризации пирена от времени инкубирования клеток с кукумариозидом A_2-2 ; **В** – изображение клеток, нагруженных флуоресцентным потенциал-чувствительным зондом DiOC2(3); **Г** – регистрация изменения МП макрофагов, нагруженных флуоресцентным зондом DiOC2(3). Стрелками указано время введения кукумариозида A_2-2

Было установлено, что инкубирование иммунных клеток мыши с гликозидом приводит к существенному изменению микровязкости мембран, регистрируемому по

степени эксимеризации пирена. В присутствии SA₂-2 наблюдали выраженное уменьшение степени эксимеризации флуоресцентного зонда, отражающее увеличение вязкости клеточных мембран (рис. 15А). Изменение вязкости клеточных мембран происходило достаточно быстро: максимальное увеличение вязкости регистрировали в течение первых 2 мин после добавления гликозида в инкубационную среду независимо от применяемой концентрации гликозида. В то же время, динамика изменения вязкости биомембран во времени зависела от концентрации гликозида. Так, при концентрации 1 мкМ гликозид вызывал резкое увеличение вязкости – высокий уровень вязкости оставался неизменным на протяжении длительного времени. Однако при концентрации 10 нМ наблюдали выраженную обратимость действия гликозида SA₂-2 (рис. 15Б). В этом случае было зарегистрировано восстановление степени эксимеризации зонда почти до исходного уровня примерно через 15 мин после начала эксперимента.

Проведено исследование влияния гликозида на мембранный потенциал (МП) макрофагов мыши методом оптического имаджинга клеток, нагруженных флуоресцентным потенциал-чувствительным зондом (рис. 15В). Было показано, что аппликация SA₂-2 на монослой культуры перитонеальных макрофагов мыши вызывала выраженную обратимую деполяризацию клеточных мембран, что выражалось во временном (на протяжении 100–150 с) увеличении интенсивности флуоресценции клеток и последующем восстановлении МП до исходных значений (рис. 15Г). Наблюдали прямопропорциональную зависимость между концентрацией добавляемого к клеткам гликозида и значениями рассчитанного мембранного потенциала. Максимальные значения МП были зарегистрированы после аппликации максимальной концентрации гликозида (1 мкМ), а минимальные значения потенциала соответствовали самой минимальной применяемой концентрации в 1 нМ

6.4. Изучение влияния кукумариозида A₂-2 на транспорт Ca²⁺ в перитонеальных макрофагах мышей

Ионы кальция играют важную роль в регуляции жизнедеятельности организма. Проникая в клетки, они активируют внутриклеточные биоэнергетические процессы, обеспечивающие реализацию физиологических функций этих клеток (Авдонин, Ткачук, 1994; Berridge, 1997; Ткачук, 2001). Мы провели сравнительное исследование влияния ряда тритерпеновых гликозидов из голотурии *C. japonica* (кукумариозид A₂-2, кукумариозид A₇-1 и их агликон) на кальциевый гомеостаз перитонеальных макрофагов мыши. С помощью метода микроцитометрии и селективных флуоресцентных кальций-чувствительных зондов Calcium Green-1/AM и Fura-2/AM мы установили, что моносульфатированный тритерпеновый гликозид кукумариозид A₂-2 вызывает увеличение концентрации внутриклеточного кальция [Ca²⁺]_i в цитоплазме клеток. После добавления гликозида в инкубационную среду с клеточным монослоем изменения в базальном уровне концентрации кальция наблюдали уже через несколько секунд. В диапазоне концентраций гликозида 0,001–0,1 мкМ наблюдали резкое обратимое увеличение [Ca²⁺]_i, максимум которого был достигнут за 20–30 сек. Вслед за этим регистрировали плавное понижение [Ca²⁺]_i, достигающее до первоначального уровня за 50–100 сек (рис. 16А, Б). Однако применение цитотоксической концентрации SA₂-2 в 1 мкМ вызывало резкий и необратимый подъем внутриклеточного уровня кальция. В то же время полисульфатированный гликозид кукумариозид A₇-1 вызывал едва заметный эффект, а агликон был полностью не активен. Зависимость внутриклеточной концентрации кальция (интенсивности сигнала зонда) от концентрации SA₂-2 имела куполообразный характер; максимум наблюдали при концентрации 0,02 мкМ (рис. 16В). При аппликации гликозида наблюдалось два вида Ca²⁺-ответов макрофагов. В первом случае, регистрировали однократное кратковременное повышение [Ca²⁺]_i, в то время как во втором случае в

клетках наблюдали кальциевую осцилляцию с амплитудой от 0,9 до 1,2 отн. ед. и периодичностью в 1–3/мин (рис. 16Г).

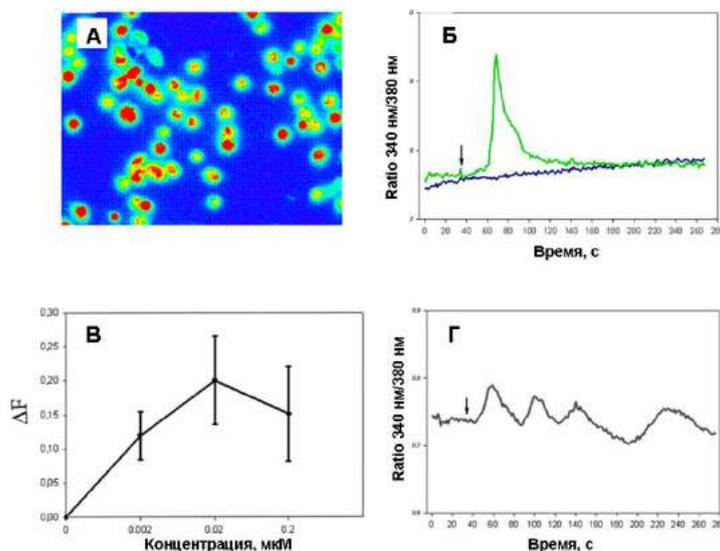


Рис. 16 Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах, нагруженных флуоресцентным зондом Fura-2/AM, вызванное кукумариозидом A_2-2 . **А** – Псевдоцветное флуоресцентное изображение макрофагов, активированных кукумариозидом A_2-2 (0,01 мкМ); **Б** – изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} после применения гликозида; **В** – зависимость изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (ΔF) от концентрации гликозида. Данные представлены как $m \pm sd$; **Г** – осцилляция Ca^{2+} в одиночном макрофаге, инициированная гликозидом. Стрелки указывают время введения кукумариозида A_2-2

Для того, чтобы выяснить, с какой стороны поступает Ca^{2+} в цитоплазму клетки, из внеклеточного пространства или из внутриклеточного депо (эндоплазматического ретикулула и митохондрий, например), весь Ca^{2+} во внешней культуральной среде был связан путем добавления раствора хелатора двухвалентных катионов – ЭГТА в концентрации 5 мМ. В этих условиях при добавлении субтоксической дозы гликозида наблюдалось практически полное блокирование увеличения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Это свидетельствует о том, что под действием CA_2-2 ионы кальция поступают в цитоплазму клетки из внеклеточной среды. Для выяснения участия ряда мембранных структур в переносе ионов кальция в цитоплазму под действием гликозида был проведен ингибиторный анализ с применением различных блокаторов. Блокаторы потенциал-чувствительных кальциевых каналов, такие как верапамил, нифедипин и дилтиазем, преинкубированные с клеточным монослоем макрофагов в эффективной концентрации 10^{-6} М, не блокировали увеличение кальция в цитоплазме после действия CA_2-2 . Амилорид, ингибитор Na^+/Ca^{2+} -антипортера в клетках, в концентрации 50 мкМ так же оказался не эффективен. Применение блокатора G-белков, тиопроизводного гуанозиндифосфата приводило к блокировке входа кальция только при высокой нефизиологической концентрации >1 мМ.

