

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

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

Диссертация на соискание ученой
степени доктора биологических наук

Научный консультант:
академик РАН, доктор химических наук
Стоник Валентин Аронович

Владивосток – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	16
1.1. Введение в литературный обзор.....	16
1.2. Ихтиотоксичность и общая токсичность.....	19
1.3. Мутагенная активность.....	20
1.4. Гемолитическая активность.....	20
1.5. Противогрибковая активность.....	22
1.6. Антипротозойная активность.....	25
1.7. Нейротоксические свойства.....	25
1.8. Взаимодействие с биологическими мембранами.....	26
1.9. Взаимодействие с рецепторами.....	33
1.10. Иммуномодулирующая активность.....	35
1.11. Противоопухолевая активность тритерпеновых гликозидов.....	41
1.12. Биомедицинские препараты, БАДы и другие продукты функционального питания на основе гликозидов голотурий.....	53
1.13. Фармакокинетика тритерпеновых гликозидов.....	58
1.14. P2X рецепторы.....	60
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	76
2.1. Исследуемые соединения.....	76
2.2. Животные.....	79
2.3. Получение и культивирование клеток.....	79
2.4. Определение жизнеспособности клеток.....	81
2.5. Определение острой токсичности.....	83
2.6. Определение иммуномодулирующей активности.....	84
2.6.1. Распластывание, адгезия и подвижность.....	84
2.6.2. Определение лизосомальной активности.....	86
2.6.3. Определение АФК, NO и iNOs.....	86
2.7. Исследование специфической активности кумазида.....	88
2.7.1. Влияние на устойчивость к инфекции мышей.....	88
2.7.2. Исследование радиозащитного действия.....	88
2.7.3. Исследование влияния профилактического введения кумазида на кроветворение сублетально облученных мышей.....	89
2.7.4. Оценка люминолзависимой и люцигенинзависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов человека.....	90
2.7.5. Определение поглотительной активности фагоцитов периферической крови человека.....	90
2.7.6. Определение бактерицидной активности (киллинга) лейкоцитов периферической крови человека.....	91
2.7.7. Определение накопления антителообразующих клеток (АОК) у мышей....	92
2.7.8. Определение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у мышей.....	92
2.7.9. Определение пролиферативной активности лимфоцитов человека.....	92
2.7.10. Определение продукции цитокинов мононуклеарными клетками человека	93
2.7.11. Исследование экспрессии мембраноассоциированных маркеров лимфоцитов.....	93
2.8. Исследование фармакодинамики кумазида.....	94
2.8.1. Связывание ³ H-кукумаризида A ₂ -2 с перитонеальными макрофагами мыши.....	94
2.8.2. Измерение микровязкости мембран клеток.....	95
2.8.3. Измерение мембранного потенциала клеток.....	95

2.8.4.	Микроцитофлуориметрическая оценка транспорта Ca^{2+} в клетках.....	96
2.8.5.	Иммуноцитохимическое исследование перитонеальных макрофагов.....	98
2.8.6.	Регистрация трансмембранных токов в клетках методом пэтч-кламп.....	98
2.8.7.	Протеомный анализ.....	99
2.8.8.	Поверхностный плазмонный резонанс.....	103
2.8.9.	Транзистентная трансфекция клеток малыми интерферирующими РНК (siRNA).....	104
2.8.10.	Экспрессия P2X4 рецепторов. Иммуноблотинг.....	105
2.9.	Исследование безопасности кумазида.....	105
2.9.1.	Оценка острой токсичности.....	105
2.9.2.	Оценка кумулятивной токсичности.....	106
2.9.3.	Оценка хронической токсичности.....	106
2.9.4.	Оценка репродуктивной токсичности.....	107
2.9.5.	Оценка мутагенной активности.....	109
2.10.	Построение модели пространственной структуры mP2X4 рецептора мыши и кукумариозида A_2-2	111
2.11.	Исследование фармакокинетики кукумариозида A_2-2	112
2.11.1.	Исследование фармакокинетики 3H -кукумариозида A_2-2	112
2.11.2.	MALDI-IMS.....	113
2.11.3.	MALDI-TOF-MS.....	114
2.12.	Исследование противоопухолевой активности <i>in vivo</i>	115
2.13.	Двугибридная дрожжевая тест-система для оценки эстрогенной активности химических соединений.....	117
2.14.	Статистический анализ.....	119
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	120
3.1.	Исследование цитотоксического действия тритерпеновых гликозидов голотурий.....	120
3.1.1.	Цитотоксическая активность тритерпеновых гликозидов в отношении эмбрионов морского ежа.....	120
3.1.2.	Влияние тритерпеновых гликозидов на жизнеспособность опухолевых клеток.....	121
3.1.3.	Цитотоксическая активность тритерпеновых гликозидов в отношении иммунокомпетентных клеток.....	126
3.1.4.	Гемолитическая активность кукумариозида A_2-2 и фрондозиды А.....	126
3.1.5.	Оценка острой токсичности.....	127
3.2.	Исследование иммуномодулирующей активности тритерпеновых гликозидов.....	128
3.2.1.	Адгезия, распластывание и подвижность макрофагов.....	128
3.2.2.	Влияние тритерпеновых гликозидов на лизосомальную активность и уровень АФК и NO в макрофагах мыши.....	134
3.2.3.	Влияние тритерпеновых гликозидов на формирование NO и активность iNO синтазы в макрофагах мыши <i>in vitro</i>	146
3.3.	Иммуномодулирующая активность препарата кумазид.....	149
3.3.1.	Создание препарата кумазид.....	149
3.3.2.	Изучение гемолитической и цитотоксической (эмбриотоксической) активностей кумазида.....	151
3.3.3.	Исследование влияния кумазида на лизосомальную активность макрофагов.....	153
3.4.	Изучение безопасности препарата кумазид.....	155
3.4.1.	Острая токсичность кумазида.....	155
3.4.2.	Кумулятивные свойства кумазида.....	156
3.4.3.	Хроническая токсичность кумазида.....	156

3.4.4.	Патоморфологические исследования органов крыс, получавших кумазид	157
3.4.5.	Оценка репродуктивной токсичности препарата кумазид.....	158
3.4.6.	Оценка мутагенной активности препарата кумазид.....	158
3.5.	Исследование специфической иммунологической активности препарата кумазид.....	160
3.5.1.	Влияние кумазида на люминолзависимую и люцигенинзависимую хемилюминесценцию нейтрофилов человека.....	160
3.5.2.	Влияние кумазида на поглотительную активность фагоцитов периферической крови человека.....	163
3.5.3.	Влияние кумазида на бактерицидную активность лейкоцитов периферической крови человека.....	166
3.5.4.	Влияние кумазида на пролиферативную активность лимфоцитов человека	167
3.5.5.	Влияние кумазида на продукцию цитокинов мононуклеарными клетками человека.....	168
3.5.6.	Влияние кумазида на экспрессию мембраноассоциированных белков лимфоцитов.....	170
3.5.7.	Влияние кумазида на экспрессию активационных антигенов лимфоцитов периферической крови здоровых доноров.....	172
3.5.8.	Влияние кумазида на накопление антителообразующих клеток у мышей..	173
3.5.9.	Влияние кумазида на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей.....	174
3.5.10.	Влияние кумазида на антиинфекционную резистентность мышей.....	175
3.5.11.	Исследование радиозащитного действия кумазида.....	178
3.6.	Противоопухолевая активность <i>in vivo</i>	184
3.6.1.	Изучение превентивной противоопухолевой активности кукумариозида А ₂ -2 и фрондозид А.....	184
3.6.2.	Противоопухолевая активность кумазида.....	185
3.7.	Фармакокинетические исследования кумазида.....	192
3.7.1.	Исследование фармакокинетики ³ Н-кумазида	192
3.7.2.	Исследование фармакокинетики кукумариозида А ₂ -2 в гомогенате селезенки мышей методом радиоспектроскопии.....	196
3.7.3.	Идентификация и количественное определение кукумариозида А ₂ -2 в гомогенате селезенки мыши методом MALDI-TOF MS.....	197
3.7.4.	Исследование стабильности кукумариозида А ₂ -2 в тканях селезенки	199
3.7.5.	Оценка пространственного распределения кукумариозида А ₂ -2 методом MALDI-IMS.....	200
3.8.	Исследование фармакодинамики.....	203
3.8.1.	Протеомный анализ белков с помощью двумерного гель-электрофореза и масс-спектрометрии.....	203
3.8.2.	Исследование эстрогенной активности тритерпеновых гликозидов.....	222
3.8.3.	Взаимодействие кукумариозида А ₂ -2 с мембранами иммунокомпетентных клеток.....	228
3.8.4.	Влияние кукумариозида А ₂ -2 на микровязкость биомембран.....	230
3.8.5.	Влияние кукумариозида А ₂ -2 на мембранный потенциал перитонеальных макрофагов мыши.....	232
3.8.6.	Влияние кукумариозида А ₂ -2 на транспорт Са ²⁺ в перитонеальных макрофагах мышей.....	234
3.8.7.	Влияние кукумариозида А ₂ -2 на функционирование пуриновых рецепторов в макрофагах.....	240
3.8.8.	Электрофизиологическое исследование ионных токов в одиночных макрофагах.....	248
3.8.9.	Типирование популяции перитонеальных макрофагов мыши,	

	принимающих участие в Ca^{2+} ответе на кукумариозид A_2 -2.....	253
3.8.10.	Компьютерное моделирование пространственной структуры комплекса кукумариозида A_2 -2 с пуриновым рецептором P2X_4	258
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	266
	ВЫВОДЫ.....	271
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	273
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	274

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы отмечается существенный рост острых и хронических инфекционных заболеваний различной природы, включая бактериальные, грибковые, протозойные и вирусные инфекции. Этиологическим фактором таких инфекционных заболеваний зачастую выступают оппортунистические (или условно-патогенные) микроорганизмы, которые, как правило, лишены болезнетворных свойств и не вызывают инфекционных заболеваний у здорового человека. Важными условиями их развития являются массивность инфицирования и нарушения сопротивляемости организма. Чем более выражены эти нарушения, тем более широкий спектр микроорганизмов способен вызывать инфекционные поражения. Часто такие микроорганизмы обладают фенотипом множественной лекарственной устойчивости и атипичными биологическими свойствами. 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 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 отмечено наличие цитотоксической, гемолитической, антимикробной, ихтиотоксической, противовоспалительной и некоторых других видов 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. Результатом успешной работы специалистов из лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН (зав. лабораторией акад. В.А. Стоник) стало создание на основе кукумариозидов из *C. japonica* серии ветеринарных препаратов (КД, КМ и КМ-2), официально разрешенных к применению и успешно используемых для лечения различных заболеваний у животных, в том числе для профилактики и лечения алеутской болезни норок. 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.

Целью исследования является выяснение молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида A₂-2, 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 A₂-2 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 A₂-2 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 моносульфатированных 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 А₂-2, 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 А₂-2 являются пуриновые рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X₄ типа), обеспечивающие Ca²⁺-сигнализацию в мембране макрофагов. Кукумариозид А₂-2 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 Ca²⁺ ответе на действие гликозида.

Научная новизна. 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.

В ходе исследования токсичности (безопасности) созданного на основе кукумариозида А₂-2 иммуномодулирующего препарата кумазид впервые 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 репродуктивной токсичности, 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, вызывает достоверное дозозависимое повышение продукции ФНО-альфа мононуклеарными клетками здоровых добровольцев, увеличивает продукцию активных форм кислорода, регистрируемую по люминол- и люцигенинзависимой хемилюминисценции нейтрофилов. Действие кумазида приводит к восстановлению экспрессии CD3-, CD4- и CD8-антигенов лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, экспрессия которых была предварительно подавлена гидрокортизоном. Кроме того, кумазид практически не влияет у животных на выраженность гиперчувствительности замедленного типа, увеличивает в селезенке мыши число антителообразующих клеток, 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 и является минимальной при пероральном введении. Методами MALDI-TOF MS и MALDI-IMS впервые изучены и определены фармакокинетические параметры кукумариозида A₂-2 в селезенке мыши при внутрибрюшинном введении препарата. Обнаружено, что кукумариозид A₂-2 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 кукумариозида A₂-2 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, вовлечены в ремоделирование цитоскелета и сигнальную трансдукцию.

Показано, что в основе иммуномодулирующего действия кукумариозида A_2-2 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 Ca^{2+} в цитоплазме за счет его поступления из внеклеточного пространства. На мембранах макрофагов мыши существует, как минимум, два сайта связывания кукумариозида A_2-2 (высокоаффинный и низкоаффинный), характеризующихся различными константами диссоциации. Впервые установлено, что молекулярной мишенью действия кукумариозида A_2-2 являются мембранные пуриnergические рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающие Ca^{2+} проводимость в мембранах макрофагов и активацию клеток. Показано, что кукумариозид A_2-2 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 (пэтч-кламп), Ca^{2+} -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. Очевидно, именно крупные F4/80+ / P2X+ перитонеальные макрофаги принимают участие в Ca^{2+} ответе на применение кукумариозида A_2-2 .

На основании полученных данных создана современная концепция молекулярного механизма иммуномодулирующего действия тритерпеновых гликозидов голотурий.

Практическая значимость. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида кукумариозида A_2-2 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, 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, иммуноблотинг пуринаргических рецепторов, нокдаун 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 A₂-2 проводили совместно с Институтом молекулярной генетики РАН (г. Москва, д.х.н., в.н.с. В.П. Шевченко). Исследование связывания P2X₄ 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 A_2-2 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 РФФИ № 14-25-00037, грантов НАТО (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 научных статей 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. Авилову за выделение и любезное предоставление серии тритерпеновых гликозидов голотурий, включая кукумариозид A_2-2 , фрэндозид 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. Дмитренку 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 двугибридной дрожжевой тест-системы, д.б.н. В.И. Калинин 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.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Введение в литературный обзор

Голотурии (или морские огурцы), принадлежащие к классу *Holothuroidea*, являются иглокожими, практически повсеместно встречаются во всех районах мирового океана. Это животные с кожистым и удлинённым мягким телом, и многие из них действительно имеют форму огурцов. Класс *Holothuroidea* по общепризнанной классификации (Pawson, Fell, 1965) разделяют на шесть отрядов: *Dendrochirotida* (Древовиднощупальцевые), *Aspidochirotida* (Щитовиднощупальцевые), *Elasipodida* (Боконогие), *Molpadida* (Боченкообразные), *Apodida* (Безногие) и *Dactylochirotida* (Пальцевиднощупальцевые) (Рис. 1 А). В тоже время существуют и более современные классификации, основанные, например, на результатах геносистематики (Miller et al., 2017) и включающие большее количество отрядов (Рис. 1 Б). Этот класс животных насчитывает около 1100 описанных видов. Некоторые из них съедобны, считаются деликатесом во многих странах мира и имеют высокую коммерческую ценность (Beirne et al., 2001; Brusca and Brusca, 2003).

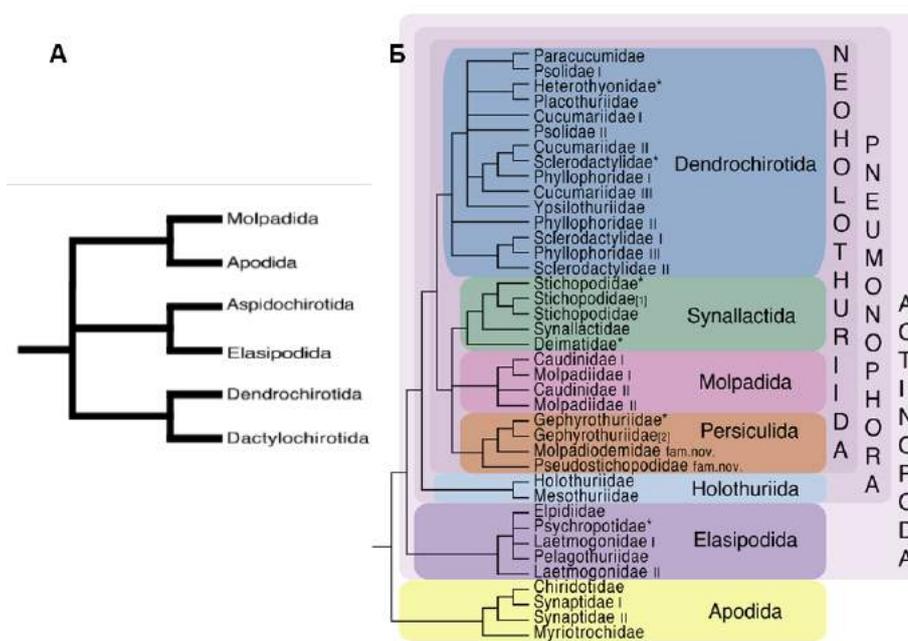


Рис. 1. Классификация голотурий по Паусону и Феллу (А) (Pawson, Fell, 1965) и Миллеру с соавторами (Б) (Miller et al., 2017)

В голотуриях содержатся особые химические вещества – тритерпеновые гликозиды, которые являются характерными метаболитами этих животных и обуславливают их биологическое действие. Вот уже более пятидесяти лет тритерпеновые гликозиды голотурий привлекают к себе внимание химиков, биохимиков, фармакологов и биологов-систематиков. До момента их обнаружения существовало мнение, что в

животном мире тритерпеновые гликозиды распространены только среди этих морских беспозвоночных, однако затем вещества с подобного типа химическими структурами были найдены в морских губках (Kitagawa et al., 1987; Kobayashi et al., 1991; Стоник, 2001; Kalinin et al., 2012).

Тритерпеновые гликозиды являются природными низкомолекулярными соединениями, химическая структура которых состоит из двух частей – тритерпенового агликона и одной или нескольких углеводных цепей, соединенных с агликоном *O*-гликозидной или ацилозидной связями. В качестве агликона в тритерпеновых гликозидах могут присутствовать хедерагенин, гипсогенин, олеаноловая либо эхиноцистовая кислоты и ряд других тритерпенов. По химическому строению тритерпеновых агликонов гликозиды относят к различным рядам, например: урсановому, олеановому, лупановому, гопановому, даммарановому, ланостановому и некоторым другим (Деканосидзе и др., 1982, 1984; Shibata, 1985; Stonik, 1986). В большинстве случаев тритерпеновые гликозиды голотурий имеют агликоны ланостановой природы с 18(20)-лактоном, в основе структуры которых лежит голостан, поэтому они относятся к голостановому ряду соответственно (Habermehl, Volkwein, 1971). Однако, начиная с конца 90-х годов прошлого столетия, благодаря интенсивным поисковым структурным исследованиям в голотуриях стали обнаруживать и новые структурные типы агликонов (Калинин и др., 1989; Авилов и др., 1991а, б).

Углеводная цепь тритерпеновых гликозидов голотурий может быть либо линейной, либо разветвленной. В свою очередь в состав углеводных цепей могут быть включены от двух до шести различных моносахаридных остатков (пентоз и гексоз) и от одной до трех сульфатных групп. Обычно моносахаридный состав включает D-ксилозу, D-хиновою, D-глюкозу, 3-*O*-метил-D-глюкозу и 3-*O*-метил-D-ксилозу (Еляков, Стоник, 1986). Некоторые гликозиды содержат в своем составе остатки органических кислот, таких как ангеликовая, тиглиновая, коричная, уксусная и ряд других, которые этерифицируют преимущественно агликон (Basu, Rastogi, 1967; Shibata, 1985; Stonik, 1986). Химическая структура одного из первых тритерпеновых гликозидов голотурий голотурина А с установленной полной структурой представлена на рисунке 2.

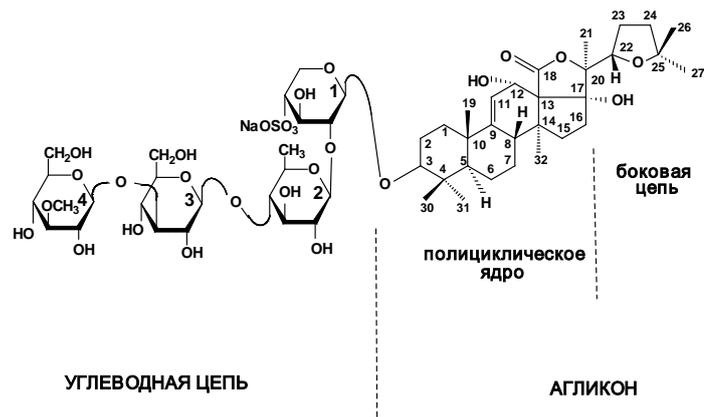


Рис. 2. Структура голотурина А из голотурии *Holothuria leucospilota* (Kitagawa et al., 1981). Позиционные номера в агликоне соответствуют конкретным атомам углерода. Номера в углеводной цепи, присоединенной к С-3 агликона, обозначают положения моносахаридных остатков относительно агликона. 1 – остаток ксилозы, сульфатированной по положению С-4; 2 – остаток хиновозы (6-дезоксиглюкозы); 3 – остаток глюкозы; 4 – остаток 3-О-метилглюкозы. Все моносахаридные остатки относятся к D-ряду, находятся в пиранозной форме, и имеют β -конфигурации гликозидных центров

Гликозиды голотурий являются чрезвычайно удобной моделью для изучения биохимической эволюции и структурно-функциональных отношений природных соединений. Они имеют сложное строение, поскольку биосинтезируются как из углеводных, так и тритерпеновых предшественников и варьируют по многим относительно независимым признакам: числу, положению и природе моносахаридных остатков, числу и положению сульфатных групп в углеводных цепях, а также по числу и расположению двойных связей, гидроксильных, ацетатных и других функциональных групп в агликонах. Благодаря исследованиям Калинина В.И. и соавторов, эти биохимические признаки стали служить и своеобразными дополнительными таксономическими маркерами при определении более точного систематического положения животных и их родственных связей в том или ином таксоне (Калинин и др., 1990; Калинин и Стоник, 1990; 1991; Калинин, 1992; Kalinin et al., 1992; Kalinin, Stonik, 1996; Stonik et al., 1999; Kalinin et al., 2015). Для изучения биохимической эволюции авторами были применены понятия эволюционной морфологии на молекулярном уровне. С помощью концепции системно-теоретического (холистического) подхода Ван-дер-Клауве-Даллемайера, используемого для моделирования структурно-функциональных отношений гликозидов, для многих гликозидов были представлены сетевые диаграммы структурно-функциональных связей, хорошо согласующиеся с экспериментальными данными и показывающие очень сложное и гибкое действие естественного отбора на структурные фрагменты гликозидов (Kalinin, 2000).

Тритерпеновые гликозиды голотурий характеризуются проявлением разнообразной биологической активности. Для них описаны, прежде всего, гемолитические, цитотоксические и противогрибковые свойства (Stonik, Elyakov, 1988). С древних времен сами животные и препараты на их основе применяют в качестве целительных средств в традиционной восточной медицине, причем их лечебные свойства связывают с тритерпеновыми гликозидами (Левин, 1982; 2000; Анисимов, 1987). К настоящему времени опубликовано большое количество обширных научных обзоров, посвященных описанию биологической активности тритерпеновых гликозидов голотурий (см. например, Анисимов, 1987; Анисимов, Чирва, 1980; Bakus, 1968; Burnell, ApSimon, 1983; Стоник, Еляков, 1986; Левин, 1989; Kalayani et al., 1988; Kalinin et al., 1996a; Chludil et al., 2003; Bahrami and Franco, 2016).

Однако, в последние годы усилия химиков, биохимиков и фармакологов сосредоточены в основном на исследовании иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств гликозидов, как наиболее привлекательных и перспективных для использования гликозидов в качестве лекарственных средств. В связи с этим в настоящем обзоре литературы основное внимание будет уделено иммуномодулирующей и противоопухолевой активности тритерпеновых гликозидов с упором на установленные молекулярные механизмы действия. Информация о других видах биологической активности тритерпеновых гликозидов дается в сжатом виде с целью создать представление о полном спектре фармакологических свойств этих природных соединений.

1.2. Ихтиотоксичность и общая токсичность

Одним из наиболее ранних задокументированных наблюдений проявления биологической активности тритерпеновых гликозидов голотурий является описание их ихтиотоксичности. Хорошо известно, что коренное население Гуама и других регионов тропической зоны Тихого и Индийского океанов использовало некоторые виды голотурий для обездвиживания и ловли рыбы в мелких морских лагунах, образующихся во время отлива. В качестве таких средств рыболовства использовали в основном голотурии *Bohdschia argus* и *Holothuria atra*. Эти наблюдения привели к исследованию, прежде всего, ихтиотоксических свойств водных экстрактов голотурий по отношению к морским обитателям (Nigrelli, 1952; Yamanouchi, 1955; Nigrelli, Jakowska, 1960). Скрининг биологической активности позволил установить наличие ихтиотоксических веществ в 30 видах морских огурцов, принадлежащих к четырем различным отрядам (Yamanouchi, 1955; Nigrelli, Jakowska, 1960), причем экстракты из голотурий *Actinopyga agassizi* (Friess

et al., 1959) и *Holothuria leucospilota* (= *H. vagabunda*) (Yamanouchi, 1955) были исследованы одними из первых. Установлено, что водные экстракты этих голотурий содержат фракции гликозидов, получивших название «голотурин». На основании проведенного гистологического анализа было сделано заключение, что гибель рыб под воздействием фракций гликозидов наступает в результате повреждения и разрушения капилляров кровеносной системы в жабрах.

Впоследствии были определены летальные дозы «голотурина» для целого ряда различных животных, включая дождевых червей, лягушек и мышей. ЛД₅₀ для мышей через 24 часа после введения «голотурина» были 0,75; 70 и 400 мг/кг при внутривенном, подкожном и пероральном способах введения соответственно (Yamanouchi, 1955). В более поздний период была определена острая токсичность фракции гликозидов экстракта кукумарии *Cucumaria japonica*, названной «кукумариозид». Для мышей ЛД₅₀ составила 10 мг/кг при внутрибрюшинном способе введения (Поликарпова и др., 1990).

1.3. Мутагенная активность

Изучение мутагенной активности тритерпеновых гликозидов голотурий не носит систематического характера; в этой области существуют лишь единичные исследования. Так, например, было установлено, что «голотурин» ряда тропических голотурий, обитающих в филиппинских водах и относящихся к семейству Holothuriidae, проявляет невыраженную генотоксическую активность, незначительно увеличивая число хромосомных aberrаций у грызунов, выявляемых в микроядерном тесте. В то же время в классических тестах *in vitro* (гес-анализ и тест Эймса) какая-либо мутагенная активность «голотуринов» не обнаружена (Pascidio, 1983). Еще в одном цитогенетическом исследовании мутагенных свойств гликозидов голотурий было установлено полное отсутствие мутагенной активности смеси тритерпеновых гликозидов «кукумариозид» из кукумарии *C. japonica* (Поликарпова и др., 1990).

1.4. Гемолитическая активность

При исследовании биологической активности гликозидов голотурий на клетках теплокровных животных Нигрелли и Яманучи впервые показали, что гликозидная фракция «голотурин» вызывает гемолиз эритроцитов кролика, причем эффективность гемолитического действия «голотурина», оцениваемая по гемолитическому индексу, была почти в 7 раз больше, чем у «сапонина», представляющего собой смесь тритерпеновых гликозидов растительного происхождения. (Yamanouchi, 1955; Nigrelli, Jakowska, 1960; Thron, 1964). Гемолитическое действие «голотурина» наблюдали не

только в экспериментах *in vitro* при тестировании препарата в суспензии эритроцитов, но и *in vivo* после введения препарата в лимфатические сосуды лягушки *Rana pipiens*. В этом случае наблюдаемый гемолиз сопровождался интенсификацией кроветворной активности (Jakowska et al., 1958).

Было установлено, что гемолитическая активность различных гликозидных фракций различается в зависимости от видов голотурий, из которых эти фракции получены. Так, при исследовании гликозидных фракций из обитающих в филиппинских водах голотурий *H. fuscocinerea*, *H. pulla*, *A. lecanora* и *Opheodesoma grisea* было показано, что степень гемолиза эритроцитов, вызываемого этими фракциями, не одинакова. Наименьшим гемолитическим индексом отличалась гликозидная фракция из голотурии *O. grisea* (Poscidio, 1983).

Наличие коллекции индивидуальных тритерпеновых гликозидов и их производных с установленной химической структурой позволило исследователям (Kalinin et al., 1992) провести детализированное изучение взаимосвязи между структурой и гемолитической активностью этих соединений. В анализе участвовала большая серия гликозидов из голотурий отряда Dendrochirotida: кукумариозиды G₁, G₂ и H и их производные из голотурии *Eupentacta fraudatrix*, фрондозид А из *C. frondosa*, кукумариозид А₄-2 и его производные из *C. japonica*. Установлено, что, в зависимости от химической структуры, полумаксимальная гемолитическая активность данных соединений (EC₅₀) варьировала от 0,10×10⁻⁶М до 1,12×10⁻⁵М. Обнаружено, что степень гемолиза, вызываемого гликозидами, определяется как химической структурой агликоновой части молекулы, так и углеводной цепи, и имеет довольно сложную зависимость. Прежде всего, одним из ключевых требований для проявления активности является наличие 18(20)-лактона в агликоне. В структуре углеводной цепи важными показателями в проявлении высокой гемолитической активности является присутствие линейного тетрасахаридного фрагмента. Например, пентасахаридные производные (пентазиды) с разветвлением у второго моносахаридного остатка менее активны, чем тетраозиды.

Достаточно сложное влияние на гемолитическую активность гликозидов из голотурий рода Dendrochirotida оказывают сульфатные группы. Так, присутствие сульфатной группы при С-4 первого остатка ксилозы является несущественным в проявлении активности, в то время как десульфатирование при первой ксилозе биозидов существенно снижает степень гемолиза, вызываемого такими гликозидами. Более детальное исследование роли сульфатных групп в проявлении гемолитических свойств было проведено для другой группы гликозидов, выделяемых из голотурий рода Dendrochirotida: псолусозида А из *Psolus fabricii* и его десульфатированного

производного, кукумариозидов A₂-2, A₆-2, A₃, A₇-1, A₄-2, A₇-3 и ряда их десульфатированных производных из голотурии *C. japonica* (Kalinin et al., 1996b). Благодаря исследованиям этого коллектива, в которых анализ кинетики гемолиза сопровождался оценкой выхода K⁺ из эритроцитов мыши, было выяснено, что присутствие сульфатной группы в различных моносахаридных остатках может приводить к различной активности:

– наличие С-4 у первой ксилозы разветвленных пентаозидов, имеющих 3-О-метильную группу в терминальной части моносахаридного остатка, приводит к увеличению гемолитической активности;

– наличие сульфатных групп в аналогичных гликозидах, не имеющих 3-О-метильной группы, приводит к обратному эффекту, выражающемуся в существенном снижении гемолитической активности;

– наличие сульфатной группы при С-6 концевого остатка 3-О-метилглюкозы значительно снижает активность и показатели гемолиза и уровня выхода K⁺;

– присутствие сульфатной группы при С-6 третьего моносахаридного остатка также уменьшает гемолитическую активность, однако заметно увеличивает скорость выхода K⁺.

Кроме того, было установлено, что отсутствие 16-кетогруппы в агликоне у гликозидов с 7(8)-двойной связью приводит к резкому увеличению проницаемости мембран эритроцитов для ионов калия, сопровождающегося существенным возрастанием гемолиза.

1.5. Противогрибковая активность

На начальных этапах исследования противомикробной активности тритерпеновых гликозидов голотурий было установлено, что эти соединения неэффективны в отношении бактерий и микобактерий (Shimada, 1969). В то же время, в достаточно большом количестве исследований было установлено, что эти соединения ингибируют рост различных патогенных грибов в микрограммовых концентрациях.

Так, было показано, что гликозидные фракции из голотурий *Apostichopus* (= *Stichopus*) *japonicus* («голотоксин»), гликозидные фракции из голотурий рода *Bohadshia*, *Holothuria*, *Actinopyga*, *Stichopus*, *Thelenota* и *Eupentacta* (= *Cucumaria*) *fraudatrix* и *Cucumaria japonica* ингибируют рост различных патогенных грибов в микрограммовых концентрациях в диапазоне 2,5–16 мкг/мл (Shimada, 1969; Kuznetsova et al, 1982; Анисимов и др., 1979; Anisimov et al., 1973; Анисимов, Чирва, 1980; Щеглов и др., 1979; Батраков и др., 1989)

В период с 1985 по 2000 годы была исследована противогрибковая активность таких индивидуальных гликозидов и их производных из семейства Stichopodidae, как стихопозиды А, С, D и E из голотурии *Stichopus chloronotus*, теленотозиды А и В из *Thelenota ananas*, голотоксин А₁ и три его производных из А. (=Stichopus) *japonicas*, голотоксин В₁; десульфатированное производное голотурина А из *H. leucospilota*, десульфатированное производное эхинозида А из *Actinopyga echinites*, производное десульфатированного эхинозида А, десульфатированное производное 24-дегдроксиэхинозида А из А. *Agassizi*, стихлорозид С₂ из *Stichopus chloronotus*, бивиттозид В из *Bohadschia bivittata*, десульфатированные первикозид В и первикозид С и десульфатированное производное первикозида А из *H. pervicax*, производные голотоксина А₁ из А. (=S.) *japonicas*, бивиттозиды А, С, и D из *B. Bivittata*, эхинозиды А и В и ряд их производных из А. *echinites* (Мальцев и др., 1985; Kitagawa, 1988; Kitagawa et al., 1985; 1989), кукумехинозиды А, В, С, D, E и F, ряд их десульфатированных производных и два агликона из голотурии *C. echinata* (Miyamoto et al., 1990), патагоникозид А и его десульфатированное производное из голотурии *Psolus patagonicus* (Murray et al., 2001), гемоидемозиды А и В и их десульфатированные производные из *Hemoidema spectabilis* (Chludil et al., 2002) и ряд других. В качестве тест-культур использовался довольно широкий набор различных видов грибов, включающий *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citricum*, *Mucor spinescens*, *Cladosporium herbatum*, *Cladosporium cucumerinum*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Torula utilis*, *Hormodendron pedrosol*, *Trychophyton mentagraphytes*. Было найдено, что минимальные ингибирующие концентрации варьировали в диапазоне от нескольких микрограмм на миллилитр до 100 мкг/мл в зависимости от структуры гликозида и вида грибов.

Благодаря относительной простоте биотестирования и интерпретации полученных данных исследователи практически сразу стали отмечать зависимость противогрибковой активности от химической структуры тритерпеновых гликозидов. При изучении этих веществ многие авторы сделали заключение о том, что для проявления противогрибковой активности важны как структура агликона, так и структура углеводной цепи, как это было замечено при изучении гемолитических свойств этих веществ. Так, для проявления активности голотоксина А₁ важно наличие 18(20)-лактона, поскольку не имеющее лактон производное голотоксина А₁ было полностью неактивно. Еще одним важным элементом строения агликона является присутствие, по крайней мере, одной функциональной группы, содержащей кислород, соседствующей с 18(20)-лактоном в 12, 16 позиции. Так, бивиттозид С, характеризующийся отсутствием такой функциональной группы,

практически не активен (Kitagawa et al., 1989). Кроме того обнаружено, что производное голотоксина А₁ с сульфатированным агликоном не обладает противогрибковой активностью, а биозид стихопозид А демонстрирует лишь ограниченный спектр противогрибкового действия. С другой стороны, голотоксин А₁ с 9(11)-двойной связью и 16-кетогруппой в агликоновой части был менее активен, чем стихопозид С с 7(8)-двойной связью и ацетатом при С-23. Индивидуальные агликоны практически всегда были неэффективными. Так, агликоны кукумехинозида А и С, полученные путем кислотного гидролиза, вообще не проявляли антимикробную активность (Miyamoto et al., 1990).

Многие исследователи продемонстрировали, что качественный и количественный состав углеводной цепи существенно влияет на биологические свойства гликозидов. Показано, что наличие линейного фрагмента тетрасахарида и наличие сульфатной группы при С-4 в биозидах является значимым для проявления противомикробной активности гликозидов. Увеличение количества моносахаридных остатков, как правило, не приводило к изменению активности. Так, например, активность гексаозидов не превышала таковую у тетраозидов. В то же время, свой вклад в активность приносят входящие в углеводную цепочку индивидуальные моносахариды. Так, стихопозид С и теленотозид А, содержащие хиновозу, были в 2 и 8 раз более активными, чем стихопозид D и теленотозид В, содержащие глюкозу вместо хиновозы, соответственно (Мальцев и др., 1985).

Важную роль в проявлении антигрибковой активности играют сульфатные группы, а именно, их количество и локализация. Так, только десульфатированные производные кукумехинозидов имели достоверную противогрибковую и антипротозойную активности (Miyamoto et al., 1990). Сульфатная группа при С-4 первого остатка ксилозы не оказывала влияния на активность тетраозидов, а противогрибковый эффект природных гликозидов был существенно подавлен у соединений, имеющих сульфатные группы при С-6 в глюкозе или С-6 в 3-О-метилглюкозе, или при С-2 в третьем моносахаридном остатке - ксилозе. Установлено, что патогоникозид А был более активным по сравнению с его десульфатированным производным (Murray et al., 2001). Гликозид гемоидемозид А достаточно эффективно ингибировал рост микроорганизмов, в то время как гемоидемозид В, отличающийся наличием третьей сульфатной группы при С-6 остатка 3-О-метилглюкозы, был в несколько раз менее активен. Авторы полагают, что сульфатные группы при С-4 первого моносахаридного остатка (ксилоза) и при С-6 третьего моносахаридного остатка (гликоза) вносят важный положительный вклад в проявление противогрибковой активности, в то время как сульфатная группа при С-6 терминальном моносахаридном остатке (3-О-метилглюкоза) имеет негативное влияние (Chludil et al., 2002).

1.6. Антипротозойная активность

В серии экспериментов, проведенных с тритерпеновыми гликозидами *in vitro* в отношении ряда простейших, было выявлено наличие у гликозидов антипротозойной активности. При исследовании гликозидной фракции «голотурин», получаемой из тропической голотурии прибрежных вод Багамских островов *A. agassizi*, было показано, что он активен по отношению к амебе протей *Amoeba proteus* (Nigrelli, Jakowska, 1960), а голотоксины из голотурии *A. japonicus* подавляли жизнеспособность трихомонад *Trichomonas vaginalis* (Kitagawa et al., 1976). Оказалось, что антипротозойная активность гликозидов из голотурии *C. echinata* совпадает с противогрибковой активностью этих соединений (Miyamoto et al., 1990).

Помимо тестов *in vitro* были проведены эксперименты *in vivo*, в которых у некоторых гликозидов также был зарегистрирован антипротозойный эффект. Было показано, что крысы, которым внутрибрюшинно инъецировали «голотурин» и которых одновременно или после инъекции гликозида инфицировали трипаносомами *Trypanosoma lewisi*, оказались менее поражены паразитами по сравнению с контрольными животными (Styles, 1970). Однако наиболее значительный уровень подавления инфекции наблюдался у животных, которым гликозид вводили до инъекции трипаносом. В другой серии экспериментов с мышами, инфицированными трипаносомами *Trypanosoma duttoni*, эти данные были полностью подтверждены (Sen, Lin, 1975; 1977).

1.7. Нейротоксические свойства

Практически все научные исследования, связанные с изучением нейротоксических свойств гликозидов голотурий, были проведены с использованием гликозидной фракции «голотурин». В работах Фрисса с соавторами (Thron et al., 1964; Friess et al., 1965) было показано, что голотурин А необратимо блокирует нервно-мышечную передачу в седалищных нервных волокнах лягушки и нервах, иннервирующих диафрагму крысы и кошки. По эффективности действия эффект голотурина А оказался сопоставим с такими блокаторами, как прокаин, физостегмин и кокаин, но его действие было необратимо при концентрации 10^{-5} М. Этот препарат блокировал эффект подергивания в случае прямого стимулирования мышц и непрямого стимулирования нерва. В более низких концентрациях (10^{-7} М) это влияние становилось обратимым (Thron et al., 1964; Friess et al., 1965). Эти же авторы провели сравнительное исследование нейротоксического действия голотурина А и его десульфатированного производного (Friess et al., 1967; 1968; 1970; 1972). При действии на различные периферические нейромускульные рецепторы оба

вещества вызывали необратимую инактивацию возбуждения в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. Причем действующая концентрация голотурина А была на порядок ниже, чем у его десульфатированного производного (Friess et al., 1970; 1972).

Влияние «голотурина» на мембранный потенциал и мембранную проводимость аксона гигантского кальмара было изучено в работах Де Груфа и Нарахаша (De Groof, Narahashi, 1976). Действие этого препарата на внешнюю сторону интактного аксона при концентрации 2×10^{-4} М вызывало необратимую деполяризацию, в то время как мембранный потенциал приближался к нулю. Был предложен вероятный механизм деполяризации мембран, основанный на вызываемом гликозидом увеличении проницаемости мембран для Na^+ .

Установлено, что «голотурин» (2×10^{-4} М) необратимо блокировал ответ в стимулированных клеточных препаратах электрического угря *Electrophorus electricus* (Dettbarn et al., 1965), а также вызывал необратимую деполяризацию клеточных мембран. Такое действие гликозида на потенциал покоя авторы объяснили влиянием на трансмембранный перенос ионов K^+ . В свое время Руггьери и Нигрелли (Ruggieri, Nigrelli, 1974) отметили, что голотурин А увеличивает время проводимости через атриовентрикулярный узел и уменьшает скорость спонтанно сокращающихся клеток Пуркинье. В связи с этим авторы предложили применять голотурин А для воздействия на синусный узел в случае аритмии и тахикардии.

Для производного гризеогенина (вероятно голотурин A_1) из голотурии *H. floridana* была показана выраженная дозозависимая гипотермическая активность (Kaul, Daffari, 1986). Механизм этой активности не изучали, однако существует предположение, что гипотермия может быть связана с мембранотоксическими свойствами гликозидов и их деструктивным влиянием, наблюдаемом на возбуждаемых нервах и тканях (Verbist, 1993).

1.8. Взаимодействие с биологическими мембранами

Ингибирование Na^+, K^+ -АТФазы

На начальном этапе исследования молекулярных механизмов цитотоксического действия тритерпеновых гликозидов усилия исследователей были сосредоточены на поиске мембранных мишеней. Ряд авторов связывал высокую цитотоксическую активность тритерпеновых гликозидов голотурий с влиянием гликозидов на различные ферментные комплексы, входящие в состав клеточных мембран, и с изменением проницаемости мембран при действии гликозидов.

В серии работ Горшковой и Горшкова (Gorshkov et al., 1982; Gorshkova et al., 1989a, 1989b, 1999, 2000) было установлено, что ряд тритерпеновых гликозидов голотурий

способен ингибировать активность некоторых мембранных ферментов, главным образом АТФаз. Например, было показано, что бивиттозиды А и В, голотурины А и А₂, кукумариозиды А₂₋₂ и G₁, стихопозид С, апостихопозид С, теленотозид А и голотоксины А₁ и В₁ в концентрациях порядка 10⁻⁴ М необратимо ингибируют Na⁺-K⁺-АТФазу микросомальной фракции мозга крыс на 40–60%. В этих же работах была обнаружена зависимость эффективности ингибирующего действия гликозидов от их химической структуры. Так, стихопозиды D и E, и теленотозид В, у которого отсутствует хиновоза в качестве второго моносахаридного остатка, обладали существенно более низкой активностью, ингибируя активность Na⁺-K⁺-АТФазы только на 19–27%, а голотурин А₁, содержащий гидроксильную группу в боковой цепочке агликона, ингибировал активность фермента только на 16%. Кроме того, эти соединения оказывали существенное влияние на липидное окружение фермента, резко меняя микровязкость биомембран. Было высказано предположение, что механизм ингибирования активности фермента связан со способностью гликозидов образовывать комплексы с холестерином в липидном окружении АТФазы, что приводит к изменению конформации соответствующих белков.

Было обнаружено (Gorshkova et al., 1999), что псолюсозиды А и В из голотурии *Psolus fabricii* ингибируют Na⁺-K⁺-АТФазу в микромолярном диапазоне концентраций со значениями IC₅₀ 1-3×10⁻⁴ М. Были найдены различия во влиянии этих двух гликозидов на функционирование Na⁺-K⁺-АТФазы. Так, псолюсозид А стимулировал связывание [³H]-АТФ с ферментом, незначительно увеличивал связывание [³H]-уабаина и ингибировал K⁺-фосфатазную активность, в то время как псолюсозид В, напротив, уменьшал связывание [³H]-АТФ с Na⁺-K⁺-АТФазой, не влиял на связывание [³H]-уабаина и также ингибировал K⁺-фосфатазную активность. Авторы объясняют значительную разницу в активности псолюсозидов их химической структурой, разницей в сродстве к мембранному холестерину и способностью формировать гликозид-стериновый комплекс. Действительно, было показано, что псолюсозид А в концентрации 1×10⁻⁶ М вызывает быстрый выход K⁺ из эритроцитов человека, тогда как псолюсозид В оказался не эффективным даже в концентрации 1×10⁻⁵ М.

Детальное исследование ингибирующей активности некоторых тритерпеновых гликозидов голотурий в отношении активности Na⁺-K⁺-АТФазы было описано группой Китагавы (Kitagawa et al., 1985). При изучении ингибирующей активности эхинозида А (голотурин А₂) и его производных было установлено, что отсутствие сульфатной группы и уменьшение числа моносахаридных остатков в гликозиде резко снижает его активность. Кроме того было показано, что большой ряд изученных тритерпеновых гликозидов оказывал существенное влияние на липидное окружение фермента, резко меняя

микровязкость биомембран, что также имело выраженное влияние на функционирование АТФазы. Так, было установлено, что в достаточно низких концентрациях порядка 10^{-7} М индивидуальный голотурин A_1 из голотурии *H. grisea* и серия гликозидов из кукумарии *C. japonica* ингибируют активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула скелетной мышцы кролика без заметного изменения проницаемости мембран. Авторы этого исследования сделали заключение о том, что снижение ферментативной активности связано с взаимодействием гликозидов с белковыми компонентами мембран саркоплазматического ретикулула или с липидами ближайшего окружения Ca^{2+} -АТФазы (Рубцов и др., 1980).

Взаимодействие с холестерином мембран

В настоящее время существует мнение, что в основе мембранолитической активности тритерпеновых гликозидов лежит их способность взаимодействовать с компонентами биологических систем, в первую очередь, со стеринами, входящими в структуру биомембран. В результате этого взаимодействия значительно изменяются физико-химические свойства биомембран, в том числе стабильность, избирательная проницаемость и микровязкость. При этом проницаемость биомембран, содержащих стерин, увеличивается весьма значительно. Мембранные ферменты, в особенности различные АТФазы, как правило, уменьшают свою активность из-за влияния гликозидов на белок-липидные взаимодействия и вследствие прямого ингибирования их активности. Изменения в активном транспорте и образование в мембранах пор способствуют потере клетками части ионов и небольших молекул (Анисимов, 1987; Попов, 2006).

Выяснению точных молекулярных механизмов мембранолитического действия тритерпеновых гликозидов посвящено значительное количество исследований, большая часть которых была выполнена сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН. При исследовании цитотоксических свойств тритерпеновых гликозидов голотурий прежде всего было отмечено, что практически все эти соединения проявляют выраженную антимикробную активность в отношении роста культур патогенных дрожжеподобных грибов, оставаясь полностью неэффективными по отношению к культивируемым бактериям (Kuznetsova et al., 1982; Анисимов и др., 1983; Мальцев и др., 1985). Оказалось, что существует прямая зависимость между количеством стерина, содержащегося в биомембранах грибов, и эффективностью действия гликозидов. Известно, что клеточные стенки и мембраны бактерий (в отличие от биомембран дрожжеподобных грибов) не содержат стерина. Именно этим фактом ряд авторов объясняет отсутствие антибактериального эффекта тритерпеновых гликозидов (Olsen, 1973 a, b).

Эти выводы были успешно подкреплены экспериментальными работами по включению экзогенного холестерина в состав липосомальных мембран и «обогащению» стеринового состава мембран опухолевых клеток путем их слияния с такими липосомами. Обнаружено, что увеличение концентрации холестерина клеточных мембран за счет введенного экзогенного холестерина значительно увеличивало цитотоксический эффект тритерпеновых гликозидов (Попов и др., 1981). Причем уменьшение мембранотропной активности гликозидов голотурий в отношении различных биологических объектов при добавлении в инкубационную среду экзогенного холестерина является еще одним подтверждением того, что мембранотропное действие этих веществ основано на их способности образовывать комплексы со стеринами мембран.

В цикле работ Лихацкой Г.Н. и Попова А.М. были изучены молекулярные механизмы мембранолитического действия тритерпеновых гликозидов. Использование техники работы с различными биологическими и модельными липидными мембранами позволило сделать авторам однозначное заключение, что механизм действия этих веществ связан с образованием в мембранах ионопроводящих структур. Был оценен вклад различных внешних условий, таких как температура, рН, ионный состав среды, а также вид биологической модели и стеринный состав, в изменение клеточной проницаемости под действием гликозидов. Было выдвинуто предположение, что «рецепторами» тритерпеновых гликозидов в биологических мембранах являются стерины, главным образом, холестерин. Установлено, что способность природных стерinov, входящих в состав мембран животных и растительных клеток, взаимодействовать с тритерпеновыми гликозидами падает в ряду: холестерин > β -ситостерин > стигмастерин > эргостерин (Попов и др., 1983; 1984). Использование липосом и бислойных липидных мембран (БЛМ) с установленным стеринным составом позволило более детально изучить стерин-зависимые мембранолитические свойства гликозидов. Применение метода микрокалориметрии для регистрации фазовых переходов в липидах при действии гликозида на многослойные липосомы в отсутствии и присутствии холестерина в липосомальных мембранах позволило впервые установить, что один из самых эффективных мембранолитиков голотуринов А, как и другие гликозиды голотурий, способны образовывать комплекс со стеринами, входящими в состав мембран липосом (Лихацкая и др., 1985).

Формирование комплекса гликозид-холестерин было также установлено с помощью рентгеноструктурного анализа. Рентгенографические исследования комплекса тритерпеновых гликозидов голотурина А₂ и астихопозидов С со свободным холестерином показали, что происходит взаимодействие этих соединений на молекулярном уровне.

Кроме того, на рентгенограммах мембранного препарата клеток млекопитающих, обработанного гликозидами, появлялись рефлексы, идентичные рефлексам модельного комплекса гликозид-холестерин и характерные для исследуемых гликозидов. Эти эксперименты явились прямым доказательством того, что тритерпеновые гликозиды голотурий взаимодействуют с мембранным холестерином и образуют с ним комплекс в мембранах клеток (Gorshkova et al., 1989).

Было проведено систематическое изучение ион-селективных каналов и неселективных пор, образованных гликозидами различного строения в стеринсодержащих модельных и биологических мембранах. Показано, что в проявлении мембранолитической активности тритерпеновых гликозидов значительную роль играют строение агликона, степень окисленности боковой цепи и наличие различных функциональных групп в их структуре. Немаловажное значение имеют размер и строение углеводной цепи, а так же наличие сульфатных, метильных и ацетатной групп в углеводной цепи. Установлено, что механизм изменения проницаемости клеточных и модельных мембран состоит в образовании ион-селективных каналов при действии низких концентраций гликозидов и неселективных водонаполненных пор при действии высоких концентраций, а свойства ионных каналов и пор, образованных в мембранах гликозидами, находятся в прямой зависимости как от структуры самих гликозидов, так и от структуры стерина (Лихацкая, 2006; 2011).

Большой цикл работ был выполнен сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН под руководством Анисимова М.М. Было проведено масштабное изучение противомикробной, цитотоксической, гемолитической и противоопухолевой активности тритерпеновых гликозидов голостанового, β -амиринового, даммаранового и лупанового рядов. В круг исследований входило изучение влияния гликозидов на биосинтез стерина, жирных кислот, белков и нуклеиновых кислот, на проницаемость биомембран для УФ-поглощающих соединений и ионов K^+ . В качестве тест-культур использовались культуры различных патогенных бактерий и грибов, эмбрионы морских ежей, эритроциты и опухолевые клетки мыши. Было оценено влияние различных факторов (композиционный состав, значение pH и температура инкубационной среды, концентрация тестируемых клеток, время инкубирования и способы введения гликозидов) на проявление мембранотропной активности гликозидов (Аминин и др., 1990а; Анисимов, 1987; Анисимов и др., 1972; 1973; 1974; 1979; 1983; 1999; 2000; Анисимов, Чирва, 1980; Гришин, Анисимов, 1987; Мальцев и др., 1985; Стехова и др., 1998; Прокофьева и др., 1987; 1992; Шенцова и др., 1989; Anisimov et al., 1973, 1974; Anisimov, Chirva, 1980; Kuznetsova et al., 1982). Результатом этих работ стало выяснение общих закономерностей

связи между химическим строением и биологической активностью тритерпеновых гликозидов, включая и гликозиды голотурий. Были сформулированы основные принципы действия гликозидов голотурий, позволившие рассматривать тритерпеновые гликозиды голотурий в качестве модификаторов структурно-функциональных свойств биологических и модельных липидных мембран.