Таким образом, в данной серии экспериментов было установлено, что кукумариозид A_2-2 в наномолярном диапазоне концентраций активирует выраженный и обратимый вход Ca^{2+} в макрофаги. Под действием гликозида кальций поступает в клетки из внеклеточного пространства, минуя потенциал-чувствительные Ca^{2+} каналы, Na^+/Ca^{2+} -обменник и рецептор-управляемые Ca^{2+} каналы, сопряженные с G-белком (например, пуриnergические рецепторы P2Y семейства).

6.5. Влияние кукумариозида A_2-2 на функционирование пуриновых рецепторов в макрофагах

В настоящее время очевидно, что АТФ (и некоторые другие нуклеотиды) могут выполнять роль нейротрансмиттеров и модуляторов клеточных сигналов во многих типах клеток и периферических тканях. На начальном этапе экспериментов было установлено, что перитонеальные макрофаги мыши проявляют чувствительность к действию агонистов пуринорецепторов. Добавление АТФ в диапазоне концентраций 10-100 мкМ в инкубационную среду с культивируемыми макрофагами приводило к резкому и

обратимому увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле клеток (рис. 17Б). Обнаружено определенное сходство в активации входа ионов кальция в клетки под действием АТФ и CA_2-2 – одинаковая длительность кальциевого спайка во времени и одинаковая величина амплитуды Ca^{2+} ответа клеток (рис. 17А-Г). В то же время для индукции увеличения $[Ca^{2+}]_i$ нужна концентрация АТФ, превышающая практически в 1000 раз эффективную концентрацию гликозида.

Кроме того, отмечено, что в монослое культивируемых перитонеальных макрофагов мыши только часть клеток реагирует на добавление применяемых индукторов. Методом оптического имаджинга с использованием флуоресцентного кальций-чувствительного зонда Fura-2/AM в ответ на действие АТФ или CA_2-2 в монослое макрофагов регистрировали только порядка 20-25% клеток, реагирующих на аппликацию резким входом Ca^{2+} (рис. 17Д, Е).

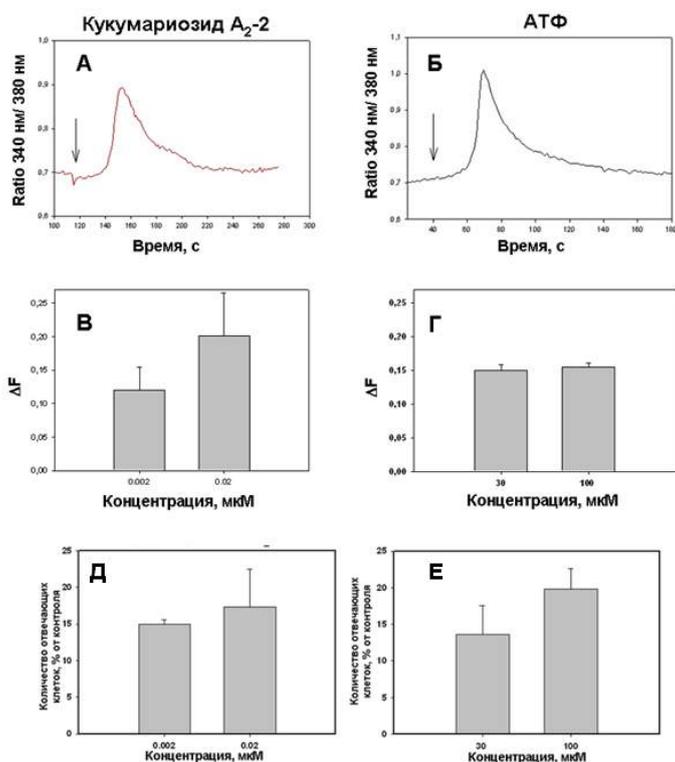


Рис. 17. Влияние кукумариозида A_2-2 (0,02 мкМ) и АТФ (30 мкМ) на динамику изменения Ca^{2+} ответа перитонеальных макрофагов мыши, нагруженных зондом Fura-2/AM. Изменение продолжительности (А, Б), амплитуды (В, Г) Ca^{2+} -ответа клеток и количество клеток, отвечающих на воздействие индукторов (Д, Е)

Предполагается, что перитонеальные макрофаги мыши содержат ограниченный набор пуриновых рецепторов P2X семейства: P2X1, P2X4 и, возможно, P2X7 (Sim et al., 2007). Чтобы определить, какие именно P2X рецепторы участвуют в Ca^{2+} ответе макрофагов на действие гликозида, мы использовали ряд селективных блокаторов P2X рецепторов: сурамин (Sur, для P2X1), PPADS (для P2X1), феноловый красный (PhR, для P2X1), фенолфталеин (Phph, для P2X4), бриллиантовый голубой G-250 (BBG, для P2X4, P2X7) и KN-62 (для P2X7). Результаты экспериментов по регистрации Ca^{2+} ответа макрофагов на добавление CA_2-2 после предварительного инкубирования клеток с блокаторами представлены на рис. 18.

Из приведенных результатов видно, что наиболее эффективными являются фенолфталеин (наиболее селективен к P2X4 рецепторам) и BBG (наиболее селективен к P2X4 и P2X7 рецепторам), в микромолярных концентрациях ингибирующее действие CA_2-2 на 100% и 50%, соответственно, а при использовании фенолового красного наблюдалось лишь незначительное (порядка 30%) ингибирование входа Ca^{2+} в клетки. Предварительная обработка культуры макрофагов апиразой в концентрации 20 ед/мл в течение 3 ч, приводящая к полному устранению АТФ из инкубационной среды, ингибировала влияние CA_2-2 на вход Ca^{2+} в макрофаги практически на 100% (рис. 18А).

Были проведены дополнительные эксперименты по блокированию рецепторов P2X типа в макрофагах с помощью специфических антител. Установлено, что при предварительной обработке клеток специфическими антителами к P2X1 и к P2X4 рецепторам, затрудняющими связывание гликозида с этими рецепторами, наблюдалось достоверное ингибирование активирующего эффекта CA₂-2 на макрофаги (рис. 18Б). Максимальный ингибирующий эффект был обнаружен при использовании анти-P2X4 антител.

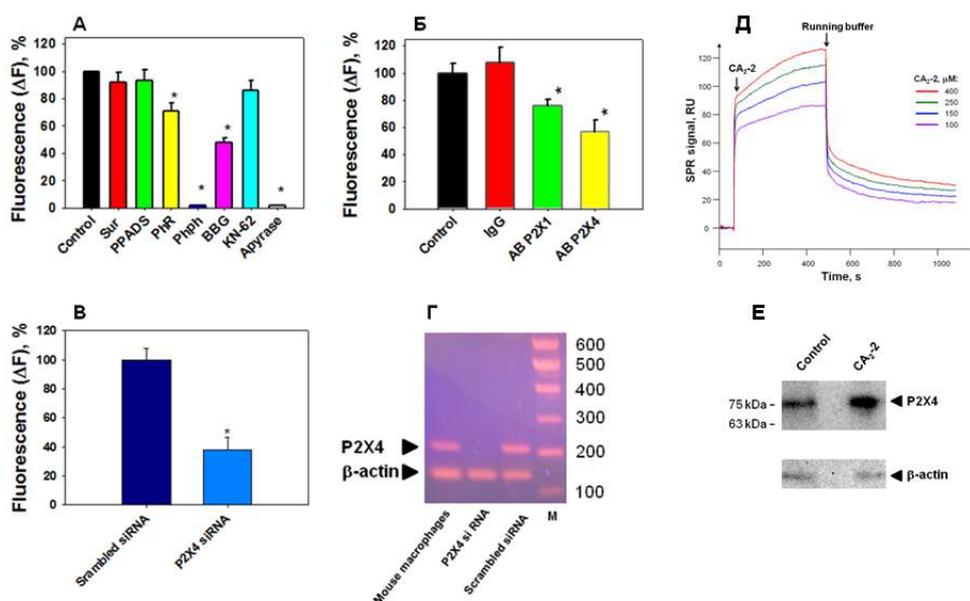


Рис. 18. Влияние различных блокаторов P2X рецепторов, апиразы (А) и специфических антител к P2X1 и P2X4 рецепторам (Б) на вход Ca²⁺ в перитонеальные макрофаги мыши, вызываемый аппликацией CA₂-2 (100 нМ); В – эффект транзientной трансфекции макрофагов с помощью siRNA, подтверждающий значительную роль P2X4 рецепторов в индукции Ca²⁺ входа под действием CA₂-2; Г – экспрессия P2X4 mRNA в макрофагах мыши до и после трансфекции клеток с помощью siRNA (данные ПЦР); Д – сенсорограммы взаимодействия CA₂-2 с иммобилизованным рекомбинантным P2X4 рецептором и Е – экспрессия P2X4 белка в перитонеальных макрофагах мыши, инкубированных с CA₂-2 (10 нМ) в течение 48 час (вестерн-блот)

Для подавления в перитонеальных макрофагах экспрессии пуриновых рецепторов была выполнена трансфекция перитонеальных макрофагов мыши малыми интерферирующими РНК (siRNA) для нокдауна гена, кодирующего пуриновый рецептор P2X4. Обнаружено, что по сравнению с отрицательным контролем (неспецифичная scrambled siRNA) транзientная трансфекция клеток с помощью конструкции P2X4-siRNA приводит к ингибированию индуцированного гликозидом Ca²⁺ входа более чем в два раза (рис. 18В). Одновременно с помощью ПЦР было продемонстрировано, что трансфекция макрофагов такими siRNA вызывала практически полное ингибирование экспрессии мРНК рецептора P2X4 в макрофагах (рис. 18Г). Таким образом, нокдаун экспрессии P2X4 рецептора в макрофагах приводил к существенному ингибированию кальциевой сигнализации в клетках при аппликации гликозида.

Был проведен анализ взаимодействия CA₂-2 с P2X4 рецептором мыши методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием оптического биосенсора Biacore T200 (GE Healthcare, USA). С этой целью был получен рекомбинантный P2X4 рецептор мыши (полный внеклеточный домен, включая присоединенный к N-концу His-6 тэг), экспрессированный в *E. coli* (MyBioSource Inc., USA). Прямое взаимодействие CA₂-2 с P2X4 рецептором было зарегистрировано и константа диссоциации (Kd) комплекса CA₂-2/P2X4 составила 45,2×10⁻⁶М. Дозозависимая кривая кинетического анализа SPR показана на рис. 22Д. Таким образом, было доказано прямое связывание кукумариозида А₂-2 с пуринергическим рецептором мыши P2X4 типа.

Влияние CA_2-2 на рецептор $P2X_4$ в макрофагах мыши было также подтверждено методом иммуноблоттинга на уровне экспрессии белка. С этой целью перитонеальные макрофаги мыши инкубировали в присутствии CA_2-2 (10 нМ) в течение 48 часов. После проведенного вестерн-блоттинга мы обнаружили, что экспрессия $P2X_4$ рецепторов в перитонеальных макрофагах мыши была несколько увеличена после инкубирования клеток с тритерпеновым гликозидом. Это свидетельствует о стимулирующем влиянии CA_2-2 на экспрессию и количественное содержание белка $P2X_4$ и об активирующем эффекте CA_2-2 на иммунные клетки в целом (рис. 18Е).

6.6. Электрофизиологическое исследование ионных токов в одиночных макрофагах

Исследование влияния CA_2-2 на динамику входа Ca^{2+} в одиночные макрофаги мы проводили с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp). Регистрацию ионных токов проводили на изолированном фрагменте клеточной мембраны одиночного перитонеального макрофага мыши (рис. 19) при перфорировании этого участка каналоформером нистатином (whole cell performed patch-clamp). На первом этапе мы использовали перитонеальные макрофаги мыши без предварительной обработки первичной культуры апиразой. В таких условиях аппликация CA_2-2 приводила к появлению резкого входящего кальциевого тока в одиночных макрофагах; этот ток эффективно блокировался блокатором ВВГ, селективным для пуриновых рецепторов $P2X_4$ и $P2X_7$ типа (рис. 19А).

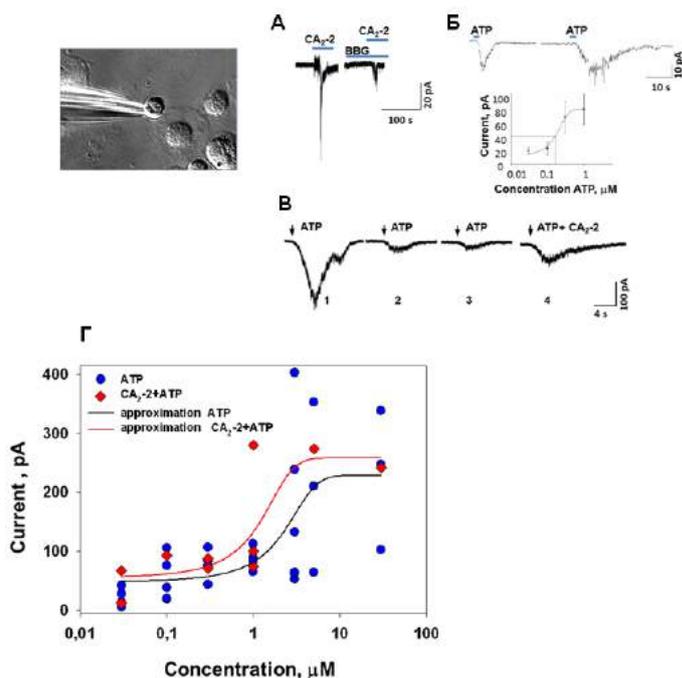


Рис. 19. Влияние кукумариозида A_2-2 (CA_2-2) на трансмембранный Ca^{2+} ток в одиночных перитонеальных макрофагах мыши, регистрируемый методом patch clamp. **А** – аппликация CA_2-2 (100 нМ) и в присутствии блокатора ВВГ (100 мкМ); **Б** – аппликация АТФ (0,03 мкМ, 2 секунды, слева) и АТФ (0,03 мкМ, 2 секунды) после 2 минутной аппликации CA_2-2 (справа). Зависимость амплитуды тока от концентрации АТФ (внизу); **В** – снятие инактивации при обработке одиночного макрофага CA_2-2 . **1, 2 и 3** – последовательные ответы клетки на действие 0,3 мкМ АТФ с интервалом 2 минуты. **4** – ответ клетки на действие 0,3 мкМ АТФ после предварительной обработки клетки кукумариозидом A_2-2 . **Г** – зависимость амплитуды Ca^{2+} тока от концентрации АТФ в отсутствие (●) или присутствии (◆) CA_2-2 , 100 нМ

Далее мы проводили предварительное инкубирование клеток в среде, содержащей апиразу, отщепляющей остатки фосфорной кислоты от АТФ и АДФ. Такой подход исключал десенситизацию пуринергических рецепторов макрофагов эндогенными АТФ и АДФ, которые могут выделяться из клеток в процессе получения и подготовки первичной культуры (Beigi, Dubyak, 2000). Если АТФ добавляли к культуре макрофагов в концентрационном диапазоне 0,03-5,0 мкМ, то регистрировали входящие кальциевые токи, которые по динамике нарастания ответа, амплитуде ответа и скорости инактивации соответствовали токам $P2X_1$ и $P2X_4$ рецепторов, как описано в (Sim et al., 2007). На участие в ответе на аппликацию гликозидом преимущественно $P2X_1$ и $P2X_4$ рецепторов также указывает полученная нами концентрационная зависимость (рис. 19Б, нижняя

вставка) с $EC_{50}=0,16$ мкМ АТФ, сопоставимая с ранее опубликованными данными (Coddou et al., 2011).