Основные принципы мембранотропного действия тритерпеновых гликозидов сформулированы следующим образом: в основе мембранотропного и мембранолитического действия тритерпеновых гликозидов голотурий лежит их способность взаимодействовать с 5(6)-ненасыщенными стеринами биомембран, главным образом, с холестерином, и формировать с ними ион-проводящие комплексы. Формирование таких комплексов приводит к изменению ионной проницаемости и избирательности биомембран, нарушению барьерных свойств и изменению ионного гомеостаза и осмолярности клеток. В конечном итоге, это приводит к лизису клеток и их гибели (Анисимов, 1987). Необходимым минимумом для проявления мембранолитического действия тритерпеновых гликозидов является наличие в ланостановом агликоне гликозида 18(20)-лактона и хотя бы одной кислородной функциональной группы в непосредственной близости от него. В углеводных цепях определяющим фактором является присутствие линейного тетрасахаридного фрагмента. В этом случае наиболее активными являются гликозиды, у которых хиновоза присутствует в качестве второго моносахаридного остатка (Калинин и др., 1994).

Устойчивость клеточных мембран и физиологическая активность в организме-продуценте

Сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН было проведено исследование биологической функции гликозидов голотурий в организме-продуценте. На первых этапах было проведено сравнительное изучение количественного содержания тритерпенового гликозида, голотоксина А₁, в трепанге *Stichopus (=Apostichopus) japonicus*. Было обнаружено неравномерное распределение и сезонная зависимость количественного содержания гликозида в различных органах этой голотурии. В преднерестовый период в яичниках со зрелыми яйцеклетками концентрация гликозида почти в 80 раз превышала содержание гликозида в остальных органах. Было установлено, что оплодотворенные яйцеклетки трепанга резистентны к действию мембранолитических концентраций как собственного голотоксина А₁, так и некоторых других тритерпеновых и стероидных гликозидов животного и растительного происхождения, в то время как эти гликозиды в микромолярных концентрациях блокировали деление яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и вызывали их лизис. Авторы доказали, что причиной

устойчивости клеток голотурии к голотоксину A_1 является очень низкое содержание в клетках свободных Δ^5 -стеринов и наличие сульфатированных Δ^5 -стеринов и β -ксилозидов Δ^7 -стеринов. В модельных экспериментах было продемонстрировано, что другой гликозид, кукумариозид G_1 из голотурии *E. fraudatrix*, не нарушал ионную проводимость БЛМ, сформированных из общих липидов этой голотурии, или если в состав БЛМ из яичного фосфатидилхолина входили стеринны из голотурии (Анисимов и др., 1983; Аминин и др., 1986; 1987).

Показано, что гликозиды голотурий играют важную роль в физиологии организма-продуцента, принимая участие в регуляции процессов размножения этих животных. Доказано, что голотоксин A_1 играет важную роль в гаметогенезе, синхронизируя мейотическое созревание ооцитов голотурий. Голотоксины ингибируют спонтанное созревание (мейоз) ооцитов, блокируя в них транспорт Ca^{2+} , осуществляя тем самым функцию половых гормонов созревания (Аминин, 1988; Аминин, Анисимов, 1987; 1990а; Аминин и др., 1990б; Aminin, Anisimov, 1992).

Другая биологическая роль, приписываемая тритерпеновым гликозидам голотурий, связана с функцией химической защиты, выражающейся в предохранении животных-продуцентов от рыб и других хищников вследствие высокой ихтиотоксичности гликозидов (Frey, 1951; Nigrelli, 1952; Yamanouchi, 1955). Недавно с помощью методов MALDI-MS и MALDI-IMS было показано, что голотурия *H. forskali* содержит порядка 26 тритерпеновых гликозидов, локализованных главным образом в эпидермисе и мезотелии стенки тела животного. В тот момент, когда голотурии подвергались внешнему раздражению (стрессу), эти соединения высвобождались в окружающую среду, причем в воде детектировали только три гликозида - голотуринозид С и F, и десголотуриин А в очень незначительных количествах по сравнению с их концентрациями в стенке тела и кювьеровых органах. Поскольку в таких концентрациях гликозиды не представляли угрозы для жизни хищных обитателей моря, авторами было высказано предположение об отпугивающей роли гликозидов, сигнализирующих хищникам и предупреждающих их об опасности отравления в случае поедания тканей голотурии (van Dyck, 2010; 2011).

Однако в 2013 г. в научном журнале Scientific Reports появилась публикация под названием «Когда репеллент становится аттрактантом: опасные сапонины являются кайромонами, привлекающими симбиотических крабов-арлекинов (When a repellent becomes an attractant: harmful saponins are kairomones attracting the symbiotic Harlequin crab). В статье приводятся данные, что продуцирующие цитотоксические сапонины голотурии *Bohadschia subrubra*, *Bohadschia vitiensis*, *H. scabra* и *H. lesson* колонизированы многочисленными симбиотическими организмами, среди которых одним из самых

известных в Индо-Пацифике является краб-арлекин *Lissocarcinus orbicularis*. Бельгийские исследователи убедительно продемонстрировали, что выделяемые голотуриями сапонины являются привлекающими кайромонами, которые распознаются крабами и обеспечивают симбиоз этих животных с голотуриями. Практически все 14 разнообразных тритерпеновых гликозидов, выделенных из вышеперечисленных голотурий, оказались привлекательными для крабов в их поисках организма-хозяина. Более того, даже гликозиды из голотурии *H. forskali* воспринимались крабами-арлекинами как аттрактанты, несмотря на то, что данная голотурия встречается территориально только в восточной части Атлантического океана и в Средиземном море, что полностью исключает контакт этих двух видов животных (Caulier et al., 2013).

1.9. Взаимодействие с рецепторами

Несмотря на установление роли холестерина мембран клеток в качестве основной мишени для проявления цитотоксической активности тритерпеновых гликозидов, был предпринят поиск клеточных рецепторов, принимающих участие в формировании ответа клеток на физиологическое действие этих соединений. В ряде исследований было показано, что некоторые растительные тритерпеновые гликозиды даммаранового ряда, в частности, гликозиды женьшеня и моногликозиды протопанаксадиола, не способны формировать комплексы со стеринами, а их взаимодействие с клетками не является холестерин-зависимым. Агликоны этих соединений характеризуются практическим отсутствием взаимодействия с гидрофобной липидной областью биомембран, а нарушение проницаемости мембран под действием этих гликозидов незначительно в сравнении с действием гликозидов, например, голостанового ряда. В связи с этим, некоторые авторы, основываясь на структурном подобии между данными гликозидами и стероидными гормонами глюкокортикоидного типа, высказали предположение о возможном взаимодействии растительных гликозидов даммаранового ряда со стероидными рецепторами клеток. С этим взаимодействием авторы связывают физиологические эффекты, проявляемые, например, панаксазидами (Odashima et al., 1985; Lee et al., 1993; Попов и др., 1994).

Во время исследований противовирусной активности двух гликозидов из голотурии *Telenota ananas*, один из которых идентифицировали как бивиттозид D, был проведен анализ связывания данных гликозидов с хемокиновыми рецепторами CCR5 и CXCR2 типа, являющимися сопряженными с G-белком рецепторами. Данные рецепторы экспрессируются в иммунных клетках (преимущественно, Т-клетках, макрофагах, нейтрофилах, дендритных клетках и клетках микроглии) и широко используются в

фармакологическом скрининге при поиске соединений, обладающих противовирусной (анти-ВИЧ-1) активностью, поскольку вирусы СПИДа проникают в клетки-мишени благодаря связыванию с хемокиновыми рецепторами данных типов. Было показано, что исследуемые гликозиды в микромолярных концентрациях способны селективно ингибировать функциональную активность хемокиновых рецепторов. Так, оба гликозида эффективно ингибировали активность CCR5 рецептора в диапазоне концентраций 5-30 мкМ, в то время как по отношению к CXCR2 рецептору гликозиды были практически не активны даже в концентрации 50 мкМ. Это свидетельствует о селективном воздействии исследуемых гликозидов на определенный тип хемокиновых рецепторов (CCR5) (Hegde et al., 2002).

При исследовании механизмов противоопухолевого действия фрондозид А из голотурии *C. frondosa* в отношении клеток рака молочной железы человека было установлено, что антимитотическая активность данного гликозида сопряжена с ингибированием рецепторов простагландина E2 (PGE2). Оказалось, что фрондозид А в низких микромолярных концентрациях способен модулировать функции данных рецепторов, выступая в качестве антагониста, вытесняя простагландин E2 из мест его связывания с простагландиновыми рецепторами EP4 и EP2 типа. Известно, что синтез больших количеств PGE2 во многих типах опухолей за счет увеличения активности циклооксигеназы-2 (цог-2) приводит к усилению злокачественного роста и метастазированию. В связи с этим авторы работы указывают на перспективность использования фрондозид А как селективного блокатора простагландиновых рецепторов для подавления образования метастазов у онкологических больных (Ma et al., 2012).

Поскольку одной из возможных физиологических функций, проявляемых тритерпеновыми гликозидами в организмах-продуцентах, считается роль репеллентов и средств химической защиты, был проведен ряд исследований в поисках молекулярных сенсоров у морских животных, реагирующих на присутствие тритерпеновых гликозидов в окружающей среде. Благодаря этим исследованиям в рыбах *Danio rerio* (зебрафиш) был обнаружен, идентифицирован и затем клонирован в ооцитах шпорцевой лягушки рецептор, получивший название RL-TGR (RAMP-like triterpene glycoside receptor), который является у рыб молекулярным сенсором на тритерпеновые гликозиды, присутствующие в окружающей среде. Было доказано, что один из представителей тритерпеновых гликозидов морского происхождения, формозид, синтезируемый в морской губке *Erylus formosus*, способен селективно связываться с RL-TGR рецептором. В свою очередь, это ведет к ассоциированию RL-TGR рецептора с другим G-белок-управляемым рецептором (GPCR), что приводит к существенному модулированию

активности RL-TGR. Сигнальный путь, который инициируется при этом взаимодействии, вызывает возникновение сильного физиологического стрессорного сигнала, вызывающего отпугивание хищника от поедания губок, продуцирующих тритерпеновые гликозиды (Cohen, 2008; 2010).

1.10. Иммуномодулирующая активность

Несмотря на широкий спектр биологической активности тритерпеновых гликозидов, эти соединения представляют большой интерес с точки зрения их влияния на иммунную систему. С древних времен голотурии (или морские огурцы) используются в традиционной восточной медицине для усиления устойчивости человека к различным заболеваниям (Bordbar, Anwar and Saari, 2011).

Наибольший прогресс в изучении иммуномодулирующих свойств гликозидов был достигнут при исследовании гликозидов (сапонинов) растительного происхождения. Одним из первых растений, которое привлекло внимание исследователей, было мыльное дерево *Quillaja saponaria*, которое является богатым источником тритерпеновых гликозидов. Сапонины из этого дерева использовали в течение многих лет в качестве адъювантов для ветеринарных вакцин. Наиболее широко используемые адъюванты называются Quil A и представляют собой очищенную фракцию сапонинов из мыльного дерева. Уникальная способность Quil A, а также другого выделенного и очищенного сапонина QS-21, стимулировать как Th1-опосредованный иммунный ответ, так и продукцию цитотоксических Т-лимфоцитов против экзогенных антигенов, сделала их идеальными соединениями для использования в вакцинах, направленных против внутриклеточных патогенов, а также для терапевтических противораковых вакцин. Например, Quil A был использован для приготовления иммуностимулирующего комплекса ISCOM, эффективного в отношении ряда вирусов, включая вирус кошачей лейкемии и ВИЧ (Rajput et al., 2007). Фактически, существует целая серия коммерческих ветеринарных вакцин, а также вакцин для человека, приготовленных с использованием этого адъюванта. Часть этих вакцин в настоящее время проходит клинические исследования.

Среди других растений, содержащих гликозиды, которые были тщательно исследованы иммунологами, были женьшень (*Panax notoginseng*), астрагал (*Astragalus membranaceus*, *A. oleifolius*), ряд растений семейства Бобовые (акация *Acacia victoriae*, соя *Glycine max* (L.) Merr.) и некоторые другие. Обширные фитохимические и фармакологические исследования женьшеня доказали, что сапонины даммаранового ряда являются главными биологически активными соединениями в этом растении. Гликозиды

даммаранового ряда из *P. notoginseng* представлены протопанаксадиолом и протопанаксатриолом. Было доказано, что гликозиды из женьшеня проявляют слабовыраженный гемолитический эффект, но значительно усиливают продукцию специфических антител и клеточный ответ на овальбумин у мышей, причем более эффективно, чем препарат Quil A. Корни травянистого растения *Achyranthes bidentata*, хорошо известного в традиционной китайской медицине, содержат сапонины и обладают иммуностимулирующими свойствами. Гликозиды из *A. bidentata*, являющиеся слабыми гемолитиками, способны модулировать иммунные ответы у мышей, значительно увеличивая титры специфичных к овальбумину антител. Авицины, представляющие собой семейство тритерпеноидных сапонинов из акации *A. victoriae*, являются новым классом растительных метаболитов, способных усиливать адаптацию к стрессу и подавлять провоспалительные компоненты врожденной иммунной системы в клетках человека, одновременно регулируя в них окислительно-восстановительные реакции. Было обнаружено, что гликозиды из сои проявляют высокую адъювантную активность, в то время как группа соясапогенолов практически не активна. Более подробную дополнительную информацию об иммуномодулирующих свойствах сапонинов растений можно найти в ряде обширных научных обзоров, посвященных этой теме (Cheeke, 1999; Francis et al., 2002; Sun et al., 2006; Rajput et al., 2007).

В то же время систематизированные данные об иммуномодулирующих свойствах тритерпеновых гликозидов голотурий и их влиянии на иммунную систему животных и человека практически отсутствуют или слабо представлены в научной литературе. В данном разделе обобщены последние сведения об иммуномодулирующей активности тритерпеновых гликозидов голотурий, предшествующие нашему исследованию, и описаны некоторые аспекты их молекулярного механизма (механизмов) действия.

Первые упоминания о стимулирующем влиянии некоторых гликозидов голотурий на функции клеток иммунной системы относятся к 60–70-м годам прошлого столетия. Одним из первых исследованных в этой области гликозидов был так называемый «сырой» голотурин, представляющий собой смесь тритерпеновых гликозидов из тропической голотурии *A. agassizi*. В случае применения «сырого» голотурина в низких концентрациях (0,1–6,0 мкг/мл) наблюдалось стимулирование миграции лейкоцитов, индукция фагоцитоза бактерий *Staphylococcus aureus* полиморфноядерными лейкоцитами человека, по аналогии с действием сывороточного фактора, и активирование гемопоэза в костном мозге лягушки (Nigrelli and Jakowska, 1960; Lasley and Nigrelli, 1970).

Хорошо известно, что тритерпеновые гликозиды голотурий сами по себе не проявляют антибактериальной активности (Shimada, 1969). В то же время было показано,

что гликозиды голотурий обладают выраженным противогрибковым действием (Батраков и др., 1980). В цикле работ Седова с соавторами (Седов и др., 1984а, б, в; 1988; 1990а, б) было продемонстрировано, что гликозиды из кукумари японской *C. japonica* значительно увеличивают иммунный ответ у животных в отношении бактериальных инфекций, вызванных различными патогенными микроорганизмами. Например, было установлено, что смесь кукумариозидов проявляет неспецифическое антибактериальное действие по отношению к целому ряду бактерий, таких как *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* и *Neisseria* после внутрибрюшинной инъекции инфицированным мышам. Этот эффект был частично опосредован увеличением фагоцитарной активности макрофагов, киллинга и способности к перевариванию, которые, по меньшей мере, удваивались через 7–14 дней после внутрибрюшинного введения смеси этих гликозидов в дозе 0,03 мг/мышь. При введении мышам кукумариозида за две недели до их инфицирования сальмонеллами *Salmonella typhimurium* наблюдалось заметное повышение сопротивляемости животных к бактериальной инфекции, а в случае инфицирования мышей штаммом бактерий *S. minnesota* SF III внутрибрюшинная инъекция кукумариозида приводила к увеличению более чем в 4 раза показателя полуэффективной летальной дозы (ЛД₅₀) для этих сальмонелл. Было обнаружено, что однократное внутрибрюшинное введение кукумариозида предотвращало гибель мышей в случае их экспериментального инфицирования летальными количествами бактерий *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*, что сопровождалось ускорением элиминации возбудителей заболевания, существенным уменьшением проявления цитопатогенного действия бактерий на макрофаги и активизацией системы мононуклеарных фагоцитов. Из всех гликозидов кукумари японской кукумариозид А₂-2 был признан самым эффективным: его внутрибрюшинное введение приводило к увеличению в несколько раз (до 6 раз) количества макрофагов. В то же время внутрибрюшинная инъекция смеси моносulfатированных гликозидов приводила к увеличению количества макрофагов только в 2–2,5 раза, в то время как применение ди- и(или) трисульфатированных гликозидов существенно сокращало их количество (в случае трисульфатированных гликозидов наблюдалось полное отсутствие макрофагов). Авторами было высказано предположение о том, что главным образом активация мононуклеарной фагоцитарной системы, включающая усиление фагоцитарной и переваривающей способности макрофагов, лежит в основе усиления кукумариозидами естественной резистентности животных к инфекциям (Седов и др., 1984а, б, в; 1988; 1990а, б).

На основе тритерпеновых гликозидов кукумариозидов из дальневосточной съедобной голотурии *C. japonica* в ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток) был создан ряд

ветеринарных иммуностимулирующих препаратов (так называемые КД, КМ и КМ-2), официально разрешенных к применению для лечения норок, свиней, собак и других животных (Гришин и др., 1995; Стоник и др., 1998). Установлено, что препарат КД или "кукумариозид" (подфракция моносультатированных пентаозидов, в состав которых входят кукумариозиды групп А₀, А₁, А₂ и А₄) способствовал усилению действия корпускулярной энтеробактериальной вакцины, приготовленной на основе сальмонеллы *S. minnesota*. Эти кукумариозиды проявляли выраженный адьювантный эффект и приводили к усилению иммунного ответа на корпускулярные антигены, причем образование антител увеличивалось даже у мышей с наследственным ослабленным иммунитетом (Седов и др., 1984в; 1990а, б).

Были проведены исследования радиопротекторных свойств ветеринарного препарата КМ (подфракция кукумариозидов группы А₂). Было установлено, что препарат КМ оказывает как лечебное, так и профилактическое защитное действие при облучении мышей сублетальными дозами ионизирующего излучения. Оказалось, что уже на 5-е сутки после облучения у мышей, получавших препарат КМ, происходит ускорение пролиферации и миграции стволовых клеток, а на более поздних сроках после облучения применение препарата приводит к росту клеточной массы селезенки. Наряду с этим, существенных изменений массы тимуса и числа лейкоцитов крови не отмечалось (Гришин, Авиллов, 1988б; Гришин и др., 1988а; 1990; Поверенный, 1990). Во время изучения радиозащитного действия кукумариозида А₂-2 из голотурии *S. japonica* и препарата «трепангин» из гликозидов *A. japonicus* было установлено, что кукумариозид А₂-2 в дозе 1 мкг/кг увеличивал выживаемость мышей до 47% после их радиационного облучения цезием ¹³⁷Cs (γ-радиация, доза облучения 7,7 Гр, 5–10 мин) и усиливал гемопоэз в красном костном мозге у облученных животных. При использовании гликозида в дозах, в 200 раз меньше токсических, наблюдалось существенное увеличение числа кардиоцитов бедренных костей и количества клеток селезенки, а также возрастание числа выживших стволовых клеток костного мозга. Автор связывал этот феномен с увеличением пролиферации и миграции плюрипотентных стволовых клеток, принимающих участие в восстановлении показателей кроветворной и иммунной систем животных (Поверенный, 1990).

Высокая эффективность кукумариозидов была обнаружена при профилактике и лечении клещевого энцефалита. Необходимо отметить, что авторы объясняют эту активность гормоноподобным действием препарата, применяемого в низких дозах. Авторы приходят к выводу, что механизм противовирусной активности тритерпеновых гликозидов голотурии может быть связан с противовирусной защитой на стадии

взаимодействия вируса с клеткой. Этот тип защиты был подтвержден экспериментами по ингибированию цитопатического эффекта везикулярного стоматита, полиомиелита и других вирусов в культуре клеток кукумариозидами *in vitro*. Было установлено, что кукумариозид А₂-2 более активен, чем кукумариозид А₄-2, тогда как кукумариозид G1 не был активен (Гришин и др., 1988а, 1991а, б, 1995; Любимова и др., 1990; Grishin et al., 1991).

Было показано, что голотуринозиды А, С и D из голотурии *H. forskali* и десульфатированное производное голотуринозида А в концентрации 20 мкг/мл вызывали ингибирование цитопатического эффекта, индуцированного вирусом везикулярного стоматита (VSV) в клеточной культуре клеток (20%-ное ингибирование VSV в клеточной линии почек хомячка) (Rodriguez et al., 1991). Было обнаружено, что два трисульфатированных тетрасахаридных гликозида, лиувиллозиды А и В, выделенные из антарктической голотурии *Staurocucumis liouvillei*, проявляют противовирусное действие по отношению к вирусу простого герпеса 1-го типа (HSV-1) в концентрациях ниже 10 мкг/мл. Лиувиллозид А вызывал слабую инактивацию вируса HSV-1, тогда как эффективность противовирусного действия лиувиллозида В в тех же экспериментальных условиях была в 10 раз выше (Maier et al., 2001).

С другой стороны, был отмечен лечебный эффект кукумариозида А₂-2 в составе препарата КМ-2 (индивидуальный кукумариозид А₂-2) при лечении норок, содержащихся в норководческих хозяйствах и пораженных алеутской болезнью (вирусный плазмоцитоз), которая является основной причиной падежа, снижения плодовитости норок и ухудшения качества и ценности меха животных (Слугин, 1982; Гришин и др., 1991а, б; Гришин и др., 1995). При сравнении препарата КМ и препарата КМ-2 было показано, что они одинаковым образом усиливали динамику нарастания титра антител к вирусу при экспериментальном заражении норок. Результатом этой работы стало официальное разрешение на использование обоих препаратов в ветеринарии, как в случае алеутской болезни, так и с целью профилактики этого и ряда других заболеваний, а также для повышения устойчивости и продуктивности норок и улучшения товарного качества шкурок (Гришин и др., 1991а, б; 1995).

Результаты исследований кукумариозидов позволили предположить, что лечебное и профилактическое действие этих соединений обусловлено двумя процессами: во-первых, усиливается взаимодействие Т- и В-лимфоцитов и гуморальный ответ у животных, благоприятно влияющий на пролиферацию стволовых клеток; во-вторых, наблюдается противовирусная активность на стадии взаимодействия вирус-клетка. Высокая эффективность препарата в низких концентрациях указывает на возможное

гормоноподобное действие (Авилов, 2000). Выполненные исследования и промышленные испытания на норках, свиньях, собаках и других животных позволили создать ветеринарный препарат КД для профилактики и лечения различных заболеваний у животных, который был защищен патентом РФ (Гришин и др., 1995), зарегистрирован в Департаменте ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия РФ за № ПВР2.01.0001-95 от 29 мая 1995 г., получил государственное регистрационное удостоверение № Р004-2.0105 и успешно применялся в ряде зверохозяйств Приморского края.

Недавно в качестве носителя для белковых антигенов был предложен липид-сапониновый иммуностимулирующий комплекс, состоящий из смеси тритерпенового гликозида голотурий кукумариозида А₂-2 или голотоксина А₁, холестерина и полярного липида моногалактозилдиацилглицерида из морских макрофитов. Вакцинация мышей таким комплексом усиливала иммуногенность бактериального антигена, как в отношении специфического, так и неспецифического иммунного ответа, что может свидетельствовать о возможности применения этого комплекса в качестве адъюванта в медицине (Костецкий и др. 2006; Ли и др. 2008; Kostetsky et al., 2011; Sanina et al., 2012).

В настоящий момент существует лишь одно схематическое представление о иммуномодулирующей активности тритерпеновых гликозидов голотурий, описанное в литературе и представленное на рисунке 3. Исходя из этого представления, биоактивные соединения из голотурий, включая гликозаминогликаны и тритерпеновые гликозиды, проявляют иммуномодулирующие свойства и стимулируют иммунный ответ, воздействуя на клетки иммунной системы. Согласно этой схеме тритерпеновые гликозиды усиливают фагоцитоз макрофагов очевидно благодаря активации гамма-интерферон индуцибельной лизосомальной триолредуктазы (*gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase, GILT*) и увеличивают лизосомальную активность макрофагов (Janakiram et al., 2015b). Однако эта схема практически не объясняет детальных молекулярных механизмов, лежащих в основе проявления иммуномодулирующих эффектов.



Рис. 3. Иммуномодулирующая активность биологически активных соединений (гликозаминогликанов и тритерпеновых гликозидов) из голотурий (Janakiram et al., 2015b)

1.11. Противоопухолевая активность тритерпеновых гликозидов

В течение последнего десятилетия было опубликовано несколько обзоров, посвященных изучению цитотоксической активности тритерпеновых гликозидов голотурий. Эти обзоры показали взаимосвязь между структурой тритерпеноидных сапонинов и их цитотоксической активностью, связанной с молекулярными механизмами действия (Kalinin et al., 2008; Podolak et al., 2010; Osbourn et al., 2011; Kim, Himaya, 2012). Как уже говорилось, большинство гликозидов проявляет цитотоксическую, гемолитическую, противогрибковую и биологическую активность, вызванную мембранотропным действием в милли- и микромолярных концентрациях. Мембранотропное действие гликозидов обусловлено их способностью связываться с клеточными мембранами и образовывать неселективные ионо-проводящие комплексы с 5(6)-насыщенными стеринами, преимущественно с холестерином, с последующим выходом из клеток некоторых ионов, нуклеотидов и пептидов. Возникающее нарушение ионного гомеостаза и осмолярности приводит к последующему лизису и гибели клеток (Kalinin et al., 2008).

Исследования тритерпеновых гликозидов голотурий показали, что наряду с определенными цитотоксическими эффектами эти вещества могут блокировать деление яйцеклеток и развитие эмбрионов морских ежей и подавлять пролиферацию таких типов опухолевых клеток человека *in vitro* как U-87-MG, HCT-8, лейкемия P-388, KB, Schabel, Mel-28, A-549, MCF-1, HT-29, IA9, CAKI-1, SK-MEL, PC-3, лимфоидный лейкоз L 1210, MCF-7, MKN-28, HCT-116, U87MG, HepG2, HeLa, THP-1, KB-VIN, HCT-8, C33A и некоторые другие (Sun et al., 2007; Wu et al., 2007; Zhang et al., 2007; Avilov et al., 2008;

Kalinin et al., 2008; Liu et al., 2008; Althunibat et al., 2009; Han et al., 2010; Podolak et al., 2010; Osbourn et al., 2011; Kim, Himaya, 2012). В связи с этим в последние годы тритерпеновые гликозиды голотурий привлекают внимание экспериментальных онкологов как потенциальные противораковые природные соединения. В данном разделе литературного обзора обобщены последние данные о противоопухолевой активности тритерпеновых гликозидов голотурий и некоторые аспекты их молекулярного механизма (механизмов) воздействия на раковые клетки.

Одними из первых были работы периода 1950–1960 гг., описывающие противоопухолевые свойства гликозидов голотурий (Nigrelli, 1952; Sullivan et al., 1955; Sullivan, Nigrelli, 1956; Friess et al., 1960; Nigrelli et al., 1967). В цикле этих работ было продемонстрировано, что фракция гликозидов, которую авторы назвали "голотурин", из Багамской голотурии *A. agassizi*, приводила к ингибированию роста опухолей мышей саркомы-180, Krebs-2 и эпидермальной карциномы KB и их регрессии.

В дальнейшем были проведены более тщательные эксперименты по изучению противоопухолевых свойств индивидуальных гликозидов со строго установленными химическими структурами и выяснению механизмов их противоопухолевого действия как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Так, из голотурии *Pentacta quadrangularis* были выделены новые тритерпеновые гликозиды, филинопсиды А, В, Е и F, а также пентактазиды I, II и III. Все гликозиды проявляли значительную цитотоксическую активность *in vitro* против таких линий опухолевых клеток человека, как U87MG, A-549, P-388, MCF-7, HCT-116 и MKN-28 с IC₅₀ в диапазоне 0,60–3,95 мкМ (Zhang et al., 2006; Han et al., 20010).

Было установлено, что филинопсид А оказывает влияние на ангиогенез, а также на рост опухоли. Результаты показали, что из-за значительного торможения трех важных стадий ангиогенеза (пролиферация эндотелиальных клеток, миграция и образование трубок), индуцированных филинопадом А, образование и рост новых кровеносных сосудов были значительно подавлены. Этот гликозид также проявлял сильную противоопухолевую активность как *in vitro*, так и *in vivo*. Он уменьшал объем опухоли саркомы-180 у мышей, индуцируя апоптоз опухолевых клеток, также как и эндотелиальных клеток, ассоциированных с опухолью. Филинопсид А ингибировал все тестируемые рецепторы тирозинкиназы (RTK), связанные с ангиогенезом, включая рецептор-1 фактора роста фибробластов (FGFR1), рецептор фактора роста тромбоцитов β (PDGF β), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и рецептор эпителиального фактора роста (EGFR), при значениях IC₅₀ в диапазоне от 2,6 до 4,9 мкМ. Эти результаты свидетельствуют о том, что филинопсид А, благодаря способности ингибировать все тестируемые RTK, может оказаться эффективным противоопухолевым

агентом, в то время как летальная доза (LD₅₀) этого гликозида составляет только 625 мг/кг при пероральном введении мышам (Tong et al., 2005).

Не так давно были изучены противоопухолевые свойства еще одного сульфатированного гликозида из *Pentacta quadrangularis* – филинопзида Е. Ингибирование ангиогенеза оценивали *in vitro* по пролиферации, миграции, адгезии, образованию микротрубочек и апоптозу в дермальных микрососудистых эндотелиальных клетках и эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Гликозид также ингибировал активные (фосфорилированные) формы рецепторов фактора роста эндотелия сосудов, включая: KDR/Flk-1, VEGF2 ERK (который необходим для проявления митогенной активности VEGF в эндотелиальных клетках), FAK (который регулирует митогенез), паксиллин (который связывается с FAK и играет важную роль в клеточной адгезии и миграции, участвуя в пролиферации и выживании эндотелиальных клеток) и Akt (который обеспечивает выживание клеток, а также подавляет передачу интегрин-опосредуемых сигналов, вызываемую нарушением взаимодействия KDR и интегрина $\alpha v \beta 3$ с последующим нарушением организации цитоскелета и снижением адгезии клеток к витронектину) (Tian et al., 2005; 2007).

Установлено, что патагоникозид А, основной тритерпеновый гликозид из голотурии *Psolus patagonicus*, имеющий сульфатную группу в углеводной цепи, и его десульфатированный аналог проявляли антипролиферативный эффект по отношению к опухолевым клеткам человека трех линий, Her3B, MDA-MB231 и A549. Для патагоникозида А была установлена полумаксимальная эффективная доза в диапазоне 15 - 89 мкМ в зависимости от типа клеток. Десульфатированное производное показывало менее сильный антипролиферативный эффект на опухолевые клетки линий Her3B и MDA-MB231 (Careaga et al., 2009).

Показано, что эхинозид А и десульфатированный Ds-эхинозид А из голотурии *Pearsonothuria graeffei* блокировали клеточный цикл в G₀/G₁ фазе клеток гепатокарциномы мышей H22. Оба гликозида в значительной мере увеличивали экспрессию белков p16, p21 и c-мус, и понижали экспрессию циклина D, принимающих непосредственное участие в регуляции клеточного цикла. Для двух гликозидов отмечено ингибирование экспрессии Bcl-2, усиление выброса цитохрома С из митохондрий, активация каспазы-3 и расщепление PARP. В конечном итоге, введение эхинозида А или Ds-эхинозида А в дозе 2,5 мг/кг уменьшало объем гепатокарциномы H22 у мышей примерно на 50% (Zhao et al., 2012).

Более того, обнаружено, что эхинозид А ингибировал нековалентное связывание топоизомеразы 2-альфа (Top2alpha) с ДНК, конкурируя с ДНК за ДНК-связывающий

домен. Эти характеристики отличают эхинозид А от известных ингибиторов Top2alpha. Был сделан вывод о том, что индуцированный эхинозидом А двухцепочечный разрыв ДНК зависит от Top2. На модели ксенографтов карциномы простаты человека показано, что эхинозид А ингибирует рост опухоли (Li et al., 2010).

Исследовано влияние гликозида Ds-эхинозида А на физиологию клеток гепатоцеллюлярной карциномы печени человека Hep G2. Было установлено, что Ds-эхинозид А способен блокировать пролиферацию и подавлять адгезию, миграцию и инвазию этих клеток. Ds-эхинозид А значительно понижал экспрессию матриксной металлопротеазы-9 (ММР-9), играющей существенную роль в функционировании базальной мембраны, ассоциированной с метастазированием и ангиогенезом, а также повышал уровень экспрессии ингибитора металлопротеазы-1 (ТИМР-1), который является важным регулятором активации ММР-9. Кроме того, гликозид редуцирует формирование тубул в эндотелиальных клетках человека ECV-304 в матриксном геле *in vitro* и уменьшает неоваскуляризацию в аллантоисной мембране куриного эмбриона *in vivo* (Zhao et al., 2011).

Коллектив этих же авторов исследовал противоопухолевые свойства еще двух тритерпеновых гликозидов, голотурина А и 24-дегидроэхинозида А, выделенных из голотурии *P. graeffei*, в отношении опухолевых клеток линий HepG2 и ECV-304. Установлено, что оба соединения существенно влияют на целый ряд биохимических и физиологических параметров опухолевых клеток, а именно ингибируют экспрессию ММР-9, подавляют уровни экспрессии VEGF и NF-κB, усиливают экспрессию тканевого ингибитора ТИМР-1, значительно уменьшают адгезию клеток на внеклеточный матрикс и ингибируют миграцию и инвазию опухолевых клеток HepG2. Кроме того, оба этих гликозида существенно ингибировали метастазирование опухолей (Zhao et al., 2010).

Оказалось, что колохирозид А голотурии *Colochirus anceps* обладает достаточно сильным цитотоксическим действием по отношению к таким линиям опухолевых клеток человека, как клетки линий P-388, HL60, A-549, SpC-A4, MKN-28 и SGC-7901. Найденные значения IC₅₀ колеблются в пределах 3,5-4,0 мг/л. В экспериментах *in vivo* было установлено, что гликозид обладает антинеопластическим действием и ингибирует рост клеток рака печени линии H22 и клеток саркомы S180 мыши, не уменьшая иммунорегуляторную функцию и не влияя на развитие тимуса и селезенки у мышей (Zhang et al., 2011).

Показано, что тритерпеновые гликозиды, интерседензиды А, В и С из голотурии *Mensamaria intercedens*, проявляют цитотоксичность по отношению к нескольким типам опухолевых клеток человека. Один из них, интерседензид А, также показал выраженную

противоопухолевую активность против рака лёгкого Льюиса и саркомы S180 мыши (Zou et al., 2003).

Было установлено, что умеренно цитотоксичные в отношении клеток линии HeLa гликозиды из голотурии *C. okhotensis* – олиогликозид, охотозид В₁, В₂ и В₃ и фрондозид А, демонстрировали противоопухолевый эффект *in vitro*. Показано, что фрондозид А подавляет транскрипционную активность p53 в клетках мыши линии JB6-Lucp53, а также предотвращает образование колоний клеток JB6 P(+)C1 41, стимулированных с помощью EGF (Silchenko et al., 2008).

Была исследована противоопухолевая и проапоптотическая активность различных водорастворимых гликозидных фракций из голотурии *A. japonicus* и обнаружена дозозависимая индукция апоптоза в клетках HeLa под действием очищенной гликозидной фракции SC-2. Фрагментацию ДНК в клетках HeLa наблюдали после 12 часов инкубирования в присутствии SC-2 в концентрации 10 и 50 мг/л. Авторы пришли к выводу, что очищенная фракция водорастворимых гликозидов SC-2 обладает чрезвычайно мощной противоопухолевой активностью, а подавление реализуется путем индуцирования апоптоза в опухолевых клетках (Fan et al., 2009).

Недавно было проведено исследование влияния стихопозида С из голотурии *Thelenota anax* на апоптоз опухолевых клеток человека (Yun et al., 2012). Апоптоз, индуцированный этим гликозидом в клетках лейкемии и колоректального рака, исследовали в контексте повреждения митохондрий и нарушения ряда сигнальных путей. Обнаружено, что стихопозид С индуцирует апоптоз в этих клетках дозозависимым образом, приводя к активации Fas и каспазы-8, расщеплению Bid, митохондриальному повреждению и активации каспазы-3. Стихопозид С активировал такие ферменты как нейтральная и кислая сфингомиелиназы (SМазы), и, как следствие, образование церамида. Эксперименты по нокдауну экспрессии генов нейтральной SМазы или кислой SМазы с помощью специфических siРНК частично блокировали апоптоз, индуцированный стихопозидом С. Кроме того, гликозид значительно уменьшал рост клеток опухоли HL-60 в ксенографтах, а также размер подкожных опухолей СТ-26, увеличивал образование церамида *in vivo*. Авторы пришли к выводу, что образование церамида под действием стихопозида С из-за активации нейтральной и кислотной SМаз может способствовать апоптозу и указывает на противоопухолевую активность стихопозида С (Yun et al., 2012).

Были исследованы канцерпревентивные, цитотоксические и проапоптотические свойства восемнадцати тритерпеновых гликозидов, выделенных из голотурий семейства Cucumariidae, Stichopodidae, Psolidae, Holothuriidae и Synaptidae. Установлено, что исследуемые гликозиды ингибируют EGF-индуцированную неопластическую

трансформацию клеток мыши JB6 C141 P+ в мягком агаре и вызывают апоптоз и некроз клеток лейкемии человека линий HL-60 и THP-1. Установлено, что факторы AP-1 и NF-κB вовлечены в ответ опухолевых клеток на действие гликозидов. Авторы полагают, что на основе данных гликозидов могут быть разработаны как новые противоопухолевые средства, так и новые инструменты для исследования ядерных факторов (Fedorov et al., 2016).

Самые детализированные и разносторонние исследования противоопухолевой активности гликозидов представлены в работах по изучению противоопухолевых свойств фрондозидов А и его аналогов, выделенных из голотурии *C. frondosa*. Прежде всего, были выделены гликозидные фракции из этой голотурии, названные фронданол А5 и фронданол-А5Р. Было обнаружено, что на модели азоксиметан-индуцируемого рака толстой кишки крысы фронданол А5 значительно подавлял формирование очагов с аномальной морфологией, существенно увеличивая экспрессию белка p21^{EAF1/CIP1} и понижая экспрессию ядерного антигена пролиферирующих клеток, понижая экспрессию Cdc25c, усиливая экспрессию p21^{WAF1}/CIP1 и вызывая арест клеточного цикла с увеличением количества клеток в S и G₂/M фазах. Отмечено, что гликозид индуцировал апоптоз HCT116 клеток, при этом апоптоз сопровождался фосфорилированием гистона H2AX и расщеплением каспазы-2 (Janakiram et al., 2010).

Более полярная фракция (фронданол-А5Р) ингибировала пролиферацию и индуцировала арест клеточного цикла в фазе G₂/M в клетках рака поджелудочной железы человека линий S2013 и AsPC-1. Процесс сопровождался понижением экспрессии циклинов А и В и циклинзависимой киназы Cdc25c, фосфорилированием стресс-зависимой протеинкиназы, Janus-киназы (SAPK/JAK) и p38 митоген-активированной протеинкиназы (MAP) и повышением экспрессию p21^{WAF1} матричной РНК и белка в обеих клеточных линиях (Roginsky et al., 2010).

Индивидуальный гликозид, фрондозид А, заметно ингибировал рост клеток линий AsPC-1 и S2013 рака поджелудочной железы человека и индуцировал апоптоз этих опухолевых клеток. Под действием гликозида наблюдалось повышение популяции апоптотических клеток в фазе sub-G₀/G₁, повышение экспрессии Вах и p21, активация каспазы-3, -7 и -9, и понижение экспрессии Bcl-2 и Mcl-1. Эти результаты указывают на каспазо-зависимый митохондриальный путь индукции апоптоза в данном типе опухолевых клеток. Показано усиление эффективности действия гликозида в экспериментах по совместному действию фрондозидов А и гемцитабина как *in vitro*, так и *in vivo*. Во всех типах экспериментов был отмечен синергизм, приводящий либо к

выраженному ингибированию пролиферации клеток, либо к значительному снижению опухолевого роста (Li et al., 2008; Shemali et al., 2014).

Было проведено масштабное исследование молекулярных механизмов противоопухолевого действия фрондозид А на различных типах опухолевых клеток, а именно, на клетках рака молочной железы человека линии MDA-MB-231, немелкоклеточного рака легких человека линии LNM35, клетках лейкемии линий HL-60, NB4, THP-1, K562, клетках линий LNM35, A549, NCI-H460-Luc2, MDA-MB-435, MCF-7 и HepG2. Ряд экспериментов проводили в сравнении с неопухолевой клеточной линией MCF10-A, полученной из нормального эпителия молочной железы человека. Фрондозид А проявлял выраженную цитотоксическую активность в отношении клеток опухолевых линий, в то время как клетки MCF10-A были менее чувствительны к гликозиду. Установлено, что данный гликозид индуцирует апоптоз, регистрируемый по накоплению клеток в фазе sub-G₀ посредством активации p53, каспаз-3/7 и 9. Наблюдалось ингибирование миграции клеток и их инвазии, а также предотвращение основного и bFGF-индуцированного ангиогенеза в хориоаллонтаисной мембране куриного эмбриона. В экспериментах *in vivo* гликозид существенно понижал рост различных опухолей в бестимусных мышах и усиливал антипролиферативный эффект паклитокселя или цисплатина на ксенографтных моделях опухолей у мышей (Al Marzouqi et al., 2011; Attoub et al., 2013).

Сравнительное исследование гликозид-индуцированного апоптоза в раковых клетках дало возможность установить, что фрондозид А вызывает апоптоз по каспаза-независимому пути в отличие от кукумариозида А, выделенного из голотурии *C. japonica*. Кроме того, при сравнительном изучении проапоптотического потенциала некоторых тритерпеновых гликозидов голотурий с различными химическими структурами в отношении клеточных линий лейкемии человека было показано, что кукумариозиды А₂-2 и А₄-2, выделенные из *C. japonica*, и стихопозиды С и D из *Thelenota anax* в цитотоксических дозах показали способность индуцировать апоптоз в клетках лейкемии человека HL60, THP-1, NB-4 и K562 *in vitro* по каспазо-зависимому механизму (Jin et al., 2009; Yun et al., 2012).

Выраженная анти-метастатическая активность была продемонстрирована при исследовании фрондозид А на сингенной модели метастатического рака молочной железы мыши. Показано, что внутрибрюшинное введение гликозида мышам с имплантированными опухолевыми клетками приводит к ингибированию спонтанного возникновения метастазов в легких. Известно, что увеличение активности циклооксигеназы-2 способствует росту опухоли и метастазированию за счет интенсивного

синтеза PGE₂, взаимодействующего с рецепторами простагландина E, главным образом, EP₄ и EP₂. Установлено, что фрондозид А может выступать в качестве антагониста рецепторов EP₂ и EP₄. В экспериментах *in vitro* гликозид блокировал миграцию опухолевых клеток в ответ на агонисты EP₄ или EP₂, препятствовал связыванию ³H-PGE₂ с рекомбинантными клетками, экспрессирующими EP₂ или EP₄, и ингибировал EP₄- или EP₂-опосредованную активацию внутриклеточного cAMP и EP₄-зависимую активацию ERK1/2 (Ma et al, 2012).

Для клеток рака молочной железы человека MVA-MB-231, стимулированных TPA, также показано, что фрондозид А существенно уменьшает формирование, миграцию и инвазию клеток этих колоний (Park et al., 2012). Было обнаружено, что гликозид подавляет TPA-индуцированную ферментативную активность MMP-9, секрецию и экспрессию. Этот эффект был вызван снижением активации AP-1 и NF-κB и коррелировал с увеличением экспрессии TIMP-1 и TIMP-2. Вероятно, ингибирование TPA-индуцированной экспрессии MMP-9 под действием гликозида происходило благодаря подавлению сигнальных путей NF-κB и AP-1. Авторы полагают, что анти-метастатический эффект фрондозид А может быть обусловлен ингибированием TPA активации факторов AP-1 и NF-κB и уменьшением TPA активации ERK1/2, PI3K/Akt и p38 MAPK, ведущих к даун-регуляции экспрессии MMP-9 в клетках рака молочной железы человека (Park et al., 2012).

Недавно установлено, что фрондозид А в составе препарата фронданол А5 в дозе 250 и 500 ppm способен подавлять формирование опухоли толстой кишки мыши на 65–75% по сравнению с контрольными APCMin/+ мышами (мышы с предрасположенностью к формированию аденомы кишечника). Обнаружено, что перитонеальные макрофаги из мышей, получавших препарат, отличались повышенной эффективностью фагоцитоза и увеличением экспрессии мРНК GILT. Кроме того, в группе животных, получавших фронданол А5, наблюдали повышение уровня цитокинов G-CSF, снижение уровней провоспалительных цитокинов и маркера 5-LOX, его регулятора FLAP, маркеров пролиферации (PCNA) и ангиогенеза (VEGF). Эти данные показывают, что фронданол А5 эффективно стимулирует врожденный иммунитет и ингибирует образование опухолей, выступая в качестве химиопревентивного средства (Janakiram et al., 2015a).

При проведении сравнительного анализа влияния трех гликозидов, фрондозид А, В и С и их агликона, на рост раковых клеток поджелудочной железы человека, было установлено, что наиболее цитотоксичным был фрондозид А (EC₅₀ ~ 1 μM); фрондозид В был менее активным (EC₅₀ ~ 2,5 μM), а фрондозид С и агликон не обладали цитотоксичностью. Показано, что при пероральном способе введения фрондозид А не оказывает противоопухолевого эффекта. В то же время при внутривентральном введении

фрондозид А (100 мкг/кг/день) заметно ингибировал развитие опухолей у ксенографтов, не проявляя при этом острой токсичности (Shemali et al., 2016).

Проведенное исследование механизмов противоопухолевого действия фрондозида А с использованием клеточных линий кастрационно-резистентного рака предстательной железы человека (CRPC) в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показало, что гликозид проявил высокую эффективность и избирательность по отношению к клеткам рака простаты человека, тогда как незлокачественные клетки оказались менее чувствительными. Гликозид вызывал зависимый от типа клеток арест клеточного цикла и индукцию каспаза-зависимого или -независимого апоптоза. В опухолевых клетках, инкубированных с гликозидом, было обнаружено повышение или индукция нескольких проапоптотических белков (Bax, Bad, PTEN, p21), расщепление PARP и каспазы-3, -8, -9, фрагментация ДНК и даун-регуляция антиапоптотических белков (survivin и Bcl-2). С помощью глобального протеомного анализа были выявлены белки, участвующие в образовании метастазов, инвазии опухолевых клеток и апоптозе, такие как кератин 81, CrkII, IL-1b и катепсин В. Примечательно, что нокдаун гена p53 не подавлял апоптотическую активность фрондозида А в уротелиальных клетках. Кроме того, после воздействия гликозида наблюдали ингибирование аутофагии (известного механизма приобретения резистентности к лекарственным средствам) в опухолевых клетках простаты и уротелиальных клетках. Данный гликозид проявлял синергизм при совместном действии с цисплатином и гемцитабином. В экспериментах *in vivo* фрондозид А ингибировал рост циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, а также опухолей простаты PC-3 и DU145 с заметным уменьшением метастазов в легких. Увеличение количества лимфоцитов у животных после терапии гликозидом указывает на иммуномодулирующий эффект фрондозида А (Dyshlovoy et al., 2016; 2017).

Было обнаружено, что препарат КД, созданный на основе кукумариозидов из голотурии *S. japonica*, обладает противоопухолевым эффектом и является перспективным для лечения онкологических больных при его совместном использовании с другими противоопухолевыми препаратами (Соботович, Богуславский, 2001).

При исследовании влияния индивидуального кукумариозида А₂-2 на апоптоз, клеточный цикл, биосинтез ДНК и активность p53 в клетках асцитной карциномы Эрлиха мыши, установлено, что гликозид в субцитотоксических концентрациях проявляет цитостатические свойства, блокирует пролиферацию опухолевых клеток и биосинтез ДНК в S фазе, вызывает апоптоз опухолевых клеток по каспаза-зависимому механизму, минуя активацию p53-зависимого сигнального пути (Menchinskaya et al., 2013).

Возможность проявлять противоопухолевые свойства тритерпеновыми гликозидами была недавно подтверждена методами компьютерного моделирования. Было продемонстрировано, что бивиттозид А, голотурин А, голотоксин А, голотуринозид А и кукумариозид А₂₋₂ способны связываться с топоизомеразой II альфа человека (topo II α), играющей ключевую роль в репликации ДНК и являющейся мишенью для различных химиотерапевтических препаратов. Методами QSAR и ADME/TOX были установлены сайты связывания этих гликозидов с ферментом. Согласно этим исследованиям, наиболее выраженные свойства ингибитора активности topo II α проявляет кукумариозид А₂₋₂ (Patil, Thakare, 2012).

Суммированные данные по противоопухолевой активности тритерпеновых гликозидов голотурий представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние некоторых тритерпеновых гликозидов голотурий на опухолевые клетки и раковые опухоли

№	Гликозид	Голотурия	Тип активности
1 2	Филинопсид А Филинопсид Е	<i>Pentacta quadrangularis</i>	Подавление жизнеспособности клеток (Zhang et al., 2006; Han et al., 2010) , индукция апоптоза, ингибирование ангиогенеза и подавление роста опухолей <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (Tong et al., 2005; Tian et al., 2005; 2007)
3	Патагоникозид А	<i>Psolus patagonicus</i>	Супрессия пролиферации клеток (Careaga et al., 2009)
4 5 6 7	Голотурин А Ds-эхинозид А Эхинозид А 24-дегидро эхинозид А	<i>Pearsonothuria graeffei</i>	Подавление жизнеспособности клеток (Zhao et al., 2011); ингибирование адгезии и миграции клеток, метастазирования и инвазии опухолей (Zhao et al., 2010; 2011); индукция апоптоза (Zhao et al., 2012); арест клеточного цикла, подавление роста опухолей <i>in vivo</i> (Zhao et al., 2012; Li et al., 2010)
8	Колохирозид А	<i>Colochirus anceps</i>	Подавление жизнеспособности клеток и роста опухолей <i>in vivo</i> (Zhang et al., 2011)
9	Интерседензид А	<i>Mensamaria intercedens</i>	Подавление жизнеспособности клеток и роста опухолей <i>in vivo</i> (Zou et al., 2003)
10	Охотозиды В ₁ , В ₂ , В ₃	<i>Cucumaria okhotensis</i>	Подавление жизнеспособности клеток (Silchenko et al., 2008)
11	Скабразид D	<i>Holothuria scabra</i>	Ингибирование ангиогенеза, индукция апоптоза (Asswasupareerk et al., 2016a,

			b)
12	Фрондозид А	<i>Cucumaria frondosa</i> ; <i>Cucumaria okhotensis</i>	Подавление жизнеспособности клеток (Silchenko et al., 2008); ингибирование образования колоний (Silchenko et al., 2008, Janakiram et al., 2010; Park et al., 2012) и пролиферации клеток (Li et al., 2008; Al Marzouqi et al., 2011), арест клеточного цикла (Janakiram et al., 2010; Roginsky et al., 2010; Li et al., 2008), индукция апоптоза (Roginsky et al., 2010; Li et al., 2008; Al Marzouqi et al., 2011; Kim et al., 2015); ингибирование миграции клеток (Ma et al., 2012; Attoub et al., 2013; Park et al., 2012) и инвазии (Attoub et al., 2013; Park et al., 2012); ингибирование метастазирования (Ma et al., 2012; Attoub et al., 2013; Kim et al., 2015), ангиогенеза (Attoub et al., 2013); ингибирование МЛУ (Aminin et al., 2014; Menchinskaya et al., 2013); подавление роста опухолей <i>in vivo</i> (Li et al., 2008; Attoub et al., 2013); усиление действия противоопухолевых цитостатиков (Al Marzouqi et al., 2011; Attoub et al., 2013; Al Shemali et al., 2014).
13	Стихопозид С	<i>Thelenota anax</i>	Индукция апоптоза, подавление роста опухолей <i>in vivo</i> (Yun et al., 2012).
14	Кукумариозиды А ₂ -2 и А ₄ -2	<i>Cucumaria japonica</i>	Ингибирование пролиферации клеток, арест клеточного цикла и индукция апоптоза (Fedorov et al., 2007; Jin et al., 2009; Menchinskaya et al., 2013); ингибирование метастазирования и инвазии (Kim et al., 2015); подавление роста опухолей <i>in vivo</i> (Fedorov et al., 2007; Jin et al., 2009); усиление действия противоопухолевых цитостатиков (Aminin et al., 2010) ингибирование МЛУ (Menchinskaya et al., 2013; Aminin et al., 2014).