Было продемонстрировано, что введение в систему регистрации только СА₂-2 в концентрации 0,3 мкМ не вызывает заметного изменения проводимости мембраны. Но когда сразу после 2-х минутного введения СА₂-2 проводили аппликацию АТФ в концентрации 0,03 мкМ, то характер входящих Ca²⁺ токов существенно изменялся. Наблюдали увеличение амплитуды ответа приблизительно на 15% и увеличение значения интеграла тока более чем в 4 раза, что соответствует увеличению общего количества вошедших в клетку ионов Ca²⁺ (рис. 19Б, вставки слева и справа соответственно). Заметное увеличение амплитуды Ca²⁺ тока через мембрану макрофагов на аппликацию АТФ в присутствии СА₂-2 (100 нМ) по сравнению с клетками, не обработанными гликозидом, обнаружено в широком диапазоне концентрации АТФ от 0,03 мкМ до 30,0 мкМ (рис. 19Г).

В следующей серии экспериментов было проведено многократное и последовательное введение АТФ в постоянной концентрации 0,3 мкМ. Показано, что при самом первом введении АТФ в систему регистрации клетка отвечает с очень большой амплитудой, в то время как при последующих аппликациях АТФ амплитуда ответа последовательно существенно снижалась. Максимальное снижение составило в среднем $4,6\pm 3$ раза (рис. 19В; записи 1-3). Такое снижение амплитуды ответа клетки на последовательное введение АТФ является, вероятно, следствием десенситизации рецепторов. Введение СА₂-2 в систему регистрации с макрофагами, инактивированными последовательными добавками АТФ в наномолярных концентрациях, в течение 2 мин не вызывало заметного изменения проводимости мембраны. Однако при последующей аппликации АТФ сразу после обработки клетки СА₂-2 характер Ca²⁺ токов заметно изменялся: увеличивалась как амплитуда ответа на добавление АТФ в концентрации 0,3 мкМ (на 56%, в отдельных экспериментах увеличение от 4% до 174%), так и общее количество вошедших в клетку ионов Ca²⁺ (интеграл тока больше в среднем на 55%, в отдельных экспериментах наблюдалось увеличение от 36% до 358%) за счет частичного снятия инактивации рецепторов (рис. 19В; запись 4). Таким образом, кукумариозид А₂-2 выступает в качестве аллостерического модулятора пуриновых рецепторов. Связываясь с рецепторами P2X типа, гликозид усиливает ответ клеток на действие АТФ и частично снимает эффект инактивации рецепторов.

6.7. Типирование популяции перитонеальных макрофагов мыши, принимающих участие в Ca²⁺ ответе на кукумариозид А₂-2

С помощью метода проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии нами были выявлены две субпопуляции перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c, различающиеся по своему размеру и гранулированности. Согласно полученным дотограммам в координатах прямого и бокового рассеивания, субпопуляция крупных клеток с выраженной гранулированностью составляет порядка 20–25%, а большая часть клеток представлена в основном небольшими малогранулированными клетками, составляющими до 65% всех макрофагов (рис. 20).

Было проведено иммуноцитохимическое типирование популяции перитонеальных макрофагов мыши с помощью специфических антител к различным поверхностным маркерам для выявления моноцитов/макрофагов. Количественный анализ флуоресцентного изображения клеток показал, что определенная часть перитонеальных макрофагов ($23,7\pm 3,0\%$) положительно окрашивается антителами к маркеру зрелых макрофагов F4/80. Эти данные хорошо коррелируют с нашими результатами по определению количества F4/80⁺ клеток в популяции перитонеальных макрофагов мыши методом проточной цитофлуориметрии. По результатам анализа цитометрических гистограмм процент F4/80⁺ позитивных клеток составлял около 29% (рис. 21А). Эти же данные, представленные как дотограммы в координатах прямого и бокового рассеивания,

демонстрируют, что F4/80⁺ клетки представлены более крупными макрофагами с большей гранулированностью и более шероховатой поверхностью. Сопоставление результатов, полученных методами конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, не оставляет сомнений в том, что в перитонеальной полости мыши присутствует две субпопуляции макрофагов, различающиеся размерами и зернистостью (гранулированностью), и именно крупные зернистые клетки являются F4/80⁺ макрофагами.

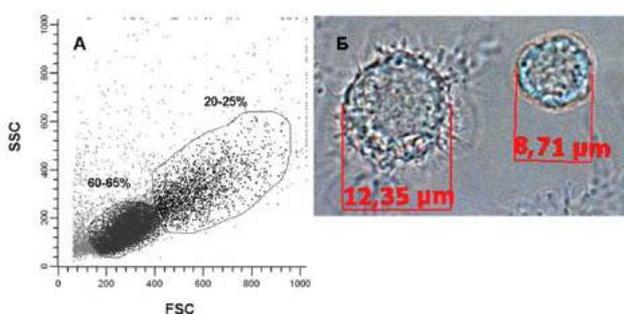


Рис. 20. Определение геометрических размеров клеток в популяции перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c методами: **А** – проточной цитофлуориметрии и **Б** – оптической микроскопии

Было проведено иммуноцитохимическое типирование популяции перитонеальных макрофагов мыши с помощью специфических антител к пуринергическим рецепторам P2X семейства. На поверхности макрофагов выявлено два типа пуриновых рецепторов – рецепторы P2X1 и P2X4 типа. В то же время пуринергических рецепторов P2X7 типа практически не наблюдали (рис. 21Б). Было обнаружено, что пуриновые рецепторы P2X1 и P2X4 типов распределены на поверхности макрофагов неравномерно. В популяции перитонеальных макрофагов выявлены клетки с повышенной плотностью пуриновых рецепторов P2X1 и P2X4 типа на поверхности и с пониженной плотностью этих рецепторов (рис. 21Б). Анализ гистограмм и дотограмм убедительно демонстрирует наличие макрофагов с пониженной и повышенной плотностью пуриновых рецепторов в общей клеточной популяции. Количество клеток с повышенной плотностью пуриновых рецепторов P2X1 и P2X4 типов составляло 35,2±1,3 и 35,9±0,2% соответственно. Причем, макрофаги с повышенной плотностью данных рецепторов были локализованы главным образом в области крупных и гранулированных клеток (рис. 21Б).

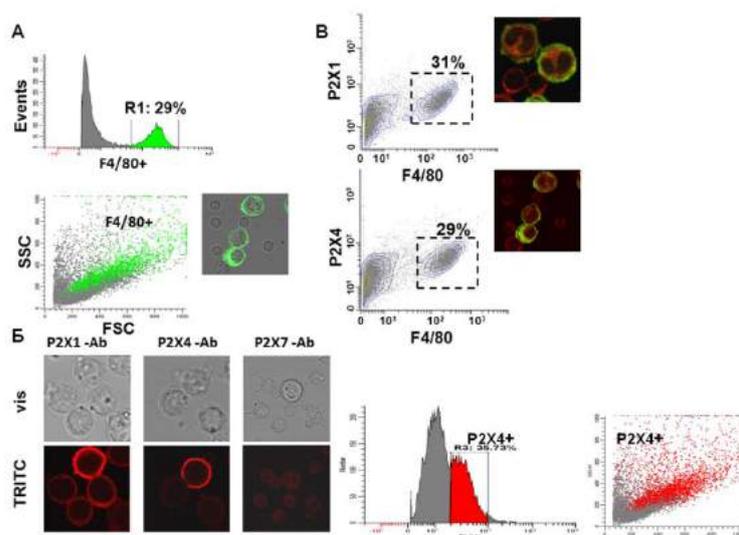


Рис. 21. Локализация пуриновых рецепторов P2X типа на поверхности перитонеальных макрофагов мыши методом, конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. **А** – определение количества F4/80⁺ клеток в популяции макрофагов; **Б** – локализация пуриновых рецепторов P2X типа на поверхности макрофагов; **В** – колокализация P2X⁺ / F4/80⁺ клеток. Окрашивание клеток антителами к F4/80 (FITC, зеленая флуоресценция) и к P2X1, P2X4 соответственно (TRITC, красная флуоресценция)

Методом колокализации с помощью двойного иммуноцитохимического выявления на поверхности макрофагов F4/80 маркеров и пуриновых рецепторов P2X типа было установлено, что именно для крупных зрелых F4/80⁺ положительных клеток характерна

повышенная плотность пуриновых рецепторов P2X1 и P2X4 типа. Анализ дотограмм показал, что количество таких клеток колеблется в пределах 25–31% от общего количества перитонеальных макрофагов в культуре (рис. 21В).

Таким образом, мы установили, что в перитонеальной полости мышей линии Balb/c присутствует как минимум две субпопуляции макрофагов. Эти клетки различаются не только геометрическими размерами, но и уровнями экспрессии и наличием маркеров зрелых макрофагов F4/80, а также плотностью пуринергических рецепторов P2X1 и P2X4 типа. Число крупных F4/80⁺ / P2X⁺ положительных макрофагов с высокой плотностью пуринергических рецепторов сопоставимо с количеством клеток в монослое макрофагов, отвечающих увеличением [Ca²⁺]_i в цитозоле после введения кукумариозида A₂-2 в наномолярных концентрациях. С высокой степенью вероятности можно заключить, что клетки именно этого фенотипа перитонеальных макрофагов являются мишенью иммуномодулирующего действия кукумариозида A₂-2 и принимают участие в Ca²⁺ ответе на аппликацию гликозида.

6.8. Компьютерное моделирование пространственной структуры комплекса кукумариозида A₂-2 с пуриновым рецептором P2X4

Для прогнозирования и установления механизма взаимодействия CA₂-2 с пуриновыми рецепторами с помощью расчетных методов, включающих гомологичное моделирование, молекулярный докинг и молекулярную динамику и биоинформационный анализ была изучена теоретическая 3D-структура комплекса этого гликозида с пуринергическим рецептором мыши P2X4 типа (mP2X4).

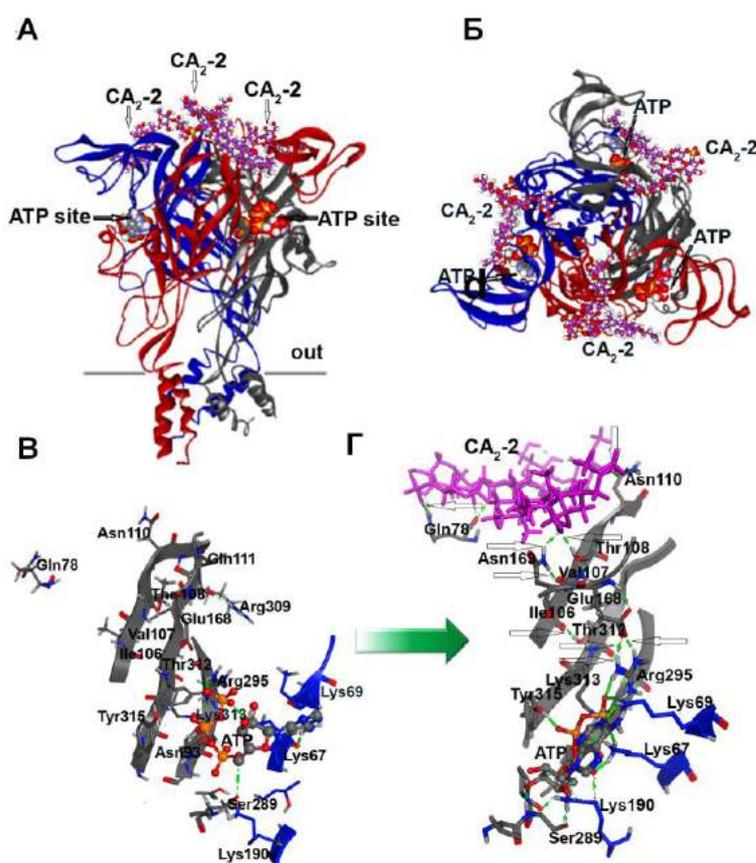


Рис. 22. Модель пространственной структуры комплекса mP2X4 рецептора с АТФ и кукумариозидом A₂-2 (CA₂-2). Структура рецептора представлена в виде ленточной диаграммы: А – вид сбоку параллельно плоскости мембраны; Б – вид сверху перпендикулярно плоскости мембраны. Фрагмент структуры mP2X4 рецептора, содержащего β-лист, на котором локализованы сайты связывания АТФ и CA₂-2: В – в начальном состоянии с небольшим количеством связей; Г – в модифицированном CA₂-2 состоянии. Стрелками указана образованная сеть водородных и ионных взаимодействий двумя центрами связывания АТФ и CA₂-2

Расчетные данные, полученные при моделировании комплекса гликозида с пуриновым рецептором P2X4 типа, показали, что во взаимодействие с CA₂-2 вступают две (или более) субъединицы рецептора (рис. 22А, Б). Установлено, что сайт связывания CA₂-2 локализован на внеклеточном домене рецептора mP2X4, в области, характерной для

связывания пуринорецептора с производным аминсахара – N-ацетил-D-глюкозамином, как это было продемонстрировано ранее для zfP2X4 рецептора (Hattori, Gouaux, 2012).

Установлено, что связывание гликозида SA₂-2 с mP2X4 не затрагивает сайт связывания рецептора с АТФ. Таким образом, показано отсутствие конкуренции двух лигандов (SA₂-2 и АТФ) за сайт связывания на рецепторе. Анализ теоретических расчетов сайта связывания SA₂-2 с mP2X4 и межмолекулярных контактов позволил выявить функционально значимые для образования комплекса остатки аминокислот и установить, что в комплексообразовании принимают участие следующие аминокислотные остатки: Asn 75, Ser 77, Gln 78, Ley 79, Gly 80, Asn 110, Val 109, Pro 166, Phe 152, Val 167, Pro 117, Thr 108 и Asn 169 одной субъединицы и остатки Arg 301, Ala 304 и Gly 305 смежной субъединицы рецептора. Взаимодействие SA₂-2 с рецептором мыши mP2X4 стабилизируется водородными связями с аминокислотными остатками.

На основании исследования лиганд-рецепторного взаимодействия, выполненного методом молекулярной динамики, можно заключить, что в результате связывания гликозида с P2X4 рецептором мыши, пуриnergический рецептор подвергается ряду конформационных преобразований. Прежде всего, происходит реорганизация внутримолекулярных взаимодействий, приводящая к контакту аминокислотных остатков, формирующих сайты связывания SA₂-2 и АТФ на рецепторе. Эта реорганизация осуществляется за счет образования сети водородных и ионных взаимодействий, пронизывающих жесткий β-лист субъединицы рецептора (рис. 22В, Г). Вероятнее всего, формирование этой новой сети водородных связей между двумя центрами связывания и определяет характер влияния SA₂-2 на взаимодействие АТФ с P2X4 рецептором. Возникновение именно этой сети сокращает время пребывания рецептора в десенситизированном состоянии и обеспечивает аллостерическую модуляцию его активации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом исследований иммуностимулирующих свойств гликозидов голотурий стало создание на основе наиболее эффективных моносulfатированных тритерпеновых гликозидов из *S. japonica* (главным образом кукумариозида A₂-2) препарата кумазид, предназначенного для восстановления иммунных реакций при вторичных иммунодефицитных состояниях человека. По параметрам острой токсичности кумазид относится к практически безопасным соединениям при пероральном способе введения. Кумулятивные токсические свойства кумазида выражены слабо; препарат не оказывает заметного хронического токсического воздействия на подопытных животных и на состояние их основных внутренних органов. Результаты комплексного исследования позволяют заключить, что кумазид не обладает мутагенными свойствами и репродуктивной токсичностью.