Недавно появилось несколько научных обзоров, описывающих возможные механизмы противоопухолевого действия цитотоксических тритерпеновых гликозидов голотурий (Park et al., 2014; Kim, Kwak, 2015) В частности, в них обсуждаются мембранотропная активность гликозидов и их способность индуцировать цитотоксичность и апоптоз, с акцентом на соотношение структура-активность. В качестве потенциальных терапевтических молекулярных мишеней авторами рассматриваются

модулируемые гликозидами мембранные транспортеры, такие как Na^+ - K^+ -АТФаза и Ca^{2+} -АТФаза в саркоплазматическом/эндоплазматическом ретикулуме, потенциал-чувствительные Ca^{2+} каналы L-типа, TRP рецептор-управляемые катионные каналы, риадиновые рецепторы, потенциал-управляемые Na^+ каналы ($\text{NaV}1,2$ и $\text{NaV}1,4$) и K^+ -каналы ($\text{Kv}1.4$), кальций-активируемые K^+ -каналы (BKCa), человеческие Ether-à-go-go Related Gene (hERG) K^+ каналы ($\text{Kv}11.1$), N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторы, никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, а также рецепторы γ -аминомасляной кислоты (GABA). В обзоре Кима и Квака (Kim, Kwak, 2015) обобщены механизмы противоопухолевого действия фрондозидов А и кукумариозидов А₂₋₂ с акцентом на проапоптотическую активность, влияние на метастазирование и инвазию раковых клеток. Авторы делают заключение, что эти гликозиды являются как противоопухолевыми, так и канцерпревентивными соединениями. Противоопухолевый эффект этих соединений опосредован ингибированием туморогенеза и метастазирования, а также индукцией апоптоза в опухолевых клетках.

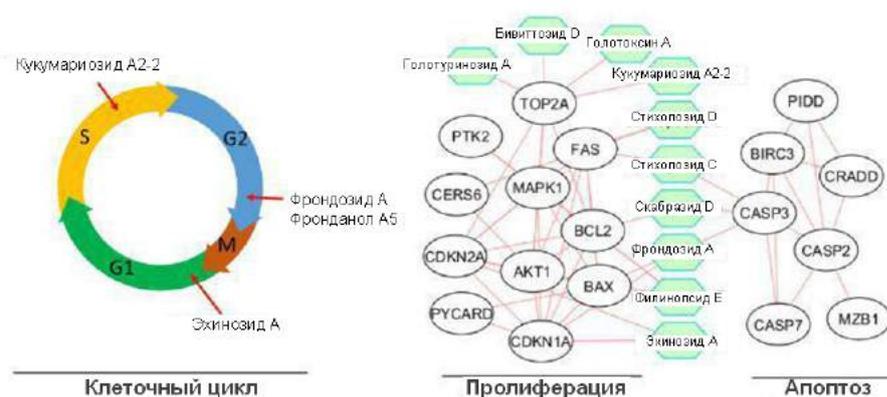


Рис. 4. Молекулярные механизмы противоопухолевого действия тритерпеновых гликозидов голотурий, регулирующие клеточный цикл, пролиферацию клеток и индуцирующие апоптоз опухолевых клеток (Wargasettia and Widodo, 2018). Ряд гликозидов (кукумариозид А₂₋₂, фрондозид А и эхинозид А) избирательно блокируют определенные фазы клеточного цикла. Серия гликозидов ингибирует пролиферацию опухолевых клеток, влияя на сигнальные пути, опосредуемые такими белками как TOP2A (топоизомераза II α), PTK2 (протеин тирозинкиназа 2), FAS (Fas-рецептор), MAPK1 (митоген-активируемая протеинкиназа 1), CERS6 (церамид синтаза 6), CDKN1A/CDKN2A (ингибиторы циклин-зависимых киназ 1A/2A), PYCARD (адаптерный апоптоз-ассоциированный Speck-подобный белок), AKT1 (протеинкиназа В альфа), BCL2/BAX (внутриклеточные белковые факторы, регуляторы апоптоза), и каспазо-зависимые сигнальные пути индукции апоптоза с участием каспаз CASP2, CASP3 и CASP7.

В 2018 году в обзоре, посвященном описанию противоопухолевых свойств тритерпеновых гликозидов и их производных (Wargasettia and Widodo, 2018), была приведена гипотетическая схема, описывающая молекулярные механизмы влияния

определенных гликозидов голотурий на фазы клеточного цикла, а также сигнальные пути, вовлеченные в регулирование пролиферации и апоптоза опухолевых клеток (рис. 4).

Тем не менее, точные молекулярные механизмы противоопухолевого действия тритерпеновых гликозидов голотурий по-прежнему остаются в значительной степени малоизученными, хотя общие известные детали этих механизмов можно представить следующим образом:

а) индукция апоптоза опухолевых клеток посредством активации внутриклеточных каспаз (каспазы 3/7 и 9) и каспазозависимого сигнального пути;

б) арест клеточного цикла опухолевых клеток в фазе S или G₂/M и увеличение популяции клеток в фазе sub-G₀/G₁, что приводит к блокированию пролиферации и апоптозу;

в) регуляция активности транскрипционного фактора NF-κB и сигнального пути NF-κB ;

г) регуляция активности определенных клеточных рецепторов и ферментов, участвующих в канцерогенезе, таких как EGFR, Akt; ERK; FAK; MMP-9 и некоторых других.

1.12. Биомедицинские препараты, БАДы и другие продукты функционального питания на основе гликозидов голотурий

Тритерпеновые гликозиды голотурий или экстракты из голотурий входят в различные биологически активные добавки (БАД) и другие продукты для функционального питания. Известны патенты, описывающие напитки и косметические средства, в состав которых входят экстракты голотурий, содержащие тритерпеновые гликозиды, или индивидуальные тритерпеновые гликозиды. Кроме того, запатентован ряд средств, созданных на основе тритерпеновых гликозидов голотурий для профилактики и лечения ряда иммунных и онкологических заболеваний. Обобщенная информация по данным запатентованным продуктам и средствам представлены в таблице 2.

Таблица 2. Запатентованные биомедицинские препараты, БАДы и другие продукты функционального питания на основе гликозидов голотурий

Название средства	Описание состава и свойств	Ссылка
<i>Средства для функционального питания и БАДы</i>		
Гидролизат из кукумарии японской	Получают ферментативным гидролизом из кукумарии японской <i>C. japonica</i> . Используется как общеукрепляющее средство при высоких физических и	Акулин и др., 2000

	умственных нагрузках и реабилитации больных после различных тяжелых заболеваний и иммунодефиците.	
Обогащенный рыбий жир.	Рыбий жир, обогащенный БАВ на основе внутренних органов голотурий и других морских беспозвоночных. Содержит различные тритерпеновые гликозиды. Проявляет антиоксидантные, антимуtagenные, иммуностимулирующие свойства.	Лебская и др., 2001; Лебская, Шаповалов, 2004
БАД, включающая тритерпеновые гликозиды	Добавка содержит водоросли, содержащие альгиновые кислоты и растительное и/или животное сырье, включая тритерпеновые гликозиды голотурий. Может быть использована в качестве адаптогена, детоксиканта и общеукрепляющего средства.	Некрасова и др., 2002
БАД «Акмар»	Продукт комплексной переработки кукумарии японской или трепанга с целью получения сушеного полуфабриката для производства пищевых продуктов, биологически активной пищевой и кормовой добавки.	Тимчишина и др., 2004
Пробиотический соевый продукт	Включает соевое молоко, пчелиный мед, варочные воды из кукумарии японской и закваски в виде «кефирных грибков». Изобретение позволяет получить продукт с повышенными технологическими и органолептическими характеристиками, а также выраженной функциональной направленностью.	Сенченко, Шульгина, 2001
Порошкообразная смесь из голотурии	Продукт содержит тритерпеновые гликозиды из голотурии вместе с порошком черного грибка и крахмалом корня лотоса в качестве сопутствующих ингредиентов. БАД имеет высокую питательную ценность, улучшает иммунитет и функцию восполнения крови.	Gao, 2012
Соль, содержащая гликозиды	Высушенный солевой экстракт голотурий, содержащий тритерпеновые гликозиды и обладающий общеукрепляющими свойствами.	Lee, Kim, 2013
Напитки		
Особая водка "Чуринь"	Содержит водно-спиртовой экстракт из голотурии (кукумария или трепанг) в виде гликозидсодержащей фракции и красный стручковый перец. Предполагается, что такая композиция оказывает благотворное воздействие на здоровье человека.	Лоенко и др., 1995
Алкогольный напиток из голотурий	Зерновое вино (60%-ный дистиллированный спирт), содержащее ферментативный гидролизат голотурий и традиционные китайские лекарственные травы. Напиток имеет выраженные адаптогенные свойства.	Jian et al., 2010; Yi, 2015
Вино, содержащее тритерпеновые гликозиды	Вино, содержащее тритерпеновые гликозиды из гидролизата голотурий. Обладает противоопухолевыми свойствами, улучшает иммунитет, проявляет антикоагуляционные свойства, антитромботический и радиозащитный эффекты, антивирусные,	Guo et al., 2012.

	гепатопротекторные и кардиопротекторные свойства	
Лечебно-профилактические напитки	Лечебно-профилактические напитки на основе гидролизата из кукумарии японской, содержащего кукумариозиды. Используются в качестве рационального питания у ожоговых больных, способствуют нормализации показателей белкового обмена после хирургических операций.	Шульгина и др., 1998
Косметика		
Косметическое средство	Косметические продукты, содержащие экстракт тритерпеновых гликозидов голотурий. Способствуют улучшению состояния кожи.	Lee, Kim, 2013
Средства для профилактики заболеваний		
БАДы ТИНГОЛ-1 и ТИНГОЛ-2.	БАДы из кожно-мышечного мешка и внутренностей кукумарии японской. Обогащены тритерпеновыми гликозидами. Предназначены для коррекции дефицита белкового обмена при ожоговых поражениях, ускоряют заживление в послеоперационном и восстановительном лечении онкологических больных.	Слущкая и др., 2003
БАД «Эрогол»	Сухой порошок из кукумарии японской, содержащий тритерпеновые гликозиды. Повышает концентрацию и подвижность сперматозоидов, физическую работоспособность и половую активность человека и животных.	Слущкая и др., 2003; Тимчишина и др., 2003
Композиция "ОСТЕОМАК С ЭКСТРА"	Включает гликамин (белково-гликозидный комплекс из кукумарии японской), глюкозамин гидрохлорид, сухие экстракты растений. Используется для профилактики и улучшения функционального состояния опорно-двигательного аппарата.	Ковалев, Баранова, 2004
Голотоксины D-I,	Тритерпеновые гликозиды голотоксины D-I из трепанга <i>A. Japonicus</i> , обладающие противогрибковой активностью в отношении <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Mircrosporium gypseum</i> и <i>Aspergillus fumigates</i> . Являются ведущими соединениями для разработки нового противогрибкового препарата.	Liu et al., 2012
Композиция тритерпеновых гликозидов	Композиция тритерпеновых гликозидов голотурий или индивидуальные тритерпеновые гликозиды голотурины А и В, эхинозиды А и В, 24-дегидроэхинозид А, ds-эхинозид А, голотоксины А и В, голотурин А ₁ и стихопозид Е запатентованы как средство для профилактики, улучшения или лечения диабета II типа.	Juan et al., 2011
Средство для профилактики и лечения гиперурикемии	Композиция, содержащая один тритерпеновый гликозид или экстракт, содержащий более 50% тритерпеновых гликозидов, и полисахариды голотурий. Нормализует уровень мочевой кислоты в сыворотке животных благодаря ингибированию ксантиноксидазы и снижению	Hang et al., 2013; Li et al., 2013

	уровня гематурии и мочевой кислоты в плазме крови.	
Иммуностимулирующие средства		
КМ, КМ-2	Суммарный препарат тритерпеновых гликозидов кукумариозидов (КМ) и индивидуальный гликозид кукумариозид (КМ-2) из кукумарии японской. Ветеринарное средство для профилактики и лечения алеутской болезни норок.	Гришин и др., 1995
Кукумариозиды	Тритерпеновые гликозиды кукумариозиды из кукумарии японской. Применяются для лечения лучевой болезни.	Ковалевская, Стоник, 1999.
Препарат КД	Сумма моносультфатированных тритерпеновых гликозидов из кукумарии японской. Эффективное средство против вирусов везикулярного стоматита, мышинного энцефаломиокардита, вирусы Coxsackie A7 и Coxsackie B7, вируса полиомиелита, простого герпеса, болезни New Castle и аденовирус типа 7.	Ковалевская и др 2002; 2004
Фракции, содержащих тритерпеновые гликозиды	Гликозидные фракции кукумарии <i>C. frondosa</i> . Существенно ингибируют воспаление и оказывают значительную пользу при артрите.	Collin, 1998
Липид-сапониновый иммуностимулирующий комплекс	Смесь тритерпенового гликозида кукумариозид А ₂ -2, холестерина и полярного липида моногалактозилдиацилглицерида из морских макрофитов. Обеспечивает усиление иммуногенности бактериального антигена и исключает воспалительные, болевые, токсические и гемолитические эффекты вакцин.	Санина и др., 2005; Костецкий и др., 2006; Попов и др., 2006
ТИ-комплекс	Однородный иммуностимулирующий комплекс. Состоит из смеси тритерпенового гликозида кукумариозид А ₂ -2, холестерина и полярного липида МГДГ из морских макрофитов. В качестве белкового антигена используют бактериальный порин из <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> . Значительно повышает иммуногенность белковых антигенов.	Санина и др., 2012; Костецкий и др., 2012
Композиция, содержащая экстракт трепанга	Содержит экстракт трепанга <i>A. japonicus</i> , используемого в качестве противовоспалительного средства для подавления индуцированных под действием ЛПС провоспалительных ферментов iNOs и COX-1.	Kim et al., 2012
Гликозиды голотурий и онкологические заболевания		
Фракции гликозидов из голотурии	Фракции тритерпеновых гликозидов, полученные из стенки тела, эпителиального слоя и щупалец кукумарии <i>C. fraudatrix</i> . Применим в качестве терапевтического агента против злокачественных новообразований, а также в качестве профилактического или терапевтического средства против ревматоидного артрита, вызванного сосудистой гиперплазией.	Collin et al., 1999
Фрондозид А и	Тритерпеновые гликозиды фрондозид А и фрондозид В	Adrian,

фрондозид В	или их смесь из голотурии <i>C. frondosa</i> . Терапевтическая композиция, содержащая данные гликозиды и различные вспомогательные средства могут быть использованы для проведения противоопухолевой терапии.	Collin, 2006
Фронданол А5, фронданол А5- CV, фронданол А5- Р	Фронданол А5 - препарат на основе тритерпеновых гликозидов голотурии <i>C. frondosa</i> . Значительно ингибирует пролиферацию клеток рака поджелудочной железы и простаты, индуцирует апоптоз, ингибирует эйкозаноидный сигнальный путь, включая 5-липоксигеназу, СОХ-1 И СОХ-2, является антагонистом рецептора EP-1. Фронданол А5-CV (экстракт порошка высушенного эпителия <i>C. frondosa</i>) и фронданол А5-Р (осадок из хлороформ-метанольного экстракта). Влияют на функционирование ряда молекулярных мишеней онкогенеза: 5-липоксигеназы, СОХ-1 и СОХ-2, эпоксидирование эстрогена, каспазы, BCL, PPAR-гамма и насинтез ДНК в опухолевых клетках.	Ding et al., 2008
Фрондозид А	Тритерпеновый гликозид фрондозид А из кукумарии <i>C. frondosa</i> и комплекс фрондозид А с холестерином запатентованы в качестве средства, ингибирующего множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток.	Менчинская и др., 2013
Кукумариозид А ₂ -2 и А ₄ -2, стихопозид С, стихопозид Д	Тритерпеновые гликозиды кукумариозид А ₂ -2 и А ₄ -2 и их смеси из кукумарии японской, стихопозид С и D и их смеси из голотурии <i>T. anax</i> . Фармацевтическая композиция избирательно индуцирует апоптоз в клетках лейкемии человека и блокирует клеточный цикл клеток лейкемии человека HL-60, ТНР-1, NB4 и K562.	Федоров и др., 2009
Эхинозид А	Тритерпеновый гликозид эхинозид А из голотурии <i>H. nobilis</i> . Ингибирует активность опухолевой топоизомеразы II <i>in vitro</i> и пролиферацию раковых клеток глиомы <i>in vivo</i> .	Yi et al., 2009a; Liu et al., 2012
Гризеазид А	Тритерпеновый гликозид гризеазид А из голотурии <i>H. grisea</i> . Соединение-лидер для разработки новых противоопухолевых препаратов. Ингибирует пролиферацию клеток карциномы желудка человека А-549, промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, лейкоза Т-лимфоцитов человека Molt-4 и клеток гепатомы человека BEL-7402.	Yi et al., 2009b
Экстракт из трепанга	Экстракт (или его фракции) из трепанга <i>A. japonicus</i> . Запатентованы фармацевтические композиции и пищевые добавки на его основе для профилактики рака толстого кишечника, рака желудка и доброкачественной гиперплазии предстательной железы.	Kim et al., 2013; 2014; Choi et al. 2014

1.13. Фармакокинетика тритерпеновых гликозидов

Несмотря на довольно длительное интенсивное и детальное изучение биологической активности тритерпеновых гликозидов голотурий, фармакокинетические исследования этих соединений практически отсутствуют, и их фармакокинетика практически не изучена. В то же время, существует несколько работ, связанных с оценкой фармакокинетических параметров некоторых гликозидов растительного происхождения. Эти исследования в основном связаны с разработкой новых подходов и методов количественной оценки гликозидов в плазме крови животных.

Так, было проведено детальное исследование фармакокинетического поведения в плазме крови тритерпенового гликозида из растения элеутерококк (*Eleuterococcus senticosus* Maxim) – элеутерозида В. С этой целью был получен гликозид, меченый тритием. Самая высокая концентрация ³H-элеутерозида В после его однократного внутривенного введения была обнаружена в крови крыс через 15 мин после введения. Это свидетельствует об интенсивной абсорбции гликозида в кровь после инъекции. Высокая концентрация гликозида сохранялась в крови в течение 30 мин, после чего наблюдали резкое уменьшение концентрации гликозида в интервале от 30 мин до 4 час. Элиминация гликозида в крови сопровождалась его появлением в экскрементах животных (Bezdetko et al., 1981).

Для проведения фармакокинетических исследований растительного тритерпенового гликозида астрагалозида IV из растения астрагал перепончатый (*Astragalus membranaceus*), обладающего кардиопротекторными и иммуномодулирующими свойствами, был разработан метод количественной оценки гликозида в биологических тканях и жидкостях, основанный на использовании высокочувствительного и точного аналитического метода ЖХ/МС/МС. Для описания фармакокинетики астрагалозида IV авторы использовали двухкамерную модель первого порядка. Было продемонстрировано, что после внутривенного введения двум видам животных в дозах 0,75 мг/кг (крысы) или 0,5 мг/кг (собаки) концентрация астрагалозида IV в плазме крови постепенно уменьшалась с клиренсом 3 мл/кг/мин для крыс и 4±1 мл/кг/мин для собак. Период полувыведения составил около 98 мин у крыс и примерно 60 мин у собак. Рассчитанный объем распределения исследуемого гликозида составлял 0,20 л/кг у крыс и 0,14 л/кг у собак, что указывает на ограниченное распределение астрагалозида IV в периферических тканях. Значения AUC и C_{max} для крыс составили 289,16 мг/мл и 3,78 мг/мл, тогда как эти значения для собак составляли 156,04±7,34 мг/мл и 4,3±2,59 мг/мл соответственно. Установлено, что гликозид стабилен при его введении в

плазму крови животных и после процедуры замораживания-оттаивания (Zhang et al., 2005).

Было проведено фармакокинетическое исследование двух гликозидов гинзенозидов Rb₁ и Rg₁, выделенных из женьшеня *Panax notoginseng*. Количественный анализ концентрации гликозидов в плазме крови экспериментальных крыс проводили методом ВЭЖХ при двух способах введения гликозидов – внутривенном и пероральном. Обнаружено, что фармакокинетическое поведение гинзенозидов может быть описано с помощью двухкамерной модели. При внутривенном введении гликозидов в дозе 50 мг/кг наблюдали два этапа элиминирования гликозидов: быструю фазу (α -фаза) и следующую за ней медленную фазу (β -фаза). Тем не менее, гликозид Rb₁ выводился гораздо быстрее, чем гинзенозид Rg₁, и отсутствовал в плазме крови уже через 24 час после введения. Показано, что после перорального введения в дозе 600 мг/кг концентрация Rb₁ достигала пика через 1,5 ч (47,13 мг/мл) и поддерживалась в плазме крови на протяжении 72 ч. Для Rg₁, C_{max} составил 7,29 мг/мл и T_{max} 0,64 ч. Кроме того, абсолютная биодоступность (отношение пероральной AUC к внутривенному AUC) составляла 4,35% для Rb₁ и 18,40% для Rg₁ (Xu et al., 2003).

Недавно с помощью метода хромато-масс-спектрометрии было проведено первое фармакокинетическое исследование тритерпенового гликозида морского происхождения – фрондозида А из кукумарии *C. frondosa*. Предварительные фармакокинетические исследования были проведены с использованием трех путей введения препарата: внутривенного, внутрибрюшинного или перорального в дозах 100 и 300 мкг/кг. Никаких неблагоприятных острых клинических признаков не наблюдали во всех случаях. Окончательное исследование по фармакокинетике проводили на мышах линии CD₂F₁ при внутривенном болюсном и внутрибрюшинном способах введения фрондозида А в дозе 100 мкг/кг. Было установлено, что показатель C_{max} после *i.v.* введения составил 129 нМ (172 нг/мл), а C_{max} после *i.p.* введения составил 18,3 нМ (24 нг/мл) на 45 минуте, что примерно в 7 раз ниже, чем при внутривенном введении той же дозы. Показатель Cl_{tb} при *i.v.* введении составил 6,35 мл/мин/м², а период полувыведения составлял 510 мин. При перитонеальном способе введения гликозида Ср_{max} составил 18,3 нМ; Cl_{tb} составил 127 мл/мин/м², а период полувыведения составлял 840 мин. Рассчитанная биодоступность препарата была примерно 20%. Однако авторы отмечают, что фрондозид А проявлял противоопухолевую активность на модели ксенографтов с имплантатами рака поджелудочной железы человека AsPC-1 только в случае парентерального (внутривенного) способа введения (Shemali et al., 2016).

1.14. P2X рецепторы

Одним из результатов проведенных нами исследований является установление факта взаимодействия кукумариозида A₂-2 с мембранными пуринергическими рецепторами P2X семейства, локализованными в макрофагах. В связи с этим, в данном разделе литературного обзора приводятся сведения, дающие представление о классификации, строении, ряде физико-химических свойств и физиологической роли пуринергических рецепторов. Эта информация поможет более глубокому восприятию раздела, посвященного результатам изучения молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия кукумариозида A₂-2 и его взаимодействия с иммунокомпетентными клетками.

Классификация пуринорецепторов

Хорошо известно, что пуриновое соединение АТФ (аденозинтрифосфорная кислота) является основным поставщиком энергии в клетках и используется в большом количестве внутриклеточных процессов, таких как движение клетки или ее частей, для секреции различных молекул, сокращения клеток и тканей, деления и некоторых других. АТФ и другие внутриклеточные нуклеотиды играют важную роль в регуляции функции ферментов и ионных каналов, синтезе нуклеиновых кислот и аккумуляции энергии. Это соединение вырабатывается клетками практически непрерывно, главным образом в митохондриях, а ее внутриклеточная концентрация достигает нескольких миллимолей.

К настоящему времени стало понятно, что АТФ и ряд других нуклеотидов может появляться во внеклеточном пространстве, благодаря высвобождению из клеток различными путями, и выполнять роль сигнальных молекул во многих периферических тканях и центральной нервной системе (Burnstock, 1972). Оказалось, что физиологическое влияние внеклеточной АТФ опосредуется путем ее взаимодействия со специфическими рецепторами (Ralevic, Burnstock, 1998). В настоящее время эти рецепторы получили название пуринорецепторы (или пуринергические рецепторы). Практически все типы пуриновых рецепторов в настоящее время клонированы, секвенированы и экспрессированы в разнообразных клеточных системах.

Первая классификация пуринорецепторов была предложена в 1978 году одним из первооткрывателей этого типа рецепторов Джеффри Бернстоком (Burnstock, 1978). Согласно этой классификации все пуриновые рецепторы разделяются на P1-пуринорецепторы (основной лиганд аденозин), и P2-пуринорецепторы (основной лиганд АТФ). В каждый из этих двух типов рецепторов входит еще несколько подтипов (Abbraccio, Burnstock, 1994; Khakh et al., 2001; King et al., 2001) (рис. 1). В свою очередь,

каждый из подтипов делится на ряд семейств. Например, P2 рецепторы делятся на P2X и P2Y рецепторы по механизму реализации своего эффекта.

P2Y являются рецепторами, сопряженными с G-белками, в то время как P2X рецепторы представляют собой лиганд-оперируемые ионные каналы (или ионотропные рецепторы). На сегодняшний день в P2Y рецепторы входит 8 подтипов, а P2X рецепторы состоят из 7 подтипов (P2X1-P2X7) (Khakh et al., 2001; King et al., 2001). Буква «P» в обозначении определяет название активатора или лиганда (пурины и в некоторых случаях пиримидины), а цифра «2» отличает их от рецепторов P1 семейства, в которые входят рецепторы A₁, A_{2a}, A_{2b} и A₃, лигандом для которых служит аденозин (рис. 5).

В настоящее время в соответствии с рекомендациями Номенклатурного Комитета Международного общества фармакологов классификация пуринорецепторов выглядит следующим образом:

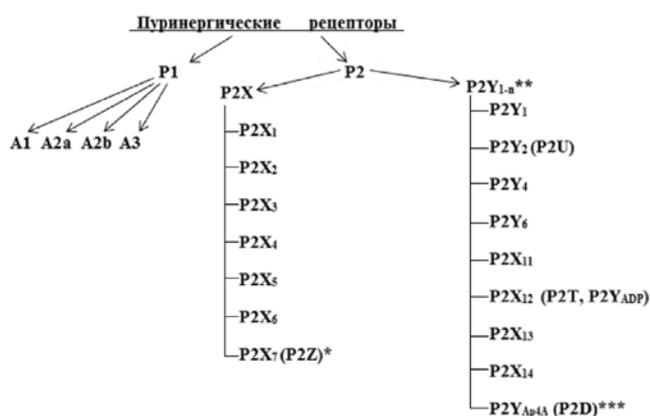


Рис. 5. Классификация пуринергических рецепторов (Зиганшин, 2005)

Строение P2X рецепторов

Рецепторы P2X семейства содержат внутренние ионные каналы, изменяющие свою конформацию благодаря связыванию рецептора с АТФ. В случае связывания рецептора с лигандом ионный канал меняет свое состояние из закрытого на открытое, что приводит к возникновению трансмембранного ионного тока, изменению трансмембранного потенциала и локальной концентрации ионов, что является ключевым моментом в сигнализации (Zimmermann, 2000).

Как и многие другие рецепторы, P2X рецепторы являются белковыми комплексами, в состав которых входит 379–472 аминокислот. Эти комплексы в виде поры встроены в биомембраны. Пора представлена гидрофобными трансмембранными доменами и значительной внеклеточной гидрофильной наружной петлей. Существуют еще концевые фрагменты, расположенные внутри клетки (Dunn et al., 2001).

Ионотропные рецепторы P2X семейства характеризуются наличием топологических трансмембранных субъединиц внутриклеточных N- и C- концов. Эти трансмембранные субъединицы несут консенсус-связывающие сайты (мотивы) для протеинкиназ. Каждый из рецепторов имеет два гидрофобных трансмембранных сегмента (TM1 и TM2), разделяющихся эктодоменом. В свою очередь эктодомен содержит десять консервативных остатков цистеина, которые образуют дисульфидные связи. Таким образом, N- и C- концы представляют собой внутриклеточные домены, в то время как наибольшая часть молекулы, состоящая из порядка 280 аминокислот, образует внеклеточную петлю. Эти петли по своей форме напоминают Na⁺-каналы эпителия млекопитающих (ENaC) или протон-чувствительные ионные каналы (ASICs). Из двух ТМ-связанных регионов первый TM1 (или M1) образует структуру так называемого «воротного механизма», а второй TM2 (или M2) участвует в формировании внутренней части поры для ионов. В структуре большой внеклеточной петли присутствует 10 остатков цистеина, благодаря которым в петле образуется несколько дисульфидных мостиков, формирующих вторичную структуру с топологическими сайтами связывания с АТФ (рис. 6А) (North, 2002; Fields, Burnstock, 2006).

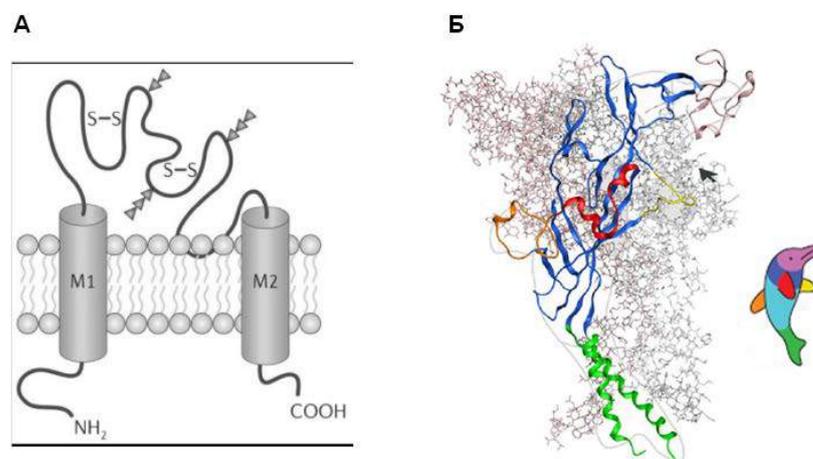


Рис. 6. Строение P2X рецептора. А – общая схема строения одной мембранной субъединицы P2X рецептора (Fields, Burnstock, 2006); Б – Модель P2X4 рецептора. Дельфиноподобная структура одной субъединицы выделена следующими цветами: «тело» – голубым и темно-синим, «хвост» – зеленым, «голова» – розовым, «спинной плавник» – оранжевым, «правый плавник» – красным и «левый плавник» – желтым. Стрелкой указано одно из трех возможных мест связывания АТФ (Kaczmarek-Hájek et al., 2012)

Благодаря применению методов электрофоретического разделения (Nicke et al., 1998) и современной атомно-силовой микроскопии (Barrera, 2005) показано, что P2X рецепторы состоят из 3 субъединиц. Впервые трехмерная структура пуриnergического рецептора была получена в 2009 году на основе анализа кристаллической структуры zfP2X4 рецептора из рыбы *Danio rerio* (zebrafish) (Kawate et al., 2009). Проведенная

кристаллизация белка zfP2X4 в неактивном состоянии позволила впервые установить топологию этого ионотропного рецептора. Обнаружено, что большой внеклеточный домен рецептора выступает из мембраны примерно на 70Å и имеет чашеобразную форму, закрученную вправо. Трансмембранный участок сравнительно небольшой и имеет протяженность около 28Å.

Трансмембранная область рецептора по форме напоминает песочные часы. Она сформирована шестью трансмембранными спиралями (по две в каждой субъединице). Положение этих спиралей в субъединицах перпендикулярно относительно друг друга. Кроме того, спирали наклонены по отношению к биомембране под углом 45°. Общепринятым считается сравнение 3D-структуры одной субъединицы P2X пуринорецептора с формой тела дельфина. В такой «дельфиноподобной» структуре (dolphin-like structure) ТМ-спирали сравнивают с «хвостовым плавником», внеклеточные области сопоставляют с «верхней частью тела» дельфина, к домену «тела» крепятся «головной» домен, «спинной плавник», «левый и правый плавники». Домен «тела» образован β-складками, сшитыми между собой и образующими своеобразный β-сэндвич, и имеет жесткую структуру (рис. 6Б).

N-конец P2X-рецепторов состоит приблизительно из 30 аминокислотных остатков, в то время как С-конец содержит приблизительно 30–240 аминокислотных остатков, варьирующих между различными подтипами рецепторов. Структура N- и С-конца не установлена, но хорошо известно, что внутриклеточные домены играют важную роль в мембранном трафике, десенситизации каналов, белок-белковых взаимодействиях и модуляции фосфолипидов (Wang, Yu, 2016).

Физико-химические свойства P2X рецепторов

Биохимическими методами было установлено, что с внеклеточной частью P2X рецепторов связываются только три молекулы АТФ (North, 2002; Jiang et al., 2003). Методами направленного мутагенеза P2X рецепторов было показано, что связыванию АТФ способствуют консервативные остатки лизина, расположенные рядом с доменами ТМ1 и ТМ2, а координировать адениновую группу АТФ могут ароматические остатки во внеклеточной петле (North, 2002; Roberts, Evans, 2004). Функциональная значимость поверхностей между соседними доменами P2X рецепторов также была доказана методами электрофизиологии (Jiang et al., 2003).

P2X рецепторы являются катионселективными (Ding, Sachs, 1999), демонстрируя в основном избирательную проницаемость для двухвалентных катионов, преимущественно для Ca²⁺ (Egan, Khakh, 2004). Для координации АТФ эти рецепторы имеют определенную

аминокислотную последовательность, что отличает их от остальных АТФ-связывающих белков. Использование техники мутагенеза позволило провести масштабную работу по определению сайтов связывания агонистов P2X1, P2X2, P2X3 и P2X4 рецепторов. Результаты этих работ, а также функциональных работ на мутантных сайтах связывания P2X2/3 рецепторов, позволили сделать вывод о том, что «карман» сайта связывания АТФ консервативен и фактически неизменен у всего семейства P2X рецепторов: он расположен на поверхности двух смежных субъединиц, и в связывании агониста вовлечены аминокислоты из различных субъединиц. Эти результаты согласуются с данными по установлению положения соответствующих аминокислот в zfP2X4 рецепторе методами моделирования. Было доказано, что сайт связывания АТФ окружен консервативными аминокислотными остатками, вовлеченными в связывание АТФ и локализован внутри субъединицы на дистанции 45 Å от трансмембранного домена (Kawate et al., 2009).

В 2012 г. в журнале Nature была опубликована работа, посвященная установлению трехмерной структуры zfP2X4 рецептора на основе рентгеноструктурного анализа кристалла этого белка в активированном состоянии в комплексе с АТФ (Hattori, Gouaux, 2012). В структуре связанного с агонистом активированного рецептора обнаружен ранее невидимый АТФ-связывающий мотив и поры открытых ионных каналов. Связывание с АТФ индуцирует в рецепторе расщепление замыкающего нуклеотидного связывающего кармана, сгибание β -листа нижнего тела и радиальное расширение внеклеточного вестибюля. Структурное расширение внеклеточного вестибюля непосредственно связано с открытием поры ионного канала посредством расширения трансмембранных спиралей наподобие ирисовой диафрагмы (рис. 7А–Г). Таким образом, было доказано структурное разграничение места связывания АТФ и поры ионного канала.

На основании сравнительного анализа данных по трехмерной структуре P2X рецептора в неактивном (закрытом) и активированном (открытом) состоянии сделано заключение, что P2X рецепторы представляют собой переплетенные тримерные мембранные белки с межоперационными внутрисубъединичными взаимодействиями, прослеживающимися во всем канале. Эти взаимодействия можно разделить на три составляющие (Hattori, Gouaux, 2012; Wang, Yu, 2016):

(1) В сайты связывания АТФ вносят вклад домены из разных субъединиц, а именно, «головного» и LF-домена (левый плавник) из одной и той же субъединицы, а также доменов DF (спинной плавник) и верхнего «тела» из соседней субъединицы. Таким образом, существует три участка связывания АТФ, хотя недавнее исследование показало, что связывание АТФ только с двумя из трех сайтов является достаточным для открытия канала.

(2) Домены тела трех субъединиц переплетаются друг с другом, образуя основное «ядро» рецепторов P2X₄, которое окружено тремя сайтами связывания АТФ. Это «ядро» может быть далее разделено на верхнюю и нижнюю секции в соответствии со строением тела «дельфина», причем верхняя часть поддерживает стабильность рецепторов P2X₄, а нижняя часть транслирует конформационные изменения, вызванные связыванием с АТФ из внеклеточного участка к ТМ домену.

(3) «Хвосты» трех субъединиц составляют ТМ-домен P2X₄ рецепторов. Три спирали ТМ2 составляют пору канала, а ТМ1 охватывает ТМ2 извне.

Мультипликационная модель АТФ-зависимого механизма активации P2X₄ рецептора представлена на рисунке 7Д–Е.

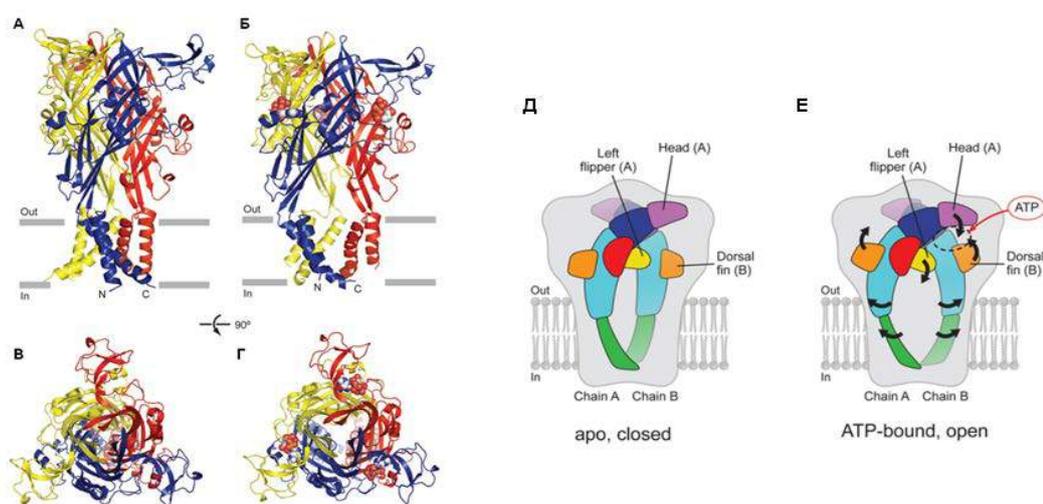


Рис. 7. Архитектура P2X₄ рецептора в неактивном (А, В) и активном АТФ-связанном (Б, Г) состояниях. А, Б – структура тримера рецептора, видимая сбоку параллельно плоскости мембраны. Субъединицы обозначены красным, синим и желтым цветом. Молекулы АТФ показаны в шаровом представлении. В, Г – структура тримера, видимая сверху перпендикулярно плоскости мембраны (Hattori, Gouaux, 2012). Мультипликационная модель АТФ-зависимого механизма активации P2X₄ рецептора. Черные стрелки обозначают перемещение из закрытого «апо» состояния (Д) в открытое АТФ-связанное состояние (Е) (Hattori, Gouaux, 2012).

Было детально показано, каким образом связывание рецептора с АТФ приводит к активации канала. Во-первых, в сайте связывания АТФ внутри междусубъединичной полости АТФ способствует смыканию пространства между доменами «головы» и «спинного плавника», вызывая перемещение домена «спинного плавника» вверх к головному домену для размещения АТФ посредством гидрофобных взаимодействий, тогда как АТФ-выталкивает «левый плавник» из кармана для связывания АТФ. Поскольку «спинной плавник» и «левый плавник» структурно связаны с доменом нижнего «тела», то происходит сопутствующее наружное изгибание области нижнего тела в связанном с АТФ

состоянии, что существенно расширяет внеклеточный вестибюль на $\sim 10 \text{ \AA}$. При сгибании или движении плеча доменов нижнего тела домены верхние тела каждой субъединицы в значительной степени ведут себя как жесткое тело, и субъединицы поворачиваются на $\sim 8 \text{ \AA}$ вокруг оси вращения, расположенной в верхней части тела рецептора. Наконец, домены нижнего тела непосредственно связаны с ТМ1 и ТМ2 доменами и, таким образом, их изгиб наружу непосредственно способствует открытию поры ионного канала, заставляя спирали ТМ «расширяться» наподобие ирисовой диафрагмы (Hattori, Gouaux, 2012; Wang, Yu, 2016).

Установленная трехмерная структура P2X4 рецептора в АТФ-связанном и активированном состоянии предполагает два возможных пути, по которым катионы могли бы получить доступ к ионному каналу: (1) центральный путь вдоль оси симметрии с тремя краями и (2) латеральный путь через отверстия над «порой ионного канала». В открытом состоянии у P2X4 рецептора, связанного с АТФ, путь вдоль оси симметрии в трех измерениях слишком мал, чтобы обеспечить проницаемость ионов, тогда как боковые проемы во внеклеточном преддверии рецептора широко открыты (Hattori, Gouaux, 2012). Поэтому боковые проемы – это наиболее вероятные пути, по которым гидратированные ионы входят и выходят из рецептора. Эти предположения находятся в соответствии с недавно проведенными вычислениями (Kawate et al., 2011; Samways et al., 2011). Как только ионы проходят через боковые проемы, достаточно кислая область центрального вестибюля притягивает катионы и отталкивает анионы, концентрируя, таким образом, катионы вблизи входа в пору ионного канала (Samways et al., 2011).

Трехмерная структура пуриновых рецепторов на уровне одиночного канала была изучена с помощью прямого наблюдения методом атомно-силовой микроскопии (AFM). С этой целью использовался рекомбинантный P2X4 рецептор крысы, исследование которого проводили в условиях отсутствия и присутствия Ca^{2+} и АТФ во внешней среде. Было убедительно продемонстрировано, что рецептор представляет собой тример, состоящий из трех субъединиц. Визуализация конформационных изменений рецептора во времени после его активации выявила две различные формы активированных структур, а именно, структуру тримера в неактивном состоянии и структуру, состоящую из трех разошедшихся в стороны субъединиц с подобием поры в центре. Это наблюдение было подтверждено исследованиями активации этого рекомбинантного рецептора, реконструированного в БЛМ. В этих условиях активация P2X4 рецептора сопровождалась резким увеличением транспорта Ca^{2+} или бромистого этидия через каналы (поры), образуемые встроенными в БЛМ рецепторами (Shinozaki et al., 2009).

Агонисты и антагонисты P2X рецепторов

В настоящий момент все соединения, проявляющие активность агонистов или антагонистов пуринергических рецепторов P2X семейства, являются синтетическими, которым присущ целый ряд недостатков, включая недостаточную селективность или эффективность, или значительное влияние на активность экто-АТФазы (Зиганшин, Зиганшина, 2009). Кроме того, ряд антагонистов проявляет избирательность по отношению к одним и тем же рецепторам, но относящимся только к определенным видам животных (или к человеку) или даже к определенному типу клеток одного и того же организма. Более того, до сих пор отсутствует достаточно большое количество эффективных и селективных антагонистов к каждому из подтипов P2X-рецепторов, что, несомненно, сдерживает прогресс в использовании таких эффекторов в биохимии, фармакологии и медицине.

Полный список известных на сегодняшний день эффекторов различных типов P2X рецепторов можно найти, например, в справочнике компании Tocris Bioscience (Tocris Reviews No. 33, 2010; www.tocris.com) или на сайте компании Sigma (Sigma-RBI eHandbook; www.sigma-aldrich.com/ehandbook). Список наиболее часто используемых агонистов и антагонистов P2X рецепторов представлен в таблице 3.

Таблица 3. Наиболее часто используемые агонисты и антагонисты P2X рецепторов

Агонисты				
№	Название вещества	Код вещества	Селективность	Ссылка
1	Аденозинтрифосфат	<i>АТФ</i>	основной эндогенный агонист для большинства подтипов P2X-рецепторов	Burnstock, 1972
2	Аналоги АТФ, где связующий атом кислорода в фосфатной цепи замещён метиленовой группой	<i>β,g-Метилен-АТФ</i> и <i>β,γ-метилен-АТФ</i>	селективны по отношению к гомомерным и гетеромерным рецепторам P2X1 и P2X3	Coddou et al., 2011..
3	Аденозин-5'-О-(3-тиотрифосфат)	<i>АТФ_{γS}</i>	активирует как P2X-, так и P2Y-рецепторы	Abbrachio et al., 2006.
4	2-Метилтио-АТФ	<i>2-MeSATP</i>	сильный агонист как для P2X-, так и для P2Y-рецепторов	Jacobson et al., 2009
5	23'-О-(4-бензоил)бензоил АТФ	<i>BzATP</i>	агонистом как P2X-, так и P2Y-рецепторов	Caresquero et al., 2009

Антагонисты				
№	Название вещества	Код	Селективность	Ссылка
1	Тринитрофенил-АТФ	<i>ТНФ-АТФ</i>	<i>ТНФ-АТФ</i> и его ди- и монофосфатные производные ингибируют P2X1, P2X3 и P2X2/3 в наномолярных концентрациях	Virginio et al., 1998
2	сурамин	- аналоги <i>NF023</i> ; <i>NF279</i> ; <i>NF157</i>	наиболее активен в отношении P2X1-рецепторов	Virginio et al., 1998; Guo et al., 2002; Ullmann et al., 2005
3	Фенолсульфонфталеина натрия соль	Феноловый красный	селективный блокатор P2X1	Sigma-RBI eHandbook
4	ненуклеотидный антагонист	<i>NF770</i> и <i>NF778</i>	являются антагонистами P2X2-рецепторов в наномолярных концентрациях	Wolf et al., 2011
5	ненуклеотидный антагонист	<i>NF110</i>	использовался при изучении нейрональных P2X3-рецепторов. Не обладает высокой селективностью, способен блокировать P2X1-рецепторы	Hausmann et al., 2006
6	Пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота	<i>PPADS</i>	обладает сильным антагонистическим эффектом в отношении как гомо-, так и гетеромерных P2X-рецепторов, а также P2Y-рецепторов.	Kim et al., 2005
7	Пиридоксаль-5-фосфат-6-азофенил-4'-карбоксилат	<i>MRS 2159</i> ,	аналог <i>PPADS</i> , высокоселективен по отношению к P2X1-рецепторам и устойчив к эктонуклеотидазе, проявляет антагонизм в отношении P2X7-рецепторов	Donnelly-Roberts et al., 2009; Kim et al., 2001
8	Антрахиноновое производное 1-амино-4-[3-(4,6-дихлоро[1,3,5]триазин-2-иламино)-4-сульфопениламино]-9,10-диоксо-9,10-дигидро-антрацен-2-сульфонат натрия	<i>PSB-1011</i>	является селективным антагонистом P2X2-рецепторов при наномолярных концентрациях	Baqi et al., 2011

9	Бриллиантовый синий G 250	<i>BVG</i>	является слабым антагонистом P2X4-рецепторов, большую активность проявляет по отношению к P2X7-рецепторам, эффект зависит от концентрации и медленно обратим.	Jiang et al., 2000
10	5-({[3-феноксibenзил][(1S)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафталенил]амино}карбонил)-1,2,4-бензентрикарбоксилловая кислота	<i>A-317491</i>	ненуклеотидный эффективный и высокоселективный антагонист рекомбинантных и нативных рецепторов P2X3 и P2X2 /3	Jarvis et al., 2002
11	соединение диаминопиримидиновой структуры	<i>AF353</i>	является высокоэффективным антагонистом рекомбинантных P2X3-рецепторов крысы и человека и P2X2/3-рецепторов человека	Gever et al., 2010
12	5-(3-бромобензил)-1,3-дигидро-2H-бензофурано[3,2-е]-1,4-дiazepин-2-он	<i>5BDBD</i>	блокирует P2X4-рецепторы, экспрессированные на клетках яичника хомячка (концентрация полумаксимального ингибирования, IC ₅₀ =0,5 мкМ)	Donnelly-Roberts et al., 2008
13	Трикарбонилдихлорорутений (II) димер	<i>CORM-2</i>	является эффективным обратимым неконкурентным антагонистом рекомбинантных P2X4-рецепторов человека и имеет значение для их изучения и разработки нового класса антагонистов	Wilkinson et al., 2011
14	3,3-бис[4-гидрофенол]-1(3H)-изофлюоранон	Фенолфталеин	селективный блокатор P2X4	Sigma-RBI Handbook
15	Декаванадат	-	в большей степени блокирует P2X7-рецепторы, но также активен в отношении P2X2 и P2X4. Являясь обратимым конкурентным антагонистом, декаванадат имеет важное значение при изучении механизмов взаимодействия лигандов с P2X7-рецепторами	Michel et al., 2006
16	1-[N,O-бис(5-	<i>KN 62</i>	один из первых	Chessell et

	изохинолинсульфон)-N-метил-L-тирозил]-4-фенилпиперазин		идентифицированных антагонистов P2X7 рецепторов; в основном блокирует P2X7 крысы. KN-62 также ингибирует CaM киназу II	al., 1998
--	--	--	--	-----------

За последние десятилетия наметился существенный прогресс в исследовании агонистов и антагонистов P2X-рецепторов, однако необходимость разработки новых веществ, избирательно активных в отношении этих рецепторов *in vitro* и *in vivo* всё ещё существует. В настоящее время известно, что, в дополнение к ортостерическим сайтам связывания АТФ, рецепторы P2X семейства имеют дополнительные аллостерические сайты, которые модулируют действие агонистов на рецепторы, включая сайты для некоторых металлов, протонов, нейростероидов, активных форм кислорода и фосфоинозитидов. Аллостерическая регуляция P2X рецепторов часто является специфичной для рецептора и может быть полезным инструментом для идентификации типа P2X рецептора в нативных тканях и их роли в передаче сигналов (Coddou et al., 2011).

Дифференциальная аллостерическая модуляция металлами является одной из наиболее интересных характеристик P2X рецепторов. Направление эффектов модуляции варьирует между различными металлами и между различными субъединицами P2X. Было идентифицировано несколько аминокислотных остатков во внешней петле рецептора, имеющих решающее значение для эффектов металлов, и они, вероятно, являются частью специфических аллостерических сайтов в P2X рецепторах. Первыми аллостерическими модуляторами, описанными для семейства P2XR, были цинк и медь, которые используются в качестве дополнительных критериев для характеристики P2XR. Эти металлы оказывают прямо противоположное действие в зависимости от типа рецептора, который они модулируют. Например, цинк ингибирует P2X1 и P2X7, но потенцирует P2X2, P2X3, P2X4 и P2X5 рецепторы (Virginio et al., 1997). В настоящее время аллостерическая модуляция P2X рецепторов доказана для таких металлов как цинк, медь, кадмий и ртуть.

Установлено, что липофильное соединение инвермектин (IVM), широко используемое в качестве противопаразитарного средства в медицине и ветеринарии, является специфическим и селективным модулятором P2X4 рецепторов. Добавленный извне, IVM резко усиливает амплитуду входящего тока, чувствительность рецептора к АТФ, уменьшает уровень десенситизации, значительно продлевает деактивацию после удаления АТФ. Было показано, что модулирующее действие инвермектина связано с его

избирательным распознаением определенного сайта в трансмембранном ТМ-домене P2X4 рецепторов (Jindrichova et al., 2009).

Очевидно, что некоторые нейростероиды обратимо взаимодействуют с P2X рецепторами прежде всего как положительные или отрицательные аллостерические модуляторы, а не влияют на экспрессию генов. Хотя в настоящее время сайт(ы) связывания этих стероидов с P2XR не описаны на молекулярном уровне, установлено, что такие нейростероиды как альфаксолон и аллопрегнанонон эффективно потенцируют P2X4 рецепторы, а прогестерон является позитивным модулятором для рецепторов P2X2 типа (Codocedo et al., 2009). Помимо этого было показано, что в качестве аллостерических модуляторов могут выступать такие соединения как фосфоинозитиды (потенциация P2X1, P2X3, P2X4, P2X5, P2X7 и уменьшение десенситизации P2X2 рецепторов), профорбол (потенциация P2X4 и P2X7), кетамин (потенциация P2X7), этиловый спирт (ингибирование P2X2 и P2X4) и толуол (потенцирование P2X2 и P2X4) (Coddou et al., 2011).

Распространение P2X рецепторов и их физиологическая роль

Генетический анализ выявил гены P2X рецепторов у многих видов животных (North, 2002), кроме *Drosophila* и *Caenorhabditis elegans*. Эти рецепторы найдены почти во всех без исключения органах и тканях, однако отмечено неравномерное распределение P2X рецепторов в различных типах тканей и клеток. На начальных этапах исследований данные рецепторы анализировали с помощью методов Northern blot, гибридизации *in situ*, иммуногистохимии с применением специфических антител, световой и электронной микроскопии (Collo et al., 1996; Llewellyn-Smith et al., 1998; Gröschel-Stewart et al., 1999). Это позволило провести скрининг и представить общую картину принадлежности P2X рецепторов различным типам тканей организма животных и человека. Так, P2X1 рецепторы в настоящее время найдены в центральной нервной системе в пре- и постсинаптических сайтах гипоталамуса и мозжечка (Loesch et al., 1998; 2001). Согласно последним данным, P2X2 и P2X3 рецепторы локализованы в эндотелиальных клетках микрососудов в мозге, тимусе, щитовидной железе и кишечнике, а также в эпителиальных клетках щитовидной железы (Gröschel-Stewart et al., 1999; Loesch et al., 2001). Кроме того, установлено, что P2X3 рецепторы преимущественно локализованы в сенсорных нервах, особенно в небольших ноцицептивных нейронах дорсальных корешков тройничного и узлового ганглиев (Burnstock, 2000). Доказано наличие P2X2, P2X4 и P2X5 рецепторов в гладких мышцах (Nori et al., 1998), а P2X5 рецепторы преимущественно связаны с пролиферирующими и дифференцирующими клетками кожного эпителия и волосных фолликулах (Gröschel-Stewart et al., 1999), в мочевом пузыре, мочеточнике и тканях

половых органов (Bardini et al., 2000). Кроме того, P2X5 рецепторы появляются в некоторых клетках во время эмбрионального развития (Meyer et al., 1999). В ЦНС обнаружено существенное количество P2X4 и P2X6 рецепторов, которые не блокируются стандартными антагонистами P2 рецепторов (Burnstock, 2001). Большой набор пуриновых рецепторов (P2X1, P2X2, P2X4, P2X5 и P2X7 рецепторы) был обнаружен в тимоцитах, макрофагах, нейтрофилах, эозинофилах, лимфоцитах, тучных и дендритных клетках (Burnstock, Knight, 2004).