Исследование специфической активности кумазида *in vitro* установило, что препарат в малых дозах стимулирует фагоцитоз бактерий моноцитами и нейтрофилами и усиливает бактерицидную способность лейкоцитов человека, очевидно, за счет активирования кислородзависимых механизмов киллинга. Эти данные хорошо согласуются с результатами исследований *in vivo* на животных, поскольку кумазид заметно повышает устойчивость мышей к экспериментальным инфекциям, вызываемым иерсиниями или стафилококками. Кумазид достоверно индуцирует продукцию цитокинов, ФНО-α и ИЛ-6, мононуклеарными клетками человека, вызывает повышение продукции ИФН-γ, являющегося активатором клеточного иммунитета, и усиливает исходно сниженную экспрессию мембраноассоциированных иммунорегуляторных структур (CD3, CD4, CD8 и CD25) лимфоцитов человека. Благодаря проведенному исследованию установлено влияние кумазида на факторы врожденного и адаптивного иммунитета: препарат оказывает значительное дозозависимое влияние на гуморальный иммунитет в опытах *in vivo*, достоверно увеличивая количество антителообразующих

клеток в селезенке животных. В фармакокинетических экспериментах *in vivo* установлено, что препарат быстро всасывается при внесосудистых способах введения. Скорость выведения препарата в значительной степени зависит от способа его введения и является минимальной при пероральном способе введения.

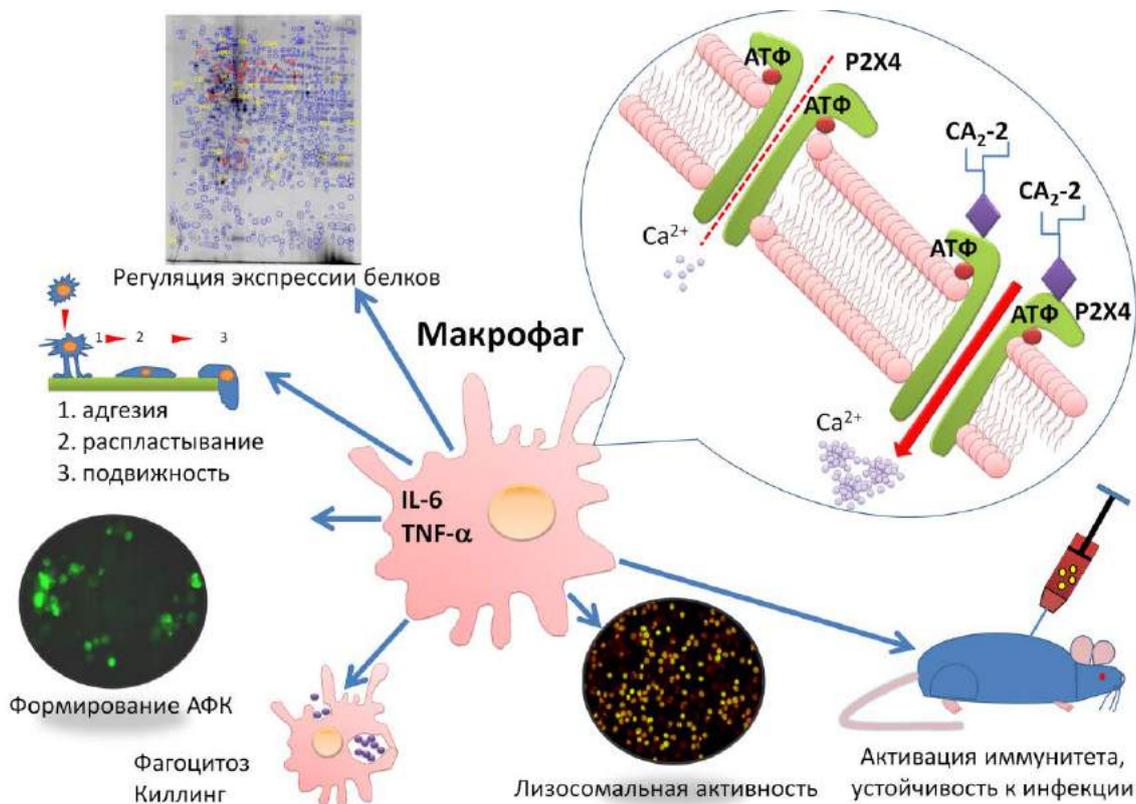


Схема 1. Общая схема взаимодействия кукумариозида A₂-2 с макрофагами

Суммируя результаты исследования фармакодинамики, можно сделать вывод, что кумазид относится к группе иммуотропных препаратов, обладающих способностью стимулировать, главным образом, клеточное звено иммунитета. Входящий в состав кумазида тритерпеновый гликозид кукумариозид A₂-2 является низкомолекулярным биорегулятором, способным модулировать активацию пуринергических рецепторов P2X4 типа под действием внеклеточного АТФ и обеспечивать увеличение проводимости мембраны макрофагов для Ca²⁺. Такое взаимодействие может вызывать запуск каскада внутриклеточных реакций, приводящих к иммуностимулирующему ответу клеток. Первым звеном в этом каскаде является активация Ca²⁺-сигнального метаболического пути, инициирующая впоследствии увеличение экспрессии набора внутриклеточных белков, участвующих в ключевых этапах физиологии иммуокомпетентных клеток. Это приводит к усилению адгезии клеток и их пролиферации, формированию в них активных форм кислорода, увеличению лизосомальной активности, фагоцитоза и синтеза некоторых цитокинов. В конечном итоге происходит активирование всего клеточного звена иммунитета и увеличение резистентности организма к различным патогенным инфекциям после введения препарата. В случае хронического воспаления, сопровождающегося инактивацией P2X рецепторов, после введения препарата происходит восстановление первоначального иммунного ответа, и организм может выйти из состояния хронического воспаления (Схема 1).

ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой фундаментальное исследование иммуномодулирующей активности тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазид. В результате путем систематических исследований *in vitro* и *in vivo* определены цитотоксические и токсические свойства препарата, доказано специфическое иммуномодулирующее действие кумазида, изучены его фармакокинетические параметры, впервые исследован молекулярный механизм взаимодействия кукумариозида А₂-2 с иммунокомпетентными клетками и установлены молекулярные мишени его иммуномодулирующего действия.

1) Выполнены исследования токсических свойств кумазида. Установлено, что кумазид при внутрижелудочном введении по параметрам острой токсичности относится к IV классу опасности, а при внутрибрюшинном способе введения - ко II классу опасности. Установлено, что кумулятивные токсические свойства кумазида выражены слабо; препарат не обладает хронической и репродуктивной токсичностью, а также мутагенными свойствами. Показано, что преимуществом кумазида перед исходным гликозидом и ранее созданными ветеринарными препаратами является снижение гемолитических, цитотоксических свойств при полном сохранении иммуномодулирующей активности.

2) Исследована фармакокинетика кумазида и кукумариозида А₂-2. Установлено, что кумазид быстро всасывается при внесосудистых способах введения. Скорость выведение препарата в значительной степени зависит от способа его введения. При внутрибрюшинном способе введения мышам гликозид достигает максимальной концентрации в органе-мишени селезенке за полчаса, а время полувыведения препарата составляет всего несколько часов. Показано, что кукумариозид А₂-2 в течение длительного времени не претерпевает метаболических трансформаций в ткани селезенки и локализуется главным образом в области серозной оболочки.

3) Изучен механизм влияния кумазида на различные системы клеточного и гуморального иммунитета:

- Кумазид стимулирует фагоцитоз и бактерицидную способность лейкоцитов за счет активирования кислородзависимых механизмов киллинга. Препарат индуцирует продукцию фактора некроза опухолей ФНО- α , и стимулирует синтез цитокинов ИЛ-6 и ИФН- γ мононуклеарными клетками человека, а так же усиливает исходно сниженную экспрессию мембраноассоциированных белков (CD3, CD4, CD8) и активирует CD25.

- Показано, что кумазид увеличивает количество антителообразующих клеток в селезенке животных, оказывает радиозащитное действие, стимулируя процессы кроветворения, обладает противоопухолевым действием и существенно повышает устойчивость животных к экспериментальным бактериальным инфекциям *in vivo*.

4) Изучен механизм иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2. Показано, что максимальный иммуностимулирующий эффект гликозида лежит в наномолярном диапазоне концентраций, что практически на два порядка ниже диапазона концентраций его цитотоксического действия. Установлено, что действие кукумариозида А₂-2 вызывает усиление адгезии, распластывания, подвижности и пролиферации иммунных клеток, увеличение синтеза в них активных форм кислорода и NO, активацию индуцибельной NO-синтазы и лизосомальной активности.

5) Установлен ряд внутриклеточных белков, экспрессия которых регулируется в спленоцитах мыши после их инкубирования с кукумариозидом А₂-2. Наиболее значимыми белками признаны NSFL1 cofactor p47, hnRNP K, Septin-2, NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 и GRB2-related adaptor protein 2. Данные белки принимают непосредственное участие в регуляции активности иммунных клеток.

6) Исследовано взаимодействие кукумариозида А₂-2 с биомембранами:

- Взаимодействие гликозида с макрофагами приводит к обратимому увеличению микровязкости липидного бислоя и временной деполяризации, и сопровождается обратимым увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

- Взаимодействие гликозида с макрофагами происходит в двух местах связывания; наличие высокоаффинного сайта подразумевает присутствие на поверхности клеток специфического рецептора.

- Установлено, что кукумариозид A_2-2 не взаимодействует с рецепторами к эстрогенам, и под действием гликозида кальций поступает в клетки из внеклеточной среды, минуя потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы, Na^+/Ca^{2+} -антипортер и G-белок-сопряженные рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы.

7) Впервые доказано, что мембранными молекулярными мишенями иммуномодулирующего действия кукумариозид A_2-2 являются пуриновые рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающие Ca^{2+} проводимость в мембране макрофагов и поступление ионов кальция из окружающей внеклеточной среды в цитоплазму клеток. Показано, что кукумариозид A_2-2 взаимодействует с внеклеточным доменом пуриновых рецепторов и действует по типу аллостерического модулятора, который, связываясь с рецепторами, усиливает ответ клеток на АТФ и частично снимает эффект инактивации рецепторов. Установлено, что зрелые F4/80⁺ макрофаги с повышенной плотностью пуриновых P2X1 и P2X4 рецепторов являются клетками-мишенями и принимают участие в Ca^{2+} ответе на действие гликозида.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. **Aminin D.L.**, Agafonova I.G., Berdyshev E.V., Isachenko E.G., Avilov S.A., Stonik V.A. Immunomodulatory properties of cucumariosides from the edible Far-Eastern holothurian *Cucumaria japonica* // J. Med. Food. 2001. V.4. No 3. P.127-135.
2. Agafonova I.G., **Aminin D.L.**, Avilov S.A., Stonik V.A. Influence of cucumariosides upon intracellular $[Ca^{2+}]_i$ and lysosomal activity of macrophages // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 6982-6986.
3. Кожемяко В.Б., Ковальчук С.Н., Рассказов В.А., **Аминин Д.Л.** Двугибридная дрожжевая тест-система для оценки эстрогенной активности химических соединений // ДАН. 2005. Т. 401. № 2. С. 259-262.
4. **Aminin D.L.**, Pinegin B.V., Pichugina L.V., Zaporozhets T.S., Agafonova I.G., Boguslavski V.M., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A. Immunomodulatory properties of cumaside // Int. Immunopharmacol. 2006. V. 6. No.7. P. 1070-1082.
5. Kovalchuk S.N., Kozhemyako V.B., Atopkina L.N., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Rasskazov V.A., **Aminin D.L.** Estrogenic activity of triterpene glycosides in Yeast Two-Hybrid Assay // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2006, V.101. No 4-5. P.226-231.
6. **Аминин Д.Л.**, Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Гладких Р.В., Капустина И.И., Лихацкая Г.Н., Авиллов С.А., Стоник В.А. Использование в фармакокинетических исследованиях меченных тритием тритерпеновых гликозидов из голотурии *Cucumaria japonica* // ДАН. 2008. Т. 422. №5. С.710-713.
7. **Aminin D.L.**, Agafonova I.G., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A., Collin P.D., Woodward C. Immunomodulatory properties of frondoside A, a major triterpene glycoside from the North Atlantic commercially harvested sea cucumber *Cucumaria frondosa* // J. Med. Food. 2008. V. 11. No 3. P. 443-53.
8. Белоусов М.В., Новожеева Т.П., Ахмеджанов Р.Р., Новицкая Л.Н., Юсубов М.С., **Аминин Д.Л.**, Авиллов С.А., Стоник В.А. Влияние препарата кумазид на

- функциональное состояние внутренних органов крыс // Бюллетень сибирской медицины. 2008. №2. С. 20-22.
9. Белоусов М.В., Новожеева Т.П., Ахмеджанов Р.Р., Новицкая Л.Н., Юсубов М.С., **Аминин Д.Л.**, Авиллов С.А., Стоник В.А. Влияние длительного введения препарата кумазид на состояние внутренних органов крыс (патоморфологическое исследование) // Бюллетень сибирской медицины. 2008. №3. С. 9-12.
10. **Aminin D.L.**, Koy C., Dmitrenok P.S., Müller-Hilke B., Koczan D., Arbogast B., Silchenko A.S., Kalinin V.I., Avilov S.A., Stonik V.A., Collin P.D., Thiesen H.J., Deinzer M.L., Glocker M.O. Immunomodulatory effects of holothurian triterpene glycosides on mammalian splenocytes determined by mass spectrometric proteome analysis // J. Proteomics. 2009. V. 72. No 5. P. 886-906.
11. **Aminin D.L.**, Silchenko A.S., Avilov S.A., Stepanov V.G., Kalinin V.I. Cytotoxic action of triterpene glycosides from sea cucumbers from the genus *Cucumaria* on mouse spleen lymphocytes. Inhibition of nonspecific esterase // Nat. Prod. Commun. 2009. V. 4. No 6. P. 773-6.
12. Белоусов М.В., Новожеева Т.П., Ахмеджанов Р.Р., Новицкая Л.Н., Юсубов М.С., **Аминин Д.Л.**, Авиллов С.А., Стоник В.А. Токсикологическое изучение препарата кумазид // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. Т. 73 №2. С. 22-24.
13. **Aminin D.L.**, Chaykina E.L., Agafonova I.G., Avilov S.A., Kalinin V.I., Stonik V.A. Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside // Int. Immunopharmacol. 2010. V.10. P. 648-654.
14. **Aminin D.L.**, Silchenko A.S., Avilov S.A., Stepanov V.G., Kalinin V.I. Immunomodulatory action of monosulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Cucumaria okhotensis* Levin et Stepanov: Stimulation of activity of mouse peritoneal macrophages // Nat. Prod. Commun. 2010. V. 5. No 12. P.1877-1880.
15. **Aminin D.L.**, Gorpenchenko T.Y., Bulgakov V.P., Andryjashchenko P.V., Avilov S.A., Kalinin V.I. Triterpene glycoside cucumarioside A₂-2 from sea cucumber stimulates mouse immune cell adhesion, spreading and motility // J. Med. Food. 2011. V. 14. No 6. P. 594-600.
16. **Aminin D.L.**, Zaporozhets N.S., Adryjashchenko P.V., Avilov S.A., Kalinin V.I., Stonik V.A. Radioprotective properties of Cumaside, a complex of triterpene glycosides from the sea cucumber *Cucumaria japonica* and cholesterol // Nat. Prod. Commun. 2011. V. 6. No 5. P. 587-592.
17. Pisyagin E.A., Gladkikh R.V., Kapustina I.I., Kim N.Y., Shevchenko V.P., Nagaev I.Y., Avilov S.A., **Aminin D.L.** Interaction of holothurian triterpene glycoside with biomembranes of mouse immune cells // Int. Immunopharmacol. 2012. V. 14. P. 1-8.
18. Гриценко В.А., **Аминин Д.Л.**, Зурочка А.В., Зурочка В.А., Иванов Ю.Б. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения in vitro как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2012. №3. С. 1-17.
19. Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., Kovalchyk S.N., Davydova V.N., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., **Aminin D.L.** Antitumor activity of cucumarioside A₂-2 // Chemotherapy. 2013. No 59. P. 181-191.
20. Pisyagin E.A., Dmitrenok P.S., Gorpenchenko T.Y., Avilov S.A., Silchenko A.S., **Aminin D.L.** Determination of cucumarioside A₂-2 in mouse spleen by radiospectroscopy, MALDI-MS and MALDI-IMS // Eur. J. Pharm. Sci. 2013. V. 49. No 4. P. 461-467.
21. Silchenko A.S., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Menchinskaya E.S., **Aminin D.L.**, Kalinin V.I. Structure of cucumarioside I₂ from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova) and cytotoxic and immunostimulatory activities of this saponin and relative compounds // Nat. Prod. Res. 2013. V. 27. No. 19. P. 1776-1783.