Физиологическая роль пуринергических рецепторов P2X семейства достаточно разнообразна. Например, отсутствие P2X1 рецепторов в тромбоцитах нокаутных по гену этого рецептора мышей приводит к снижению уровня образования тромбов и снижению свертываемости крови (Nurden, 2007). Кроме того, P2X1 рецепторы выполняют важную функцию в узнавании бактерий иммунокомпетентными клетками. Показано, что активация P2X1 рецепторов у нейтрофилов приводит к увеличению хемотаксиса клеток и усилению иммунной защиты (Kälvegren et al., 2010). В тучных клетках синтез цитокинов и экспрессия хемокинов опосредуется действием АТФ на P2X7 рецепторы и P2X1/P2X3 рецепторы соответственно. Оказалось, что P2X7 рецепторы вовлечены в процессы иммуномодуляции. В местах повреждения тканей и воспаления этот тип рецепторов воспринимает сигналы и активируется от действия внеклеточного АТФ, а его стимуляция в дендритных клетках приводит к реализации различных тканевых факторов воспаления (Baroni et al., 2007; Lecut et al., 2009; Bulanova et al., 2009).

Участие P2X1 и P2X4 рецепторов в функционировании макрофагов и иммунных реакциях более детально описано в главе «Результаты и обсуждение» настоящей диссертации в разделе, посвященном исследованию иммуномодулирующего действия кукумариозида A₂-2. Роль P2X7 рецепторов, расположенных в иммунных клетках, в воспалении изучена достаточно хорошо (Di Virgilio, 2007). Например, было установлено, что P2X7 рецепторы играют фундаментальную роль в трансдукции сигналов липополисахаридов и последующей активации макрофагов, что подразумевает их использование в качестве терапевтической мишени при сепсисе (Sommer et al., 1999). Поскольку известно, что АТФ уменьшает анти-IgE-индуцируемый выход гистамина из тучных клеток в легких, можно предположить участие P2X рецепторов в развитии аллергических и астматических реакций (Schulman et al., 1999). Показано, что экспрессирующиеся в альвеолярных макрофагах P2X7 рецепторы во время запуска провоспалительных ответов клеток активируют синтез и выход индуктора гранулематозного воспаления интерлейкина IL-1 β (Lemaire, Leduc, 2003). Стимуляция с помощью АТФ P2X7 рецепторов в макрофагах и клетках микроглии приводит к быстрой

активации каспазы-1 с последующим высвобождением из этих клеток противовоспалительных цитокинов IL-1 β (Ferrari et al., 2006; Di Virglio, 2007).

В настоящий момент известно, что P2X7 рецепторы отличаются от остальных подтипов семейства P2X рецепторов своей способностью формировать большие (до 4 нм в диаметре) поры, вероятно, благодаря удлиненным внутриклеточным С-концам. Формирование таких пор может приводить к индукции апоптоза клеток (Surprenant et al., 1996). В настоящий момент известно, что P2X7 рецепторы часто интернализованы внутри клеток, но во время некоторых патологических состояний, таких как ишемия или рак, происходит экстернализация этих рецепторов на поверхность мембран клеток, что приводит к апоптозу (Dutton et al., 2000). А вот АТФ-индуцированный через P2X7 рецепторы макрофагов апоптоз может приводить к подавлению жизнедеятельность ряда бактерий, живущих в цитоплазме клеток, что рассматривается сейчас как одно из средств борьбы с внутриклеточными инфекциями (Lammas et al., 1997).

Пуриnergические рецепторы принимают активное участие в процессах обновления кератиноцитов в кожном эпидермисе. Так, P2X7 рецепторы, локализованные в клетках на границе зернистого/рогового слоя, принимают активное участие в апоптозе, а P2X5 рецепторы зернистого слоя вовлечены в клеточную дифференцировку (Greig et al., 2003). Обнаружена экспрессия P2X7 рецепторов в клетках костной ткани, остеобластах и остеокластах, где они усиливают дифференциацию, формирование и рост костей и являются посредниками активации апоптоза соответственно (Grol et al., 2009). В настоящий момент активно изучается участие и роль P2X рецепторов в передаче сигналов, связанных с чувственным восприятием (Housley et al., 2009). Такие пуриновые рецепторы как P2X1, P2X2, P2X3 и P2X2/3 найдены в эпителии языка, где они принимают участие в передаче вкусовых ощущений и сигналов боли (Bo et al., 1999; Rong et al., 2000), а вот в эпидермальном слое полости носа обнаружены P2X2, P2X5 и P2X7 рецепторы (Gayle, Burnstock, 2005).

В одном из детальных научных обзоров (Surprenant et al., 2009), посвященных описанию основных функций пуриновых рецепторов в различных органах и тканях, дана обобщенная характеристика физиологической роли рецепторов P2X семейства:

1. P2X1 рецепторы являются нейромедиаторными рецепторами в симпатически иннервируемых гладких мышцах и играют важную функциональную роль в тромбоцитах и в юкстагломерулярном аппарате почек;

2. P2X2 и P2X3 субъединицы (и P2X2/3 гетеромерные рецепторы) необходимы для инициирования сенсорных сигналов в сигнальных путях передачи вкуса, хеморецепции, висцерального растяжения и невропатической боли;

3. P2X4 рецепторы участвуют в функционировании сосудистого эндотелия. Мыши, лишенные гена рецептора P2X4, являются гипертониками и имеют уменьшенный диаметр артерий. Микроглиальные P2X4 рецепторы в спинном мозге также вовлечены в формирование нейропатической боли;

4. Активация P2X7 рецепторов приводит к освобождению провоспалительных цитокинов макрофагами, праймированными липополисахаридами. Применение антагонистов P2X7 является крайне полезным при лечении воспалений в случае ревматоидных артритов.

В настоящее время стало очевидным, что P2X рецепторы представляют собой важные молекулярные терапевтические мишени, нарушение функционирования которых приводит к серьезным осложнениям физиологии человека и животных, и опасным заболеваниям. Поиск соединений, способных модулировать функцию пуриновых рецепторов, может привести к созданию новых лекарственных средств, эффективных при лечении болезней центральной и периферической нервной системы (включая нейродегенеративные заболевания) и иммунных заболеваний. Данные рецепторы играют ключевую роль во внутриклеточной сигнализации, синаптической передаче, агрегации тромбоцитов, регуляции почечного кровотока, функционировании сосудистого эпителия, иммунной воспалительной реакции и т.д. Этот тип ионных каналов вовлечен в развитие патологических состояний при ряде заболеваний и поэтому P2X рецепторы представляют собой потенциальные молекулярные мишени для создания новых лекарственных средств.

Так, P2X1 и P2X4 рецепторы играют важную роль в регулировании кровотока, ремоделировании кровеносных сосудов и в функционировании миокарда. Нарушение функционирования этого типа рецепторов приводит к ряду сердечно-сосудистых заболеваний (Ralevic, 2012). Известно, что P2X7 рецепторы сверхэкспрессированы при ряде заболеваний центральной нервной системы. Стрессовые воздействия, такие как гипоксия/ишемия, механические повреждения, бактериальные или химические токсины вызывают эндогенную активацию P2X7 рецепторов и приводят к самостоятельному усилению выделения АТФ и дальнейшей активации P2X7 рецепторов в соседних клетках. В конечном итоге это может привести к некоторым нейродегенеративным заболеваниям, таким как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона (Sperlagh., Ples, 2014). Установлено, что P2X4 и P2X7 рецепторы сверхэкспрессированы в активированной микроглии после периферийных повреждений нервов. Взаимодействие этих рецепторов с АТФ приводит к возникновению сильной нейропатической боли (Makoto et al., 2012). Установлено, что P2X7 рецепторы играют ключевую роль в процессах воспаления, благодаря их участию в созревании и высвобождении

провоспалительных интерлейкинов IL-1 β и IL-18. Ингибирование этого типа рецепторов приводит к немедленному уменьшению уровня провоспалительных цитокинов в области воспаления и в плазме крови (Morandinet al., 2014). В настоящий момент известно, что некоторые патогенные микроорганизмы, такие как, например, *Chlamidia*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Neisseria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Listeria*, *Francisella*, *Legionella*, и *Yersinia pestis* ведут внутриклеточное существование, прячась преимущественно в макрофагах и ускользая тем самым от иммунной системы. Направленная активация P2X7 рецепторов в макрофагах может приводить к апоптозу зараженных клеток иммунной системы и, соответственно, к гибели патогенов (Miller et al., 2011). Показано, что некоторые пуриновые рецепторы P2X семейства могут быть полезными в разработке терапии онкологических заболеваний. Установлено, что активация P2X5 (совместно с P2Y11 рецепторами) в опухолевых клетках может вызывать переключение клеточного цикла из состояния пролиферации в стадию дифференцировки. Обнаружено, что P2X7 рецепторы, активирующие апоптотическую каспазную систему клеток, экспрессируются в опухолевых клетках в нефункциональной конформации nfP2X7. Такие рецепторы не способны формировать большие поры, приводящие к гибели клеток. Разработка способов трансформации нефункциональной формы P2X7 рецепторов в функциональную в опухолевых клетках может привести к созданию нового подхода в борьбе с раком (Varden et al., 2014).

Таким образом, P2X рецепторы играют ключевую роль в различных физиологических процессах. Функционирование этих рецепторов нарушено при многих патологических состояниях, что позволяет рассматривать пуриновые рецепторы в качестве перспективных мишеней для лечения ряда заболеваний. Терапевтический потенциал агонистов и антагонистов P2X рецепторов в настоящее время активно исследуется при терапии ряда расстройств, в том числе хронической невропатической и воспалительной боли, депрессии, кистозного фиброза, сухости глаз, синдрома раздраженного кишечника, интерстициального цистита, дисфункции мочевого пузыря, рака и внутриклеточных инфекций. Сами пуринергические соединения изучают в настоящее время в качестве потенциальных препаратов для лечения нейрогенных воспалений, ревматоидных артритов, периодонтитов. Однако, эти исследования по-прежнему сдерживаются отсутствием эффективных и селективных активаторов и блокаторов пуринергических рецепторов. Следовательно, поиск новых потенциальных эффекторов P2X рецепторов является чрезвычайно актуальной задачей.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исследуемые соединения

Получение кукумариозида A₂-2

Тритерпеновый гликозид кукумариозид A₂-2 получен из этанольного экстракта дальневосточной голотурии *S. 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 ¹³C ЯМР спектроскопии и ESI масс-спектрометрии и сравнивали с ранее опубликованными данными (Авилов и др., 1990). Химическая структура кукумариозида A₂-2 представлена на рис. 8А.

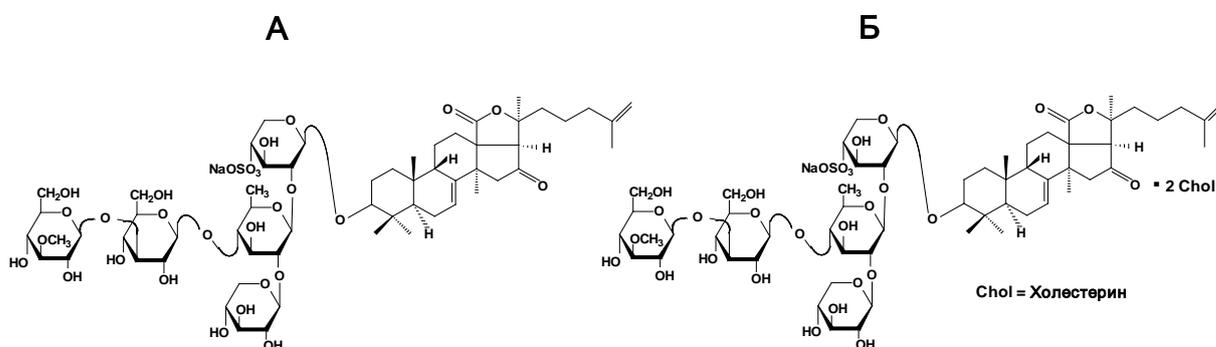


Рис. 8 Химическая структура кукумариозида A₂-2 (А) и кумазида (Б).

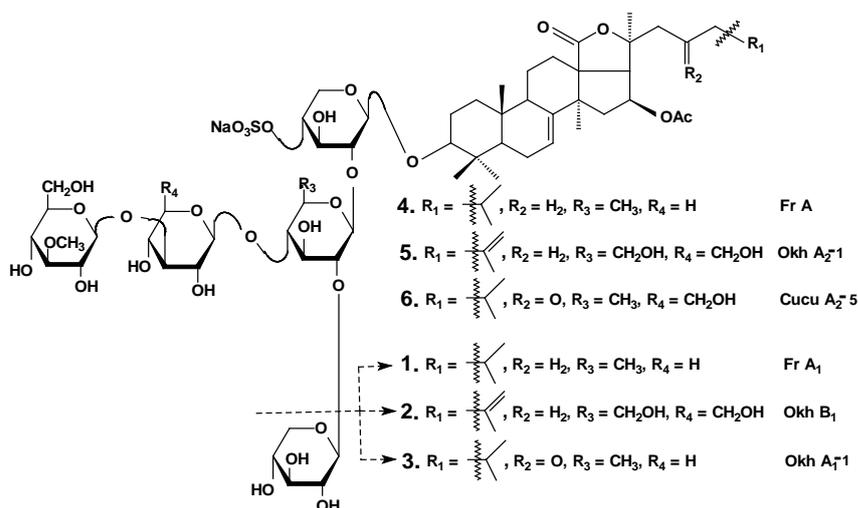


Рис. 9. Моносульфатированные тритерпеновые гликозиды из голотурии *S. okhotensis*: **1** – фрэндозид A₁ (Fr A₁) (Авилов и др., 1993; Silchenko et al., 2008); **2** – охотозид B₁ (Okh B₁) (Silchenko et al., 2008); **3** – охотозид A₁-1 (Okh A₁-1) (Сильченко и др., 2007); **4** – фрэндозид A (Fr A) (Girard et al., 1990; Silchenko et al., 2008); **5** – охотозид A₂-1 (Okh A₂-1) (Сильченко и др., 2007); **6** – кукумариозид A₂-5 (Cucu A₂-5) (Авилов et al., 2003; Silchenko et al., 2008).

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* (Avilov et al., 2007), образцы тритерпеновых гликозидов из голотурии *C. okhotensis*, *E. fraudatrix* и *Actinoscumis typical* (рис. 9–11).

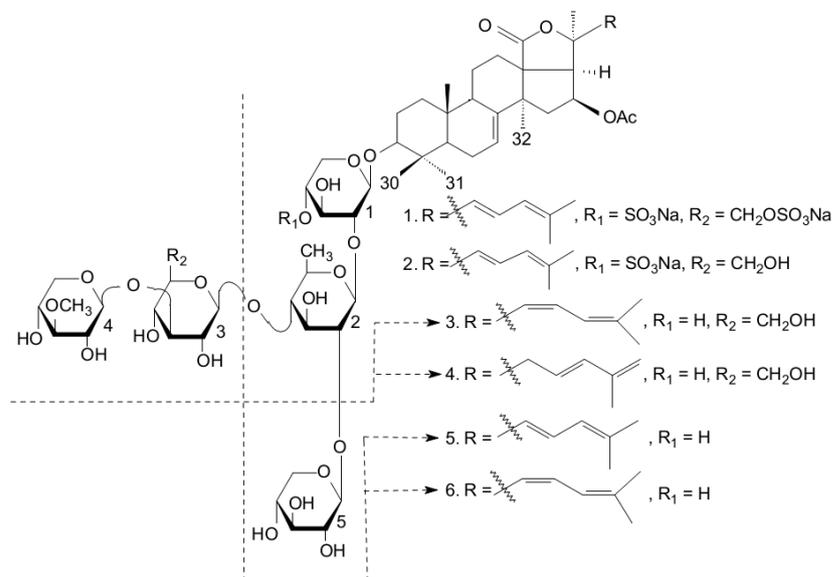


Рис. 10. Структура кукумариозидов I₂ (1), H (2), A₅ (3), A₆ (4), B₂ (5) и B₁ (6) из голотурии *E. fraudatrix* (Калинин и др., 1988; Silchenko et al., 2012a; Silchenko et al. 2012b; Silchenko et al., 2013c).

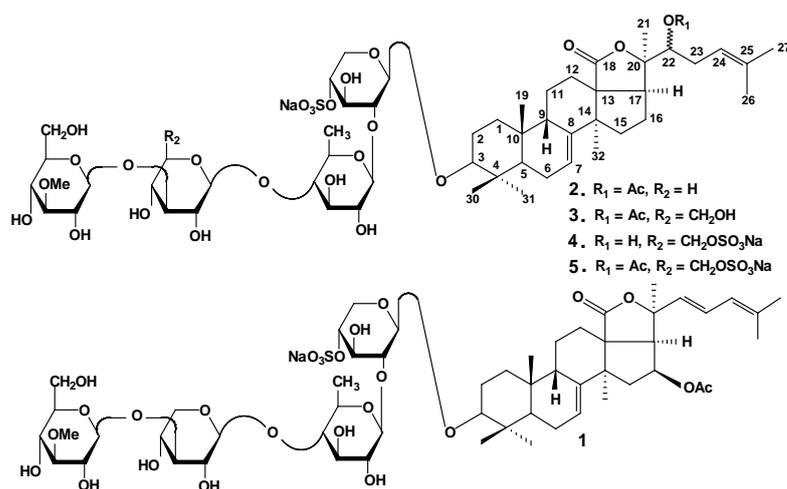


Рис. 11. Химическая структура тритерпеновых гликозидов тупикозидов, выделенных из голотурии *Actinoscumis typica*: 1 – тупикозид A₁; 2 – тупикозид A₂; 3 – тупикозид B₁, 4 – тупикозид C₁; 5 – тупикозид C₂ (Silchenko et al., 2013a).

Получение кумазида

Препарат кумазид (рис. 8Б) 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. Его получают из водно-бутанольного экстракта дальневосточной голотурии *S. japonica* и применяют для изготовления лекарственных форм кумазида. Эмпирическая формула: $C_{59}H_{91}O_{29}SNa \cdot 2C_{27}H_{46}O$. Супрамолекулярная масса: 2070 Да. Детальное описание метода получения кумазида описано в работе (Стоник и др., 2004).

Получение ³H-меченного кукумариозида A₂-2

³H-меченный кукумариозид A₂-2 был получен в лаборатории изотопно-меченных физиологически активных веществ, отдел химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН (г. Москва) под руководством академика РАН Н. Ф. Мясоедова. На рисунке 12 показано строение исходного гликозида кукумариозида A₂-2 (1) и общая схема синтеза меченных производных (2) и (3).

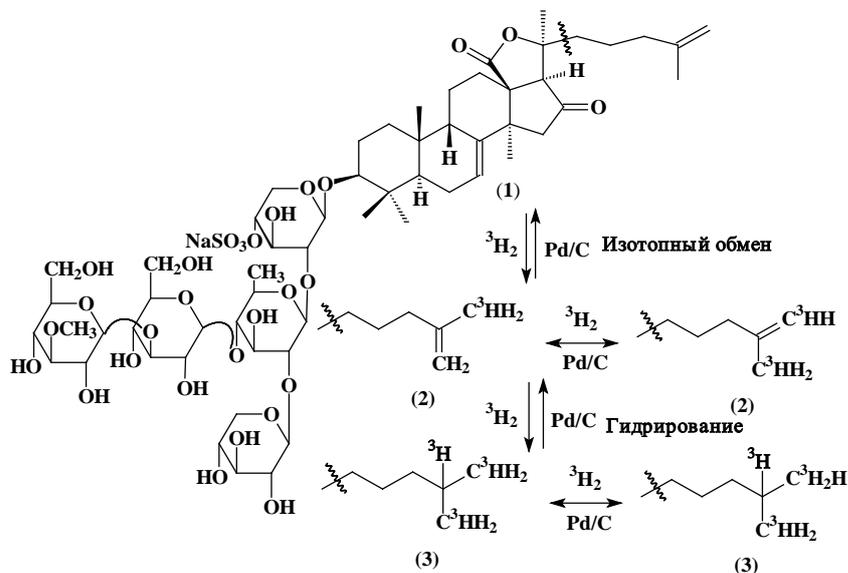


Рис. 12. Строение исходного гликозида (1) и схема синтеза меченных производных (2) и (3).

Выход меченого целевого препарата 2 составил 26%, молярная радиоактивность – 22 Ки/ммоль, радиохимическая чистота 96–98%. Наряду с целевым соединением 2 при этом образуется около 3% насыщенного по боковой цепи третированного производного 3, причем его молярная радиоактивность составляла 46 Ки/ммоль (Шевченко и др., 2003; Мясоедов и др., 2007).

2.2. Животные

Мыши линии Balb/c, CBA, C57BL/6 и CD-1 весом 18–20 г были приобретены в питомнике РАМН «Столбовая» (Московская область, Россия) и в дальнейшем содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище.

Белые беспородные крысы (самцы) с начальной массой 200–220 г получены из вивария НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАМН. Животные содержались на стандартном лабораторном рационе в условиях свободного доступа к воде и пище.

Все эксперименты были проведены с соблюдением правил, этических норм и международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (European Treaty Series-No. 123, 1986 г.), и одобрены Этическим комитетом ФГБУН ТИБОХ им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

2.3. Получение и культивирование клеток

Получение эмбрионов морского ежа. Развивающиеся эмбрионы морского ежа *S. nudus* использовали в качестве клеточной модели для определения цитотоксичности тестируемых соединений (Бузников и Подмарев, 1975; Kobayashi, 1984). Для выделения зрелых половых продуктов 1–2 мл 0,5 М раствора KCl вводили с помощью шприца в перивисцеральную полость тела морских ежей. Зрелые яйца и сперму собирали отдельно в стаканы с фильтрованной морской водой. Собранные зрелые яйцеклетки промывали трижды фильтрованной морской водой и доводили конечную концентрацию яйцеклеток в суспензии до 1000 клеток/мл. Стадию зрелости яйцеклеток оценивали по отсутствию зародышевого пузырька у яйцеклеток. Для искусственного оплодотворения к суспензии яйцеклеток добавляли несколько капель неразведенной спермы и тщательно перемешивали клеточную суспензию. Через несколько минут оценивали процент оплодотворения под микроскопом по отделению оболочки оплодотворения. В эксперименты брали клетки с процентом оплодотворения не ниже 95%.

Получение первичной культуры спленоцитов. Мышиные спленоциты получали из селезенки мышей линии Balb/c (Хэй, 1989). С этой целью мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, извлекали селезенку, измельчали ее с помощью ножниц и гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР), а затем клеточную суспензию пропускали через нейлоновый газ (280 меш). Полученную взвесь спленоцитов отмывали от дебриса трижды физраствором с помощью центрифугирования (1500 об/мин, 5 мин, 5°C, центрифуга Heraeus Labofuge

400R, Германия) и ресуспендировали в необходимом количестве раствора ФСБР (рН 7.4). Конечная концентрация клеток в суспензии была $2-5 \times 10^6$ клеток/мл. Подсчет количества клеток проводили в гемоцитометре (Sigma, США). Полученную культуру клеток хранили для дальнейших исследований на холоду в течение 1-2 час.

Выделение перитонеальных макрофагов. Макрофаги получали из перитонеальной жидкости мышей линии Balb/c (самки весом 20–22 г). Мышей забивали методом цервикальной дислокации, в брюшную полость немедленно вводили 3 мл ФСБР и интенсивно пальпировали брюшную полость в течение 1–2 мин (Адамс, 1983). Затем с помощью шприца собирали перитонеальную жидкость и переносили ее в стеклянные чашки Петри или на покровные стекла в камеры для визуализации и анализа клеток (Cell Imaging Dish, 170 μ m, 35×10 mm, Eppendorf). Чашки или камеры инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа до полного прикрепления макрофагов ко дну камеры. Затем клеточный монослой трижды промывали ФСБР и на конечном этапе приливали к клеткам 100 мкл ФСБР. В дальнейшем клеточный монослой в камерах использовали для окрашивания специфическими флуоресцентными зондами и последующего анализа клеток, либо аккуратно снимали с чашек Петри с помощью скрепера и использовали в дальнейших экспериментах.

Получение клеток асцитной карциномы Эрлиха. В экспериментах использовали музейный тетраплоидный штамм клеток мышинной асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), полученный из Всесоюзного онкологического центра РАМН (г. Москва). Клетки асцитной карциномы Эрлиха пассировали в брюшной полости мышей линии CD-1 обоего пола (Софьина, 1976). Для эксперимента клетки отбирали на 7–8 день после инокуляции опухоли. Для этого мышей забивали методом цервикальной дислокации и с помощью шприца собирали асцитическую жидкость, содержащую опухолевые клетки. Клетки трижды отмывали от экссудата центрифугированием при 1500 об/мин (450 g) в течение 5 мин с помощью центрифуги Heraeus Labofuge 400R в растворе ФСБР. Конечная концентрация клеток в инкубационной среде составляла $1-2 \times 10^6$ клеток/мл.

Культивирование опухолевых клеток человека. В экспериментах использовали различные типы клеток рака простаты человека. Клетки линий PC3, NT2, NT2-R, 2102EP и 2102EP-R, полученные в Университетской клинике Гамбург-Эппендорф (г. Гамбург, Германия), выращивали при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в среде DMEM (Lonza, Бельгия) или RPMI-1640 (Gibco by Life Technologies, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (Invitrogen, США) и 1% раствора пенициллин-стрептомицина (Gibco, Life Technologies, США).

Получение эритроцитов. Эритроциты получали из крови мышей. С этой целью полученную кровь трижды промывали ФСБР, рН 7.4, осаждая эритроциты методом центрифугирования ($450\text{ g} \times 10\text{ мин}$). Осадок эритроцитов ресуспендировали в ФСБР до конечной концентрации 1,0% и хранили на льду.

2.4. Определение жизнеспособности клеток

Окрашивание клеток трипановым синим. Цитотоксическое действие исследуемых веществ определяли при помощи прижизненного красителя трипановый синий. Погибшие клетки интенсивно окрашиваются в синий цвет, так как краситель свободно проникает в цитоплазму таких клеток через мембрану с нарушенной проницаемостью. В то же время, живые клетки остаются неокрашенными в течение 3–5 мин. Такой методологический подход позволяет быстро оценить эффективность влияния веществ на жизнеспособность клеток и проницаемость их биомембран.

Для эксперимента брали 96-луночные планшеты, в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора исследуемого вещества и 200 мкл суспензии клеток, после чего ставили планшеты в CO_2 -инкубатор на 1–24 ч при 37°C . После инкубирования отбирали по 20 мкл суспензии клеток из лунки, смешивали с 20 мкл раствора красителя трипановый синий (Flow, США, концентрация 0,4 %), суспензию вносили в гемоцитометр, помещали на предметный столик микроскопа AXIO Imager A1 (Zeiss, Германия) и фотографировали клетки с помощью цветной CCD видеокамеры (AxioCam MRc, Zeiss, Германия). Подсчет живых (неокрашенных) клеток и погибших (окрашенных трипановым синим) клеток производили при помощи программы Image Tool Version 3.00 (UTHSCSA, США).

Измерение активности неспецифической эстеразы. Активность неспецифической эстеразы в клетках определяли с помощью флуоресцентного зонда флуоресцеин диацетат (FDA, Sigma, США). Во все лунки 96-луночной планшеты добавляли по 20 мкл растворителя (0,9% NaCl), 20 мкл исследуемых веществ и 200 мкл суспензии клеток. Планшету ставили в CO_2 -инкубатор на 24 ч при 37°C , затем добавляли зонд FDA (200 мкг/мл), и инкубировали при 37°C 15 мин. После чего измеряли флуоресценцию при $\lambda_{\text{ex}} = 485\text{ нм}$ и $\lambda_{\text{em}} = 518\text{ нм}$ с помощью спектрофлуориметра планшетного формата Fluoroskan Ascent (Thermo LabSystems, Финляндия).

MTT тест. Цитотоксическую активность исследуемых соединений определяли методом МТТ. Принцип метода МТТ основан на способности фермента сукцинатдегидрогеназы митохондриальной мембраны клеток млекопитающих восстанавливать желтую соль 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до кристаллов формазана фиолетового цвета, накапливающихся в результате этой

реакции в цитоплазме живых клеток. Таким образом, по интенсивности накопления кристаллов формазана в цитоплазме можно судить об уровне митохондриального дыхания клетки, что является показателем ее жизнеспособности. Количество образующегося формазана в клеточном монослое пропорционально имеющемуся количеству живых клеток.

В лунки 96-луночной планшеты (Costar, США) вносили по 20 мкл раствора тестируемого соединения различных концентраций и по 200 мкл клеточной суспензии (7×10^3 клеток/лунку), и затем инкубировали в течение 24 ч или 48 ч при 37°C и 5% CO₂. После инкубирования отбирали по 200 мкл супернатанта и добавляли по 100 мкл чистой среды. Затем по 10 мкл раствора МТТ (Sigma, США, 5 мкг/мл в ФСБР) добавляли в каждую лунку и инкубировали в темноте 4 ч, после чего добавляли по 100 мкл 10%-ного раствора SDS-HCl и инкубировали при 37°C на протяжении 4-18 ч. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 570 нм с помощью спектрофотометра Wallac 1420 Victor (PerkinElmer, США) или Multiskan FC (Thermo Scientific, Канада).

Окрашивание клеток флуоресцеин диацетатом и иодидом пропидия. FDA готовили как раствор в ДМСО (10 мкг/мл). Раствор иодида пропидия (PI, Sigma, США) готовили в дистиллированной воде в концентрации 1 мг/мл. Для приготовления рабочей концентрации FDA, 20 мкл маточного раствора добавляли к 5 мл ФСБР (pH 7.4). Затем 100 мкл рабочего раствора FDA вносили в каждую лунку микропланшеты с 1 мл суспензии клеток и тщательно перемешивали. После инкубирования в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 15 мин к суспензии клеток добавляли по 10 мкл маточного раствора иодида пропидия (PI). Через 5 мин аликвоту клеточной суспензии переносили на предметное стекло. Жизнеспособность клеток подсчитывали с помощью флуоресцентного микроскопа, учитывая количество живых клеток (зеленая флуоресценция) и погибших клеток (красная флуоресценция) (Розанов, 1988). Число окрашенных и неокрашенных клеток подсчитывали с использованием компьютерной программы AxioVision 2.0 (Zeiss, Германия). Процент жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле: (количество живых клеток / общее количество клеток) \times 100%. Цитотоксическую активность вещества выражали как концентрацию EC₅₀, при которой количество погибших клеток равно 50%.

Проточная цитометрия. Суспензию клеток разливали в пластиковые эппендорфы по 1 мл, вносили туда по 100 мкл исследуемого вещества в различных концентрациях, и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем в каждую пробирку добавляли по 5 мкл раствора FDA (в концентрации 5 мкг/мл) и снова инкубировали 30 мин при 20°C. За 3–5 мин до анализа к суспензии клеток добавляли раствор PI по 5 мкл (в концентрации 50 мкг/мл).

Цитотоксическую активность определяли методом проточной флуоресцентной цитометрии на анализаторе FACS Calibur, используя программное обеспечение BD CellQuest Pro (Becton Dickinson, США).

Процентное содержание погибших и живых клеток рассчитывалось по двумерному графику (дот-плот), считая количество клеток, собранных в зеленом (FL1, живые клетки) и красном (FL2, погибшие клетки) каналах. Математическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы WinMDI 2.9 (Joseph Trotter, США) и SigmaPlot 3.02 (Jandel Corporation, США).

Определение эмбриотоксической активности. После искусственного оплодотворения по 0,9 мл суспензии яйцеклеток морского ежа (1×10^3 клеток/мл) помещали в каждую лунку 24-луночной планшеты, содержащей по 0,1 мл раствора тестируемых соединений. Планшету с исследуемыми соединениями инкубировали при температуре 18–20°C до формирования в контроле зародышей на стадии развития 8 бластомеров (в некоторых случаях на стадии бластулы или плутеусов). Затем аликвоты раствора формалина (2%, конечная концентрация) добавляли в каждую лунку для фиксации эмбрионов и количество развившихся до стадии 8 бластомеров эмбрионов оценивалось с помощью инвертированного микроскопа для каждой концентрации тестируемых соединений. Все эксперименты повторяли трижды. Эффективные ингибирующие концентрации ($ЭД_{50}$, $ЭД_{100}$), средние значения и стандартную ошибку эксперимента рассчитывали графически с помощью компьютерной программы SigmaPlot 3.02 (Jandel Corporation, США).

Определение гемолитической активности. Гемолитическую активность препаратов исследовали следующим способом: 20 мкл раствора тестируемого соединения смешивали с 200 мкл суспензии эритроцитов в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Суспензию инкубировали 60 мин при 37°C в термостате. Затем клетки осаждали центрифугированием (2000 об/мин, 10 мин) и аликвоты супернатанта по 100 мкл переносили в 96-луночные плоскодонные планшеты. Концентрацию гемоглобина в супернатанте измеряли с помощью спектрофотометра μ Quant plate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, США) при $\lambda=541\text{nm}$. Степень гемолиза выражали в процентах по отношению к контрольным эритроцитам (Thron, 1964; Segal et al., 1966).

2.5. Определение острой токсичности

Для определения токсичности использовали лабораторных белых беспородных мышей. Острую токсичность препаратов оценивали по формуле Кербера (Behrens, Karber, 1935; Бойд, 1969):

$$ЛД_{50} = ЛД_{100} - \Sigma (z \times d)/m;$$

Где $ЛД_{50}$ – показатель гибели 50%-ов животных; $ЛД_{100}$ – показатель гибели всех животных; z – половина суммы числа животных, павших от двух последних доз; d – интервал между каждыми двумя последними дозами; m – число животных на каждую дозу.

2.6. Определение иммуномодулирующей активности

2.6.1. Распластывание, адгезия и подвижность

Распластывание клеток. Выделенную из мышей линии Balb/c перитонеальную жидкость переносили в чашки Петри и инкубировали в течение 1 ч при 37°C до прикрепления перитонеальных макрофагов к поверхности чашки. Затем монослой клеток трижды промывали раствором ФСБР (рН 7.4) для удаления не прикрепившихся лимфоцитов, фибробластов и эритроцитов. Далее клетки снимали с поверхности с помощью скрепера и полученную суспензию макрофагов в растворе ФСБР (2×10^6 клеток/мл) помещали на ледяную баню до использования. Затем 250 мкл суспензии перитонеальных макрофагов помещали на поверхность покровных стекол и инкубировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 2 ч в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамина и раствор тестируемого вещества в определенных концентрациях. Контрольные клетки инкубировали только в культуральной среде RPMI-1640.

Для оценки распастывания применяли окраску клеток с помощью флуоресцентного зонда 5-CFDA (50 мкг/мл в ФСБР). Клетки инкубировали в течение 60 мин, затем монослой клеток дважды промывали раствором ФСБР, после чего покровные стекла с клетками монтировали в камере для регистрации изображения на предметном столе инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия). В качестве источника света для возбуждения флуоресценции использовали ртутную лампу 75W Optosource, DAC-контроллер и монохроматор Optoscan (Cairn Research Ltd., Великобритания). Клетки облучали светом с длиной волны возбуждения $\lambda_{ex} = 488$ нм. Набор фильтров HQ FITC filter-block (Chroma Technology Corp., США) и объектив Fluor 40×/1.30 Oil (Zeiss, Германия) были установлены для визуализации флуоресценции. Изображения флуоресцентных клеток были получены с использованием цифровой CCD видеокамеры Hamamatsu Orca-ER C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Япония), затем захвачены и перенесены в IBM-совместимый компьютер Pentium-IV с помощью специализированной платы видеозахвата Firewire и сохранены на жестком диске компьютера в виде видеофайлов.

Интенсивность флуоресценции изображений 100 случайно выбранных клеток определяли инструментальными средствами программы AQM Advance 6 software (Kinetic Imaging Ltd., Великобритания) и выражали в пикселях. Геометрические параметры клеток (площадь, периметр, максимальная хорда и поверхность) оценивали с помощью программного модуля Spot Analysis (Kinetic Imaging Ltd., Великобритания). Каждый эксперимент проводили в трех повторностях. Увеличение площади, периметра и максимальной хорды отражает распластывание макрофагов и свидетельствует о том, что клетки становятся более плоскими. Увеличение параметра поверхности говорит об изменении морфологии и показывает, что клеточная поверхность стала более неправильной формы.

Определение адгезии спленоцитов. Полученные из селезенки мышей линии Balb/c спленоциты ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамина. Эксперименты по адгезии клеток проводили согласно протоколу производителя (Calbiochem, User Protocol CBA013 Rev. 30 November 2005, США) с некоторыми модификациями. В лунки 96-луночных плоскодонных планшет (Linbro®) вносили по 100 мкл раствора внеклеточного матрикса в ФСБР: коллаген I (Sigma, 200 мкг/мл), поли-L-лизин (0,1%, MP Biomedicals, США,) или БСА (10 мг/мл, Serva, Германия,). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°C и промывали раствором ФСБР. Затем в лунки последовательно вносили 20 мкл раствора тестируемого вещества в различных концентрациях и 200 мкл суспензии спленоцитов (2×10^5 клеток/лунка) в культуральной среде RPMI-1640. После 2 ч инкубирования при 37°C лунки осторожно дважды промывали раствором ФСБР (по 200 мкл) и прикрепившиеся клетки окрашивали с помощью 5-карбоксихлорофлуоресцеин диацетата (5-CFDA, 1 мкг/мл, Molecular Probes, США) в течение 1 ч при 37°C (Davenpeck et al., 1995). Затем клеточный монослой осторожно промывали раствором ФСБР и измеряли интенсивность флуоресценции при $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм с помощью спектрофлуориметра планшетного формата (Fluoroscan Ascent, Thermo Lab Systems, США). Все эксперименты проводились в пяти повторностях.

Подвижность клеток. Перитонеальные макрофаги мышей линии Balb/c были получены как описано выше и помещены на поверхность покровных стекол в проточной камере для регистрации флуоресценции RC-30HV (Warner Instruments, США). Клетки инкубировали при комнатной температуре в культуральной среде RPMI-1640 в течение 2 ч в присутствии или отсутствии тестируемого соединения. Затем клетки окрашивали флуоресцентным зондом 5-CFDA (50 мкг/мл в ФСБР для окраски цитоплазмы) и DAPI (10 мкг/мл в ФСБР для окраски ядер), промывали и инкубировали в культуральной среде RPMI-1640. Движение клеток регистрировали с помощью лазерного сканирующего

конфокального микроскопа LSM510 META (Zeiss, Германия), объектив Plan-Apochromat 100×/1.4 Oil DIC. В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали ультрафиолетовый лазер UV laser Enterprise (Coherent, США) $\lambda_{ex} = 364$ нм; фильтры Ch2-BP filter 385-470 нм и аргоновый лазер $\lambda_{ex} = 488$ нм; фильтры Ch3-LP filter 505 нм. Захват изображений проводили непрерывно в течение 15 мин с интервалами в 2 сек. Видеофайлы были записаны и перенесены на жесткий диск компьютера с помощью программного обеспечения LSM 510 software release 3.5 (Zeiss, Германия). Подвижность клеток оценивали инструментальными средствами программы CellTracker v.0.5 (Shen et al., 2006a; 2006b). Одновременно подсчитывали среднюю площадь клеток и ее изменение, скорость движения клеток и местоположение центра (центроид) клеток. Все эксперименты проводили в трех повторностях; по крайней мере, 5 клеток из каждой повторности были проанализированы.

2.6.2. Определение лизосомальной активности

Оценку активности внутриклеточных лизосом перитонеальных макрофагов проводили путем окрашивания и локализации лизосом флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым (Millot et al., 1997; Zoccarato et al., 1999). После адгезии макрофагов на покровном стекле камеры для анализа изображения клеток, на клеточный монослой наносили 200 мкл раствора акридинового оранжевого (10 мкМ, Calbiochem, США) в физрастворе и оставляли камеры в термостате при 37°C на 30 мин. Затем клеточный монослой трижды промывали физраствором. После этого камеры с клетками монтировали на предметном столе флуоресцентного микроцитометра Axiovert 200 (Zeiss, Германия) и проводили измерение интенсивности флуоресценции клеток в монослое с использованием системы регистрации флуоресцентного изображения клеток (Cairn Research Ltd., Великобритания). Клетки облучали светом с длиной волны $\lambda_{ex} = 488$ нм, флуоресценцию регистрировали при $\lambda_{em} = 520$ нм. Интенсивность флуоресценции изображений случайно выбранных клеток и оценку лизосомальной активности в клетках осуществляли инструментальными средствами программы AQM Advance 6 (Kinetic Imaging Ltd., Великобритания).

2.6.3. Определение АФК, NO и iNOs

Определение АФК в макрофагах. Для исследования генерирования АФК в клетках использовали первичную культуру перитонеальных макрофагов мыши и культуру мышинных макрофагов линии RAW 264.7, культивируемых в 96-луночных плоскодонных планшетах. Клетки инкубировали с тестируемыми веществами в различных

концентрациях или с липополисахаридом (0,5 мкг/мл, ЛПС), после чего проводили регистрацию уровня АФК в клетках. С этой целью проводили окрашивание клеток с помощью молекулярного флуоресцентного зонда 2,7-дихлородигидрофлюоресцеин диацетат (H₂DCF-DA, 10 мкМ, Molecular Probes, США) или дигидрорадамин-123 (100 нг/мл, Sigma) согласно протоколам производителя. Интенсивность флуоресценции клеток оценивали с помощью планшетного спектрофлуориметра PHERAstar FS (BMG Labtech, Германия) при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 488$ нм и эмиссии $\lambda_{em} = 518$ нм.

Определение NO в макрофагах. Для исследования генерирования NO в клетках использовали первичную культуру перитонеальных макрофагов мыши и культуру макрофагов мыши линии RAW 264.7. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами или ЛПС (0,5 мкг/мл) в течение различного времени, после чего проводили регистрацию уровня NO с помощью молекулярного флуоресцентного зонда FA-OMe (Shiue et al., 2012). Изображения флуоресцирующих клеток получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510 META (Zeiss, Германия), объектив 40×. Для количественного определения использовали спектрофлуориметр планшетного формата FERASTAR FS (BMG Labtech). Регистрацию проводили при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 488$ нм и эмиссии $\lambda_{em} = 540$ нм.

Оценка экспрессии iNOs методом ПЦР в реальном времени. Перитонеальные макрофаги мыши инкубировали с раствором тестируемого вещества или ЛПС (0,5 мкг/мл) в течение определенных промежутков времени. Затем клетки промывали и выделяли тотальную РНК с помощью TRIZOL реагента согласно инструкции производителя (GIBCOBRL, Gaithersburg, MD, США). Затем проводили реакцию обратной транскрипции РНК в комплементарную ДНК с использованием набора MMLV RT kit (Evrogen, РФ). Образцы нормализовали по экспрессии β -актина (F 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3' и R 5'-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3'). кДНК iNOs мыши амплифицировали, используя специфические праймеры: iNOS (F 5'-CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT-3' и iNOS R 5'-CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG-3'). В качестве флуоресцентного агента использовали интеркалирующий краситель SYBR Green (Sigma, США). Кинетические кривые накопления флуоресцентного сигнала регистрировали с помощью системы ПЦР-РВ RotorGene Q 5plex HRM (QIAGEN, Германия). Результаты выражали как уровень экспрессии гена iNOs, нормализованный относительно уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» бета-актина.

2.7. Исследование специфической активности кумазида

2.7.1. Влияние на устойчивость к инфекции мышей

Неинбредным мышам массой 18–20 г (по 12 мышей в группе) за 3 дня до заражения однократно вводили подкожно кумазид в дозах 0,01мкг/кг, 0,1 мкг/кг, 1 мкг/кг. Мышам контрольной группы вводили подкожно 0,85% раствор NaCl. Для заражения использовали двухсуточную агаровую культуру *Salmonella typhimurium* (штамм № 3339) ($LD_{100} = 125 \times 10^3$), *Yersinia pseudotuberculosis* (№ 538/1) ($LD_{100} = 250 \times 10^3$), *Listeria monocytogenes* (штамм № 2531) ($LD_{100} = 1 \times 10^7$), выделенные от больных псевдотуберкулезной, сальмонеллезной и листериозной инфекцией. *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* культивировали при температуре 37°C в течение 18–24 часов, *Y. pseudotuberculosis* при температуре 4°C в течение 48 часов на мясопептонном агаре (рН 7,2), после чего культуру микроорганизмов смывали 0,85% раствором NaCl и готовили взвесь микроорганизмов нужной концентрации по оптическому стандарту мутности (производства ГИСК им. Л.А.Тарасевича). Исследование устойчивости к стафилококковой инфекции проводили на мышах линии (СВА×BL)F1. В опыте формировали 5 групп: 12 мышей – контрольная группа, получавшая инъекции физиологического раствора, 12 мышей получали инъекцию препарата ГМДП (действующее вещество препарата ликолипид – N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин) в дозе 100 мкг/мл в качестве положительного контроля, по 12 мышей – группы, получавшие п/к инъекции препарата в дозах 10, 1 и 0,1 мкг/мышь. На следующие сутки после введения кумазида мышам заражали летальной дозой (10^{10} кл/мышь) *Staphylococcus aureus* (штамм Wood-46). За животными вели наблюдение в течение 21 дня. По полученным данным вычисляли величину ED₅₀ по формуле Кербера в модификации Ашмарина (Ашмарин, Воробьев, 1962), учитывая соотношение погибших и выживших животных в группах, зараженных микроорганизмами в логарифмически нарастающих дозах, процент выживаемости и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышам опытной и контрольной групп:

$\% \text{ выживаемости} = (\text{число выживших мышей} / \text{суммарное число выживших и погибших мышей}) \times 100$; СПЖ = сумма продолжительностей жизни всех мышей / число мышей в группе.

2.7.2. Исследование радиозащитного действия

В экспериментах использовали неинбредных лабораторных мышей массой 18–20 г (самки). Каждая группа включала по 10 животных. За 4 суток до облучения однократно или ежедневно животным вводили подкожно препарат кумазид в виде суспензии в 0,85%-

ном растворе NaCl в дозах 0,01 мкг/кг, 0,1 мкг/кг или 1,0 мкг/кг. Мышам контрольной группы вводили подкожно 0,85%-ный раствор NaCl. Сублетальное облучение животных проводили на гамма-терапевтической медицинской установке с закрытым источником на основе радионуклида кобальт-60 «Рокус-М» (ФГУП «ПП Равенство», Санкт-Петербург, Россия) в дозе 6,5 Гр при мощности дозы 1,14 Гр/мин. Наблюдение за животными вели в течение 30 суток. В каждой группе наблюдали динамику гибели животных после облучения. Расчет среднего времени жизни проводился с учетом выживших животных, время жизни которых полагали равным 30 суток:

$\% \text{ выживаемости} = (\text{число выживших мышей} / \text{суммарное число выживших и погибших мышей}) \times 100$; СПЖ = сумма продолжительностей жизни всех мышей / число мышей в группе.

Статистический анализ данных проводился методами описательной статистики, частотного анализа и анализа выживаемости (метод Каплан-Мейера, лог-ранговый критерий) (Kaplan, Meier, 1958). Обработка данных проводилась с использованием пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Ink., США).

2.7.3. Исследование влияния профилактического введения кумазида на кроветворение сублетально облученных мышей

После облучения на 4, 9 и 17 сутки мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков, из сердца забирали кровь и подсчитывали количество лейкоцитов в камере Горяева. Параллельно готовили мазки крови, которые фиксировали метанолом, окрашивали азур-П-эозином и микроскопировали. В мазках сосчитывали форменные элементы крови, определяя процентное содержание нейтрофилов и лимфоцитов. Для исследования влияния кумазида на массу и клеточность кроветворных (костный мозг бедренной кости) и лимфоидных (тимус, селезенка) органов из мышей параллельно выделяли тимус и селезенку, гомогенизировали, фильтровали через капроновый фильтр и подсчитывали количество ядросодержащих клеток в камере Горяева. Бедренную кость выделяли, отделяли эпифиз и диафиз, костный мозг вымывали 1 мл культуральной среды 199 и подсчитывали количество ядро-содержащих клеток в камере Горяева.

Для исследования влияния профилактического введения кумазида на количество полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) в селезенке сублетально облученных мышей на 8 сутки после облучения умерщвляли дислокацией шейных позвонков, выделяли селезенку, фиксировали в жидкости Буэна и подсчитывали количество дискретных колоний ПСКК стандартным методом (Patchen et al. 1987).

2.7.4. Оценка люминолзависимой и люцигенинзависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов человека

Выделение лейкоцитов. Вся работа была проведена на образцах венозной крови здоровых добровольцев. Забор крови производился утром натощак из локтевой вены в пробирку с антикоагулянтом, в качестве которого применяли гепарин в концентрации 10 Ед/мл. К 4 мл гепаринизированной крови добавляли 2 мл 3% желатины на ФСБР (рН 7,4), перемешивали и инкубировали в течение 10-15 минут при 37°C для осаждения эритроцитов. Лейкоциты из надосадочной жидкости отбирали и двукратно отмывали в ФСБР. Концентрацию лейкоцитов доводили до 2 млн/мл по сегментоядерным нейтрофилам.

Оценка ХЛ. В полистироловые пробирки добавляли 200 мкл ФСБР, 100 мкл люминола в концентрации 0,1 мг/мл, 100 мкл лейкоцитов, раствор препарата в конечных концентрациях 10, 1 и 0,1 мкг/мл, реакцию проводили в дублях. После предварительной инкубации лейкоцитов с различными дозами препарата измеряли хемилюминесценцию (ХЛ) при помощи хемилюминометра LUCY 1 (Anthos Labtec Instruments, Австрия) в течение 10 минут. Затем в пробы добавляли зимозан (Sigma, США), опсонизированный смешанной сывороткой доноров, до конечной концентрации 0,5 мг/мл и измеряли стимулированную ХЛ в течение 10–15 минут.

2.7.5. Определение поглотительной активности фагоцитов периферической крови человека

Мечение бактерий. Для постановки фагоцитоза и реакции внутриклеточного киллинга использовали бактерии *S. aureus*, меченые ФИТЦ. Суточную культуру *S. aureus* смывали ФСБР. Для экспериментов по фагоцитозу бактерии убивали нагреванием на водяной бане при 100°C в течение 40 мин. Стафилококк дезинтегрировали с помощью ультразвука на УЗ-бане (51кГц, 90W) 2 часа, осаждали при 1000g 25 мин. и отмывали 10 мл ФСБР. Второй раз отмывку проводили 0,1 М карбонатно-бикарбонатным буфером, рН 9,5. Ресуспендировали в этом же буфере и по стандарту мутности концентрацию бактерий доводили до 100 млн./мл. К суспензии добавляли свежеприготовленный раствор ФИТЦ: для убитых бактерий – 0,1 мг/мл, для живых – 1 мг/мл. Для мечения стафилококка его выдерживали с ФИТЦ в течение 12-16 часов при +4°C в темноте. Затем бактерии трижды отмывали ФСБР (режим центрифугирования – 1000g 25 мин), ресуспендировали в ФСБР с добавлением 5% эмбриональной сыворотки телят и 5% ДМСО. Концентрацию бактерий доводили до 500 млн./мл с помощью Tru Count пробирок с известным количеством (52800 шт.) микробусинок. Аликвоты хранили при –70°C.

Оценка фагоцитарной активности. Лейкоциты выделяли, как описано раньше. Лейкоциты предварительно инкубировали с различными дозами препарата (0,1, 1 и 10 мкг/мл) в ФСБР в течение 1 и 3 часов при 37°C. Затем 90 мкл клеток смешивали с 90 мкл ФИТЦ-меченого стафилококка 100 млн./мл и инкубировали 30 мин при 37°C, добавляли 2 мл охлажденного лизирующего раствора на 10-15 минут для лизиса эритроцитов, лейкоциты осаждали 200g 3 мин, отмывали 1 раз 2 мл охлажденного ФСБР с 0,02% ЭДТА и ресуспендировали в 0,5 мл того же раствора с добавлением 1% параформальдегида. Отмывка от несвязавшихся бактерий была достигнута за счет использования ЭДТА и дифференцированного центрифугирования на низких оборотах (200g – бактерии не оседают). Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Beckton Dickinson, США) в программе CellQuest. На DotPlot по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния выделяли облака нейтрофилов и моноцитов и анализировали флюоресценцию на канале FL1 (535 нм). Оценивали процент клеток с высокой флюоресценцией на канале FL1 (клетки, поглотившие меченый стафилококк).

2.7.6. Определение бактерицидной активности (киллинга) лейкоцитов периферической крови человека

Мечение ФИТЦ живых бактерий *S. aureus* описано выше. Лейкоциты предварительно инкубировали с различными дозами препарата (0,1; 1 и 10 мкг/мл) в ФСБР в течение 1 и 3 часов при 37°C. Затем 90 мкл клеток смешивали с 90 мкл живых ФИТЦ-меченых бактерий (10 млн/мл), 20 мкл сыворотки. Смесь инкубировали 20 мин. при 37°C, лейкоциты осаждали центрифугированием при 200 g 1 мин. при +4°C и 2 раза отмывали ФСБР (200 мкл на лунку) от несвязавшихся бактерий. Лейкоциты ресуспендировали в 200 мкл ФСБР и инкубировали еще 1 ч при 37°C. Затем клетки осаждали 200 g 1 мин при +4°C, клетки разрушали 200 мкл 0,2% сапонины (Merck) на 0,01 М карбонатно-бикарбонатном буфере с рН 9,5 в течение 5 мин. Высвободившиеся бактерии осаждали 2000 g 10 мин. Для разделения живого стафилококка от убитого в пробы добавляли PI (2,5 мкг/мл), который окрашивает только мертвые клетки, и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur. На DotPlot по параметрам прямого и бокового светорассеяния выделяли облако стафилококка и анализировали флюоресценцию на каналах FL1(535 нм) и FL3(585). Оценивали процент клеток с двойной меткой (погибший стафилококк) по отношению к общему числу клеток.

2.7.7. Определение накопления антителообразующих клеток (АОК) у мышей

Исследования проводили на мышах-гибридах (СВА×С57В1/6)F₁ весом 19-21 г. Препарат кумазид разводили физиологическим раствором и в объеме 200 мкл в дозах 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мышь вводили подкожно за 3 часа до иммунизации их эритроцитами барана (ЭБ) в дозе 5×10^6 клеток. Контрольным животным вместо препарата вводили физиологический раствор и также иммунизировали их ЭБ. На 4 сутки методом локального гемолиза в геле агарозы определяли количество антителообразующих клеток в селезенках. Одновременно подсчитывали количество ядро-содержащих клеток (ЯСК) в селезенках. Результаты выражали в виде числа АОК на селезенку, на 1 миллион ЯСК селезенки и в виде индекса модуляции (ИМ) иммунного ответа по сравнению с контрольной группой (Jerne, Nordin, 1963).

2.7.8. Определение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у мышей

Мышей иммунизировали подкожно (в холку) эритроцитами барана в дозе 2×10^8 клеток через 3 часа после подкожного введения препарата. Препарат вводили в объеме 200 мкл в дозах 0,1 мкг, 1 мкг, 10 мкг и 100 мкг на мышь. Животным контрольной группы вводили вместо препарата 200 мкл физиологического раствора. На 5 сутки в правую лапку мышей опытных и контрольной группы проводили разрешающую инъекцию антигена в дозе 1×10^8 в объеме 50 мкл. В другую лапку в том же объеме вводили физиологический раствор. Разрешающей инъекции были подвергнуты также не иммунизированные, но получавшие физиологический раствор мыши (отрицательный контроль реакции). Через 24 часа регистрировали ответ путем определения массы «опытной» и «контрольной» лап. Индекс реакции выражали в процентах прироста массы лапки, в которую вводили ЭБ, по отношению к массе «контрольной» лапки.

2.7.9. Определение пролиферативной активности лимфоцитов человека

Забор крови осуществляли у здоровых добровольцев из локтевой вены в стеклянную стерильную пробирку, содержащую 1 мл раствора гепарина (KRKA, Словения) в среде 199 (ПанЭко, Россия) в концентрации 50 ЕД/мл. Гепаринизированную кровь разводили средой 199 (ПанЭко) в 2 раза и наслаивали на 2 мл фиколл-верографина (ПанЭко). После центрифугирования в течение 40 минут 400g при комнатной температуре кольцо клеток стерильно собирали и дважды отмывали в среде 199. Мононуклеарные клетки (МНК) разводили в полной культуральной среде (ПКС – RPMI-1640 (Sigma), 10% инактивированной эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США), 10мМ HEPES-буфера (Sigma), 2мМ L-глутамин (ICN, США) и 40 мкг/мл гентамицина (KRKA) в концентрации

2×10^6 кл/мл. МНК культивировали в объёме 150 мкл в ПКС в 96-луночных круглодонных планшетах (Nunc, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ 72 часа в присутствии или без стимуляторов: фитогемаглютинин (ФГА, Sigma) 5 мкг/мл, кумазид 0,1; 1 и 10 мкг/мл. За 6 часов до окончания реакции в каждую лунку добавляли ³H-тимидин в концентрации 1 микроКюри на лунку. По окончании реакции клеточную взвесь переносили на стекловолоконные фильтры. Высушенные в течение ночи фильтры помещали в сцинтиляционные флаконы с 3 мл сцинтиляционной жидкости и производили подсчет включения радиоактивной метки. Результаты выражали в импульсах в минуту (имп./мин.).

2.7.10. Определение продукции цитокинов мононуклеарными клетками человека

Забор крови и выделение МНК осуществляли как описано выше. МНК в количестве 2×10^5 кл/лунку инкубировали в плоскодонном 96-луночном планшете (Costar, США) в ПКС в дублях в присутствии или без стимуляторов: ФГА 5 мкг/мл, ЛПС (Sigma) 200 нг/мл, препарат кумазид в концентрациях 0,1; 1 и 10 мкг/мл при 37°C 5% CO₂. Через 72 ч супернатанты собирали и хранили при -20°C до проведения ИФА. Концентрацию цитокинов в супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов: интерферон γ -OptEIA human IFN-gamma Set (Pharmingen, США), интерлейкин-12p70 – OptEIA human IL12p70 Set (Pharmingen), интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли- α – «ProCon» (Санкт-Петербург, Россия).

2.7.11. Исследование экспрессии мембраноассоциированных маркеров лимфоцитов

Мононуклеары крови здоровых доноров выделяли на градиенте плотности фикоколл-верографина (1,077). Клетки дважды отмывали и суспендировали в ФСБР, довели до концентрации 2×10^6 /мл, помещали в центрифужные пробирки, добавляли кумазид в конечной концентрации 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл и инкубировали в течение 60 минут при 37°C. Жизнеспособность выделенных клеток по данным теста на окрашиваемость трипановым синим составляла 95–98%. Экспрессию мембранных молекул определяли методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител, меченных флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), к антигенам CD3, CD4, CD8, CD25, HLA-DR производства ТОО «Медбиоспектр» (Москва, Россия).

2.8. Исследование фармакодинамики кумазида

2.8.1. Связывание ³H-кукумариозида A₂-2 с перитонеальными макрофагами мыши

Макрофаги мышей линии Balb/c получали описанным выше способом. Перитонеальную жидкость переносили в стеклянные чашки Петри (10 см диаметром) и оставляли на 1 ч при 37°C для адгезии макрофагов. Затем монослой клеток трижды промывали физраствором и собирали макрофаги с помощью скрепера и пипетирования в среде DMEM. Полученную суспензию макрофагов (в конечной концентрации 2×10^5 клеток/мл) вносили по 200 мкл в лунки 96-луночной плоскодонной планшеты и оставляли на 1 ч при 37°C в термостате для последующей адгезии.

³H-кукумариозид A₂-2 (удельная активность 22 Ки/ммол) был получен методом, описанным ранее. Для определения связывания кукумариозида A₂-2 с перитонеальными макрофагами мыши применяли радиолигандный метод исследования (Levitzki, 1980). С этой целью готовили растворы ³H-кукумариозида A₂-2 в растворе 145 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7.4 в последовательных разведениях. После удаления культуральной среды от клеточного монослоя в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора с различными концентрациями ³H-кукумариозида A₂-2 и оставляли планшету для инкубирования в течение определенного времени при комнатной температуре. После инкубирования, раствор, содержащий радиоактивно-меченный гликозид, удаляли, четырежды отмывали клеточный монослой от несвязавшегося радиоактивно-меченого гликозида (по 200 мкл холодного физраствора), добавляли к монослою 100 мкл горячего (65°C) лизирующего раствора (25% SDS и 0,125 М NaOH) и оставляли планшету при нагревании в термостате (65°C) на 15 мин. Затем из каждой лунки отбирали по 100 мкл раствора, содержащего лизированные клетки, и переносили в 5 мл сцинтилляционного коктейля, тщательно перемешивали и оставляли высвечиваться в темноте в течение ночи, после чего считали радиоактивность образцов, используя сцинтилляционный счетчик радиоактивности Tri-Carb 2800 TR (PerkinElmer/Packard, США). Чистые лунки пластиковой планшеты, содержащие эквивалентное количество радиоактивно-меченого гликозида, но не содержащие клеток, использовали для расчета неспецифической адсорбции.

Перерасчет концентраций связавшегося с клетками гликозида и расчет параметров связывания производили, исходя из паспортных значений удельной радиоактивности ³H-кукумариозида A₂-2 и эффективности счетчика по каналу ³H, равной 66,15%. Расчет количества свободного (free) и связанного (bound) с клетками гликозида, а также представление полученных данных в координатах Скэтчарда и определение констант

связывания и количества мест связывания производили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc., США).

2.8.2. Измерение микровязкости мембран клеток

Оценку микровязкости биомембран спленоцитов селезенки мыши осуществляли методом регистрации латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена (Galla, 1974). Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (возбужденных димеров) пирена. Степень эксимеризации пирена I_2/I_1 , равная соотношению значений интенсивности флуоресценции эксимеров ($\lambda_{em}=470$ нм) и мономеров ($\lambda_{em}=372$ нм), находится в обратной зависимости от относительной микровязкости (Владимиров, Добрецов, 1980; Болдырев и др., 1986). Клетки суспендировали в физрастворе, добавляли раствор пирена (Sigma, США) в этаноле (5 мкМ, конечная концентрация) и инкубировали 1 мин при 25°C и постоянном встряхивании. Затем к суспензии клеток добавляли исследуемые вещества в различных концентрациях и через 1 мин снимали спектры флуоресценции при длине волны возбуждения 336 нм с помощью спектрофлуориметра Hitachi-850 (Япония). Степень эксимеризации пирена рассчитывали из отношения значений интенсивности флуоресценции при 470 нм к значениям интенсивности флуоресценции при 372 нм (I_{470}/I_{372}).

2.8.3. Измерение мембранного потенциала клеток

Для нагрузки клеток флуоресцентным зондом на клеточный монослой наносили 100 мкл раствора ФСБР, содержащего флуоресцентный зонд DioC2(3) (Molecular Probes, США) в конечной концентрации 5 мкМ, и оставляли камеры в темноте при комнатной температуре на 30 мин. Затем клеточный монослой трижды промывали ФСБР. Далее на монослой клеток наносили 100 мкл ФСБР, после чего камеры с клетками монтировали на предметном столе флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия) и проводили измерение интенсивности флуоресценции клеток в монослое. В качестве источника света использовали ртутную лампу 75W Optosource и монохроматор Optoscan (Cairn Research Ltd., Великобритания). Клетки облучали светом с длиной волны возбуждения $\lambda_{ex} = 488$ нм. Набор фильтров Tex Red filter-block (Chroma Technology Corp., США) и объектив Fluor 40×/1.30 Oil (Zeiss, Германия) были установлены для визуализации флуоресценции зонда в цитоплазме при $\lambda_{em}=500$ нм для зонда DioC2(3). Изображения флуоресцентных клеток были получены с использованием цифровой CCD видеокамеры Hamamatsu Orca-ER C4742-95 (Hamamatsu Photonics), затем захвачены и перенесены в IBM-совместимый компьютер Pentium-IV с помощью специализированной платы видеозахвата Firewire и сохранены на жестком диске компьютера в виде

видеофайлов. Интенсивность флуоресценции изображений случайно выбранных клеток, измерение динамики мембранного потенциала в клетках осуществляли инструментальными средствами программы AQM Advance 6 software (Kinetic Imaging Ltd., Великобритания) по стандартному методу (Grinvald et al., 1982).

Тестируемые вещества в водном растворе в объёме 10 мкл вносили в камеру с клеточным монослоем через 1 мин после начала регистрации мембранного потенциала клеток. Последующую регистрацию изменения мембранного потенциала проводили в течение двух минут. Мембранный потенциал выражали в относительных флуоресцентных единицах (F_0), изменившийся мембранный потенциал после действия тестируемого препарата выражали в относительных флуоресцентных единицах (F), а изменение мембранного потенциала выражали как $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$.

2.8.4. Микроцитофлуориметрическая оценка транспорта Ca^{2+} в клетках

После адгезии макрофагов на покровных стеклах их трижды промывали в ФСБР (рН 7.4), а затем на клеточный монослой наносили 200 мкл раствора флуоресцентного зонда Calcium Green-1/AM (10 мкМ, Molecular Probes) или Fura-2/AM (10 мкМ, Molecular Probes) в буферном растворе следующего состава: NaCl – 145 мМ; глюкоза – 10 мМ; KCl – 5 мМ; MgCl₂ – 0,8 мМ; CaCl₂ – 2 мМ; HEPES – 10 мМ (рН 7,4) и оставляли стекла в инкубаторе при 37°C на 40 мин. В некоторых случаях использовали бескальциевую среду следующего состава: NaCl – 145 мМ; глюкоза – 10 мМ; KCl – 5 мМ; MgCl₂ – 0,8 мМ; HEPES – 10 мМ; EGTA – 5 мМ (рН 7.4). Затем клеточный монослой трижды отмывали той же средой. Далее, на монослой клеток наносили 200 мкл среды и оставляли клетки в инкубаторе при 37°C еще на 30 мин. Затем покровные стекла с клетками еще раз промывали средой и монтировали в системе регистрации флуоресценции клеток. Использовали два варианта регистрации.

Для оценки изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция в одиночных клетках, нагруженных зондом Calcium Green-1/AM, использовали эпифлуоресцентный микроцитометр (LUMAM ИУФ-1, Санкт-Петербург, Россия). В качестве источника возбуждения использовали ртутную лампу, луч от которой пропускали через систему оптических фильтров для FITC (488 нм) и фокусировали на одиночной клетке. Эмиссионную флуоресценцию регистрировали с помощью ФЭУ, затем захвачены, преобразованы и перенесены в IBM-совместимый компьютер с помощью 14-ти битного аналогово-цифрового преобразователя (Decision Computer International Co., Тайвань). Обработку полученных данных проводили с помощью C++ компьютерной программы собственной разработки. Изменения флуоресценции в одиночных клетках выражали как

F/F_0 , где F_0 – начальная интенсивность флуоресценции клеток в состоянии покоя (мВ), а F – максимальная интенсивность флуоресценции после добавления вещества (мВ). Проток буферных растворов в камере осуществляли гравиметрическим методом, скорость протока в камере составляла 100 мкл/мин.

Для оценки флуоресценции клеток, нагруженных зондом Fura-2/AM, стекла с клетками монтировали в специальной проточной камере RC-30HV для регистрации изображения клеток (Confocal imaging chamber, Warner Instruments, США) на предметном столе флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия) и проводили измерение интенсивности флуоресценции клеток в монослое с использованием системы ратиометрической регистрации флуоресцентного изображения клеток (Cairn Research Ltd., Великобритания). В качестве источника света для возбуждения флуоресценции использовали ртутную лампу 75W Optosource, DAC-контроллер и монохроматор Optoscan (Cairn Research Ltd., Великобритания). Клетки попеременно облучали светом с переменной длиной волны возбуждения $\lambda_{ex} = 340$ и 380 нм. Набор фильтров HQ FURA filter-block (Chroma Technology Corp., США) и объектив Fluor 40×/1.30 Oil (Zeiss, Германия) были установлены для визуализации флуоресценции зонда Fura-2 в цитоплазме при $\lambda_{em}=510$ нм. Изображения флуоресцентных клеток были получены с использованием цифровой CCD видеокамеры Hamamatsu Orca-ER C4742–95 (Hamamatsu Photonics), затем захвачены и перенесены в IBM-совместимый компьютер Pentium-IV с помощью специализированной платы видеозахвата Firewire и сохранены на жестком диске компьютера в виде видеофайлов.

Проток буферных растворов в камере осуществляли гравиметрическим методом, скорость протока в камере составляла 1 мл/мин. Исследуемые соединения в известных концентрациях добавляли непосредственно в проток. Интенсивность флуоресценции изображений случайно выбранных клеток и подсчет содержания Ca^{2+} в клетках осуществляли инструментальными средствами программы AQM Advance 6 software (Kinetic Imaging Ltd., Великобритания) по стандартному методу (Grynkiewicz et al., 1985). Концентрацию ионов кальция в цитозоле $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по формуле и выражали в относительных единицах:

$$[Ca^{2+}]_i = F_{340\text{ nm}} / F_{380\text{ nm}},$$

где $F_{340\text{ nm}}$ и $F_{380\text{ nm}}$ – интенсивности флуоресценции зонда при возбуждении светом с длиной волны 340 нм и 380 нм соответственно. В некоторых случаях клетки, нагруженные зондом, предварительно инкубировали 15–30 мин в присутствии различных агонистов и антагонистов Ca^{2+} -транспорта и блокаторов некоторых рецепторов.

2.8.5. Иммуноцитохимическое исследование перитонеальных макрофагов

Перитонеальные макрофаги мыши (адгезированные на покровных стеклах или суспензированные в ФСБР) фиксировали путем добавления по каплям холодного 100%-ного метанола в течение 5 мин при интенсивном встряхивании, трижды промывали ФСБР и блокировали неспецифическое связывание 10%-ной эмбриональной сывороткой телят в ФСБР, содержащей 0,2% Triton X-100, при комнатной температуре. После промывки в ФСБР клетки инкубировали с первичными антителами в 5%-ной сыворотке в ФСБР 18 ч при 4°C, а затем с конъюгированными с флуорохромами вторичными антителами согласно протоколам производителей. Для выявления F4/80 и CD14 маркеров использовали первичные антитела (BioLegend Ltd., США); для выявления пуриновых рецепторов P2X1 (Abcam, Великобритания), P2X4 или P2X7 (Biorbyt Ltd., Великобритания); FITC- или TRITC-конъюгированные вторичные антитела (BioLegend Ltd., США; Abcam, Великобритания).

Флуоресцентное изображение монослоя клеток получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510 META (Zeiss). Суспензию перитонеальных макрофагов помещали в проточный цитофлуориметр FACScalibur (Becton-Dickinson). Оценку результатов проводили с помощью программного обеспечения LSM510 Release 3.5 (Zeiss), BD CellQuest Pro (Becton-Dickinson, США) и WinMDI 2.9 (США) соответственно.

2.8.6. Регистрация трансмембранных токов в клетках методом пэтч-кламп

Электрофизиологические исследования и регистрацию трансмембранных токов в макрофагах проводили методом пэтч-кламп (perforated-patch-clamp) в конфигурации "whole-cell" (Molleman, 2003). С этой целью покровные стекла с прикрепленными перитонеальными макрофагами мыши помещали предварительно в буферную среду для электрофизиологических исследований (NaCl – 147 мМ, глюкоза – 13 мМ, KCl – 3 мМ, MgCl₂ – 1 мМ, HEPES – 10 мМ; pH 7.4), содержащую апиразу в концентрации 2 ед/мл (Apyrase from potato, A6535 Sigma, США) и выдерживали в инкубаторе при 37°C 2–5 ч до помещения в камеру для электрофизиологических исследований. Камеру перфузировали тем же раствором, но без апиразы, с помощью гравитационной перфузионной системы со скоростью 1 мл/мин. Регистрацию ионных токов проводили в условиях гигаомного контакта с перфорацией фрагмента мембраны под микроэлектродом с помощью нистатина (Sigma). Для заполнения микропипеток использовали раствор следующего состава: NaCl – 145 мМ, MgCl₂ – 1 мМ, HEPES – 10 мМ, EGTA – 0,5 мМ; pH 7.2, нистатин 150 мкг/мл. Для регистрации токов использовали усилитель Model 2400 (AM Systems,

США), плату ЦАП/АЦП L-791 (L-Card, Москва, Россия) и пакет программ WinWCP 3.2.6 (Strathclyde Electrophysiology Software, Великобритания). Смену омывающих клетку растворов производили с помощью системы fast-step со скоростью переключения < 0,5 с.

2.8.7. Протеомный анализ

Выделение и стимулирование спленоцитов селезенки мышей. Мыши линии Balb/c (самки, возраст 4 недели) были получены из питомника Charles River Laboratories (Германия) и содержались в стандартных условиях вивария университета г. Росток (Германия). Мышей умертвляли методом цервикальной дислокации и в течение 10 мин извлекали селезенки. Спленоциты выделяли как описано выше, переносили в 15 мл центрифужные пробирки и трижды отмывали в 10 мл ФСБР (Gibco™ phosphate buffered saline, Invitrogen, США) методом центрифугирования (5 мин × 1500 об/мин). Осадок спленоцитов ресуспендировали в 9 мл среды RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамин (Biosource International, США). Для каждого животного была получена индивидуальная первичная культура спленоцитов. По 250 мкл каждой суспензии было использовано для FACS анализа.

Для стимулирования, 9 мл суспензии первичной культуры спленоцитов добавляли к 1 мл раствора тритерпенового гликозида (0,2 мкг/мл) в чашках Петри и чашки помещали на 3 часа в CO₂-инкубатор при 37°C. Каждый эксперимент по стимуляции был выполнен в трех повторностях. После стимулирования клеточные культуры объединяли и переносили в 15 мл пластиковые центрифужные пробирки и промывали с 10 мл ФСБР методом центрифугирования. Затем спленоциты осаждали в эппендорфах (1,5 мл), супернатант удаляли, а осадок хранили в жидком азоте до процедуры экстрагирования.

FACS анализ. Для цитофлуориметрического анализа спленоцитов были использованы следующие первичные и вторичные антитела: anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD45R/B-220-PE-Cy5, biotinylated anti-CD3, anti-CD11b-FITC (BD Biosciences, Heidelberg, Германия). 100 мкл суспензии первичной культуры спленоцитов смешивали с 500 мкл лизирующего эритроциты буферного раствора (0,1 мМ EDTA, 10 мМ карбоната калия, 155 мМ хлорида аммония, растворенных в дистиллированной воде) и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем суспензию центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин и супернатант удаляли. Образцы клеток дважды промывали в 1 мл буферного раствора FACS (FACSFlow, BD Biosciences) и центрифугировали 4 мин при 5700 об/мин. Суспензии клеток инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре со 100 мкл буферного раствора FACS /5% сыворотка мыши с последующим добавлением первичных антител и инкубированием в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте.

Впоследствии, клетки дважды промывали в 1 мл буферного раствора FACS методом центрифугирования при 5700 об/мин, 4 мин. Образцы, за исключением тех, что содержали anti-CD3 антитела, ресуспендировали в 500 мкл буферного раствора FACS и переносили в пробирки для цитофлуориметрии. Образцы, содержащие anti-CD3 антитела, ресуспендировали в 100 мкл буферного раствора FACS, куда добавляли 1 мкл раствора стрептавидин-APC (BD Biosciences), и образцы инкубировали 20 мин при комнатной температуре в темноте. После двух процедур отмывки в 1 мл буферного раствора FACS, методом центрифугирования при 5700 об/мин, 4 мин, образцы были ресуспендированы в 500 мкл буферного раствора FACS и помещены в пробирки для цитофлуориметрии. FACS анализ проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACScalibur (Becton-Dickinson). Каждую полученную первичную культуру спленоцитов анализировали индивидуально.

Приготовление белковых экстрактов и определение белков. Экстракты белков были приготовлены согласно описанному методу (Just et al., 2006). С этой целью замороженный осадок клеток переносили в ступку, находящуюся в пенопластовой коробке с жидким азотом на протяжении всей процедуры. Осадок измельчали в порошок с помощью холодного пестика и переносили в предварительно взвешенные холодные пробирки типа эппендорф. Порошок смешивали с предварительно замороженным лизирующим буферным раствором, состоящим из 2 М тиомочевины, 7 М мочевины, 4% CHAPS, 70 мМ DTT и 0.5% Servalyte 3-10 (Serva, Heidelberg, Германия) в комплексе с EDTA (Roche, Diagnostics, Германия) и PMSF/Peppstatin A (Sigma). Полученную суспензию гомогенизировали со стеклянными бусами, озвучивали, перемешивали на льду и центрифугировали 20 мин при 4°C и 13000 об/мин. Аликвоты супернатанта хранили при -80°C для дальнейшего использования. Аликвоту в 20 мкл использовали для определения концентрации белка (Bradford, 1976; Lorenz et al., 2003), используя набор Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Munich, Германия). Концентрация белка составила для контроля - 10,3 мкг/мл (конечный объем 145 мкл), для стимулированных кукумариозидом A₂-2 клеток - 3,6 мкг/мл (конечный объем 280 мкл) и для стимулированных фрондозидом A клеток - 10,1 мкг/мл (конечный объем 100 мкл). В случае глобального протеомного анализа для выделения белков была взята часть всей замороженной ткани селезенки мыши. Процедура экстракции белков была такой же, как описано выше. Конечная концентрация белка была 9,3 мкг/мл (конечный объем 600 мкл).

2D гель электрофорез. Двумерный гель электрофорез проводили, как описано ранее (Sinz et al., 2002). Аликвоты с 500 мкг белка наносили на полосы для изоэлектрофокусирования Immobiline Dry strips (pH 3-10, nonlinear) и первое разделение

было проведено с помощью прибора для изоэлектрофокусирования IPGphor system (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg, Германия). Стрипы регидратировали в течение ночи в 350 мкл смеси белок-содержащего раствора и регидратирующего буферного раствора (8 М мочевины, 2% CHAPS, 16 мМ DTT, 0.5% IPG buffer (pH 3-10) в комплексе с EDTA, PMSF/Peppstatin A и бромфеноловым синим). Изоэлектрофокусирование проводили, используя многоступенчатый протокол (1 ч при 500 В, 1 ч при 2000 В, 5 ч при 8000 В). После первого разделения стрипы были уравновешены дважды по 15 мин в 5 мл уравновешивающего буферного раствора (50 мМ TRIS HCl, pH 8,8; 6 М мочевины, 30% глицерин, 2% SDS, бромфеноловый синий), содержащего 1% DTT и 4% йодацетамид. Второе электрофоретическое разделение было проведено с использованием полиакриамидного геля в буферном растворе Laemmli (Laemmli, 1970) в течение ночи при напряжении 100 В, используя систему для электрофореза Hoefer DALT Vertical Electrophoresis System (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Freiburg, Германия). Затем гели были зафиксированы и окрашены раствором Coomassie Brilliant Blue G-250 (Neuhoff et al., 1988; Vantscheff et al., 2004).

Обнаружение белковых пятен. Окрашенные гели были отсканированы с помощью денситометра Umax Mirage II Scanner (Umax Data Systems, Willich, Germany). Оптическую плотность сигналов белковых пятен на гелях анализировали с помощью программного обеспечения Progenesis PG200, version 2006 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, Великобритания) (Sinz et al., 2002).

Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа. Пятна белков, количественное содержание которых менялось в экспериментальных гелях по отношению к контрольным в два и более раза, вырезали из гелей с помощью системы Flexus Proteomics Picker (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, США). Вырезанные участки гелей подвергали трипсинолизу (Heitner et al., 2006). Для этого к каждому кусочку геля добавляли 5 мкл раствора трипсина (Promega, Madison, WI, США) и образцы инкубировали в течение 5 ч при 37°C. После экстракции смеси пептидов с помощью водного раствора, содержащего 0,3% TFA, 5 мМ *n*-октилглюкопиранозид и 50% ACN, образцы наносили на мишени AnchorChip™ 600/384 target plate (Nordhoff et al., 2003; Just et al., 2006), используя CHCA в качестве матрицы.

MALDI-TOF-MS анализ. Протеомный анализ проводили на времяпролетном тандемном масс-спектрометре Reflex III MALDI ToF (Bruker Daltonik, Bremen, Германия), снабженном SCOUT ионным источником, в режиме положительных ионов (Mikkat et al., 2004). Внешнюю калибровку спектров выполняли с помощью коммерческого набора пептидных/белковых калибраторов Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonik).

Записанные масс-спектры далее анализировали с помощью средств программного обеспечения FlexAnalysis 2.4 и BioTools 3.0. Поиск в базах данных был выполнен с помощью созданного в лаборатории программного пакета SWALL database (UniProt Release 13.6, состоящей из Swiss-Prot Release 55.6 от 01.07.2008, и TrEMBL Release 38.6 от 01.07.2008), используя Mascot software, версия 2.2.03 (Matrix Science, London, Великобритания) (Heitner et al., 2006).

Валидация белков Septin-2 и hnRNP K методом ИФА. Выделение и стимулирование спленоцитов селезенки мышей линии Balb/c проводили, как описано выше. Экстрагирование белков из клеток проводили с помощью лизирующего буферного раствора RIPA lysis buffer (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Inc, США). Для количественного определения белков Septin-2 и hnRNP K в экстракте белков использовали иммуноферментный анализ, «сэндвич-метод». С этой целью 100 мкл раствора захватывающих антител (1 мкг/мл) в ФСБР переносили в 96-луночные планшеты (MaxiSorp, Nunc) и планшеты инкубировали в течение ночи при 4 С. После трехкратной промывки промывочным буферным раствором по 300 мкл (ФСБР, содержащий Tween-20; 0,05%), проводили блокировку путем добавления в каждую лунку по 300 мкл блокирующего буферного раствора (1% BSA в ФСБР) и планшеты инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После трехкратной промывки с помощью промывочного буферного раствора, в лунки добавляли по 100 мкл экстракта белков в различных разведениях (1:128 для Septin-2 и 1:16 для hnRNP K соответственно) и планшеты инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Затем проводили трехкратную промывку промывочным буферным раствором, после чего в лунки добавляли по 100 мкл раствора детектирующих антител (5 мкг/мл), и планшеты дополнительно инкубировали еще 2 ч при комнатной температуре. После этого проводили промывку и в лунки добавляли по 100 мкл вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (5 мкг/мл). Через 1 ч инкубирования планшеты промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) сульфата. Планшеты инкубировали в темноте при комнатной температуре 15 мин, после чего в лунки добавляли по 50 мкл останавливающего раствора (H₂SO₄, 5%). Поглощение измеряли при 450 нм с помощью спектрофотометра планшетного формата μ Quant plate reader (Bio-Tek Instruments, США). Для количественного определения Septin-2 использовали захватывающие антитела (Abcam Inc., каталожный № ab58657), детектирующие антитела (Santa Cruz Biotechnology, Inc., каталожный № sc-20408) и вторичные HRP-конъюгированные антитела (Santa Cruz Biotechnology, Inc., каталожный № sc-2020). Для определения hnRNP K были использованы захватывающие антитела (каталожный № cs-28380), детектирующие

антитела (каталожный № sc-53620) и вторичные HRP-конъюгированные антитела (каталожный № sc-2314, все из Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Определение пролиферации спленоцитов. Полученные из селезенки мышей линии Balb/c спленоциты ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 100 мкг/мл гентамицина, 20 мкМ L-глутамин и 10 мМ HEPES. Клетки (1×10^5 /0,2 мл) культивировали в плоскодонных 96-луночных планшетах (Corning Costar Corp., Cambridge, MA, США) в чистой среде или в присутствии митогена В клеток – ЛПС (1 мкг/мл, Sigma). Водные растворы кукумариозида A₂-2 или фрондозид А добавляли к клеточной суспензии в конечной концентрации 0,2 мкг/мл (167 нМ). Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч, затем в каждую лунку добавляли метил-[³H]-тимидин (Изотоп, Россия) в конечной дозе 2 μCi, и клетки инкубировали еще 16 ч. Затем клетки переносили на стекловолоконные фильтры и включение [³H]-тимидина в ДНК определяли с помощью сцинтилляционного счетчика Tri-Carb 2800 TR liquid scintillation counter (PerkinElmer/Packard, США) (Flynn, 1984; Froebel et al., 1999). Результаты выражали как количество распадов в минуту (срм) и как индекс стимулирования (SI), где SI = срм в экспериментальной культуре/срм в контрольной культуре.

2.8.8. Поверхностный плазмонный резонанс

Для исследования межмолекулярных взаимодействий методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) был использован оптический биосенсор Biacore T200 (GE Healthcare, США). Изменение сигнала биосенсора регистрировали в каждом канале в реальном времени в виде сенсограмм в резонансных единицах (RU), где 1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Для работы с оптическим биосенсором использовали следующие реагенты (GE Healthcare): HBS-N буферный раствор (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7.4), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 10 мМ натрий-ацетатный буферный раствор (pH 4.5); CHAPS был получен от фирмы Sigma Aldrich (США). Все эксперименты были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5, покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана. В качестве рабочего буфера использовали раствор HBS-N. Карбоксильные группы декстрана активировали путём пропускания смеси равных объёмов 0,2 М EDC и 0,05 М NHS в течении 7 минут при скорости потока 5 мкл/мин с последующей промывкой буфером HBS-N при той же скорости в течении 1 мин.

Для исследований взаимодействия пуриnergических рецепторов P2X семейства с кукумариозидом A₂-2 (CA₂-2) в бактериях *E. coli* был экспрессирован и получен рекомбинантный P2X₄ пуринорецептор мыши (последовательности 55–338aa; полный внеклеточный домен), включающий N-терминальный His-6 tag (MyBioSource, Inc., США). Имобилизацию P2X₄ рецептора осуществляли путём пропускания его раствора (20 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) по каналам оптического чипа CM5 в течение 20 мин при скорости потока 2 мкл/мин. Не прореагировавшие с белком активированные карбоксильные группы декстрана инактивировали пропусканием рабочего буферного раствора в течение 60 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Концентрированный раствор CA₂-2 готовили в дистиллированной воде (3 мМ) и впоследствии разводили буферным раствором HBS-N до тестируемых концентраций.

Анализ взаимодействия CA₂-2 с иммобилизованным P2X₄ рецептором проводили путем пропускания тест-раствора с гликозидом через опытный (с иммобилизованным P2X₄) и контрольный (без белка) каналы биосенсора в течение 6 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Диссоциацию комплексов регистрировали в течение 600 сек. Поверхность оптического чипа регенерировали двукратной инъекцией регенерационного раствора (2 М NaCl, 0,4% CHAPS в HBS-N) в течение 17 с при скорости потока 35 мкл/мин.

Расчет константы диссоциации (K_d) для комплекса CA₂-2/P2X₄ проводился на основе полученных сенсограмм с использованием программного обеспечения BIAevaluation v.4.1 (GE Healthcare, США).

2.8.9. Транзиентная трансфекция клеток малыми интерферирующими РНК (siРНК)

Для проведения транзиентной трансфекции перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c малыми интерферирующими РНК (siRNA) были использованы следующие реагенты (Ambion, США): siRNA Silencer® Select Pre-Designed siRNA for P2X₄, Silencer® Select Negative Control (scrambled siRNA), Opti-MEM® Reduced Serum Medium и Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent. Трансфекция макрофагов siRNA была выполнена согласно протоколу производителя (www.lifetechnologies.com/support) в 6-луночных планшетах, содержащих 1×10⁶ клеток на лунку. С этой целью для одной лунки готовили следующую смесь: 9 мкл раствора Lipofectamine® RNAiMAX в 150 мкл среды Opti-MEM смешивали либо с 30 пмол P2X₄ siRNA или с 30 пмол scrambled siRNA в 150 мкл среды Opti-MEM. Смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре и добавляли к монослою макрофагов вместе с siRNA в финальной концентрации 25 пмол на лунку. После 48 ч инкубирования при 37°C в CO₂-инкубаторе клетки собирали с помощью

скрепера и использовали в экспериментах по изучению Ca^{2+} сигнализации методом цитофлуориметрии. Для подтверждения ингибирования экспрессии P2X4 рецепторов в клетках (нокдаун) использовали метод ПЦР в реальном времени.

2.8.10. Экспрессия P2X4 рецепторов. Иммуноблоттинг

Экспрессию P2X4 рецепторов в перитонеальных макрофагах мыши исследовали с помощью метода гель-электрофореза и Вестерн-блоттинга. С этой целью перитонеальные макрофаги мышей линии Balb/c культивировали в 6-луночных планшетах при 37°C в CO_2 -инкубаторе в культуральной среде DMEM, содержащей 100 мкг/мл гентамицина, в присутствии или отсутствии CA_2 -2 (10 нМ) в течение 48 ч. После инкубирования клетки собирали с помощью скрепера и дважды промывали раствором ФСБР методом центрифугирования. Полученный осадок клеток лизировали с помощью лизирующего буферного раствора RIPA и трехкратной процедуры замораживания-оттаивания. Затем приготавливали образцы, содержащие по 20 мкг общего белка. Белки разделяли методом гель-электрофореза в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Sigma-Aldrich) с помощью системы для полусухого переноса Semi-dry (Хеликон, Россия). Зоны, содержащие P2X4, выявляли с помощью кроличьих anti-P2X4 антител (1:200, Abcam plc, Cambridge, Великобритания) в качестве первых антител, и козьих anti-rabbit IgG-peroxidase антител (1:10000, Sigma-Aldrich) в качестве вторых антител, согласно протоколам производителей. Визуализацию проводили с помощью метода хемилюминесцентной детекции (ECL, enhanced chemiluminescence), используя систему ChemDoc system (Bio-Rad, США). Зону β -actin (контроль нагрузки) выявляли с помощью специфических anti- β -actin первых антител (1:1000, Abcam plc) и anti-rabbit IgG-peroxidase вторых антител (1:10000, Sigma-Aldrich).

2.9. Исследование безопасности кумазида

2.9.1. Оценка острой токсичности

Исследование острой токсичности кумазида проведено при внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения на 80 белых беспородных мышках-самцах массой 18–22 г. и 72 белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Кумазид вводили в виде 10% суспензии на 1 % крахмальной слизи. Животные контрольных групп получали эквивалентное количество крахмальной слизи. Наблюдение за животными вели в течение 2-х недель.

2.9.2. Оценка кумулятивной токсичности

Кумулятивные свойства кумазида изучали на белых беспородных крысах (самцах) при внутрибрюшинном введении. Оценку проводили по летальному эффекту, вызываемому введением возрастающих доз в долях от ЛД₅₀.

Оценку кумулятивных свойств, проводили при его внутрибрюшинном введении с увеличением 1/10 доли от ЛД₅₀ в 1,5 раза при внутрибрюшинном введении (15 мг/кг) каждый 5-й день. Коэффициент кумуляции вычисляли как отношение ЛД₅₀ при однократном введении к ЛД₅₀ при кратном введении.

2.9.3. Оценка хронической токсичности

Исследование хронической токсичности кумазида проведено на 54 белых беспородных крысах-самцах с начальной массой 200–220 г. Животные были распределены на 4 группы: 1-ая группа контрольная – получала внутрижелудочно дистиллированную воду по 1 мл на 100 г массы; 2-ой группе вводили кумазид в виде суспензии на крахмальной слизи в эффективной дозе – 0.1 мг/кг; 3-ей группе – 1.0 мг/кг и 4-ой группе – 10.0 мг/кг. Препарат вводили в желудок через зонд ежедневно, в течение 3 месяцев. Животных содержали на стандартном лабораторном рационе в условиях свободного доступа к воде и пище. Все манипуляции с животными проводили в первой половине дня.

О степени токсичности препарата судили по общему состоянию животных, динамике массы тела, изменениям показателей периферической крови, функциональному состоянию печени, почек, сердечно-сосудистой системы и ЦНС. Исследуемые показатели регистрировали до введения препарата (фон), через 1,5 и 3 месяца эксперимента.

По окончании эксперимента животных (по 5-6 из каждой группы) умерщвляли путем цервикальной дислокации шейных позвонков (под гексеналовым наркозом) сразу же по окончании введения и через 2 недели после отмены препарата (2–4-ая группа). Проводили макроскопическое описание внутренних органов животных, определяли массу и массовые коэффициенты внутренних органов, кроме того, все органы и ткани подвергали гистологическому исследованию.

Полученные цифровые данные обрабатывали методом биостатистики с применением *t*-критерия Стьюдента. В таблицах все значения представлены в виде $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

2.9.4. Оценка репродуктивной токсичности

Оценка репродуктивной токсичности препарата кумазид проводилась в соответствии с Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (Фисенко, 2000).

Изучение эмбрио- и фетотоксического действия кумазида, регистрируемого в антенатальном периоде развития. Опыты по изучению влияния препарата на эмбриональное развитие (регистрация отклонений на 20 день беременности) были проведены на 30 беременных белых беспородных крысах с исходной массой 200-220 г. Животных содержали в условиях вивария, соответствующих санитарным нормам при свободном доступе к воде и корму (брикетированные и натуральные корма) и естественном фоне освещенности при температуре воздуха 20-21°C. Животных брали в опыт после 14-дневного карантина.

Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках самок, подсаженных накануне к самцам в соотношении 2:1. Препарат вводили в 1% крахмальной взвеси внутрижелудочно с помощью желудочного зонда с 1 по 19 день беременности в дозах 1 мкг/кг и 10 мкг/ кг. Контрольным животным в эти же сроки беременности вводили внутрижелудочно 1% крахмальную взвесь. Во время опыта следили за общим состоянием и поведением животных. Крыс взвешивали на 1, 7, 14 и 20 дни беременности. Эвтаназию животных осуществляли на 20 день беременности. Исследовали состояние репродуктивных органов самок: в яичниках подсчитывали число желтых тел, в матке – число мест имплантаций, живых и мертвых плодов. На основании полученных данных вычисляли показатели пред- и постимплантационной гибели. Плоды взвешивали, измеряли кранио-каудальный размер.

Определяли пол плодов и подвергали их макроскопическому осмотру на предмет выявления видимых аномалий развития. Затем часть плодов фиксировали в растворе Буэна для изучения состояния внутренних органов на серийных срезах через плод (метод Вильсона в модификации Дыбана, 1967). Другую часть плодов фиксировали в 96%-ном этиловом спирте и окрашивали по методу Доусона для выявления дефектов скелета. Подсчитывали число точек окостенения различных костей скелета (череп, конечности, ребра, грудина, кости таза, позвоночник). Цифровой материал подвергали статистической обработке с использованием методов Стьюдента и критерия χ^2 .

Изучение антенатального действия препарата кумазид, регистрируемого в постнатальном периоде развития. Опыты поставлены на 20 белых беспородных крысах, по 10 животных в группе. Препарат вводили в 1% крахмальной взвеси внутрижелудочно с помощью желудочного зонда с 6 дня беременности до родов в дозе 10 мкг/кг.

Контрольным животным вводили внутрижелудочно растворитель – 1% крахмальную взвесь. Во время опыта следили за общим состоянием и поведением крыс, самок взвешивали их на 1, 6, 14 и 20 день беременности. Регистрировали день родов, число крысят в помете и распределение их по полу. Показателями постнатального развития являлись:

- динамика массы крысят (взвешивание на 5, 15, 30, 45 и 60 дни жизни);
- физическое развитие крысят (сроки отлипания ушной раковины, обрастания шерстью, прорезывания резцов, открытия глаз, открытия вагины, опускания яичек);
- становление двигательной активности (тест «горизонтальная веревочка»);
- формирование сенсорно-двигательных рефлексов (рефлекс «переворачивания на плоскости» и «избегания края»);
- поведение в условиях «открытого поля» (регистрация горизонтальной и вертикальной двигательной активности, исследовательской и эмоциональной реакций);
- адаптивное поведение – избегание стресс-ситуации по методике Хендерсона в модификации Н.А.Бондаренко.

Цифровой материал подвергался статистической обработке с использованием методов Стьюдента и критерия χ^2 .

Влияние препарата кумазид на генеративную функцию крыс. Влияние препарата на генеративную функцию изучали в двух сериях экспериментов: в опытах на самцах и самках. Во всех опытах использовали предварительно отобранных самок с нормальным эстральным циклом.

В первой серии опытов препарат кумазид вводили в 1% крахмальной взвеси самкам крыс внутрижелудочно с помощью желудочного зонда, один раз в сутки в дозах 1 мкг/кг и 10 мкг/кг в течение 15 дней (3 эстральных цикла). Контрольным животным вводили внутрижелудочно 1 % крахмальную взвесь. В каждой группе было по 20 крыс. По окончании введения препарата самок подсаживали к интактным самцам в соотношении 2:1 на 10 дней (2 эстральных цикла). Контролем служили контрольные самки, спаренные с интактными самцами.

Часть самок забивали на 20 день беременности, считая первым возможным днем беременности день подсадки самок к самцам. Исследовали состояние репродуктивных органов самок – в яичниках подсчитывали число желтых тел, в матке – мест имплантаций, живых и мертвых плодов. На основании данных определяли показатели пред- и постимплантационной гибели. Кроме того вычисляли индекс фертильности, представляющий собой отношение числа беременных самок к числу подсаженных. Часть

самок (по 5 крыс в группе) оставляли до родов и наблюдали за развитием потомства в течение одного месяца, регистрируя поведение, динамику массы и гибель крысят.

Во время опыта следили за общим состоянием животных. Крыс взвешивали перед началом опыта, по окончании введения препарата и перед эвтаназией на 20-й день беременности. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием методов Стьюдента и критерия χ^2 .

2.9.5. Оценка мутагенной активности

Оценка мутагенной активности препарата кумазид в тесте Эймса. Тест Эймса входит в систему краткосрочных тестов по оценке канцерогенности фармакологических средств и вспомогательных веществ (Фисенко, 2000). Проведение эксперимента на нескольких штаммах салмонеллы в вариантах без метаболической активации и в присутствии системы метаболической активации позволяет выявлять мутагенную активность как тестируемого соединения, так и его метаболитов.

Опыт был поставлен на 3 штаммах ТА 100, ТА 98 и ТА 97 в вариантах без (СМ-) и в присутствии (СМ+) системы метаболической активации. Штаммы ТА 100 и ТА 98 получены от Ames в 1978 г. Штамм ТА 97 получен в 2004 г. от к.б.н. Абилева С.К. (MAINREC 112, тип штамма В, номер штамма 5291). Для метаболической активации использовали S-9 фракцию печени самцов крыс Wistar, которым за 5 дней до забоя вводили индуктор микросомальных ферментов Совол в дозе 300 мг/кг.

В качестве растворителя кумазида использовали ДМСО. Препарат растворяли *ex tempore* до конечных концентраций 10000, 1000, 100, 10 и 1 мкг/мл. В пробирки с полужидким агаром вносили 0,1 мл соответствующих разведений тестируемого препарата, 0,1 мл суспензии бактерий и 0,5 мл полной микросомальной активирующей смеси (СМ+) или 0,5 мл буферного раствора (СМ-). Тестируемые доза препарата составили 1000, 100, 10, 1 и 0,1 мкг на чашку.

В опыте был контроль с растворителем и позитивные контроли со стандартными мутагенами: азид натрия (10 мкг на чашку) для штамма ТА 100 при СМ-; 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазопирен (ДДТДП) – (10 мкг на чашку) для штамма ТА 98 при СМ- и 9-аминоакридин (9АА) (50 мкг на чашку) для штамма ТА 97 при СМ-. Для контроля активности системы метаболической активации использовали этидиум бромид (10 мкг на чашку) на штамме ТА 98 при СМ+.

На каждую точку ставили по 2 чашки. Мутагенный эффект считали значимым при превышении среднего количества колоний ревертантов на чашку в опыте над таковым в контроле в 2 и более раз.

Метод учета хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей.

Исследование выполнено на самцах и самках мышей линии C₅₇BL/6 массой 18-20 г. Животных содержали при 12-ти часовом световом режиме, на стандартном брикетированном корме, при свободном доступе к воде.

Кумазид вводили перорально в суспензии твина-80. Цитогенетические препараты готовили через 24 часа после однократного или, в случае повторных введений, последнего введения препарата. Самцам препарат вводили в дозах 1 мкг/кг и 1 мг/кг однократно. Кроме того, кумазид в дозе 1 мкг/кг вводили ежедневно самцам и самкам на протяжении 5-ти дней.

Во всех вариантах экспериментов животным за 2,5 часа до забоя вводили колхицин (Serva, Германия) из расчета 2,5 мг/кг с целью подавления формирования ахроматинового веретена клеточного деления и накопления метафаз.

Забой животных осуществляли смещением шейных позвонков. Затем максимально быстро выделяли бедренные кости, срезали эпифизы и вымывали клетки костного мозга гипотоническим раствором (0,55% KCl), предварительно подогретым до 37°C. После инкубации при 37°C в течение 15 минут клеточную взвесь центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин (центрифуга ОПН-3, Россия). Надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспензировали и добавляли 3 мл предварительно охлажденного фиксатора, состоящего из смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Время инкубации клеток в фиксаторе составляло 10 минут. Затем проводили повторное центрифугирование и смену фиксатора (3 мл). После этого клетки инкубировали в холодильнике еще 20 минут. Взвесь вновь центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 0,5 мл вновь добавленного фиксатора и наносили на мокрые предварительно обезжиренные и охлажденные стекла, которые высушивали затем в пламени спиртовой горелки.

Окраску производили азур-эозином. Состав красителя включал: 5 частей азура (0,1%), 2 части эозина (0,1%), 10 частей дистиллированной воды. При цитогенетическом анализе использовали микроскоп Zeiss Standart-20, 10×100, масляная иммерсия. Проводили визуальную регистрацию хромосомных повреждений в клетках костного мозга мелких лабораторных грызунов. При цитогенетическом анализе учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), одиночными и парными фрагментами хромосом, хромосомными и хроматидными обментами, а также клетки с множественными повреждениями хромосом (более 5 хромосомных повреждений в клетке). Оценку мутагенности производили по суммарному количеству клеток с гепами и структурными повреждениями хромосом (Малашенко и др., 1987). На каждое животное анализировали

по 100 метафаз; в каждой группе было исследовано 5 животных. Статистический анализ проводили с помощью ϕ -критерия.

2.10. Построение модели пространственной структуры mP2X4 рецептора мыши и кукумариозида A₂-2

Модель фрагмента пространственной структуры mP2X4 рецептора мыши, включающая внеклеточный и трансмембранный домены рецептора (30–354 а.о.), была построена с помощью программы Modeller 9.11 (Eswar et al., 2006). Аминокислотная последовательность была получена из базы данных UNIPROT ID Q9JJX6. В качестве прототипа была использована структура zfP2X4 в активированном состоянии (PDB ID 4DW1 (Hattori et al., 2012), RMSD для 324 C α -атомов модели относительно прототипа составила 0,553 Å. Для релаксации mP2X4 модели, система была встроена в пальмитоил-олеоилфосфатидилхолин липидный бислой (POPC) и сольватирована в водяной ячейке (модель Tip3) с учетом присутствия 0,2 М NaCl. Молекулы воды с атомами кислорода, расположенными ближе 3,8 Å до неводородных атомов белка, а также липидные молекулы, имеющие по крайней мере, один атомом ближе 1,3 Å до неводородных атомов белка, были удалены. Белково-липидный ансамбль был смоделирован с использованием VMD (Humphrey et al., 1996), а сольватация и минимизация энергии системы осуществлялась в программе MOE (CCG).

Пространственная структура кукумариозида A₂-2 построена с использованием программы Discovery Studio 3.5 Visualizer (Accelrys, США). Для оптимизации конфигурации структуры и электрических свойств молекулы кукумариозида A₂-2 были использованы программы MORAC2009 (<http://openmorac.net>) и революционный полуэмпирический метод PM6, интегрированные в пакет Molecular Docking Server (Bikadi, Hazai, 2009).

Белок-лигандный докинг. Модели пространственной структуры комплексов mP2X4 с АТФ и кукумариозидом A₂-2 были построены с помощью «слепого» молекулярного докинга гибкой структуры кумариозида A₂-2 относительно жесткой структуры внеклеточного домена рецептора, проведенного с помощью лицензированного on-line сервиса Molecular Docking Server (Bikadi, Hazai, 2009).

Молекулярная динамика белок-лигандных комплексов. Расчеты Молекулярной динамики белок-лигандных комплексов проводили с помощью программы MOE (CCG) при постоянном давлении в силовом поле Amber12ЕНТ (интегрированном в пакет MOE) при 300°К и pH 7.0, в течение 2 нс. До молекулярно-динамического моделирования вся система была уравновешена. Уравновешивание состояло в начальной минимизации

положения боковых цепей при фиксированных атомах основной цепи с последующей короткой молекулярной динамикой (10 пс).

Компьютерное моделирование и теоретические исследования проводили с использованием кластера ЦКП «Дальневосточный вычислительный ресурс» ДВО РАН.