22. Гриценко В.А., **Аминин Д.Л.** Эндогенные бактериальные инфекции как фундаментальная проблема медицины и оптимизация подходов к их терапии и профилактике // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2013. №3. С. 1-25.
23. Асташев М.Е., Соколов Р.А., Пислягин Е.А., **Аминин Д.Л.** Модуляция инактивационного процесса пуриновых рецепторов кукумариозидом А₂-2 в иммунокомпетентных клетках // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2013. № 12, ч. 3. С. 11–13.
24. **Aminin D.L.**, Pislyagin E.A., Astashev M.E., Sokolov R.A., Yurchenko E.A., Zelepuga E.A., Kozlovskaya E.P., Stonik V.A. New immunomodulators from sea cucumbers: molecular mechanisms of action // FEBS Journal. 2013. V. 280. Suppl. 1. P. 506-506.
25. Pisliagin E.A., **Aminin D.L.**, Silchenko A.S., Avilov S.A., Andryjashchenko P.V., Kalinin V.I., Stonik V.A., Padmakumar K. Immunomodulatory action of triterpene glycosides isolated from the sea cucumber *Actinocucumis typical* // Nat. Prod. Commun. 2014. V.9. No 6. P. 771-772.
26. Пислягин Е.А., Юрченко Е.А., Горпенченко Т.Ю., Давыдова В.Н., **Аминин Д.Л.** Взаимодействия тритерпенового гликозида кукумариозида А₂-2 с мембранными рецепторами макрофагов мыши // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. №12 (часть 1), С. 116-120.
27. Pislyagin E.A., Dmitrenok P.S., Gladkikh R.V., Gorpenchenko T.Y., **Aminin D.L.** Molecular targets and pharmacokinetics of cucumarioside А₂-2 // FEBS Journal. 2014. V. 281. Suppl. 1. P. 585-585.
28. **Aminin D.L.**, Menchinskaya E.S., Pisliagin E.A., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I. Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 1202-1223
29. Pislyagin E.A., Manzhulo I.V., Silchenko A.S., Avilov S.A., Dmitrenok P.S., **Aminin D.L.** Morphological and biochemical alterations in the spleen caused by immunomodulatory compound cucumarioside А₂-2 // FEBS Journal. 2015. V. 282. Suppl. 1. P. 289-289.
30. Dyshlovoy S.A., Menchinskaya E.S., Venz S., Rast S., Amann K., Hauschild J., Otte K., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Alsdorf W., Madanchi R., Bokemeyer C., Schumacher U., Walther R., **Aminin D.L.**, Fedorov S.N., Shubina L.K., Stonik V.A., Balabanov S., Honecker F. von Amsberg G. The marine triterpene glycoside frondoside A exhibits activity *in vitro* and *in vivo* in prostate cancer // Int. J. Cancer. 2016. V. 138. No. 10. P.2450-2465.
31. **Aminin D.**, Pislyagin E., Astashev M., Es'kov A., Kozhemyako V., Avilov S., Zelepuga E., Yurchenko E., Kaluzhskiy L., Kozlovskaya E., Ivanov A. Stonik V. Glycosides from edible sea cucumbers stimulate macrophages *via* purinergic receptors // Sci. Rep. 2016. V.6. No. 39683.

Обзоры

1. Kalinin V.I., **Aminin D.L.**, Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A. Triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothurioidae, Echinodermata), biological activities and functions // Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products) / Ed. Atta-ur-Rahman. Elsevier Science Publisher. Amsterdam. Netherlands. 2008. V. 35. Chap. 4. P. 135-196.
2. **Aminin D.L.**, Pislyagin E.A., Menchinskaya E.S., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I. Immunomodulatory and anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products) / Ed. Atta-ur-Rahman. Elsevier Science Publisher. Amsterdam. Netherlands. 2014. V. 41, Chap. 3. P.75-94.
3. **Aminin D.L.** Immunomodulatory properties of sea cucumber triterpene glycosides // Marine and Freshwater Toxins. Toxinology / eds. P. Gopalakrishnakone, V. Haddad Jr., A. Tubaro, E. Kim, W.R. Kem. Springer. Amsterdam. Netherlands. 2016. Chap. 19. P. 381-401.

4. **Aminin D.L.**, Menchinskaya E.S., Pislyagin E.A., Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I. Sea cucumber triterpene glycosides as anticancer agents // *Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products)* / Ed. Atta-ur-Rahman. Elsevier Science Publisher. Amsterdam. Netherlands. 2016, V.49. Chap. 2. P.55-105.

5. **Aminin D.L.**, Menchinskaya E.S., Pislyagin E.A., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stadnichenko N.I., Collin P.D., Kalinin V.I. Review of patents based on triterpene glycosides of sea cucumbers // *Studies in Natural Product Chemistry (Bioactive Natural Products)* / Ed. Atta-ur-Rahman. Elsevier Science Publisher. Amsterdam. Netherlands. 2016. V. 51, Chap. 4. P. 175-200.

6. **Аминин Д.Л.**, Пислягин Е.А., Менчинская Е.С., Сильченко А.С., Авиллов С.А., Калинин В.И. Иммуномодулирующая активность тритерпеновых гликозидов голотурий // *Исследования природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Изд-во Дальнаука ДВО РАН. Владивосток, 2013, С.130-138.*

7. Пислягин Е.А., **Аминин Д.Л.** Пуринергические P2X рецепторы как новые молекулярные мишени для поиска и создания новых лекарственных средств // *Исследования природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. Новые подходы и результаты / Отв. ред. академик РАН В. А. Стоник. Владивосток. 2016. С.45-51.*

Патенты

1. Стоник В.А., **Аминин Д.Л.**, Богуславский В.М., Авиллов С.А., Агафонова И.Г., Сильченко А.С., Пономаренко Л.П., Прокофьева Н.Г., Чайкина Е.Л. Иммуномодулирующее средство «Кумазид» и фармацевтическая композиция на его основе // Патент РФ RU 2271820 от 20.03.2006. Заявка 2004120434/15. Приоритет от 02.07.2004.

2. Avilov S.A., Kalinin V.I., Silchenko A.S., **Aminin D.L.**, Agafonova I.G., Stonik V.A., Woodward C., Collin P.D. Process for isolating sea cucumber saponin frondoside A, and immunomodulatory methods of use // Patent of the United States of America US 7163702 B1. January 16. Application No US 11/145,580. June 06, 2005.

3. Авиллов С.А., Калинин В.И., Сильченко А. С., **Аминин Д.Л.**, Агафонова И.Г., Стоник В.А., Колин Питер Д., Вудворд Карл. Способ получения фрондозидов А и способ стимулирования иммунной системы млекопитающих // Патент РФ RU 2339644 от 27 ноября 2008. Заявка 2006145513. Приоритет от 03 июня 2005.

4. Мясоедов Н.Ф., Стоник В.А., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., **Аминин Д.Л.**, Авиллов С.А. Шевченко К.В. Равномерно меченные тритерпеновые гликозиды голотурий *Cucumaria* // Патент РФ RU 2351606 от 10 апреля 2009. Заявка 2007136802. Приоритет 04 октября 2007.

5. **Аминин Д.Л.**, Сильченко А.С., Авиллов С.А., Калинин В.И., Стоник В.А. Средство, стимулирующее клеточный иммунитет млекопитающих // Патент РФ RU 2415863 от 10.04.2011. Заявка 2009137755/15. Приоритет от 12.10.2009