2.11. Исследование фармакокинетики кукумариозида A₂-2

2.11.1. Исследование фармакокинетики ³H-кукумариозида A₂-2

Радиоактивно-меченный ³H-кукумариозид A₂-2 был получен методом, описанным ранее. Для изучения фармакокинетики из меченного тритием кукумариозида A₂-2 получили радиоактивно меченый препарат кумазид, как описано в патенте РФ (Стоник и др., 2004). Водную суспензию ³H-кукумариозида A₂-2 в комплексе с холестерином однократно вводили мышам линии BALB/c в дозе 5 мг/кг внутривенно или перорально. Каждая экспериментальная группа животных содержала пять мышей. Животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации через установленные интервалы времени, выделяли кровь и органы (сердце, желудок, почки, печень и селезенку) и затем определяли содержание гликозида в собранных тканях. Для этого образцы крови определенного объема (0,1 мл) и образцы взвешенной части ткани (50-100 мг) растворяли в смеси 0,4 мл 57%-ного раствора соляной кислоты и 0,4 мл 30%-ной перекиси водорода при нагревании (Озрина, 1979). После растворения ткани всю полученную прозрачную желтоватую жидкость помещали в сцинтилляционные флаконы. Флаконы охлаждали до комнатной температуры, жидкость в них нейтрализовали с помощью раствора триса 1,5 М (рН 8,8; 2,5 мл), а затем добавляли 10 мл сцинтилляционной жидкости. Подготовленные образцы помещали в сцинтилляционный счетчик Tri-Carb 2800 TR (PerkinElmer/Packard, США) и после выдерживания флаконов в темноте в течение 4 ч определяли радиоактивность образцов.

Модельно-независимые фармакокинетические параметры кукумариозида A₂-2 рассчитывали с помощью уравнения нелинейной регрессии и пакета программ Kinetica 4.4.1 (Thermo Electron Corp., США). Были рассчитаны следующие фармакокинетические параметры и константы: максимальная концентрация (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), период полувыведения препарата (T_{1/2}), константа скорости распределения (K_e (Lz)), площадь под кривой “концентрация - время” (AUC), общий клиренс (Cl), и среднее время пребывания препарата (MRT).

2.11.2. MALDI-IMS

Подготовка ткани. Водный раствор кукумариозида A₂-2 однократно вводили мышам линии BALB/c в дозе 5 или 15 мг/кг интраперитонеально. В качестве контроля были использованы интактные мыши. Через определенное время мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и извлекали селезенку не позднее, чем через 10 мин после умерщвления. Селезенку замораживали в морозильной камере до -80°C. Перед получением срезов селезенки температуру ткани доводили до -20°C. Срезы селезенки толщиной 12 мкм получали с помощью криотома Microm HM 560 Criostat (Thermo Scientific, Великобритания) с лезвием C35 80 мм (Feather, Япония). Затем срезы ткани помещали либо на микроскопические стекла, покрытые поли-L-лизинном для гистологического окрашивания гематоксилин-эозином (H&E), либо на стекла, покрытые оксидом индия и олова (ITO) (Bruker Daltonics, Германия) для MALDI-IMS. Срезы ткани, помещенные на стекла ITO, высушивали в течение 45–60 мин в вакуумном эксикаторе при комнатной температуре. Раствор индивидуального кукумариозида A₂-2 наносили в объеме 1–5 мкл на определенные срезы и использовали в качестве стандарта для определения оптимальных параметров при настройке масс-спектрометра и получения масс-спектров. Для выявления структурных особенностей селезенки и их соотнесения с изображениями, полученными методом MALDI-IMS, гистологические срезы селезенки на микроскопических стеклах окрашивали стандартным методом с помощью гематоксилина и эозина (H&E), а затем получали их цифровые изображения с помощью стереомикроскопа SteREO Discovery V12, оснащенного фотокамерой AxioCam MRc (Carl Zeiss, Германия).

Нанесение матрицы. Для равномерного и воспроизводимого нанесения слоя матрицы на срезы ткани селезенки использовали полностью автоматизированную станцию ImagePrep (Bruker Daltonics, Германия). В качестве составляющих компонентов матрицы использовали α-циано-4-гидроксикоричневую кислоту (CHCA), трифторуксусную кислоту (TFA) и ацетонитрил (ACN) (Sigma-Aldrich, Франция). Состав матрицы: CHCA (7 мг/мл) в ACN:H₂O/0.2% TFA, 1:1 по объему. Нанесение матрицы проводили согласно протоколам производителя. Срезы ткани анализировали методом MALDI-IMS непосредственно после покрытия матрицей и процедуры предварительного высушивания стекол в вакуумном эксикаторе в течение 45–60 мин.

Сбор и анализ данных. Стекла для автоматизированной MALDI-IMS сканировали с помощью сканера HP Scanjet 2400 (Hewlett Packard, США) с разрешением 600 точек на дюйм для создания оптических изображений срезов селезенки, используемых для дальнейшего анализа. Затем стекла со срезами селезенки устанавливали в адаптер для

стекло II MALDI target (Bruker Daltonics, Германия). Ultraflex III MALDI TOF/TOF масс-спектрометр, оснащенный твердотельным лазером SmartBeam (Bruker Daltonics, Германия) с частотой 200 Гц, работающим в режиме отражения, был использован для получения изображений методом MALDI-IMS. Эксперименты были выполнены с пространственным разрешением 200 мкм, за исключением отдельных прецизионных экспериментов, проводимых с пространственным разрешением 100 мкм. Сбор данных осуществляли в диапазоне 300–2500 m/z в режиме регистрации отрицательных ионов. Настройки масс-спектрометра контролировали с помощью программного обеспечения FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). Мощность лазера была установлена оператором и составляла 70% от полной мощности. Полученные данные затем обрабатывали и визуализировали с помощью пакетов программ FlexAnalysis 3.0 и FlexImaging 3.0 (Bruker Daltonics). Для каждого среза селезенки проводили предварительную обработку интенсивности полученных сигналов, вычитая фоновые значения в различных исследуемых областях срезов ткани. Сигналы, полученные после обработки, использовали для последующей визуализации и статистического анализа с помощью программного обеспечения BioMAP 3.8 (Novartis, Швейцария).

2.11.3. MALDI-TOF-MS

Водный раствор кукумариозида A₂-2 вводили мышам, как описано выше. Каждую выделенную селезенку гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе непосредственно после выделения. Затем гомогенат ткани смешивали с водным раствором фрондозид А из голотурии *C. frondosa*, который использовали в качестве внутреннего стандарта (1 мкМ). Полученный гомогенат наносили на стальную мишень MALDI по 5 мкл. Далее мишень помещали на 60 мин в вакуумный эксикатор для высушивания образцов гомогената ткани. После высушивания ячейки на MALDI мишени покрывали матрицей (CHCA, 7 мг/мл в растворе ACN:H₂O/0.2% TFA, 1:1 по объему). В качестве стандартов использовали чистый кукумариозид A₂-2 и фрондозид А, смешанные с матрицей и отдельно нанесенные на мишень MALDI, для определения оптимальных параметров масс-спектрометра и сравнения результатов, полученных для гомогенатов тканей. Данные собирали с помощью масс-спектрометра Ultraflex III MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics) в режиме отрицательных ионов. Масс-спектры записывали с теми же параметрами прибора, как и в экспериментах со срезами ткани селезенки в случае MALDI-IMS. Пики на масс-спектрах маркировали с использованием программного обеспечения FlexAnalysis 3.0. Количественное содержание кукумариозида A₂-2 в гомогенате выражали в условных единицах как отношение значения интенсивности сигнала кукумариозида A₂-2 к значению

интенсивности сигнала фрондозид А. Фармакокинетические параметры рассчитывали, как описано выше.

Для исследования ионизационных свойств кукумариозида А₂-2 и зависимости сигнала масс-спектрометра от концентрации препарата, гликозид последовательно разводили в свежесыведенном гомогенате селезенки. Затем оценивали интенсивности его сигналов в масс-спектре. Были рассчитаны интенсивности сигналов от 5 индивидуальных спектров для каждой исследуемой концентрации препарата.

2.12. Исследование противоопухолевой активности *in vivo*

Определение противоопухолевой активности в отношении асцитной формы карциномы Эрлиха мышей. В эксперименте использовали мышей линии CD-1 весом 20–22 г, по 6–7 мышей в группе. В первой серии экспериментов мышам внутрибрюшинно инокулировали клетки асцитной карциномы Эрлиха (20×10^6 клеток на мышь). Водные растворы тестируемых соединений вводили перорально с помощью зонда или внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл в различных дозах.

Препараты вводили по «профилактической» схеме и по «комбинированной» схеме. В случае «профилактической» схемы препараты вводили либо за 7 дней до инокуляции опухоли, либо за 4 и 1 день до инокуляции опухоли. В случае «комбинированной схемы» препараты вводили либо за 7 дней до и 7 дней после инокуляции опухоли, либо за 4 и 1 день до и 4 и 1 день после инокуляции опухоли.

В обоих типах эксперимента формировали по 2 группы животных:

1 группа – контрольная. В данной группе животным вводили по 0,5 мл физиологического раствора;

2 группа – экспериментальная. В данной группе животным вводили по 0,5 мл физиологического раствора, содержащего препарат.

Наблюдение за животными продолжали на протяжении 30-40 дней. Противоопухолевый эффект оценивали по числу мышей с отсутствием опухоли (оценка на 10-ые сутки визуально), по средней продолжительности жизни (СПЖ, сутки) и по увеличению средней продолжительности жизни (УПЖ, %).

Для определения роста асцитной карциномы Эрлиха на 15-тый день эксперимента животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Рост опухоли и противоопухолевый эффект оценивали по объему опухоли, по числу клеток карциномы Эрлиха на 1 мл асцитической жидкости и по числу клеток на мышь. Концентрацию клеток подсчитывали с помощью гемоцитометра; объем опухоли определяли путем отсасывания асцитической жидкости шприцем из внутрибрюшинной полости; количество клеток на

мышь определяли путем перерасчета значения концентрации опухолевых клеток в 1 мл опухоли на весь объем опухоли. Эффективность действия препарата выражали в процентах по отношению к контролю.

Определение противоопухолевого действия в отношении солидной формы карциномы Эрлиха мышей. Эксперименты проводили на белых беспородных мышах весом 20-22 г с привитой карциномой Эрлиха, солидный вариант. С этой целью опухолевые клетки инокулировали подкожно, под правую лопатку, в количестве 5×10^6 кл/мышь. Лечение животных препаратом начинали по схеме до или после прививки опухоли в зависимости от цели эксперимента. Контрольной группе животных вводили эквивалентное количество физиологического раствора.

Противоопухолевый эффект оценивали по изменению роста опухоли по сравнению с контролем методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) с помощью томографа "PharmaScan US 70/16" (Bruker, Германия). Первое сканирование выполняли через неделю после инокуляции опухоли, затем на 8, 11, 14, 18 и 21 день эксперимента. Для каждого исследования подопытное животное предварительно анестезировали раствором рометара (Xylazinum, Чехия) в концентрации 1 мг/мл, после чего помещали в магнит с катушкой типа BGA 09P. После получения ориентировочных изображений в трех плоскостях - аксиальной, фронтальной и сагиттальной проводили основное исследование в двух проекциях - аксиальной и фронтальной для получения объемного изображения опухоли.

Для визуализации и идентификации изменений размера опухоли были получены T2-взвешенные изображения в режиме спинового эха (SE) по протоколам RARE_8, адаптированных для данного исследования. Основные изображения были получены со следующими параметрами: TR=2579,8 мс; TE=44,5 мс; FOV=3-3,5см, матрицей - 256×256; толщиной среза - 1,2 мм; расстоянием между срезами - 1,5 мм; количеством срезов - от 12 до 16.

Динамику размеров опухоли оценивали средствами программного обеспечения томографа *ParaVision 3.0.1.* (Bruker). Объем опухоли (V_{Σ}) рассчитывали по формуле:

$$V_{\Sigma} = h \sum_{i=1}^n S_i,$$

где h – толщина среза (мм); n – общее количество срезов; i – текущий номер среза; S – площадь среза (мм²).

Кумазид вводили перорально с помощью зонда. В эксперимент было взято четыре группы животных по 6 животных в каждой с разной схемой лечения:

1-я группа контрольная, животным вводили физиологический раствор.

2-я группа экспериментальная, раствор препарата вводили в дозе 0,2 мкг/мышь в течение 7 дней ежедневно, затем прививали солидную опухоль.

3-я группа экспериментальная, животным прививали опухоль и через сутки начинали лечение препаратом в дозе 0,2 мкг/мышь в течение 7 дней ежедневно.

4-я группа экспериментальная, раствор препарата вводили в дозе 0,2 мкг/мышь ежедневно за 7 дней до прививки опухоли и продолжали лечение ежедневно еще 7 дней после инокуляции опухоли.

В случае экспериментов по сочетанному действию препарата кумазид с цитостатиком 5-фторурацилом эксперименты проводили по следующей схеме:

1-я группа – интактные животные (физиологический раствор);

2-я группа – кумазид. Вводили раствор вещества в концентрации 0,2 мкг/мышь в течение 7 дней ежедневно, затем прививали солидную опухоль.

3-я группа – 5-фторурацил. Животным прививали опухоль и через сутки начинали двух-разовое лечение препаратом 5-фторурацил в концентрации 50 мг/кг, на второй и третий дни после инокуляции опухоли.

4-я группа – сочетанное действие кумазида и 5-фторурацила. Четвертой группе животных вводили раствор кумазида в концентрации 0,2 мкг/мышь в течение 7 дней ежедневно до прививки опухоли. На второй и третий дни после инокуляции опухоли начинали терапию 5-фторурацилом в концентрации 50 мг/кг.

Препараты кумазид и 5-фторурацил вводили внутривентриально в объеме 0,5 мл.

2.13. Двугибридная дрожжевая тест-система для оценки эстрогенной активности химических соединений

Для определения эстрогенной активности исследуемых соединений была создана дрожжевая двугибридная тест-система, содержащая эстрогенные рецепторы человека и ген, кодирующий β-галактозидазу в качестве репортерного фермента. С этой целью использовали следующие плазмиды: pCL1, pGBKT7-Lam (Clontech, США); две экспрессирующие плазмиды (pGBT9-hERα, содержащие ген эстрогенного рецептора человека ERα, и pGAD424-hTIF2 со встроенным геном коактиватора экспрессии TIF2), которые были любезно предоставлены доктором Нишихара Тсутому (Nishihara Tsutomu) из Университета Осака (Department of Environmental Bioscience, Osaka University, Япония). В качестве дрожжевой культуры был выбран штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y187 (*MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ*) фирмы Клонтек (Clontech, США), любезно предоставленный сотрудником ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН д.б.н.

Мартыновой Н.Ю. Трансформацию дрожжевых клеток плазмидами pGBT9-hER α и pGAD424-hTIF2 проводили с использованием литий-ацетатного метода (CLONTECH, Yeast Protocols Handbook), а отбор колоний, трансформированных одной или двумя экспрессирующими плазмидами, проводили на чашках с селективными SD средами, дефицитными по одной или двум аминокислотам в соответствии с вводимыми плазмидами. Трансформированные двумя плазмидами pGBT9-hER α и pGAD424-hTIF2 клоны были отобраны и их хранили при -80°C до проведения тестирования химических соединений на эстрогенную активность. Определение активности β -галактозидазы, экспрессируемой в дрожжевых клетках, под действием тестируемых химических соединений с использованием ONPG (*O*-нитрофенил- β -D-галактозида) в качестве субстрата в жидкой среде проводили согласно протоколу фирмы Клонтек (Clontech) с некоторыми модификациями (Nishikawa et al., 1999). С этой целью клетки культивировали в среде SD, свободной от триптофана и лейцина, для отбора трансформантов, содержащих введенные плазмиды. Для анализа эстрогенной активности тестируемых соединений выращенную в течение ночи дрожжевую культуру разбавляли средой SD так, чтобы довести O.D.₆₀₀ до 0,2-0,3. Затем свежую культуру (250 мкл) смешивали с 2,5 мкл тестируемых химикатов и 17 β -эстрадиола в качестве положительного контроля, и инкубировали в течение 4 ч при 30°C. 150 мкл суспензии дрожжей были взяты для измерения O.D.₆₀₀. Оставшиеся клетки промывали в Z-буфере (0,1 М фосфат натрия, pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄ и 0,27% -меркаптоэтанола) и дезинтегрировали жидким азотом с помощью тройной процедуры замораживания-оттаивания. Клеточный лизат смешивали с ONPG 4 мг/мл (40 мкл) и проводили реакцию до тех пор, пока не развился желтый цвет (обычно 30 мин). Для прекращения реакции в среду добавляли 1M Na₂CO₃ (100 мкл). Аликвоты (150 мкл) помещали в лунки 96-ти луночной планшеты. Поглощение при 415 и 570 нм измеряли на микропланшетном ридере « μ Quant (Bio-Tek Instruments, США). Активность β -галактозидазы рассчитывали по уравнению:

$$U=1000 \times (O.D._{415} - 1.75 \times O.D._{570} / (O.D._{600} \times V \times t),$$

где t – время реакции, мин;

V – объем культуры дрожжей в тесте, мл;

O.D.₆₀₀ – оптическая плотность суспензии дрожжей в начале эксперимента;

O.D.₄₁₅ – поглощение *O*-нитрофенола в конце реакции;

O.D.₅₇₀ – поглощение суспензии клеток в конце реакции.

2.14. Статистический анализ

Статистическая обработка данных, расчет средних значений, стандартной ошибки, стандартного отклонения и коэффициента Стьюдента, а также построение графиков во всех экспериментах были выполнены с помощью статистического и графического пакета SigmaPlot 3.02 (Jandel Scientific, США). Уровень статистической значимости различий принят равным 0,05.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование цитотоксического действия тритерпеновых гликозидов голотурий

На начальном этапе исследований мы провели сравнительное изучение цитотоксических свойств ряда тритерпеновых гликозидов голотурий, принадлежащих отрядам *Aspidochirota* и *Dendrochirota*, а также кукумариозида A_2-2 и препарата кумазид. С этой целью использовались разнообразные первичные клеточные культуры как беспозвоночных организмов (эмбрионы морского ежа), так и теплокровных животных (спленоциты, перитонеальные макрофаги), а также культивируемые линии опухолевых клеток мыши и человека. Для оценки цитотоксического действия гликозидов мы использовали несколько методических подходов, основанных на различных принципах измерения жизнеспособности клеток, от нарушения проницаемости биомембран до ингибирования ряда внутриклеточных ферментов. Это позволило нам получить достаточно полную картину цитотоксического действия, сопоставить полумаксимальные эффективные концентрации различных по структуре тритерпеновых гликозидов голотурий и установить концентрационный диапазон их цитотоксического действия.

3.1.1. Цитотоксическая активность тритерпеновых гликозидов в отношении эмбрионов морского ежа

Изучена цитотоксическая активность гликозидов голотурий: фрондозида А из кукумарии *C. frondosa* и гликозидов из кукумарии *C. japonica* (кукумариозид A_2-2 , A_7-1 и их агликон) по отношению к развивающемуся эмбрионам морского ежа *S. nudus*. Показано, что гликозиды обладают выраженной антимиотической активностью, вызывают полное блокирование деления и лизис бластомеров в концентрации 5 мкг/мл. Наблюдали значительное количество морфологических аномалий, таких как аномальное деление (три бластомера, изменение формы бластомеров и неравномерное деление) и задержка развития при более низких концентрациях кукумариозидов. Пример проявления кукумариозидом A_2-2 способности блокировать деление оплодотворенных яйцеклеток морского ежа представлен на рис. 13.

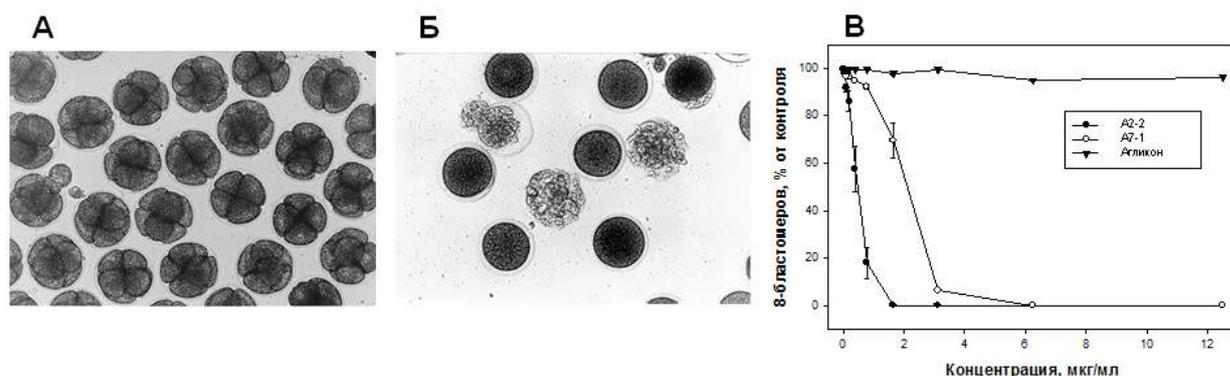


Рис. 13. Влияние кукумариозидов на развитие эмбрионов морского ежа *S. nudus*. **А** – контроль, эмбрионы на стадии 8-бластомеров; **Б** – блокирование деления и лизис бластомеров в присутствии кукумариозида A_2-2 , 2 мкг/мл; **В** – Зависимость цитотоксического действия кукумариозидов A_2-2 , A_7-1 и агликона на развивающиеся эмбрионы морского ежа *S. nudus*

Установлено, что EC_{50} для фрондозида А составляет 0,98 мкг/мл, а EC_{50} для кукумариозида A_2-2 и A_7-1 – 0,45 мкг/мл и 1,98 мкг/мл соответственно, в то время как агликон не проявлял никакой активности до концентрации 100 мкг/мл. В концентрационном диапазоне 0,001–0,1 мкг/мл все испытанные соединения не влияли на развитие эмбрионов морских ежей. Зависимость цитотоксического действия кукумариозидов A_2-2 , A_7-1 и агликона от концентрации проиллюстрирована на рисунке 13 В.

Таким образом, было установлено, что цитотоксические свойства тритерпеновых гликозидов голотурий по отношению к эмбриональным клеткам морского ежа проявляются в микрограммовом диапазоне концентраций и зависят от их химического строения.

3.1.2. Влияние тритерпеновых гликозидов на жизнеспособность опухолевых клеток

Определение влияния исследуемых веществ на жизнеспособность опухолевых клеток мыши с помощью красителя трипановый синий. Влияние гликозидов голотурий на жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха мыши представлено на рис. 14. При окрашивании опухолевых клеток трипановым синим и последующим подсчетом процента окрашенных клеток было обнаружено, что инкубирование клеток с кукумариозидом A_2-2 уже при концентрации порядка 2,5 мкМ гликозида приводит к гибели 50% клеток ($EC_{50} = 2,7$ мкМ), а при более высоких концентрациях процент погибших клеток достигает 100%, причем часть клеток лизируется (рис. 14А, Б и В). Фрондозид А проявлял схожую цитотоксическую активность. Полумаксимальная эффективная концентрация для фрондозидов А составила 2,5 мкМ. Дальнейшее увеличение

концентрации гликозида в инкубационной среде приводило к увеличению числа погибших клеток и достигало практически 100% при концентрации 8,0 мкМ и выше (рис. 14Г). Таким образом, тритерпеновые гликозиды голотурий, кукумариозид А₂-2 и фрндозид А, обладают цитотоксичным действием по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха мышей.

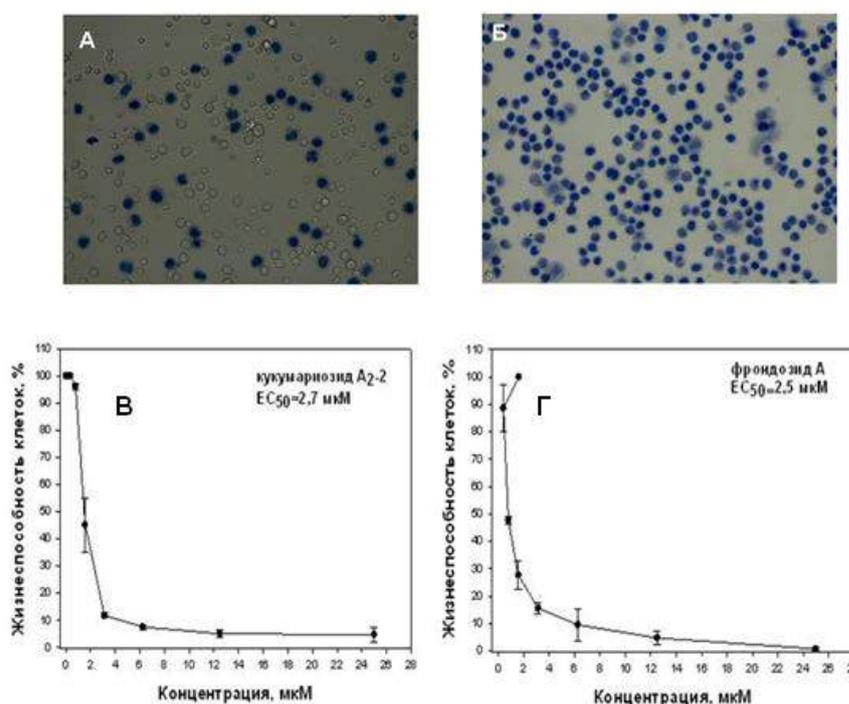


Рис. 14. Влияние гликозидов голотурий на жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха мыши (окраска трипановым синим). Концентрации гликозида – 2,5 мкМ (А) и 8 мкМ (Б). Зависимость цитотоксического действия кукумариозида А₂-2 (В) и фрндозида А (Г) по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха мышей от концентрации гликозидов, исследованная с помощью окрашивания клеток красителем трипановый синий

Определение активности неспецифической эстеразы. Одним из показателей цитотоксического действия препаратов служит оценка их ингибирующего действия на активность цитоплазматического фермента неспецифическая эстераза, являющейся одним из индикаторов жизнеспособности клеток. Активность фермента оценивали при помощи молекулярного зонда FDA. Зонд не является флуоресцентным, однако при попадании в цитоплазму клетки в присутствии неспецифической эстеразы происходит отщепление молекулы диацетата и образование флуоресцентного продукта – флюоресцеина. Интенсивность зеленой флуоресценции флюоресцеина пропорциональна его количеству и, соответственно, активности фермента и жизнеспособности клетки.

На рисунке 15 В показаны клетки асцитной карциномы Эрлиха мыши после инкубирования с кукумариозидом А₂-2, окрашенные флуоресцентными зондами FDA (живые клетки, зеленая флуоресценция) и пропидиумом иодидом (PI, погибшие клетки, красная флуоресценция). С помощью анализа флуоресцентного изображения клеток было установлено, что при инкубировании клеток асцитной карциномы Эрлиха с кукумариозидом А₂-2 или с фрондозидом А, применяемых в микромолярном диапазоне концентраций, происходит ингибирование активности неспецифической эстеразы, что подтверждает факт угнетения жизнеспособности опухолевых клеток при инкубации с этими гликозидами. Эффект носит концентрационно-зависимый характер. При концентрации гликозидов в культуральной среде 10 мкМ и выше наблюдается 100%-ная гибель клеток. ЕС₅₀ для кукумариозида А₂-2 составила 2,1 мкМ (Таблица 4). В то же время, никакого существенного влияния на активность неспецифической эстеразы и, соответственно, жизнеспособность опухолевых клеток, не наблюдалось при концентрации исследуемых соединений в диапазоне 1,0 нМ–1,0 мкМ на протяжении 1–24 ч инкубирования.

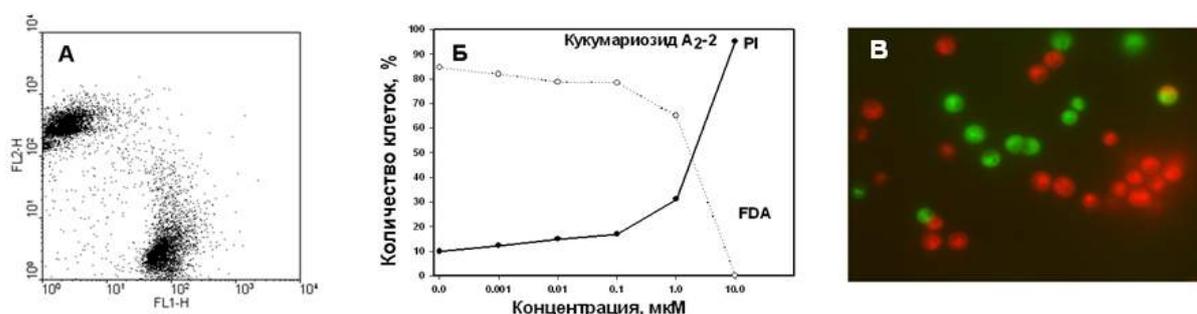


Рис. 15. Определение цитотоксической активности кукумариозида А₂-2 в отношении клеток асцитной карциномы Эрлиха методом анализа изображения и проточной цитофлуориметрии. А – дотограмма клеток, инкубированных с кукумариозидом А₂-2 (2 мкМ, 1 ч, 37°С); Б – зависимость активности неспецифической эстеразы и проницаемости биомембран от концентрации гликозида в инкубационной среде. Окрашивание клеток флуоресцентными зондами FDA (зеленый канал FL1-H) и PI (красный канал FL2-H); В - влияние кукумариозида А₂-2 на жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха мыши. Концентрации гликозида – 2 мкМ. Окрашивание с помощью FDA и PI. Изображения получены с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия); объектив ×40/Oil

Определение цитотоксической активности кукумариозида А₂-2 методом проточной цитофлуориметрии с применением двух флуоресцентных зондов, FDA и PI, показало, что жизнеспособность клеток карциномы Эрлиха при добавлении гликозида в концентрациях от 0,001 до 1,0 мкМ незначительно изменяется по сравнению с таковой в контрольной группе клеток. При концентрации 1,0 мкМ примерно 15–20% клеток погибает. При

повышении концентрации гликозида до 10 мкМ цитотоксический эффект гликозидов резко возрастает, что выражается как практически в полном ингибировании активности цитоплазматической неспецифической эстеразы, так и в нарушении барьерных функций биомембран (рис. 15).

Определение жизнеспособности опухолевых клеток с помощью метода МТТ.

Эксперименты по исследованию цитотоксической активности тритерпеновых гликозидов, кукумариозида А₂-2 и фрондозид А, на клетках асцитной карциномы Эрлиха мышей показали, что изучаемые соединения подавляют жизнеспособность опухолевых клеток в микромолярном диапазоне концентраций. Полумаксимальная эффективная концентрация цитотоксического действия кукумариозида А₂-2, полученная с помощью метода МТТ, составляет 2,7 мкМ (рис. 16 А), а для фрондозид А – 1,9 мкМ (рис. 16 Б). На рисунке 16 В, Г представлены данные по влиянию исследуемых гликозидов на жизнеспособность опухолевых клеток линии РС3 (оценка с помощью метода МТТ).

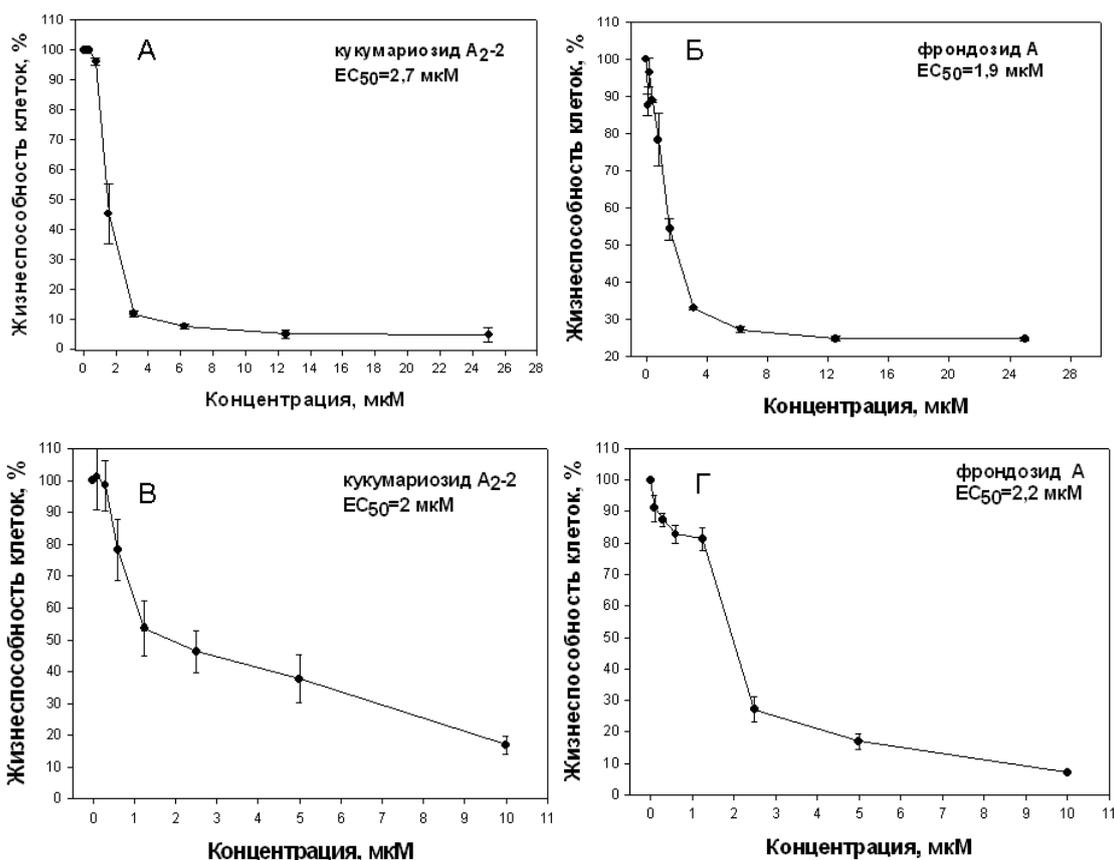


Рис. 16. Цитотоксическая активность кукумариозида А₂-2 и фрондозид А по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха мышей (А и Б) и клеток РС3 (В и Г), оцененная методом МТТ. Время инкубирования клеток с гликозидами – 24 ч (А и Б) и 48 ч (В и Г)

Обнаружена концентрационная зависимость ингибирующего действия гликозидов в микромолярном диапазоне в экспериментах на клетках линии РС3: EC₅₀ для кукумариозида А₂-2 составила 2,0 мкМ, а для фрондозид А – 2,2 мкМ. Установлено, что значительных различий в цитотоксическом действии кукумариозида А₂-2 и фрондозид А по отношению к клеткам опухоли простаты человека линии РС3 и к клеткам асцитной формы карциномы Эрлиха мышей не было.

Таблица 4. Влияние кукумариозида А₂-2 и фрондозид А на жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха мышей и опухолевых клеток репродуктивной сферы человека. Указаны полумаксимальные эффективные концентрации (EC₅₀)

Вещество	EC ₅₀ , мкМ					
	АКЭ	РС3	NT2	NT2-R	2102EP	2102EP-R
Кукумариозид А ₂ -2	2,7*; 2,1**; 2,7***	2,0***	1,4***	1,5***	1,0***	2,05***
Фрондозид А	2,5*; 2,4**; 1,9***	2,2***	2,3***	2,75***	1,6***	2,1***

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

Полумаксимальные эффективные концентрации цитотоксического действия кукумариозида А₂-2 и фрондозид А по отношению к различным типам опухолевых клеток, полученные с помощью окраски клеток трипановым синим, по оценке ингибирования активности неспецифической эстеразы и методом МТТ представлены в сводной таблице 4. Из таблицы видно, что полумаксимальные эффективный концентрации кукумариозида А₂-2 и фрондозид А по отношению к разным типам клеток, оцененные разными методами, лежат в диапазоне 1,4-2,7 мкМ.

Таблица 5. Цитотоксическая активность (МТТ) гликозидов 1-6 из голотурии *Eupentacta fraudatrix* по отношению к клеткам АКЭ

Вещество	EC ₅₀ , мкг/мл	Вещество	EC ₅₀ , мкг/мл
Кукумариозид I ₂ (1),	34,6	Кукумариозид А ₆ (4)	12,5
Кукумариозид H (2)	16,3	Кукумариозид В ₂ (5)	43,6
Кукумариозид А ₅ (3)	17,3	Кукумариозид В ₆ (6)	>100

Была исследована цитотоксическая активность тритерпеновых гликозидов, выделенных из голотурии *E. fraudatrix*, в отношении клеток АКЭ. Было установлено, что

по цитотоксической активности эти соединения можно разделить на низко-токсичные - кукумариозиды I₂ (1) B₂ (5); и умеренно-токсичные – кукумариозиды H (6), A₅ (3) и A₆ (4). Данные по цитотоксической активности этих гликозидов представлены в таблице 5.

3.1.3. Цитотоксическая активность тритерпеновых гликозидов в отношении иммунокомпетентных клеток

Анализ цитотоксического действия кукумариозида A₂-2 в отношении перитонеальных макрофагов мыши показал, что EC₅₀ составляет 3,0 мкМ. При концентрации 6,0 мкМ и выше, 100%-ную гибель клеток наблюдали через 1 ч инкубации клеток с гликозидом. Изображение перитонеальных макрофагов мыши, окрашенных красителем трипановый синий, и дозозависимая кривая цитотоксической активности кукумариозида A₂-2 по отношению к перитонеальным макрофагам показаны на рис. 21А и Б (см. главу 3.2.2.) соответственно.

Была исследована цитотоксическая активность ряда моносультатированных гликозидов, выделенных из голотурий рода *Cucumaria*, отличающихся небольшими различиями в структуре углеводных цепей и агликонов, по отношению к лимфоцитам селезенки мышей. Кроме того, исследовали цитотоксическую активность препарата кумазид. Методом оценки активности неспецифической эстеразы спленоцитов мыши было показано, что гликозиды 1–4 ингибируют активность неспецифической эстеразы в лимфоцитах селезенки мыши. Полумаксимальные эффективные дозы для этих соединений находились в пределах 2,4–8,0 мкг/мл. В тоже время, препарат кумазид оказался не эффективным в концентрации до 50 мкг/мл (Таблица 6).

Таблица 6. Влияние тритерпеновых гликозидов из голотурий рода *Cucumaria* и препарата кумазид на активность неспецифической эстеразы в лимфоцитах селезенки мышей линии Balb/c

Вещество	Охотозид A ₁ -1	Кукумариозид A ₀ -1	Фрондозид А	Кукумариозид A ₂ -2	Кумазид
EC ₅₀ , мкг/мл	2,4	4,1	5,0	8,0	>50,0

3.1.4. Гемолитическая активность кукумариозида A₂-2 и фрондозид А

Было продемонстрировано, что кукумариозид A₂-2 и фрондозид А обладают значительной гемолитической активностью по отношению к эритроцитом мыши. Максимальная и полумаксимальная эффективные концентрации (EC₅₀) для кукумариозида A₂-2 и фрондозид А составили 2,5 мкг/мл и 3,5 мкг/мл соответственно (рис. 17).

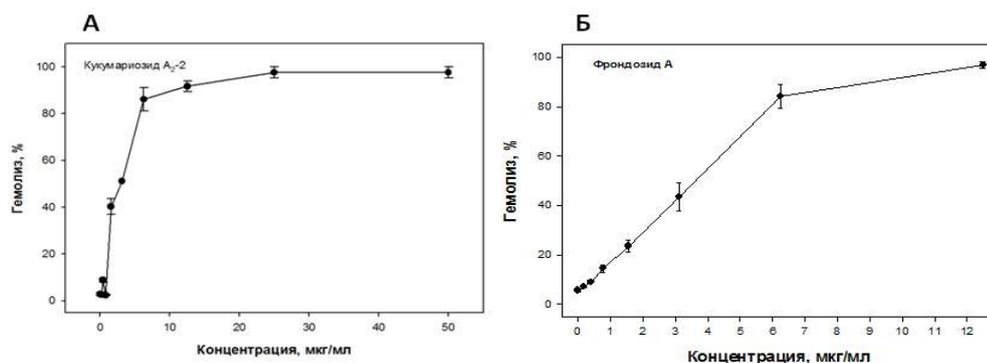


Рис. 17. Гемолитическая активность кукумариозида A₂-2 (А) и фрондозид А (Б) по отношению к эритроцитам мыши. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего

Таким образом, нами было продемонстрировано, что исследованные тритерпеновые гликозиды, выделенные из голотурий рода *Cuscutaria*, проявляют сопоставимую цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам мыши и человека, а также в отношении иммунокомпетентных клеток мыши. Кроме того, они обладают гемолитической активностью.

В настоящее время цитотоксическую активность тритерпеновых гликозидов голотурий связывают с их выраженным мембранотропным действием, а именно, с изменением проницаемости мембран и с влиянием гликозидов на различные ферментные комплексы, входящие в состав этих мембран (Попов, 1984; Анисимов, 1987; Попов, 2006). Хорошо известно, что тритерпеновые гликозиды голотурий не обладают выраженной избирательной цитотоксической активностью, и она варьирует незначительно по отношению к различным типам клеток (см., например, обзор Kalinin et al., 2008). В наших исследованиях было продемонстрировано, что ряд тритерпеновых гликозидов, выделенных из различных видов голотурий, проявляет цитотоксические свойства по отношению к различным типам клеток, включая яйцеклетки и эмбрионы морских ежей, опухолевые клетки мыши и человека, клетки иммунной системы и эритроциты. Диапазон цитотоксической активности тритерпеновых гликозидов голотурий лежит в области микромолярных (микрограммовых) концентраций.

3.1.5. Оценка острой токсичности

Острую токсичность кукумариозида A₂-2 и фрондозид А определяли на белых беспородных мышах. Каждая экспериментальная группа животных состояла из 6 мышей. В качестве контрольных использовались животные, которым вводили физиологический раствор в том же объеме. Схема введения препаратов представлена в Таблице 7.

Таблица 7. Схема введения гликозидов для определения их острой токсичности

Группа	Доза (мг/кг)
1	100
2	50
3	25
4	12,5
5	6,25
6	3,125
7	0 (контроль)

Расчет летальных доз проводили по методу Кербера. По итогам экспериментов по определению острой токсичности для мышей ЛД₅₀ кукумариозида А₂-2 при внутрибрюшинном введении составила 10,5 мг/кг. ЛД₅₀ фрондозид А при однократном внутрибрюшинном введении составила 9,9 мг/кг.

3.2. Исследование иммуномодулирующей активности тритерпеновых гликозидов

3.2.1. Адгезия, распластывание и подвижность макрофагов

Мы провели исследование влияния кукумариозида А₂-2, фрондозид 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.

Адгезия клеток. 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 кукумариозида А₂-2 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 кукумариозида А₂-2 в инкубационной среде до 2 мкг/мл снижало уровень прикрепления клеток до исходных значений (рис. 17А).

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 кукумариозидом А₂-2,

увеличивало адгезию спленоцитов на коллагеновом матриксе по сравнению с контролем. В присутствии гликозидов уровень адгезии клеток вырос с $0,47 \pm 0,03$ отн. ед. (коллаген I, контроль) до $0,75 \pm 0,04$ отн. ед. (коллаген I, стимуляция спленоцитов гликозидами). Это указывает на то, что тритерпеновые гликозиды голотурий (кукумариозид A₂-2 и фрондозид A) оказывают практически одинаковое стимулирующее влияние на способность клеток прикрепляться к внеклеточному матриксу (рис. 17Б).

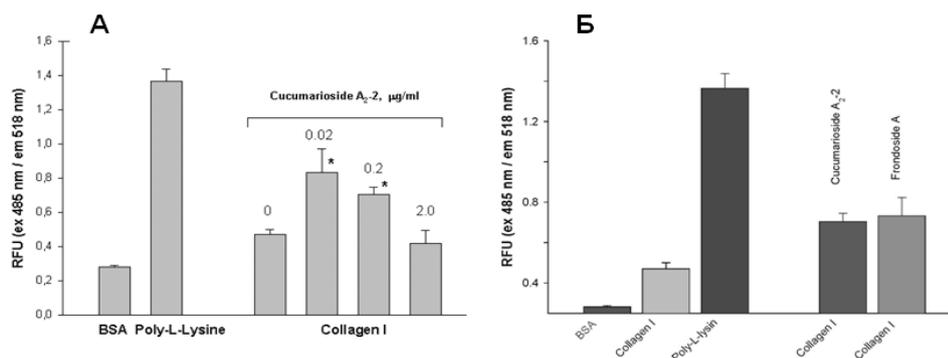


Рис. 17. Влияние тритерпеновых гликозидов кукумариозида A₂-2 и фрондозида A на адгезию спленоцитов мышей линии Balb/c на внеклеточном матриксе. **А** – зависимость степени адгезии клеток от концентрации кукумариозида A₂-2 (0,002 – 2,0 мкг/мл); **Б** – сравнительное исследование влияния кукумариозида A₂-2 и фрондозида A в концентрации 0,02 мкг/мл на степень адгезии. БСА, коллаген I и поли-L-лизин использовали в качестве покрытия для минимальной и максимальной адгезии клеток. Время инкубирования клеток 2 час при 37°C. Показана интенсивность флуоресценции зонда 5-CFDA в отн. ед. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 5). *Достоверное различие (p<0,05) по сравнению с контролем (коллаген I, без гликозида)

Для реализации процесса адгезии клетки прикрепляются как к компонентам внеклеточного матрикса (при участии рецепторов адгезии), образующих комплексы с компонентами цитоскелета, так и друг к другу. Это в конечном итоге приводит к изменению подвижности клеток, дифференцировке, пролиферации и выживаемости клеток. Найденное изменение в физиологии спленоцитов *in-vitro* полностью согласуется с полученными нами результатами по экспрессии белков с помощью анализа протеома спленоцитов (см главу 3.8.1).

Распластывание клеток. Регистрацию и оценку распластывания перитонеальных макрофагов мыши, помещенных на покровное стекло в камере для анализа флуоресцентного изображения клеток, проводили в течение 2 час после адгезии. Было установлено, что кукумариозид A₂-2 индуцирует усиление всех регистрируемых показателей клеточного распластывания. Обнаружено, что перитонеальные макрофаги,

инкубированные с кукумариозидом А₂-2 в концентрации 0,02 мкг/мл, имели увеличенные геометрические параметры, и их форма сильно варьировала из-за увеличения степени расплывания, удлинения и формирования ламелл и филоподий по сравнению с контрольными клетками (рис. 18). Гликозид вызывал статистически значимое почти двукратное увеличение площади клеток, их периметра и максимальной хорды. Оценка влияния гликозида на морфометрические параметры макрофагов представлены в таблице 8.

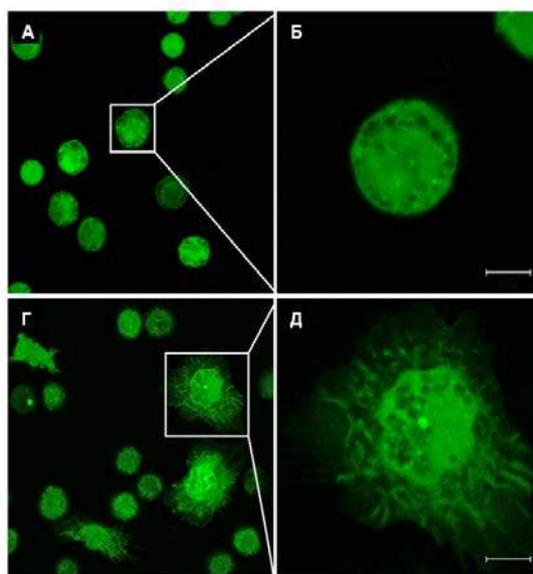


Рис. 18. Влияние кукумариозида А₂-2 на морфологию перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c. Окраска флуоресцентным зондом 5-CFDA (цитоплазма). Изображения получены с помощью конфокального микроскопа LSM510 META (Carl Zeiss, Германия). А, Б – контрольные клетки. А – объектив ×100/Oil, В – объектив ×100/Oil Zoom 3); Г, Д – стимулированные макрофаги, кукумариозид А₂-2; 0,02 мкг/мл (С- объектив ×100/Oil, D –объектив ×100/Oil Zoom 3). Масштабная линейка: 10 мкм

Таблица 8. Влияние кукумариозида А₂-2 на морфометрические параметры перитонеальных макрофагов мыши *in vitro*

Вещество	Морфометрические параметры макрофагов, пиксели			
	Площадь	Периметр	Максимальная хорда	Форма
Контроль	95,051 ± 11,301	81,576 ± 8.373	11,161 ± 1,183	0,178 ± 0,017
Кукумариозид А ₂ -2	231,519 ± 38,739*	126,504 ± 14.968*	23,481 ± 2,538*	0,208 ± 0,011

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n=100); *p < 0,05

Подвижность клеток. Влияние кукумариозида А₂-2 на подвижность перитонеальных макрофагов мыши было оценено с помощью конфокальной микроскопии клеток, преинкубированных с гликозидом в течение 2 час, а затем окрашенных

флуоресцентными красителями DAPI (окраска ядер) и 5-CFDA (окраска цитоплазмы). Было установлено, что воздействие гликозида на макрофаги приводит к значительному увеличению площади клеток и вариабельности площади, а также скорости движения и вращения клеток (Таблица 9). Влияние кукумариозида A₂-2 на скорость и направление движения одиночных перитонеальных макрофагов, регистрируемое в трехмерных координатах, представлена на рис. 19.

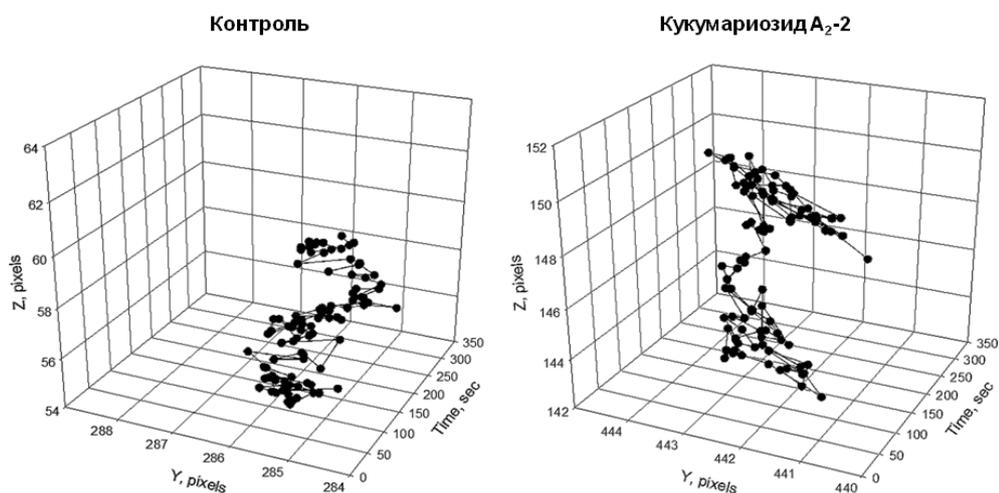


Рис. 19. Влияние кукумариозида A₂-2 (0,02 мкг/мл) на подвижность одиночного макрофага, записываемую в течение 350 сек. Окрашивание клеток флуоресцентными зондами 5-CFDA и DAPI. Изображения клеток регистрировались с задержкой 2 сек между циклами

Таблица 9. Влияние кукумариозида A₂-2 (0,02 мкг/мл) *in vitro* на параметры клеточной подвижности (площадь клеток, варьирование площади клеток, скорость движения клеток, вращение клеток)

Вещество	Площадь (пиксели)	Варьирование площади (%)	Скорость движения (пиксели)	Вращение (степень)
Контроль	3719,41 ± 372,15	28,17 ± 3,26	12,73 ± 1,18	9,68 ± 1,45
Кукумариозид A ₂ -2	5959,66 ± 907,50*	46,43 ± 12,96*	17,10 ± 1,19*	18,32 ± 3,20*

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n=15); *p < 0,05

Для отслеживания движения клеток были выбраны такие параметры, как положение центра клетки, которое отражает изменение координат геометрического центра клеток (центроид) и способность клеток изменять свою геометрию (расширение, сжатие, изменение формы) в процессе миграции. На рисунке 19 ясно видно, что подвижность клеток, регистрируемая методом отслеживания изменения позиции

центроида во времени, значительно изменяется после инкубирования клеток с кукумариозидом А₂-2. Увеличивается дистанция и боковые флуктуации в движении, на которые стимулированные клетки передвигаются за определенное время по сравнению с контрольными макрофагами.

Влияние моносulfатированных тритерпеновых гликозидов из голотурии *S. okhotensis* на морфометрические параметры перитонеальных макрофагов мыши *in vivo*. Мы исследовали влияние ряда моносulfатированных тритерпеновых гликозидов из *S. okhotensis* на морфометрические показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов мыши, такие как форма клетки и размер площади клетки, периметр и максимальная хорда. Препараты вводили экспериментальным животным в виде водных растворов внутрибрюшинно. Через определенное время из животных выделяли перитонеальные макрофаги и оценивали вышеуказанные параметры.

Было обнаружено, что все исследуемые гликозиды вызывают увеличение показателей функциональной активности перитонеальных макрофагов мыши на четвертый день после внутрибрюшинной инъекции. Было показано, что макрофаги мышей, которым вводили фрондозид А, имеют увеличенные геометрические параметры и более измененную форму поверхности благодаря выраженному расплыванию и удлинению, а также формированию ламелл и филоподий по сравнению с макрофагами мышей из контрольной группы (рис. 20).

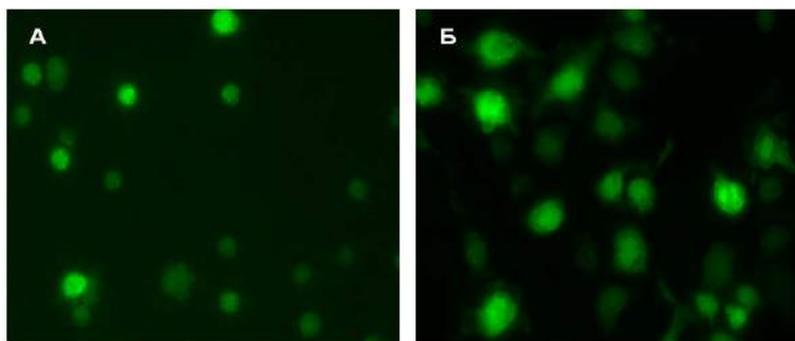


Рис. 20. Влияние фрондозид А на морфологию перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c. Окраска флуоресцентным зондом 5-CFDA (цитоплазма). А – контрольные клетки; Б – стимулированные (фрондозид А; 0,2 мкг/мышь) макрофаги. Изображения получены с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия); объектив ×40/Oil

Количественная оценка влияния гликозидов на морфометрические параметры макрофагов представлены в таблице 10. Почти все исследуемые гликозиды при внутрибрюшинной инъекции в дозе 0,2 мкг/мышь вызывают статистически достоверное увеличение площади клеток, периметра, максимальной хорды и интегрального показателя

формы клеток. Наиболее эффективными гликозидами были фрондозид A₁ (1), фрондозид A (4) и кукумариозид A₂₋₅ (6), причем наиболее активным был фрондозид A. Эти вещества активировали распластывание макрофагов в 2-2,5 раза больше по сравнению с клетками из контрольной группой животных.

Таблица 10. Влияние моносультативированных тритерпеновых гликозидов из голотурии *S. okhotensis* на распластывание перитонеальных макрофагов мыши *in vivo*. Гликозиды вводили внутривентриально в дозе 0,2 мкг/мышь. На 4 день перитонеальные макрофаги выделяли и оценивали их морфометрические параметры

Вещество	Морфометрические параметры макрофагов, пиксели			
	Площадь	Периметр	Максимальная хорда	Форма
Контроль	92,163 ± 13,111	80,698 ± 9,484	11,050 ± 1,094	0,189 ± 0,016
Fr A₁	239,315 ± 25,444*	104,849 ± 7,578*	21,284 ± 1,465*	0,245 ± 0,012*
Okh B₁	107,989 ± 15,989	120,333 ± 8,621*	14,774 ± 0,863*	0,075 ± 0,01*
Okh A₁₋₁	154,146 ± 18,282*	142,343 ± 12,40*	19,214 ± 1,452*	0,106 ± 0,007*
Fr A	250,125 ± 33,284*	128,659 ± 12,24*	22,472 ± 1,611*	0,210 ± 0,011*
Okh A₂₋₁	157,138 ± 22,937*	88,400 ± 8,956	17,493 ± 1,064*	0,285 ± 0,011*
Cucu A₂₋₅	229,608 ± 39,828*	125,411 ± 16,94*	22,592 ± 2,453*	0,206 ± 0,014

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n=100); *p < 0,05

Адгезия макрофагов с последующим распластыванием является одним из необходимых элементов для проявления их функциональной активности. Эти события сопровождаются изменениями геометрических параметров макрофагов, включая площадь клетки и периметр. Адгезия играет важную роль во взаимодействии клеток и имеет фундаментальное значение в развитии и поддержании функционирования тканей. Адгезия клеток участвует в передаче стимулирующих сигналов, которые регулируют дифференцировку клеток, клеточный цикл и выживание клеток. Процесс адгезии клеток на клеточный монослой или на внеклеточный матрикс отвечает за широкий диапазон нормальной и aberrантной клеточной активности, включая миграцию иммунных клеток в места инфекции, ангиогенез во время заживления ран, а также инвазию и метастазирование опухолевых клеток. Для выполнения многих из этих функций клетки должны связывать другие клетки или различные молекулы во внеклеточном матриксе. Адгезия макрофагов на внеклеточный матрикс и их последующее распространение необходимо для облегчения функциональной активности макрофагов. Эти показатели отражают начальную стадию фагоцитоза и способность макрофагов к фагоцитозу. Процесс адгезии и распластывания сопровождается изменениями в геометрических параметрах макрофагов, включая площадь клеток и их периметр. Клетка может

удлиниться и изменять свою форму из-за образования ламелл и филоподий (Mosser, Edwards, 2008; Martinez et al., 2008).

Мы обнаружили, что кукумариозид А₂-2 при совместном инкубировании с иммунными клетками *in vitro* вызывает их активацию, сопровождающуюся увеличением адгезии, распластывания и подвижности. Стимулирующие эффекты наблюдали при довольно низких концентрациях гликозида в диапазоне 0,02–0,2 мкг/мл. Если кукумариозид А₂-2 применяли в субцитотоксической концентрации 2 мкг/мл, стимуляции адгезии клеток не наблюдали.

Известно, что активация адгезии, распластывания и миграции фагоцитирующих клеток связана с реорганизацией их цитоскелета. Лимфоциты непрерывно рециркулирует между потоком крови и лимфоидными органами. Для обеспечения клеточной подвижности требуется целый комплекс взаимодействий между хемокинами и клеточными рецепторами хемокинов, а также с молекулами адгезии и их лигандами на других клетках или внеклеточном матриксе. Такие взаимодействия активируют сигнальные пути, которые вызывают динамические перегруппировки цитоскелета. Такие перегруппировки позволяют лимфоцитам прикрепляться к субстрату (например, на антиген-представляющие клетки), мигрировать (например, через эндотелий) и патрулировать тело в поисках места локализации антигена. Миграция и антиген-специфическая активация являются отличительными чертами некоторых лимфоцитов и имеют решающее значение для адаптивного иммунного ответа. Для обеспечения этих функций лимфоциты должны обладать пластичностью актинового цитоскелета, основанной на процессах динамической полимеризации и деполимеризации (Samstag et al., 2003).

Таким образом, изученные нами моносультатированные тритерпеновые гликозиды голотурий рода *Cucumaria* могут проявлять иммуностимулирующие свойства за счет усиления клеточного иммунитета и его барьерных функций в борьбе с патогенными микроорганизмами. Наше исследование показывает, что эти соединения существенно влияют на клеточный иммунитет в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*, что отражается в значительных изменениях морфологии иммунных клеток и их поведения.

3.2.2. Влияние тритерпеновых гликозидов на лизосомальную активность и уровень АФК и NO в макрофагах мыши

Влияние на лизосомальную активность и уровень АФК в перитонеальных макрофагов мыши *in vitro*. Как уже было отмечено в разделе 3.1.1, сравнительный анализ

цитотоксического действия кукумариозида А₂-2 в отношении перитонеальных макрофагов мышей показал, что ЕС₅₀ для гликозида в отношении данных клеток составляет 3,0 мкМ. Этот показатель сопоставим со значением ЕС₅₀ для кукумариозида А₂-2 в отношении опухолевых клеток мыши (Таблица 11; раздел 3.1.2, Таблица 4). Изображение перитонеальных макрофагов мыши, окрашенных красителем трипановый синий, и дозозависимая кривая цитотоксической активности кукумариозида А₂-2 по отношению к перитонеальным макрофагам показаны на рис. 21А и Б соответственно.

Таблица 11. Цитотоксическая активность кукумариозида А₂-2 в отношении перитонеальных макрофагов и клеток асцитной карциномы Эрлиха мышей

<i>Соединение</i>	<i>Цитотоксическая активность, ЕС₅₀, мкМ</i>	
	Асцитная карцинома Эрлиха	Перитонеальные макрофаги
Кукумариозид А ₂ -2	2,1–2,7	3,0

При использовании флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый для прижизненного окрашивания лизосом в клетках и техники исследования флуоресцентного изображения клеток, была обнаружена значительная стимуляция лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши в присутствии кукумариозида А₂-2 (в нецитотоксическом диапазоне концентраций от 0,001 до 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. 21Б и В). 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. Последующее увеличение концентрации кукумариозида А₂-2 в инкубационной среде приводило к снижению стимулирующего эффекта.

При сравнительном исследовании иммуномодулирующей активности кукумариозида А₂-2 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. 22А).

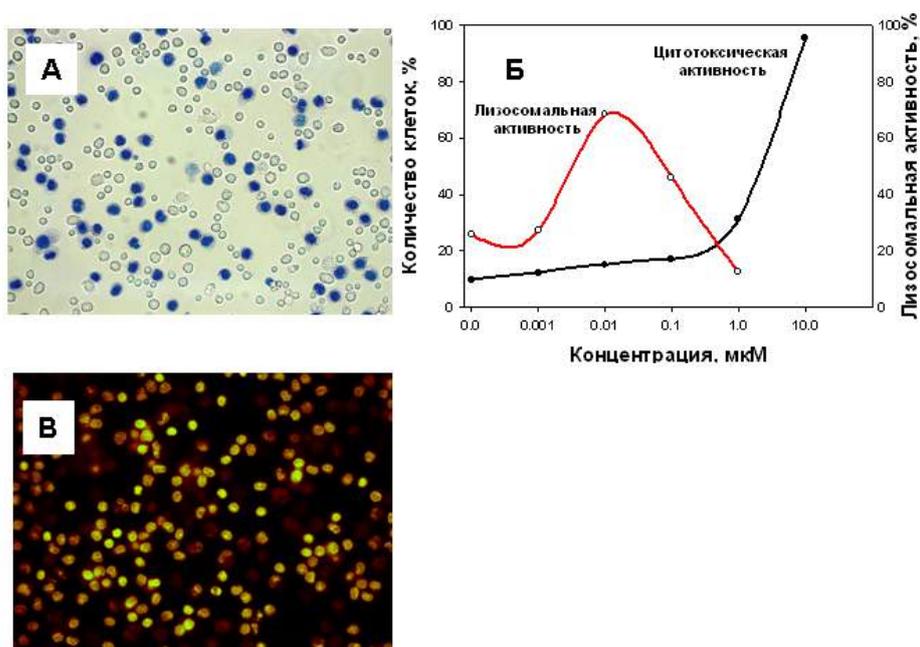


Рис. 21. Цитотоксическая и иммуностимулирующая активности кукумариозида A₂-2 в отношении перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c *in vitro*. Время инкубирования клеток с гликозидом 1 ч при 37°C. **А** – изображение монослоя перитонеальных макрофагов, инкубированных с кукумариозидом A₂-2 (2 мкМ) и окрашенных красителем трипановый синий; **Б** – дозозависимые кривые цитотоксической и лизосомальной активности кукумариозида A₂-2; **В** – изображение перитонеальных макрофагов, инкубированных с кукумариозидом A₂-2 (0,01 мкМ) и окрашенных красителем акридиновый оранжевый

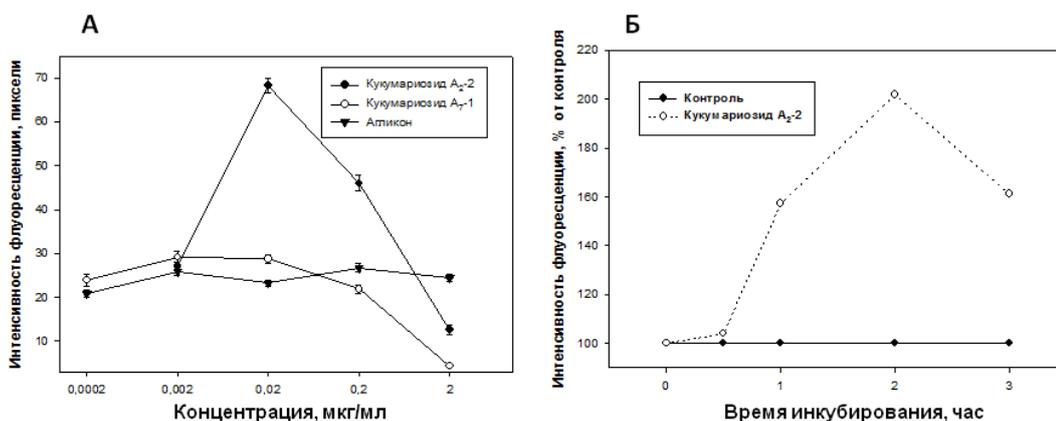


Рис. 22. А – Влияние кукумариозидов A₂-2 и A₇-1, а также их агликона на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c *in vitro*. (А) Время инкубирования клеток с гликозидами 1 час. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего (n = 100). **Б** – Зависимость лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c от времени инкубирования клеток с кукумариозидом A₂-2 *in vitro*. Концентрация гликозида 0,02 мкг/мл

Исследована зависимость проявления стимулирующей лизосомальной активности кукумариозида A₂-2 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. 22Б).

Таким образом, обнаружено, что кукумариозид А₂-2 в субцитотоксических концентрациях приводит к активации клеток иммунной системы и потенцированию клеточных функций. Применение кукумариозида А₂-2 в низких наномолярных (нанограммовых) концентрациях вызывало повышение лизосомальной активности перитонеальных макрофагов, в то время как более высокие концентрации подавляли эту клеточную функцию. Максимальный стимулирующий эффект проявлялся через 2 часа инкубирования клеток с гликозидам.

Установлено, что иммуномодулирующий эффект кукумариозида А₂-2 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. 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 кукумариозид А₂-2 в концентрации 0,1 мкМ оказался практически не эффективным. Более того, если кукумариозид А₂-2 применяли в концентрации 1,0 мкМ, то было отмечено значительное ингибирование продукции АФК в клетках по сравнению с контрольным уровнем (рис. 23А).

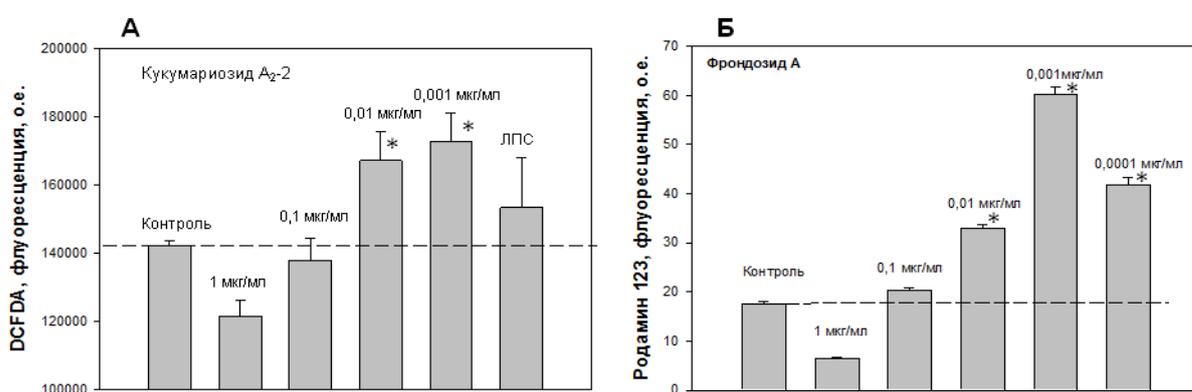


Рис. 23. Влияние кукумариозида А₂-2 и фрондозид А на содержание АФК в клетках культуры макрофагов *in vitro*. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего (n=3). Концентрация ЛПС 0,5 мкг/мл; время инкубирования с клетками 2 ч. Регистрация АФК с помощью флуоресцентного зонда DCFDA в клетках линии RAW 264.7 (А) и дигидрородамина-123 перитонеальных макрофагах мыши линии Balb/c (Б)

Фрондозид А оказывал двоякое влияние на образовании АФК в макрофагах мыши. Его эффект зависел от концентрации гликозида. В интервале концентраций гликозида 0,0001-0,01 мкг/мл наблюдали существенное увеличение флуоресценции внутриклеточного зонда родамина-123 в зеленой области, свидетельствующее об увеличении АФК в цитоплазме. Максимальный стимулирующий эффект наблюдали при концентрации гликозида 0,001 мкг/мл (рис. 23Б). С другой стороны, если фрондозид А применяли при концентрации 1,0 мкг/мл, то наблюдали значительное ингибирование образования активных форм кислорода в клетках, в то время как концентрация 0,1 мкг/мл была практически неэффективна (рис. 23Б).

Влияние гликозидов из голотурий *A. typica* и *E. fraudatrix* на лизосомальную активность и уровень формирования АФК в макрофагах мыши *in vitro*. Было исследовано иммуномодулирующее действие пяти тритерпеновых гликозидов, выделенных их голотурии *A. typica*. Это типикозиды А₁, А₂, В₁, С₁, и С₂. Нами была изучена способность типикозидов стимулировать лизосомальную активность и увеличивать формирование АФК в мышинных перитонеальных макрофагах мыши в сравнении с их цитотоксической активностью. Результаты исследования иммуномодулирующей активности типикозидов представлены в Таблице 12. Все исследуемые гликозиды, кроме типикозид С₂ (5), показали определенное иммуностимулирующее действие на перитонеальных макрофагах мышей при достаточно низких концентрациях 0,001–0,1 мкг/мл. Типикозид А₁ (1) в концентрации 0,1 мкг/мл стимулировал формирование АФК в клетках на 10% по отношению к контролю, но достоверная стимуляция лизосомальной активности во всем диапазоне исследуемых концентраций практически отсутствовала. Типикозид А₂ (2) увеличивал уровень АФК в макрофагах на 12% в концентрации 0,01 мкг/мл и лизосомальную активность на 13% в концентрации 0,1 мкг/мл. Типикозид В₁ (3) стимулировал только лизосомальную активность в клетках на 10% в концентрации 0,001 мкг/мл, но не индуцировал формирование АФК.

Типикозид С₁ (4) был самым активным среди исследованных гликозидов. Это соединение стимулировало лизосомальную активность и формирование АФК во всем диапазоне исследуемых концентрациях (0,001–0,10 мкг/мл). Наиболее сильное стимулирующее влияние на продукцию АФК в макрофагах (стимуляция на 62% по отношению к контролю) наблюдали при самой низкой концентрации гликозида 0,001 мкг/мл. При концентрациях 0,01 и 0,10 мкг/мл стимулирование формирования АФК составило 30 и 36% соответственно. Типикозид С₁ в концентрациях 0,001–0,10 мкг/мл также стимулировал активность лизосом на 10–11% относительно контрольного уровня.

Интересно, что среди исследуемых тупикозидов тупикозид С₁ (4) обладает минимальной цитотоксической активностью и малотоксичен, в то время как среди изученных гликозидов наиболее токсичный тупикозид С₂ (5) практически не обладает иммуностимулирующей активностью в отношении перитонеальных макрофагов мыши среди изученных гликозидов (Таблица 12).

Таблица 12. Влияние тупикозидов А₁ (1), А₂ (2), В₁ (3), С₁ (4) и С₂ (5) из голотурии *A. typica* на лизосомальную активность и формирование АФК в перитонеальных макрофагах мыши линии Balb/c *in vitro*

Гликозид	Лизосомальная активность, % от контроля			Формирование АФК, % от контроля		
	0,1 мкг/мл	0,01 мкг/мл	0,001 мкг/мл	0,1 мкг/мл	0,01 мкг/мл	0,001 мкг/мл
Ту А ₁ (1)	107,01±1,94	106,64±2,17	103,19±0,21	75,91±0,61	110,35±27,6*	75,28±2,96
Ту А ₂ (2)	113,4±4,89*	103,37±3,72	105,5±8,64	78,68±22,47	112,60±26,2*	99,42±19,19
Ту В ₁ (3)	107,32±1,36	107,66±5,76	110,82±2,62*	92,86±1,08	107,68±3,99	94,56±3,19
Ту С ₁ (4)	111,25±11,1*	110,62±9,94*	109,65±12,6*	135,55±31,8*	130,29±8,5*	161,95±32,9*
Ту С ₂ (5)	104,33±3,16	102,7±5,94	101,95±0,71	76,94±15,83	91,77±0,76	71,34±8,82

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего, *p<0,05

Кроме того, было проведено сравнительное исследование активации формирования АФК и лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши *in vitro*, а также цитотоксической активности в отношении клеток асцитной карциномы Эрлиха мышей ряда гликозидов из голотурии *E. fraudatrix*. Установлено, что ни один из исследуемых гликозидов не стимулирует образования АФК. Только три изученных гликозида, а именно, кукумариозиды I₂, В₂ и А₅, стимулировали активность лизосом на 15-16% в концентрациях 1-5 мкг/мл. Такие концентрации значительно выше активных доз кукумариозидов А₂₋₂ и фрондозидов А. Мы не наблюдали прямой зависимости между цитотоксической активностью и лизосомальной активностью, поскольку кукумариозид I₂ и кукумариозид В₂ принадлежат к малотоксичным гликозидам, в то время как кукумариозид А₅ умеренно цитотоксичен (см. раздел 3.1.2, Таблица 5).

Кукумариозиды стимулируют лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши в нанограммовых дозах *in vivo*. Мы исследовали влияние ряда индивидуальных тритерпеновых гликозидов кукумариозидов из голотурии *C. japonica* с различной степенью сульфатирования, а также двух десульфатированных производных, на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши в экспериментах *in vivo*. Установлено, что внутрибрюшинное введение кукумариозидов мышам стимулирует функции макрофагов на 4-й день после применения. Внутрибрюшинная инъекция некоторых 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. 24).

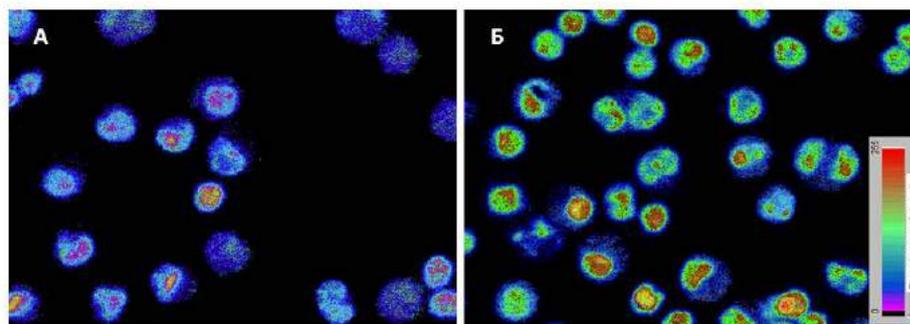


Рис. 24. Псевдоцветное изображение красно-оранжевой флуоресценции лизосом перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c, прижизненно окрашенных флуоресцентным красителем акридиновый оранжевый. А – клетки из контрольных животных; Б – клетки, выделенные на 4-й день после инъекции кукумариозида А₂-2 (0,02 мкг/мышь). Увеличение ×200

Обнаружено, что активность кукумариозидов зависит от их химической структуры. Так, кукумариозиды А₂-2, А₃ и А₄-2 были наиболее активными в индукции лизосомальной активности, в то время как их производные (десульфатированные кукумариозиды DS-А₂-2 и DS-А₄-2), а также кукумариозид А₇-1, были полностью неактивны. Способность тритерпеновых гликозидов стимулировать лизосомальную активность макрофагов можно расположить в следующем порядке: А₂-2 > А₃ > А₄-2 > А₆-2 > А₇-1 ≈ DS-А₂-2 ≈ DS-А₄-2 (рис. 25А).

Сравнительное изучение влияния наиболее эффективного моносульфатированного кукумариозида А₂-2 и наименее активного трисульфатированного кукумариозида А₇-1 на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши от вводимой внутривентриально дозы препарата показало, что на 4-й день после инъекции гликозида наблюдали существенную стимуляцию лизосомальной активности под действием кукумариозида А₂-2 в диапазоне доз 0,0002 – 2,0 мкг/мышь. Стимулирующий эффект кукумариозида А₂-2 наблюдали уже в пикограммовых дозах с максимальной эффективностью при дозе порядка 20 нг/мышь. Начиная с самой минимальной дозы эффективность препарата постепенно нарастала и достигала своего максимального значения при дозе 0,02 мкг/мышь. Затем уровень стимуляции несколько снижался, оставаясь, тем не менее, достаточно высоким (порядка 200% от контроля) при дозе 2 мкг/мышь (рис. 25Б).

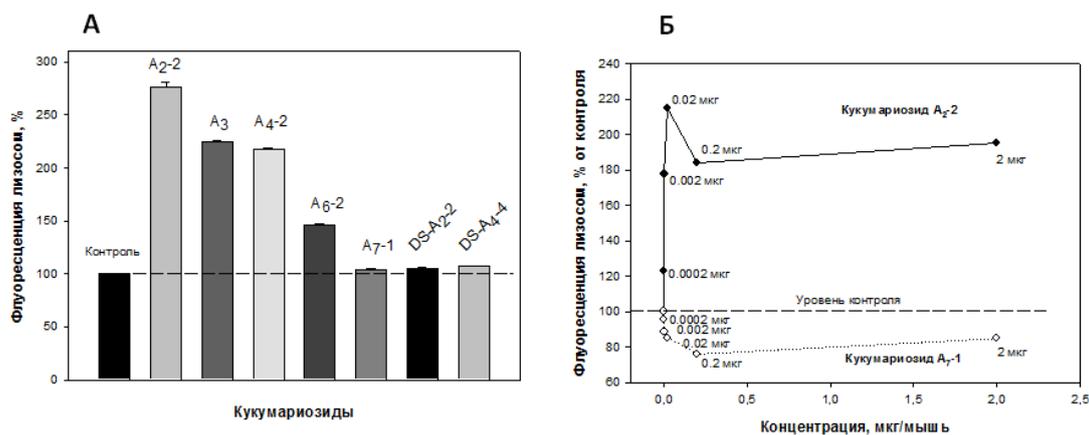


Рис. 25. А – Влияние различных кукумариозидов из голотурии *C. japonica* на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c *in vivo*. Гликозиды вводили внутривентриально в дозе 0,02 мкг/мышь. Б – Зависимость влияния кукумариозидов A₂₋₂ и A₇₋₁ из голотурии *C. japonica* на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c *in vivo* от дозы гликозида при внутривентриальном введении. Перитонеальные макрофаги были получены на 4-й день после инъекции гликозида.

Применение трисульфатированного кукумариозида A₇₋₁ приводило к супрессии активности макрофагов. Внутривентриальные инъекции этого соединения в диапазоне доз от 0,002 мкг до 2,0 мкг на животное вызывали уменьшение лизосомальной активности примерно на 20% по сравнению с интактными животными (рис. 25Б).

Влияние фрондозидов А на лизосомальную активность *in vivo*. Установлено, что фрондозид А в субцитотоксических концентрациях оказывает достоверное иммуномодулирующее действие на перитонеальные макрофаги мыши и более чем в два раза стимулирует в них лизосомальную активность. Было показано, что внутривентриальное введение раствора фрондозидов А приводит к стимулированию функций макрофагов на 4-й день после применения препарата. С помощью флуоресцентного красителя акридинового оранжевого и спектрофлуориметрии было обнаружено, что инъекция гликозида в нанограммовых дозах приводит к стимуляции лизосомальной активности в перитонеальных макрофагах мыши.

Фрондозид А в низком субцитотоксическом диапазоне доз 0,002–2,0 мкг на мышь вызывал значительный дозозависимый иммуностимулирующий эффект. Максимальный стимулирующий эффект, характеризующийся более чем двукратным увеличением лизосомальной активности, был обнаружен при дозе 0,2 мкг на мышь. С другой стороны, большие дозы в 20 и 200 мкг на мышь (1,0 мг/кг и 10,0 мг/кг соответственно) вызывали противоположный эффект: лизосомальная активность, по сравнению с контрольным уровнем, была значительно подавлена (рис. 26А). Таким образом, фрондозид А

индуцирует иммуностимулирующий эффект в субтоксических дозах *in vivo* при внутрибрюшинном способе введения и вызывает ингибирующее действие на лизосомальную активность макрофонов при более высоких концентрациях.

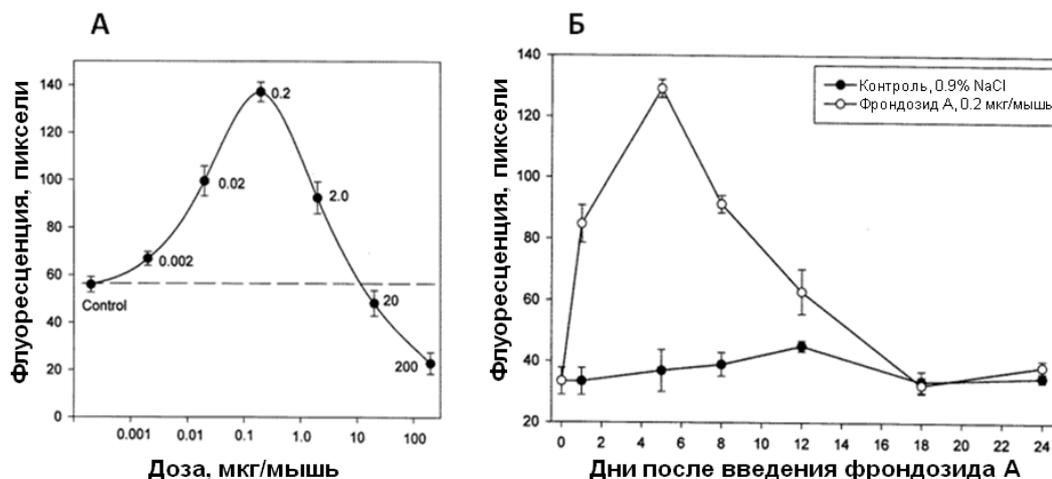


Рис. 26. Зависимость влияния фрондозид А из голотурии *C. frondosa* на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c *in vivo* от дозы гликозида при внутрибрюшинном введении (**А**, перитонеальные макрофаги были получены на 4-й день после инъекции гликозида) и от времени после однократного внутрибрюшинного введения гликозида (**Б**, макрофаги были выделены в определенные дни после введения гликозида, указанные на графике)

Иммуномодулирующий эффект фрондозид А был быстрым, и значительная стимуляция лизосомальной активности перитонеальных макрофагов была обнаружена уже на 1-й день после инъекции. Максимальный стимулирующий эффект наблюдали на 4–5-й день после инъекции гликозидов. Впоследствии наблюдали постепенное снижение лизосомальной активности, которая достигала начального уровня к 12-18-му дню эксперимента и оставалась неизменной вплоть до 24-го дня (рис. 26Б).

Влияние охотозидов на лизосомальную активность и уровень формирования АФК в перитонеальных макрофагах мыши *in vivo*. Было изучено влияние шести тритерпеновых гликозидов, выделенных их голотурии *C. okhotensis*: фрондозид А₁, охотозид В₁, охотозид А₁-1, фрондозид А, охотозид А₂-1 и кукумариозид А₂-5, на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов мыши и формирование АФК в макрофагах, выделенных из животных на четвертый день после внутрибрюшинного однократного введения гликозидов.

Почти все исследованные гликозиды вызывали статистически значимое увеличение лизосомальной активности перитонеальных макрофагов на четвертый день после однократной инъекции в дозе 0,2 мкг/мышь. Наиболее эффективными гликозидами были фрондозид А₁, фрондозид А и кукумариозид А₂-5. Эти соединения стимулировали лизосомальную активность приблизительно в 1,5–2,5 раза больше, по сравнению с

контрольными клетками (рис. 27А). Наиболее активным был фрондозид А. Активность кукумариозида А₂-5 была аналогична активности фрондозид А₁.

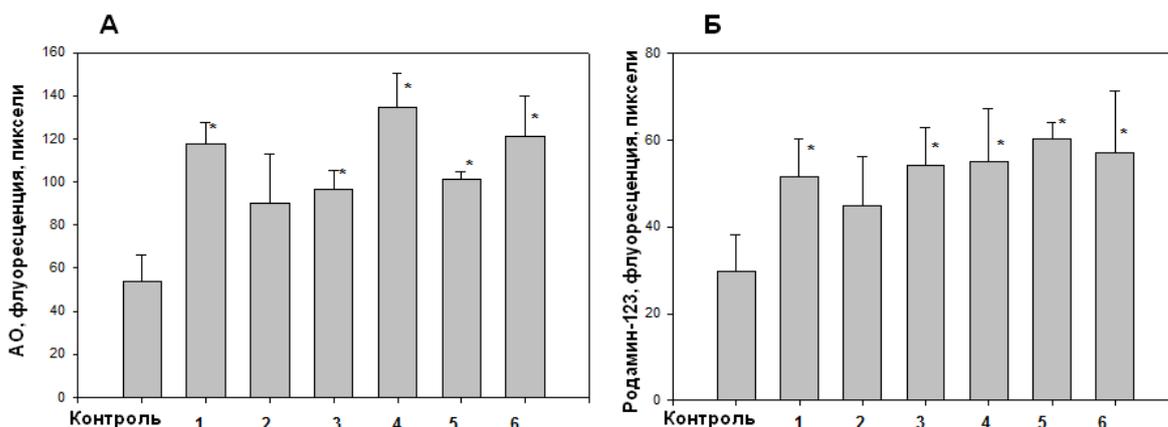


Рис. 27. Влияние тритерпеновых гликозидов из голотурии *C. okhotensis* - фрондозид А₁ (1), охотозид В₁ (2), охотозид А₁-1 (3), фрондозид А (4), охотозид А₂-1 (5) и кукумариозида А₂-5 (6) - на лизосомальную активность (А) и на продукцию АФК (Б) в перитонеальных макрофагах мыши линии Balb/c *in vivo*. Макрофаги получали на 4 день после однократного внутрибрюшинного введения 0,5 мл раствора гликозидов в дозе 0,2 мкг/мышь. Лизосомы окрашивали акридиновым оранжевым (АО), АФК измеряли с помощью дигидрородамина-123. Анализировали с помощью системы анализа флуоресцентного изображения клеток. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n=100); * – p < 0.05

Было обнаружено, что действие практически всех исследованных гликозидов приводит к статистически значимому увеличению АФК в перитонеальных макрофагах, выделенных из мышей на четвертый день после однократной внутрибрюшинной инъекции раствора гликозида в дозе 0,2 мкг/мышь (рис. 27Б). Все гликозиды схожим образом активировали продукцию активных форм кислорода в клетках в 1,3–1,8 раз сильнее в сравнении с контрольными клетками. Охотозид В₁ был наименее активен.

Известно, что лизосомная активность является одним из маркеров физиологического и биохимического статуса макрофагов и индикатором их активности. Увеличенное число этих внутриклеточных органелл, а также увеличение их размера и повышение кислотности лизосом указывают на активацию некоторых клеточных функций и лизосомальных ферментов и готовности клеток к фагоцитозу и перевариванию поглощаемых патогенов (Allison et al., 1969; Millot, 1997; Zoccarato et al., 1999).

Фагоцитоз является важнейшим механизмом защиты высших позвоночных от инфекции (Uff et al., 1993). Способность генерировать АФК (так называемый «окислительный взрыв») имеет существенное значение для макрофагов в процессе уничтожения инфекционных микроорганизмов (так называемый киллинг). Превращение нефлуоресцирующего дигидрородамина-123 во флуоресцирующий родамин-123 в клетках, зарегистрированное в данном исследовании, отражает выработку H₂O₂, O₂, и

пероксинитрита в макрофагах мыши, что связано с продукцией оксида азота и образованием НАДФ-оксидаза-зависимого супероксида. Эти формы АФК являются очень токсичными и необходимы для киллинга, окисления и дезинтегрирования поглощенных микроорганизмов (Emmendorffer et al., 1990; Childs et al., 2002).

Кукумариозид А₂₋₂ и фрондозид А в низких концентрациях стимулируют лизосомальную активность макрофагов и образование АФК, а также уменьшают соответствующую активность при высоких концентрациях, вероятно, из-за своей цитотоксической активности. Сопоставление данных по влиянию этих двух гликозидов на лизосомную активность и процесс формирования АФК в макрофагах мышей отражает выраженное сходство этих дозозависимых эффектов.

Интересно отметить, что кукумариозид А₂₋₂ при исследованиях *in vivo* максимально стимулирует лизосомную активность при дозе в 0,02 мкг на мышь, в то время как максимальная эффективная доза фрондозид А составляет 0,2 мкг на мышь. Этот гликозид также является моносulfатированным пентазидом, но его углеводная цепь содержит ксилозу, а не остаток глюкозы в качестве третьего моносахаридного остатка. Он также имеет кето-группу в С-16 положении агликона вместо ацетокси-группы, как у фрондозид А. Боковая цепь агликона у кукумариозид А₂₋₂ имеет 25(26)-двойную связь, в то время как агликон у фрондозид А характеризуется насыщенной боковой цепочкой. Таким образом, незначительные различия в структуре гликозида могут серьезно повлиять на уровень иммуномодулирующих эффектов, а поиск новых гликозидов голотурий, обладающих иммуномодулирующими свойствами, должен быть продолжен.

Суммируя полученные нами данные, можно заключить, что кукумариозид А₂₋₂ и фрондозид А реализуют свое иммуностимулирующее действие в субтоксических дозах, которые практически на два порядка меньше, чем их токсические дозы. Таким образом, терапевтический индекс для иммуномодулирующей активности составляет около 100, а токсичность гликозидов практически не влияет на их иммуномодулирующее действие и не является препятствием для применения кукумариозид А₂₋₂ и фрондозид А в качестве иммуностимулирующих средств.

Как было обнаружено ранее, исследованные типикозиды из голотурии *A. Turica*, **1–5**, за исключением типикозида С₁ (**4**), обладают достаточно выраженными гемолитическими свойствами со значениями ЕС₅₀ в диапазоне 0,18–0,29 мкг/мл, в то время как гликозид **4** характеризуется примерно в 20 раз более низкой гемолитической активностью (ЕС₅₀ = 6,25 мкг/мл) (Silchenko et al., 2013 a). Помимо этого, типикозиды **1–5**, за исключением типикозида С₁ (**4**), обладают достаточно высокой цитотоксической активностью в отношении спленоцитов мыши со значениями ЕС₅₀ в пределах 1,2–3,0

мкг/мл. Однако тупикозид С₁ (4) был в 16 раз менее активен. Гликозиды 1–5, за исключением (4), также демонстрировали сильное цитотоксическое действие по отношению к клеткам асцитной карциномы Эрлиха мышей с EC₅₀ 1,7–4,5 мкг/мл, за исключением тупикозида С₁ (4), цитотоксическая активность которого была значительно ниже (EC₅₀=72,0 мкг/мл). Интересно, что слабо токсичный тупикозид С₁ (4) отличается от тупикозида С₂ (5), с выраженными цитотоксическими и гемолитическими свойствами, только присутствием ОН-группы вместо ОАс-группы при С-22 (Silchenko et al., 2013 a). В то же время именно слабotoксичный тупикозид С₁ (4) обладает наиболее выраженной иммуномодулирующей активностью среди изученного ряда гликозидов из голотурии *A. typical*.

В связи с этим можно заключить, что иммуностимулирующая активность (стимуляция лизосомальной активности и формирование АФК в макрофагах) тупикозидов также зависит не только от углеводной цепи, но и от тонких деталей в структуре агликона и не связана с цитотоксической активностью. Например, наиболее эффективные стимуляторы лизосомной активности и формирования АФК в перитонеальных макрофагах мыши, кукумариозид А₂-2 и фрондозид А, являются довольно эффективными цитотоксинами. В то же время тупикозид С₁ (4) является первым среди гликозидов голотурий примером эффективного стимулятора клеточного иммунитета, обладающего слабо выраженной цитотоксичностью.

Иммуномодулирующая активность гликозидов из голотурии *E. fraudatrix* также существенно зависит как от структуры агликона, так и от структуры углеводной цепи. Эта зависимость носит сложный характер и также не коррелирует непосредственно с цитотоксической активностью данных соединений. Оказалось, что лизосомная активность этих соединений существенно зависит от структуры агликона, так как кукумариозид В₂, содержащий 22E,24-диеновую систему, активен, а его изомер кукумариозид В₁, имеющий 22Z,24-диеновую систему, абсолютно неактивен. Кукумариозид А₅, содержащий 22Z,24-диеновую систему, активен, но его изомер кукумариозид А₆, имеющий 23E,25-диеновую систему, не активен. Тем не менее кукумариозид В₁, имеющий точно такой же агликон, как и другие родственные соединения, не является активным.

Кроме того, различие в структуре углеводных цепей может даже изменить влияние структуры агликона на активность гликозида. Так, кукумариозид I₂, кукумариозид Н (разветвленные пентаозиды) и кукумариозид В₂ (триозид) из голотурии *E. fraudatrix* имеют один и тот же агликон с 22E, 24-диеновой системой (Silchenko et al., 2013 b). Тем не менее, кукумариозиды I₂ и В₂ активны, в то время как кукумариозид Н не проявляет

активности. Кукумариозид I₂ сходен по структуре с кукумариозидом H, но имеет только одну дополнительную сульфатную группу при С-6 у третьего моносахарида (глюкозы).

Нами было установлено, что все шесть изученных моносulfатированных гликозидов из голотурии *C. okhotensis* (фрондозид A₁, охотозид B₁, охотозид A₁₋₁, фрондозид A, охотозид A₂₋₁ и кукумариозид A₂₋₅) показали иммуностимулирующее действие, выражающееся в увеличении лизосомальной активности макрофагов и формировании в них АФК. Иммуномодулирующая активность изученных гликозидов менялась в зависимости от их химической структуры, но не очень существенно. Гликозиды фрондозид A и охотозид A₂₋₁, имеющие ксилозу в качестве пятого терминального моносахарида, были несколько более активны, чем их соответствующие тетрасахаридные аналоги, фрондозид A₁ и охотозид B₁. Наиболее активным среди изученных соединений был фрондозид A.

Таким образом, даже незначительные различия в структуре углеводной цепи и агликона могут существенно изменить иммуномодулирующую активность гликозидов.

3.2.3. Влияние тритерпеновых гликозидов на формирование NO и активность iNO синтазы в макрофагах мыши *in vitro*

Проведено качественное и количественное определение синтезируемого в макрофагальных клетках NO методами флуоресцентных молекулярных зондов, конфокальной микроскопии и спектрофлуориметрии. Было установлено, что инкубирование макрофагальных клеток линии RAW 264.7 с кукумариозидом A₂₋₂ в наномолярных концентрациях приводит к существенному возрастанию уровня NO в цитоплазме клеток. Подобную картину наблюдали и при инкубировании клеток с ЛПС в концентрации 0,5 мкг/мл, используемого в качестве препарата сравнения. Количественная оценка уровня генерирования NO в макрофагах при их инкубировании с ЛПС или кукумариозидом A₂₋₂ была проведена методом спектрофлуориметрии с использованием NO-чувствительного флуоресцентного зонда FA-OMe. Было установлено, что инкубирование макрофагальных клеток линии RAW 264.7 с ЛПС или с гликозидом в течение 2 час приводит к заметному увеличению уровня NO. Наблюдали обратнопропорциональную концентрационную зависимость действия кукумариозида A₂₋₂ 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. 28).

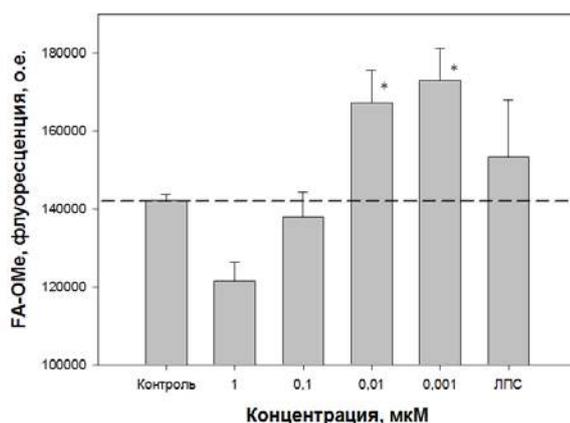


Рис. 28. Влияние кукумариозида A_2-2 и ЛПС на содержание NO в клетках культуры макрофагов линии RAW 264.7. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n=3$). Время инкубирования с клетками 2 ч. Концентрация ЛПС 0,5 мкг/мл. Регистрация NO с помощью флуоресцентного зонда FA-OMe. * $p < 0,05$

Методом ПЦР в реальном времени было оценено влияние кукумариозида A_2-2 на экспрессию ряда генов клеток мыши, принимающих участие в иммунном ответе на аппликацию гликозида. Были получены данные об участии индуцибельной NO-синтазы (iNOs) в иммунном ответе перитонеальных макрофагов мыши на экспозицию с кукумариозидом A_2-2 . С этой целью культуру мышинных перитонеальных макрофагов инкубировали в присутствии кукумариозида A_2-2 (10 нМ) или ЛПС в качестве положительного контроля (0,5 мкг/мл) в течение различных периодов времени. Затем проводили анализ экспрессии iNOs методом ПЦР в реальном времени. На рис. 27А показаны кинетические кривые увеличения флуоресценции по порядку экспонирования клеток с препаратами: 0 мин, 15 мин, 30 мин, 1 час, 4 часа.

Установлено, что кукумариозид A_2-2 в иммуностимулирующей концентрации 10 нМ вызывает достоверную активацию экспрессии гена iNOs в клетках. Наблюдали довольно чёткую практически линейную зависимость увеличения количества кДНК (уровня флуоресцентного сигнала) от времени экспозиции клеток с гликозидом. Максимальный эффект увеличения экспрессии гена индуцибельной NO синтазы отмечен через 4 часа после начала инкубирования макрофагов с кукумариозидом A_2-2 (рис. 29Б). Практически такие же значения экспрессии гена iNOs получены в случае культивирования клеток с ЛПС.

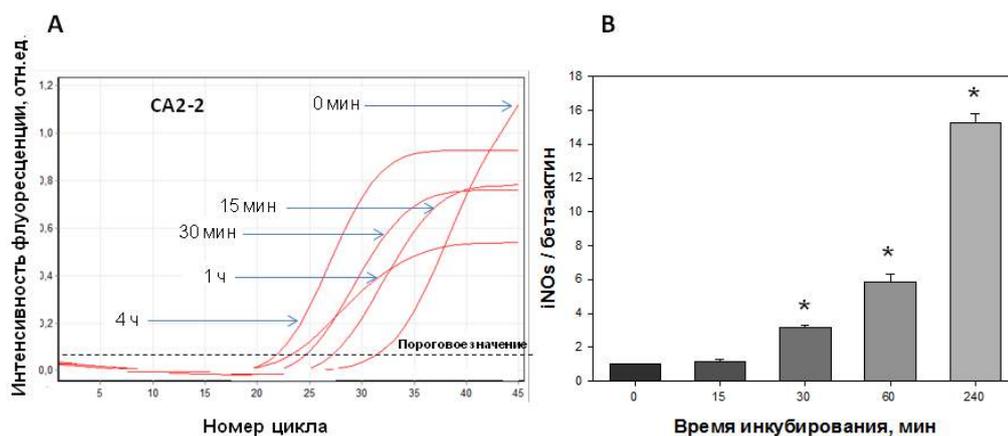


Рис. 29. Влияние кукумариозида А₂-2 (СА₂-2) на уровень экспрессии гена iNOs в культуре перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c. Показаны кинетические кривые накопления флуоресцентного сигнала (А) и уровень экспрессии гена iNOs, нормализованный относительно уровня экспрессии гена бета-актина (Б) в зависимости от времени экспозиции клеток с препаратом. Концентрация СА₂-2 10 нМ. Время инкубирования клеток с веществом: 0 мин (контроль), 15 мин, 30 мин, 1 час и 4 час. *p<0,05 (n=3). Регистрация с помощью системы ПЦР-РВ RotorGene Q 5plex HRM (QIAGEN, Германия)

В настоящее время хорошо известно, что биосинтез оксида азота в клетках млекопитающих может проходить двумя путями (Реутов и др., 1997; Сомова, Плехова, 2006):

- путем образования NO в присутствии кислорода из L-аргинина при участии группы ферментов нитроксидсинтаз (нитроксидсинтазный путь); и
- посредством образования NO в результате восстановления ионов нитратов и нитритов за счет активации нитритредуктазных систем, связанных с гемсодержащими белками, в условиях дефицита кислорода (нитритредуктазный путь).

К группе нитроксидсинтаз (или NO-синтаз), ответственных за биосинтез оксида азота, относятся три изофермента, которые локализованы в разных тканях и клетках и кодируются разными генами. Это две конститутивные NO-синтазы (нейрональная nNOS и эндотелиальная eNOS) и одна индуцибельная NO-синтаза (iNOS). Установлено, что iNOS локализована в основном в макрофагах, при этом синтез NO происходит только в результате активации этих клеток (Zamora et al., 2000). В настоящее время оксид азота рассматривают как фактор, участвующий в антимикробной защите организма хозяина и вовлеченный в механизмы неспецифического иммунитета. Образование оксида азота макрофагами может стимулироваться бактериальными липосахаридами, вирусами и провоспалительными цитокинами, такими как интерферон-γ, фактор некроза опухолей (ФНО), интерлейкин-1 или их комбинация (Маеда, Акаике, 1998). В то же время существует ряд цитокинов (например, интерлейкины ИЛ-4, ИЛ-10) и глюкокортикоидов,

оказывающих супрессирующий эффект на экспрессию iNOS и биосинтез NO в макрофагах.

Нами установлено, что иммуномодулирующий эффект кукумариозида A₂-2 при прямом взаимодействии его с клетками *in vitro* сопровождается значительным усилением экспрессии гена индуцибельной NO-синтазы. Это в свою очередь приводит к дозозависимому увеличению уровня NO в цитоплазме культуры макрофагов. Усиление синтеза NO в фагоцитах способствует более успешному обезвреживанию возбудителей. Оксид азота вызывает гибель или останавливает размножение многих типов патогенных микроорганизмов, в том числе вирусов, бактерий, грибов и простейших, или останавливает их размножение (Fang, 1997; Nathan, Shiloh, 2000; Проскуряков и др., 2000). В основе антимикробного действия лежит способность реактивных промежуточных продуктов оксида азота вызывать нитрозилирование и дезаминирование белков, окислительное повреждение и нарушение системы репарации ДНК (Beckmann et al., 1994; 1996).

Таким образом, взаимодействие кукумариозида A₂-2 с макрофагами может приводить к усилению продукции NO и усилению противомикробных свойств этих клеток.

3.3. Иммуномодулирующая активность препарата кумазид

3.3.1. Создание препарата кумазид

К моменту начала настоящих исследований в ТИБОХ ДВО РАН уже была разработана серия препаратов из кукумарии японской, использующихся в ветеринарии в качестве иммуномодулирующего и биостимулирующего средства для профилактики заболеваний сельско-хозяйственных животных и пушных зверей, а также для снижения падежа молодняка. Было известно средство для профилактики и лечения алеутской болезни норок (патент РФ №2036654, А 61 К 35/56, 1995). Описано применение как суммарного препарата тритерпеновых гликозидов (КМ), полученного способом, описанным в авторском свидетельстве №1166371, так и применение индивидуального гликозида – кукумариозида (КМ-2). Кроме того, известен препарат из кукумарии японской – кукумариозид (КД), который используют в ветеринарии в качестве иммуномодулирующего и биостимулирующего средства для профилактики заболеваний животных и снижения падежа молодняка (ТУ 08064-19-04-95; Наставление по применению кукумариозида (КД) в ветеринарии N 10.07.184-95 от 26.01.1995, Регистрационное удостоверение N P004-2.0105; номер государственной регистрации препарата: ПВР 2.01.0001-95). КД представляет собой суммарную фракцию

тритерпеновых гликозидов. Препарат получали из отвара голотурии *C. japonica* способом, описанным в авторском свидетельстве №1166371. В дальнейшем был разработан усовершенствованный способ получения суммы тритерпеновых гликозидов из выварочных вод этого животного (Стоник и др., 1998).

Исследования гликозидов дальневосточной голотурии *C. japonica*, проводимые в ТИБОХ ДВО РАН, показали, что кукумария японская содержит сложную смесь тритерпеновых гликозидов голостанового ряда (0,2–0,3 % от веса сухого остатка животного), дающего на хроматограмме (ТСХ) семь основных пятен. Каждое из пятен представляет собой подфракцию родственных гликозидов, имеющих одинаковые углеводные цепи, но различающихся строением агликонов. Они объединены в группы и получили обозначения А₀ (~3% от веса суммарной гликозидной фракции), А₁ (5%), А₂ (17%), А₃ (7%), А₄ (13%), А₆ (14%) и А₇ (26%). Гликозиды, входящие в А₀, А₁, А₂ и А₄ группы, относятся к моносультатированным гликозидам, оликозиды А₃ и А₆ групп – к дисультатированным гликозидам, а А₇ группы – к трисультатированным гликозидам (Авилов и др., 1990; Дроздова и др. 1993; Drozdova et. al., 1997; Stonik et. al., 1999).

В ходе исследовательской работы нами было обнаружено, что не все гликозиды кукумарии японской одинаково стимулируют иммунную систему. Некоторые из них, в частности ди- и трисультатированные компоненты гликозидной фракции не активны или даже обладают иммуносупрессивными свойствами (см раздел 3.2.2). С этим может быть связана неоднозначность действия кукумариозидных препаратов, полученных разными способами и из разных сборов биологического сырья, которая иногда проявляется в диаметрально противоположных иммунотропных эффектах. Кроме того, медицинское применение кукумариозидных препаратов тормозится их относительно высокой токсичностью.

В результате проводимых исследований в лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН под руководством академика РАН В.А Стоника было создано новое иммуномодулирующее лекарственное средство, названное кумазид. Средство представляет собой комплекс кукумариозидов со стеринами (холестерином или ситостерином) при молярном соотношении кукумариозиды:стерин 1:2, полученный при добавлении к экстракту кукумарии японской *C. japonica*, или к экстракту выварочных вод – отходов при переработке кукумарии японской, или к раствору суммы кукумариозидов раствора стерина. Способ получения кумазида был запатентован в 2004 году (Стоник и др, 2004). Анализ кумазида с помощью тонкослойной хроматографии и ЯМР спектров показал, что в его состав входят, в основном, моносультатированные кукумариозиды А₂ и А₄ групп. В кукумариозид-стериновом комплексе мало активные и обладающие

иммуносупрессорным действием ди- и трисульфатированные кукумариозиды являются примесями, содержание которых не превышает 5–10%. Основным действующим началом препарата кумазид является моносulfатированные тритерпеновые гликозиды, главным образом кукумариозид А₂-2.

Для проведения биоиспытаний были получены озвученные на ультразвуковом диспергаторе в течение различного времени водные суспензии комплексов моносulfатированных гликозидов с холестерином. Было показано, что размеры частичек таких комплексов уменьшаются с увеличением времени озвучивания. Время для озвучивания должно быть не менее 10 мин, по истечении которого получается практически однородная суспензия частиц комплекса. Размер частиц в суспензии колебался в пределах 10-20 мкм (рис. 30).

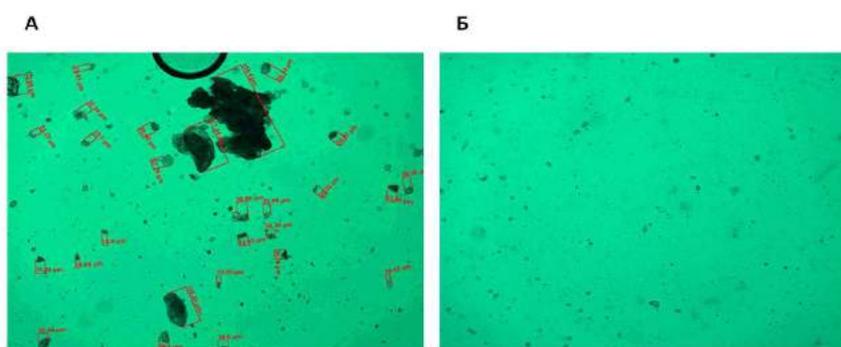


Рис 30. Микрофотографии частиц комплекса моносulfатированных тритерпеновых гликозидов голотурии *C. japonica* и холестерина (водная суспензия). Озвучивание: 3 мин (А) и 10 мин (Б)

3.3.2. Изучение гемолитической и цитотоксической (эмбриотоксической) активностей кумазида

Известно, что токсичность гликозидных препаратов из голотурий определяется, в основном, их гемолитическими (мембранолитическими) свойствами, а именно, чем выше их гемолитическая активность, тем большей токсичностью характеризуются эти препараты (Kalinin et. al., 1992).

Наши исследования показали, что кумазид отличается значительно меньшей гемолитической и цитотоксической (эмбриотоксической) активностями, чем препарат КД, представляющий сумму тех же кукумариозидов, что и кумазид, но без холестерина. Как следует из рис. 29А, кумазид показывает приблизительно в 20 раз меньшую гемолитическую активность, чем препарат КД (EC₅₀ для кумазида составляет 50 мкг/мл и для кукумариозида А₂-2 около 2,5 мкг/мл). В то же время степень измельчения комплекса практически не сказывалась на гемолитической активности кумазида. Так, комплекс,

измельченный путем озвучивания в течение 10 минут, оказывал практически такую же низкую гемолитическую активность, как и не измельченный кумазид (рис. 31А).

Независимо от используемого при образовании комплексов стерина наблюдали приблизительно одинаковое уменьшение цитотоксических свойств. Так, для комплекса моносульфатированных кукумариозидов (КД) с ситостерином наблюдали существенное уменьшение эмбриотоксичности в сравнении с самим перпаратом КД ($ЭД_{50}$ для препарата КД равна 1,5 мкг/мл, а для кумазида 6,0 мкг/мл) (рис. 31Б).

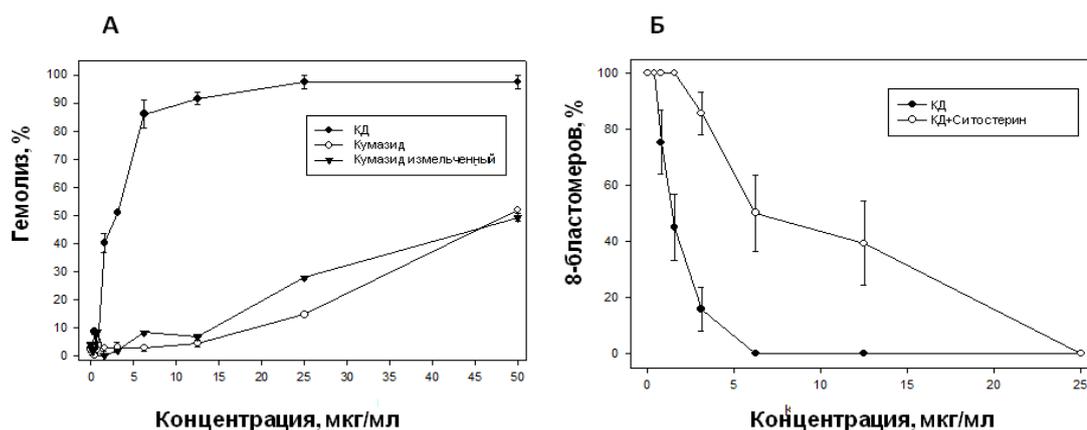


Рис. 31. Сравнительная гемолитическая активность препарата кумазид в виде водной суспензии и препарата КД по отношению к эритроцитам мыши (А) и эмбриотоксическая активность препарата КД и комплекса КД с ситостерином по отношению к развивающимся эмбрионам морского ежа (Б)

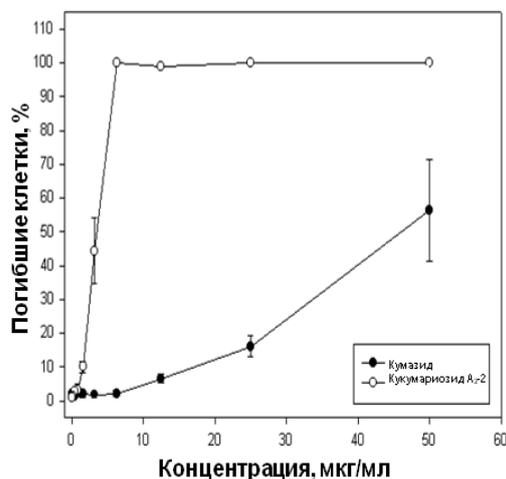


Рис. 32. Цитотоксическая активность кукумариозида А₂₋₂ и кумазида в отношении клеток асцитной карциномы Эрлиха мыши, исследованная с помощью трипанового синего

Было обнаружено, что кумазид начинал проявлять заметный цитотоксический эффект в отношении клеток теплокровных только в больших концентрациях, начиная с концентрации 25 мкг/мл. В этой концентрации количество погибших клеток составляло порядка 10%–15%, в то время как индивидуальный кукумариозид А₂₋₂ в этой

концентрации был цитотоксичен на 100%. В отличие от кукумариозида А₂-2, для которого полумаксимальная эффективная цитотоксическая концентрация в отношении клеток карциномы Эрлиха составила 3,4 мкг/мл, ЕС₅₀ для кумазида составила практически в десять раз большую величину – 46 мкг/мл (рис. 32).

3.3.3. Исследование влияния кумазида на лизосомальную активность макрофагов.

В тестах использовали лабораторных мышей линии Balb/c. В первой серии экспериментов тестируемые препараты вводили в виде суспензии однократно внутрибрюшинно по 0,5 мл в физиологическом растворе в различных концентрациях. В качестве контроля использовали физиологический раствор. Через трое суток после введения препаратов мышей забивали, выделяли перитонеальные макрофаги по стандартной методике. Использовали не менее 5 животных в группе на 1 дозу препарата.

Во второй серии экспериментов изучаемые препараты вводили перорально. Для этого использовали водные суспензии кумазида в различных концентрациях, которыми экспериментальных животных поили ежедневно. Через определенные промежутки времени (дни), в зависимости от цели эксперимента, мышей забивали и выделяли перитонеальные макрофаги по стандартной методике.

Для перорального применения на мышах использовались также таблетки, представляющие собой спрессованный мел с кумазидом, в которых содержание активной субстанции составляет 0,02 мкг/таблетка. Кормление животных таблетками проводили ежедневно. Животных отбирали в определенные дни и исследовали лизосомальную активность перитонеальных макрофагов с помощью прижизненного флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый и системы анализа изображения клеток. Иммуномодулирующие свойства препаратов оценивали по повышению лизосомальной активности перитонеальных макрофагов.

Как следует из рис. 33А и Б, кумазид в такой же степени стимулирует макрофагальную активность, как и препарат КД, причем он активен как при пероральном применении, так и при интраперитонеальной инъекции. При интраперитонеальном способе введения суспензии кумазида, предварительно озвученной в течение 10 минут, наблюдали более выраженную стимуляцию активности макрофагов в сравнении с неозвученной суспензией (рис. 33Б).

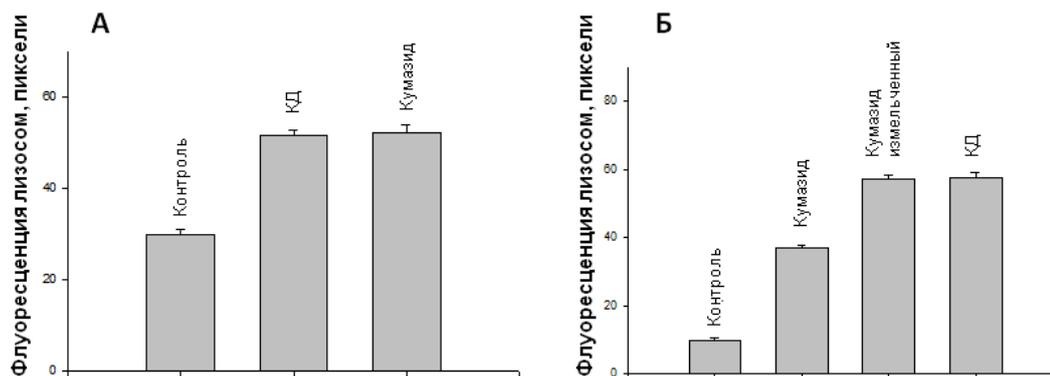


Рис. 33. Влияние кумазида и КД на величину лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши. **А** – пероральное ежедневное введение препарата в виде водной суспензии. Регистрация на 10 день эксперимента. **Б** – интраперитонеальная однократная инъекция препарата в виде водной суспензии, предварительно озвученной в течении 10 минут и без озвучивания. Регистрация на 4 день. Концентрация КД в растворе – 0,02 мкг/мл, концентрация кумазида в суспензии – 0,02 мкг/мл

В том случае, если мышам ежедневно скармливали таблетки с кумазидом, каждое животное получало приблизительно 0,02 мкг активной субстанции в день. Стимуляцию иммунной системы оценивали по активации макрофагов.

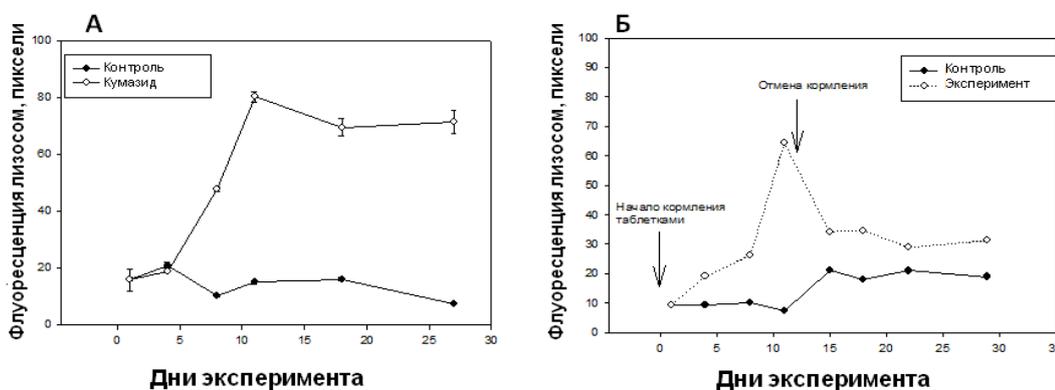


Рис. 34. Зависимость уровня лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мыши от длительности приема кумазида в таблетированной форме при ежедневном приеме препарата (**А**) и прекращении приема на 12-й день (**Б**)

Исследования показали, что лизосомальный компартмент макрофагов мышей резко активировался после пятого дня с начала кормления таблетками, 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. 34А). 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. 34Б).

Таким образом, кумазид при пероральном введении стимулировал клеточный иммунитет даже при использовании чрезвычайно низких доз (менее 0,1 мкг активной субстанции на животное).

Изучение биологической активности кумазида в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показало, что этот препарат обладает высокой иммуномодулирующей активностью (стимулируют лизосомальную активность макрофагов в 2–2,5 раза по сравнению с контрольными клетками), сравнимой с иммуномодулирующей активностью препарата КД или индивидуального кукумариозида А₂-2, но выгодно отличается от них низкой гемолитической и цитотоксической активностями. Установлено, что созданное иммуномодулирующее средство животного происхождения может найти применение в качестве стимулятора неспецифического иммунитета у животных и человека для профилактики и лечения различных заболеваний.

3.4. Изучение безопасности препарата кумазид

Оценка безопасности кумазида включает в себя три основных раздела: оценку острой токсичности, оценку кумулятивных свойств и исследование хронической токсичности.

3.4.1. Острая токсичность кумазида

Острую токсичность кумазида определяли в экспериментах на мышах и крысах при внутрибрюшинном и пероральном (внутрижелудочном) введении. 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. Введение больших доз кумазида было невозможно по технологическим причинам, из-за увеличения вязкости суспензии и невозможности введения ее больших объемов.

При однократном внутрибрюшинном введении кумазида в дозах 100–200 мг/кг мышам и крысам, у животных через 2 часа после введения наблюдалось нарушение координации движений, вялость, снижение мышечного тонуса, синюшность кожных покровов в области конечностей, ушей и носа, носовые кровотечения, частый диурез. У мышей гибель отмечалась в течение одних суток после внутрибрюшинного введения кумазида. Крысы гибли позже на 3–4-е сутки после введения кумазида.

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.

3.4.2. 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 (150 мг/кг : 198,8 мг/кг = 0,75).

Таким образом, кумазид относится к препаратам со слабовыраженными кумулятивными свойствами (при внутрибрюшинном введении).

3.4.3. Хроническая токсичность кумазида

Хроническую токсичность изучали на крысах при внутрижелудочном введении препарата в течение 3-х месяцев.

Влияние на общее состояние и массу тела крыс. Отмечено, что контрольные и подопытные животные росли и развивались нормально в течение всего тестируемого периода времени. Различия массы тела крыс, получавших кумазида во всех дозах, по сравнению с контрольными животными, в одинаковые сроки наблюдения статистически недостоверны.

Влияние на показатели периферической крови. Показано отсутствие влияния кумазида на состав периферической крови. Изменения в содержании гемоглобина, эритроцитов, составе лейкоцитарной формулы (лимфоциты, моноциты) находятся в пределах физиологической нормы (Гольдберг и Гольдберг, 1975).

Влияние на сердечнососудистую систему оценивали по частоте сердечных сокращений (ЧСС) и показателям ЭКГ, регистрируемой во II стандартном отведении на ненаркотизированных крысах (Лирман и др., 1973). Введение в течение 3 месяцев препарата в дозах 0,1–10,0 мг/кг не сопровождается дозозависимыми изменениями показателей ЭКГ и ЧСС, что свидетельствует об отсутствии выраженного влияния кумазида на сердечно-сосудистую систему крыс в условиях хронического эксперимента.

Влияние на ЦНС и поведенческие реакции крыс изучали на модели “открытого поля” (Балынина и Березовская, 1976). Через 1,5 и 3 месяца после внутрижелудочного введения кумазида (в диапазоне доз 0,1–10,0 мг/кг) не выявлено достоверных изменений температуры тела крыс, двигательной и поисковой активностей животных в тесте

«открытое поле» по сравнению с контролем. Это свидетельствует о том, что кумазид в изученном диапазоне доз не нарушает баланс метаболических процессов, функциональное состояние ЦНС и поведенческие реакции животных.

Влияние на функциональное состояние печени оценивали по активности ферментов печеночного происхождения в крови – трансаминаз и щелочной фосфатазы, а также по уровню общего билирубина и креатинина. (Блюгер, 1975; Трахтенберг и др., 1978; Колб, Камышников, 1982). Кумазид в дозах 0,1–10,0 мг/кг не вызывает дозозависимых изменений активности ферментов АлТ, Аст и ЩФ, уровня билирубина и креатинина.

Влияние на почки оценивали по следующим тестам: суточный диурез, рН мочи, присутствие сахара, содержание белка и креатинина в моче. У крыс, получавших кумазид, не выявлены изменения со стороны почек. На протяжении всего эксперимента сохранялся нормальный объем выделенной за сутки мочи, в ней отсутствовал сахар, значения рН, уровень белка и креатинина колебался в пределах физиологической нормы.

3.4.4. Патоморфологические исследования органов крыс, получавших кумазид

Патоморфологическому исследованию были подвергнуты крысы, получавшие кумазид в дозе 0,1–10,0 мг/кг, а также контрольной группы. Животные были забиты путем декапитации на следующий день после прекращения введения препаратов и через 2 недели после отмены препарата.

Макроскопическое исследование при вскрытии не выявило какой-либо патологии внутренних органов у животных. Колебания массы внутренних органов и весовых коэффициентов были, как правило, не закономерны.

Для микроскопического исследования были взяты головной мозг, мозжечок, легкое, сердце, желудок, тонкая и толстая кишка, печень, почка, надпочечник, щитовидная железа, лимфоузел, селезенка, тимус, поджелудочная железа, семенник. Кусочки органов фиксировали в 12% нейтральном формалине и заливали в парафин. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином. В результате исследований у крыс контрольной группы и у животных, получавших кумазид в дозах 0,1–10,0 мг/кг, не были выявлены патоморфологические изменения.

Таким образом, на основании исследований острой и кумулятивной токсичности можно сделать заключение, что препарат кумазид при внутрижелудочном введении по параметрам острой токсичности относится (по ГОСТ 12.007-76) к IV классу опасности – «вещества практически нетоксичные». При внутрибрюшинном способе введения кумазид относится ко II классу опасности – «вещества высоко опасные». В то же время, при внутрибрюшинном введении кумулятивные свойства кумазида выражены слабо.

В хроническом эксперименте кумазид при внутрижелудочном введении в диапазоне доз 0,1–10,0 мг/кг не оказывает токсического влияния на общее состояние, динамику массы тела, гемограмму, сердечно-сосудистую 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.

3.4.5. Оценка репродуктивной токсичности препарата кумазид

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 мкг/кг и 10 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 препарата кумазид в дозе 10 мкг/кг не повышает показателей эмбриональной гибели и не оказывает существенного влияния на постнатальное развитие крысят. Отмечено лишь незначительное снижение горизонтальной двигательной активности самок в «открытом поле» и более быстрое принятие ими правильного решения в условиях стресс-ситуации. По всем остальным показателям, характеризующим физическое развитие и поведение крысят в течение двухмесячного наблюдения, не было установлено различий между подопытными и контрольными крысятами. Кумазид в дозах 1 мкг/кг и 10 мкг/кг не влияет на способность животных к спариванию и оплодотворению. Полученные показатели находились в пределах колебаний исторического контроля. Кумазид в дозе 10 мкг/кг не повышал показателей эмбриональной гибели.

Таким образом, изучение репродуктивной токсичности кумазида не выявило противопоказаний для его практического использования.

3.4.6. Оценка мутагенной активности препарата кумазид

Исследование мутагенной активности кумазида было выполнено в рамках доклинического изучения его безопасности в соответствии с требованиями,

определенными ФК МЗ РФ к подобного рода исследованиям. В работе использовали метод учета индукции генных мутаций у микроорганизмов (тест Эймса) и метод учета хромосомных aberrаций в соматических клетках мышей.

Исследование кумазида в тесте Эймса.

Тест Эймса основан на учете мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину при действии на индикаторные штаммы сальмонеллы *S. typhimurium* химических соединений или их метаболитов. Рекомендуемые штаммы сальмонеллы позволяют выявлять мутагены разного механизма действия: штамм ТА 100 – индуцирующие замены пар оснований и разрывы ДНК, штаммы ТА 98 и ТА 97 – индуцирующие сдвиг рамки считывания генетического кода (фреймшифт-мутагены). Одновременная работа на штаммах ТА 98 и ТА 97 обеспечивает максимально полную регистрацию различных фреймшифт-мутагенов.

Количество колоний ревертантов в контроле с растворителем в вариантах СМ- и СМ+ было в пределах колебаний спонтанного уровня для данных штаммов. Ответ штаммов на стандартные мутагены был в пределах обычных уровней. Исследованный препарат кумазид во всех тестируемых дозах не повышал более чем в 1,5 раза число колоний ревертантов на чашку по сравнению с контролем на штаммах ТА 100, ТА 98 и ТА 97 в вариантах без и в присутствии системы метаболической активации. В целом полученные результаты позволяют заключить, что кумазид не проявляет мутагенных свойств в тесте Эймса.

Метод учета хромосомных повреждений в клетках костного мозга мышей.

Метод основан на визуальной регистрации (10×100 , масляная иммерсия) хромосомных повреждений в клетках костного мозга мелких лабораторных грызунов. Оценка полученных данных показала, что после суточной экспозиции кумазида в дозе 1 мкг/кг количество поврежденных метафаз в клетках костного мозга самцов составило $1,0 \pm 0,4$ %, в дозе 10 мг/кг – $2,0 \pm 0,6$ % против – $1,6 \pm 0,6$ % в контрольной серии исследования. Цитогенетический анализ, выполненный после пятидневного введения кумазида в дозе 1 мкг/кг, выявил поврежденные хромосомы в $1,6 \pm 0,6$ % клеток у самцов и в $2,0 \pm 0,6$ % клеток у самок. Попарное сопоставление зарегистрированных результатов с данными контроля не выявил между ними статистических различий.

Таким образом, кумазид в диапазоне исследованных доз не увеличивает спонтанного уровня хромосомных повреждений в клетках костного мозга самцов и самок мышей. Результаты комплексного исследования позволяют заключить, что кумазид в диапазоне исследованных доз не обладает мутагенными свойствами.

3.5. Исследование специфической иммунологической активности препарата кумазид

Вместе с токсикологическими исследованиями и изучением безопасности, доклинические исследования лекарственных средств включают в себя ряд биологических, фармакологических и других экспериментальных исследований с целью получения научными методами оценок и доказательств эффективности препарата. Исследования эффективности – это изучение специфической фармакологической активности лекарственного средства, которое позволяет установить его фармакодинамические свойства, определяющие в последующем показания к применению лекарственного препарата. В настоящей работе исследование специфической иммунологической активности препарата кумазид было проведено в соответствии с Методическими указаниями по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ (Хаитов и др., 2000).

3.5.1. Влияние кумазида на люминолзависимую и люцигенинзависимую хемилюминесценцию нейтрофилов человека

Оценка люминолзависимой и люцигенинзависимой хемилюминесценции основана на способности нейтрофилов при активации резко изменять метаболический профиль, проявляющийся в усилении потребления кислорода, активации гексозомонофосфатного шунта, мембраносвязанной NADP/H-оксидазы, других ферментов и выделение из клеток активных кислородных радикалов. Анализ хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов выявляет образование клетками активных кислородных радикалов, включая супероксидный анион, синглетный кислород, гидроксильный радикал, перекись водорода. Образуемые кислородные метаболиты обладают выраженными бактерицидными свойствами. Для усиления ХЛ применяется люминол (Sigma) и люцигенин (Sigma), обладающие свойством окисляться под влиянием кислородных метаболитов и генерировать квант света (440 nm), что существенно повышает чувствительность реакции. Люминолзависимая ХЛ в большей степени отражает продукцию H_2O_2 , люцигенинзависимая – O_2^- .

Результаты исследования люминолзависимой ХЛ нейтрофилов периферической крови человека представлены в таблицах 13, 14 и рисунке 35. В зависимости от дозы препарат оказывал неоднозначное действие. При совместной инкубации в малых дозах, 0,1 и 1 мкг/мл, кумазид незначительно подавлял спонтанную люминолзависимую ХЛ в течение всего периода регистрации и значимо на 15-й мин в дозе 0,1 мкг/мл ($p=0,027$).

Однако при использовании 10 мкг/мл наблюдали достоверное повышение ХЛ на 3, 10, 15 и 19 мин регистрации (соответственно, $p=0,032, 0,048, 0,033, 0,046$).

При предварительной инкубации нейтрофилов с препаратом в течение 30 мин с последующей стимуляцией зимозаном препарат в малых дозах практически не влиял на показатели ХЛ. Доза 10 мкг/мл увеличивала люминолзависимую ХЛ в течение всего периода регистрации. На 10, 15 и 19 мин наблюдали достоверное повышение люминолзависимой зимозаниндуцированной ХЛ (соответственно, $p=0,043, 0,014, 0,006$).

Результаты исследования люцигенинзависимой ХЛ представлены в таблицах 15, 16 и рисунке 36. В малых дозах препарат не оказывал значимого влияния на ХЛ при совместной инкубации с нейтрофилами. Однако кумазид 10 мкг/мл достоверно повышал люцигенинзависимую ХЛ в течение всего периода регистрации ($p=0,039, 0,04, 0,05, 0,049, 0,038$ на 3, 7, 10, 15 и 17 минутах соответственно).

После стимуляции зимозаном малые дозы препарата не влияли на показатели ХЛ. При дозе 10 мкг/мл была выявлена тенденция к стимуляции люцигенинзависимой зимозаниндуцированной ХЛ, но достоверное повышение было отмечено только на 19-й мин регистрации.

Таким образом, в опытах *in vitro* кумазид в дозах 0.1 и 1 мкг/мл не оказывал значимого влияния на продукцию АФК нейтрофилами. При дозе 10 мкг/мл была выявлена тенденция к стимуляции спонтанной и зимозаниндуцированной люминол- и люцигенинзависимой ХЛ, т.е. препарат кумазид обладает способностью стимулировать продукцию H_2O_2 и O_2^- нейтрофилами.

Таблица 13. Влияние препарата кумазид на люминолзависимую ХЛ нейтрофилов периферической крови человека без стимуляции зимозаном

Время регистрации ХЛ, мин	Концентрация препарата кумазид, мкг/мл			
	0	0,1	1,0	10,0
3	8,87±5,57	7,40±3,04	7,77±3,77	15,25±7,2*
7	11,55±7,68	9,17±4,04	10,03±5,39	18,65±8,84
10	12,57±4,62	11,47±4,9	12,00±3,34	23,57±11,37*
15	15,75±7,78	11,47±4,9*	14,12±6,27	28,98±15,7*
19	13,20±6,66	12,03±6,23	12,32±4,96	21,62±10,78*

Примечание: данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; * – значимые различия по сравнению с контролем (0 мкг/мл); $p<0,05$

Таблица 14. Влияние препарата кумазид на люминолзависимую зимозаниндуцированную ХЛ нейтрофилов периферической крови человека

Время регистрации ХЛ, мин	Концентрация препарата кумазид, мкг/мл			
	0	0,1	1,0	10,0
1	86,93±37,85	76,15±35,02	82,32±31,3	104,13±41,2
7	110,12±34,33	109,35±24,41	113,98±30,9	157,98±36,98
10	136,73±40,95	135,78±38,87	128,88±40,18	177,07±52,51*
15	159,97±80,22	154,30±69,44	153,52±80,57	223,57±109,99*
19	136,75±77,26	140,17±6,04	146,70±80,81	187,08±83,75*

Примечание: данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; * – значимые различия по сравнению с контролем (0 мкг/мл); p<0,05

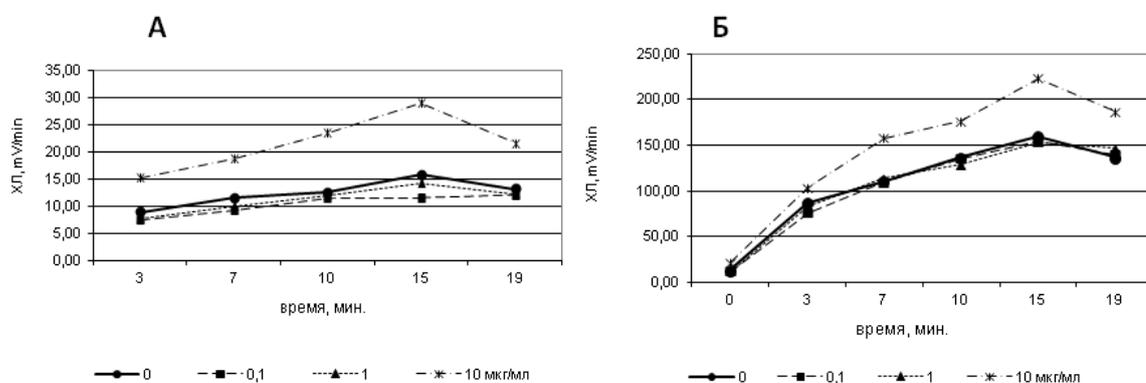


Рис. 35. Влияние препарата кумазид на спонтанную люминолзависимую ХЛ (А) и на зимозаниндуцированную люминолзависимую ХЛ (Б) нейтрофилов периферической крови человека после предварительной инкубации в течение 30 мин

Таблица 15. Влияние препарата кумазид на люцигенинзависимую ХЛ нейтрофилов периферической крови человека без стимуляции зимозаном

Время регистрации ХЛ, мин	Концентрация препарата кумазид, мкг/мл			
	0	0,1	1,0	10,0
3	0,95±0,54	1,06±0,65	1,01±0,48	2,26±1,46*
7	1,08±0,58	1,18±0,52	1,14±0,49	2,59±1,75*
10	1,25±0,67	1,34±0,7	1,24±0,5	3,27±2,47
15	1,45±0,83	1,47±0,82	1,40±0,52	3,63±2,72*
19	1,20±0,68	1,35±0,77	1,28±0,52	3,10±2,17*

Примечание: данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; * – значимые различия по сравнению с контролем (0 мкг/мл); p<0,05

Таблица 16. Влияние препарата кумазид на люцигенинзависимую ХЛ нейтрофилов периферической крови человека после стимуляции зимозаном

Время регистрации ХЛ, мин	Концентрация препарата кумазид, мкг/мл			
	0	0,1	1,0	10,0
1	20,30±6,84	17,08±3,95	17,93±5,04	25,32±10,27
7	24,33±7,14	21,85±4,05	21,77±3,63	31,73±10,49
10	24,47±7,49	21,93±5,81	21,45±5,09	32,63±13,97
15	25,53±8,84	23,08±9,00	22,43±8,44	35,55±19,74
19	20,03±8,32	21,45±8,5	20,53±8,2	31,23±17,17*

Примечание: данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; * – значимые различия по сравнению с контролем (0 мкг/мл); $p < 0,05$

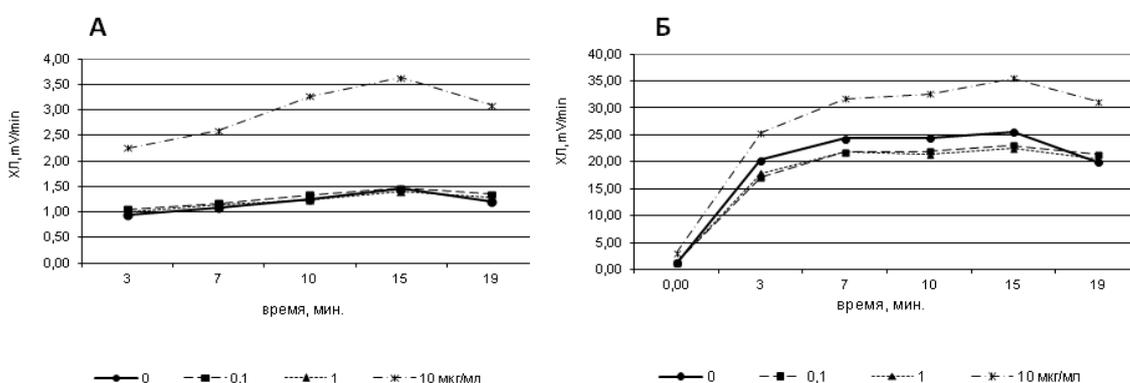


Рис. 36. Влияние препарата кумазид на спонтанную люцигенинзависимую ХЛ (А) и на зимозаниндуцированную люцигенинзависимую ХЛ (Б) нейтрофилов периферической крови человека после предварительной инкубации в течение 30 мин

3.5.2. Влияние кумазид на поглотительную активность фагоцитов периферической крови человека

Результаты исследования поглотительной способности нейтрофилов представлены в таблице 17 и рис. 37. После предварительной инкубации с различными концентрациями препарата в течение 1 часа кумазид в концентрациях 0,1 и 1,0 мкг/мл не оказывал статистически значимого влияния на фагоцитарную активность нейтрофилов, но проявлял тенденцию к стимуляции. При дозе 10,0 мкг/мл кумазид вызвал достоверное подавление поглощения *S. aureus* на 24% ($p=0,001$).

После предварительной 3-х часовой инкубации кумазид в малых дозах (0,1 и 1,0 мкг/мл) повышал фагоцитоз на 20% (достоверно для 0,1 мкг/мл, $p=0,012$). При дозе 10,0 мкг/мл инкубация с кумазидом возвращала показатели поглотительной активности нейтрофилов к исходным значениям.

Таблица 17. Показатели поглощения ФИТЦ-меченного *S. aureus* нейтрофилами периферической крови человека после предварительной инкубации с различными концентрациями препарата кумазид в течение 1 и 3-х часов. Указан % клеток, поглотивших ФИТЦ- *S. aureus*

№ донора	Инкубация 1 час				Инкубация 3 часа			
	Кумазид, мкг/мл				Кумазид, мкг/мл			
	0	0,1	1	10	0	0,1	1	10
1	43	44	47	35	47	57	62	45
2	40	47	47	32	49	59	63	43
3	46	66	62	37	50	68	70	50
4	38	45	36	30	55	67	69	56
5	46	50	39	28	33	32	35	32
6	44	44	48	33	54	63	47	44
m±sd	42,8±2,9	49,3±7,7	46,5±8,3	32,5±2,9*	48±7,3	57,7±12,1*	57,7±12,6*	45±7,3

Примечание: * – p<0,05

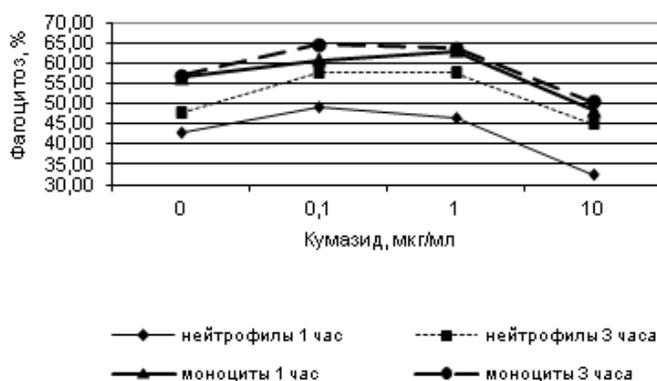


Рис. 37. Влияние препарата кумазид на поглотительную активность фагоцитов периферической крови человека

Результаты исследования поглотительной способности моноцитов представлены в таблице 18 и рис. 38. После предварительной инкубации с малыми дозами (0,1 и 1,0 мкг/мл препарата в течение 1 часа), кумазид проявил тенденцию к стимуляции, но после инкубации с большой концентрацией (10,0 мкг/мл) кумазид достоверно подавлял фагоцитоз моноцитов на 15% (p=0,015). После 3-х часовой инкубации малые дозы кумазида также повышали показатели на 12-14% (достоверно 0,1 мкг/мл – p=0,037), а доза 10,0 мкг/мл подавляла таковые на 11% (p=0,021).

Таким образом, препарат кумазид оказывает умеренное стимулирующее действие на поглотительную активность нейтрофилов и моноцитов в малых дозах (0,1 и 1,0 мкг/мл) и подавляет поглощение стафилококков *S. aureus* фагоцитами крови в дозе 10,0 мкг/мл.

Таблица 18. Показатели поглощения ФИТЦ-меченного *S. aureus* моноцитами периферической крови человека после предварительной инкубации с различными дозами препарата кумазид в течение 1 и 3-х часов. Указан % клеток, поглотивших ФИТЦ- *S. aureus*

№ донора	Инкубация 1 час				Инкубация 3 часа			
	Кумазид, мкг/мл				Кумазид, мкг/мл			
	0	0,1	1	10	0	0,1	1	10
1	55	60	68	49	61	69	69	50
2	59	62	63	50	59	69	72	51
3	60	78	80	60	60	78	80	60
4	65	67	69	56	65	67	69	56
5	51	47	47	43	33	32	35	32
6	49	51	51	32	64	73	57	54
m±sd	56,5±5,5	60,8±10,2	63±11,2	48,3±9,1*	57±10,9	64,7±15,0*	63,7±14,5	50,5±8,9*

Примечание: * – p<0,05

Таблица 19. Бактерицидность лейкоцитов периферической крови человека после предварительной инкубации с различными дозами препарата кумазид в течение 1 и 3-х часов. Указан % погибшего *S. aureus*

№ донора	Инкубация 1 час				Инкубация 3 часа			
	Кумазид, мкг/мл				Кумазид, мкг/мл			
	0	0,1	1	10	0	0,1	1	10
1	21	24	25	31	35	36	37	48
2	29	28	29	35	29	32	30	39
3	21	21	20	37	36	27	27	25
4	26	30	27	27	33	27	39	28
5	24	29	25	30	25	25	23	26
6	29	37	23	47	26	31	37	30
m±sd	25,0±3,3	28,2±5,0	24,8±2,9	34,5±6,5*	30,7±4,3	29,7±3,7	32,2±5,9	32,7±8,2

Примечание: * – p<0,05

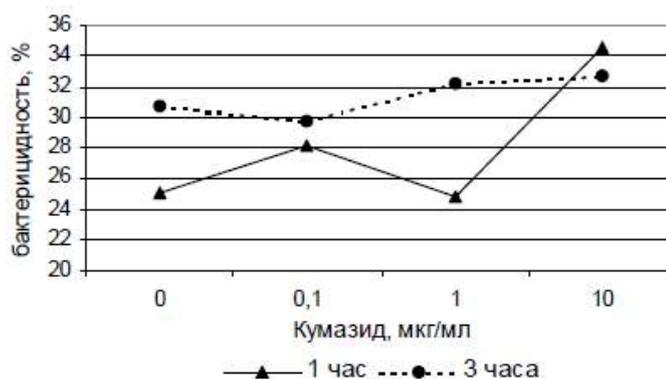


Рис. 38. Влияние препарата кумазид на бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека

3.5.3. Влияние кумазид на бактерицидную активность лейкоцитов периферической крови человека.

Результаты исследования бактерицидной активности лейкоцитов доноров представлены в таблице 19 и рис. 36. В малых дозах, независимо от продолжительности предварительной инкубации, кумазид не оказывал значимого влияния на показатели бактерицидности. Однако при дозе 10,0 мкг/мл кумазид, после предварительной инкубации 1 час, достоверно повышал бактерицидную активность до 34,5% по сравнению с контролем 25% ($p=0.016$). В отдельных экспериментах препарат увеличивал бактерицидность лейкоцитов практически в 2 раза (рис. 37).

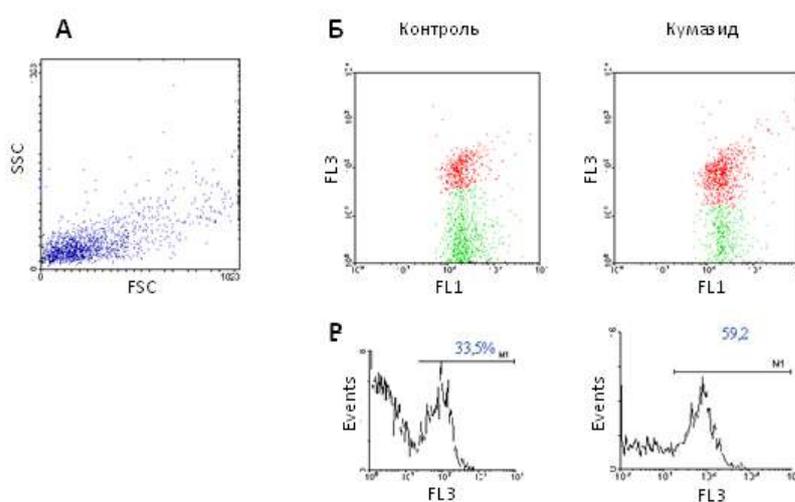


Рис. 39. Влияние препарата кумазид (10,0 мкг/мл) на бактерицидную активность фагоцитов периферической крови человека *in vitro* в отношении бактерий *S. aureus*. Время инкубирования клеток с препаратом 1 час. Показаны данные одного эксперимента. А – общая дотограмма фракции фагоцитов; Б и В – дотограммы и гистограммы фагоцитов до и после стимуляции клеток кумазидом. Показаны живые бактерии (зеленое окрашивание) и убитые бактерии (красное окрашивание)

Таким образом, в опытах *in vitro* препарат кумазид в дозах 0,1 и 1,0 мкг/мл проявляет тенденцию к подавлению люминолзависимой ХЛ, отражающей продукцию H_2O_2 , а в дозе 10,0 мкг/мл достоверно повышает как спонтанную, так и зимозаниндуцированную люминолзависимую ХЛ на 40%. В дозах 0,1 и 1,0 мкг/мл препарат не оказывает 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%. Препарат в малых дозах (0,1 и 1,0 мкг/мл) проявляет тенденцию к стимуляции поглотительной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека и вызывает 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, подавляет поглощение *S. aureus* моноцитами и нейтрофилами, но вызывает достоверное повышение бактерицидной активности на 38%.

3.5.4. Влияние кумазида на пролиферативную активность лимфоцитов человека

Результаты оценки пролиферативной активности лимфоцитов под действием кумазида представлены в таблице 20. В качестве положительного контроля был использован классический Т-митоген, фитогемаглютинин (ФГА), который вызвал 20-30-кратное увеличение пролиферативной активности лимфоцитов всех доноров (см. Таблица 20). Кумазид в исследованных концентрациях не оказал значительного влияния на пролиферативную активность клеток доноров. Препарат в концентрации 10,0 мкг/мл практически не влиял на этот показатель, в то время как в концентрациях 0,1 и 1,0 мкг/мл стимулировал пролиферативную активность лимфоцитов у 5 доноров из 7. В этих случаях повышение показателя пролиферации было в 1,2–2 раза.

Таблица 20. Влияние различных доз препарата кумазид на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови человека, имп/мин

№ донора	Кумазид, мкг/мл				ФГА, 5 мкг/мл
	0	0,1	1	10	
1	576	975	964	538	15731
2	482	569	647	541	12156
3	458	417	435	346	10558
4	357	275	652	383	6506
5	971	1582	1716	967	27383
6	1921	4166	2770	691	61174
7	3584	4255	3318	524	69513
m±sd	1192,7±1184,7	1748,4±1736,3	1500,3±1142,6	570,0±208,7	29003,0±1736,3*

Примечание: * – $p < 0,05$

Таким образом, препарат кумазид в исследованных концентрациях не оказывает значительного влияния на пролиферативную активность лимфоцитов здоровых доноров по сравнению с ФГА. При малых дозах 0,1 и 1,0 мкг/мл он повышал пролиферацию, а 10,0 мкг/мл практически не влияли на нее, проявляя тенденцию к снижению.

3.5.5. Влияние кумазида на продукцию цитокинов мононуклеарными клетками человека

Было исследовано влияние кумазида в различных концентрациях *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). Результаты представлены в таблицах 20–22 и рисунке 38. Из таблиц видно, что препарат кумазид индуцирует продукцию исследуемых цитокинов. Наиболее значимый эффект наблюдался по отношению к ФНО- α . Исследованные концентрации препарата, 0,1; 1 и 10 мкг/мл, достоверно повышали продукцию ФНО- α МНК доноров на 43, 70 и 136% соответственно (Таблица 21, рис. 40А). Даже при самой малой исследованной концентрации (0,1 мкг/мл) препарат вызывал продукцию цитокина на уровне классического индуктора ФНО- α - ЛПС.

Таблица 21. Продукция фактора некроза опухолей- α мононуклеарными клетками здоровых добровольцев под действием препарата кумазид, мкг/мл

№ донора	Кумазид, мкг/мл				ЛПС, 0,2 мкг/мл
	0	0,1	1	10	
1	103,0	84,3	107,1	171,4	154,8
2	57,4	82,2	94,7	92,6	80,2
3	76,0	82,2	86,4	142,4	103,0
4	86,4	152,7	82,2	100,9	98,8
5	61,5	94,7	96,7	208,7	90,5
6	67,7	111,3	221,1	198,3	134,1
7	65,7	134,1	192,1	310,3	123,7
m±sd	73,9±16,01	105,9±28,07*	125,8±56,42*	174,9±74,54*	112,1±26,41*

Примечание: * – $p < 0,05$

В отношении цитокина ИЛ-6 препарат кумазид также проявил стимулирующий эффект (Таблица 22, рис. 40Б). Максимальная индукция наблюдалась при использовании концентрации препарата 1,0 мкг/мл. Однако была обнаружена индивидуальная

чувствительность к кумазиду у МНК добровольцев: в 3-х случаях при концентрации 1,0 мкг/мл МНК были максимально стимулированы, в остальных – при концентрации 10,0 мкг/мл.

Таблица 22. Продукция интерлейкина-6 мононуклеарными клетками здоровых добровольцев под действием препарата кумазид, пкг/мл

№ донора	Кумазид, мкг/мл				ЛПС, 0,2 мкг/мл
	0	0,1	1	10	
1	150,8	1100,6	3294,3	2907,1	3453,5
2	175,0	2299,3	3510,9	2663,8	3406,6
3	42,5	0	0	432,1	733,6
4	0	0	0	382,9	357,8
5	0	109,6	86,9	143,5	1431,1
6	0	75,6	111,4	110,4	1262,2
7	11,4	101,5	99,9	115,6	163,7
m±sd	54,24±76,07	526,6±874,1	1014,6±1633,1	965,1±1252,2	1544,1±1364,9*

Примечание: * – p<0,05

Таблица 23. Продукция интерферона-γ мононуклеарными клетками здоровых добровольцев под действием препарата кумазид, пкг/мл

№ донора	Кумазид, мкг/мл				ФГА, 5 мкг/мл
	0	0,1	1	10	
1	0,0	0,0	0,0	27,3	2840,0
2	0,0	0,0	0,0	18,2	3431,9
3	0,0	0,0	0,0	80,0	3208,9
4	12,1	0,0	0,0	255,4	3979,3
5	0,0	0,0	0,0	40,5	3867,8
6	0,0	0,0	35,9	80,0	3812,1
7	0,0	0,0	3,9	0,0	1337,9
m±sd	1,7±4,53	0,0	5,7±13,43	71,6±86,42	3211,2±919,97*

Примечание: * – p<0,05

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 (Таблица 23, рис. 40). ИЛ-12p70 в супернатантах клеток, стимулированных кумазидом в различных концентрациях, выявлен не был (данные не представлены).

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 ИЛ12p70.

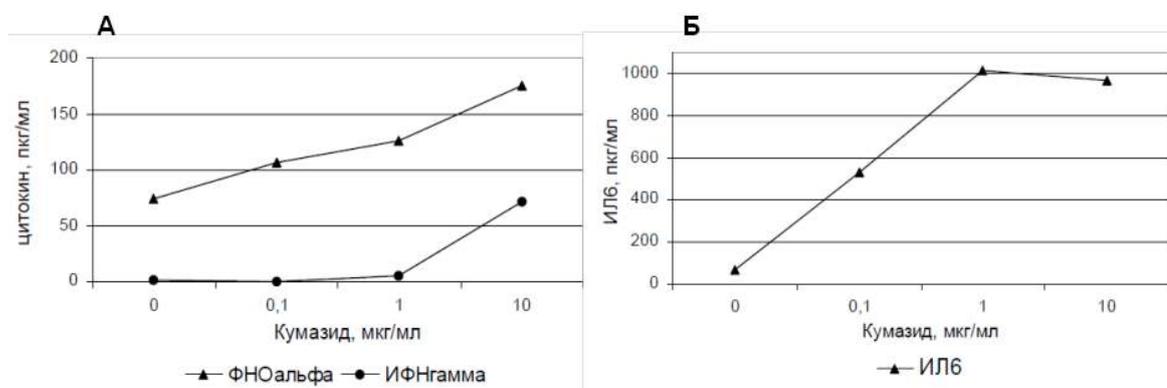


Рис. 40. Продукция фактора некроза опухолей- α , интерферона- γ (А) и интерлейкина-6 (Б) мононуклеарными клетками здоровых добровольцев

3.5.6. Влияние кумазида на экспрессию мембраноассоциированных белков лимфоцитов

Многочисленные функциональные свойства различных субпопуляций лимфоцитов – как основные (распознавание антигенных эпитопов и обмен сигналов с другими клетками иммунной системы), так и вторичные (участие в различных типах межорганных взаимодействий) – сводятся к единому базисному процессу – их активации. Именно на основе этого феномена происходят практически все иммунологические реакции. При всем многообразии запускающих механизмов процессы активации выражены как минимум в трех принципиальных исходах: пролиферация, дифференцировка, апоптоз. При любом исходе начальные стадии активационного процесса идентичны. Они выражаются в запуске каскадных механизмов, конечной целью которых является экспрессия соответствующих генов (Nussenzweig, Golstein, 2000). Продукты тех генов, которые связаны с активацией, появляются в различные сроки на поверхности лимфоцитов (Ярилин, 1999). Таким образом, процесс активации сопровождается появлением, а чаще всего увеличением количества на внешней мембране лимфоцитов определенного набора эссенциальных, т.е. обязательных для данного функционального состояния клетки, молекул. Это так называемые маркеры активации или "активационные" антигены. Определено несколько десятков молекул, выступающих в качестве маркеров активации. Активационные антигены по своей функциональной принадлежности могут относиться к самым различным группам. Например, к рецепторам цитокинов (CD25), молекулам

адгезии (ICAM-1 и ICAM-3), продуктам главного комплекса гистосовместимости (HLA I и II класса), ферментам (CD26, CD38) и т.д. Наиболее часто в качестве активационных маркеров исследуют рецепторы к ИЛ-2 (CD25), трансферрину (CD71) и HLA-DR. Рецепторы к ИЛ-2 и трансферрину появляются на мембране Т-лимфоцитов в G₁-стадии клеточного цикла, и их экспрессия необходима для перехода Т-лимфоцитов из G₁ в S-стадию и последующую пролиферацию. HLA-DR экспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов в течение S-фазы клеточного цикла или после нее. Регуляция экспрессии маркеров активации иммунокомпетентных клеток иммуномодуляторами может осуществляться на уровне экспрессии генов, трансляции внутриклеточного белка, посттрансляционной модификации и т.д. (Ярилин, 1999).

Целью данного этапа исследования явилось изучение характера модуляции экспрессии мембраноассоциированных иммунорегуляторных белков (CD3, CD4, CD8) лимфоцитов здоровых доноров, а также уровня экспрессии активационных антигенов (CD25, HLA-DR) под воздействием кумазида. Полученные нами данные показали, что кумазид при инкубации *in vitro* с лимфоцитами периферической крови (ЛПК) доноров в течение 60 минут при 37°C не влиял на уровень экспрессии CD3, CD4, CD8-антигенов, если они были в норме (Таблица 24).

Таблица 24. Экспрессия мембраноассоциированных иммунорегуляторных белков (CD3, CD4, CD8) ЛПК здоровых доноров, инкубированных с кумазидом

Группа	CD3	CD4	CD8
Контроль (итактные клетки)	58,5±7,9	38,3±5,7	26,7±4,5
Кумазид 0,1 мкг/мл	56,8±5,1	36±4,7	24,0±3,1
Кумазид 1,0 мкг/мл	58,0±3,2	38,8±5,2	27,1±5,0

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

В следующей серии исследований было определено влияние кумазида на экспрессию антигенных детерминант лимфоцитов, обработанных гидрокортизоном в дозе 10⁻⁵ М. Согласно полученным результатам, инкубация лимфоцитов с гидрокортизоном вызывала снижение количества клеток, экспрессирующих CD3, в 2,2 раза, CD4 в 1,3 раза, CD8 в 1,2 раза. Эти результаты отражают эффект иммуносупрессии, вызываемый гидрокортизоном в отношении иммунных клеток (Таблица 25).

Внесение в клеточные суспензии, прединкубированные с гидрокортизоном, кумазида приводило к частичному восстановлению 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 25).

Таблица 25. 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

Примечание: * – $p < 0,05$, значимость различий (по отношению к гидрокортизону). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $n = 8$

3.5.7. Влияние кумазида на экспрессию активационных антигенов лимфоцитов периферической крови здоровых доноров

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 (HLA-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 (рис. 41).

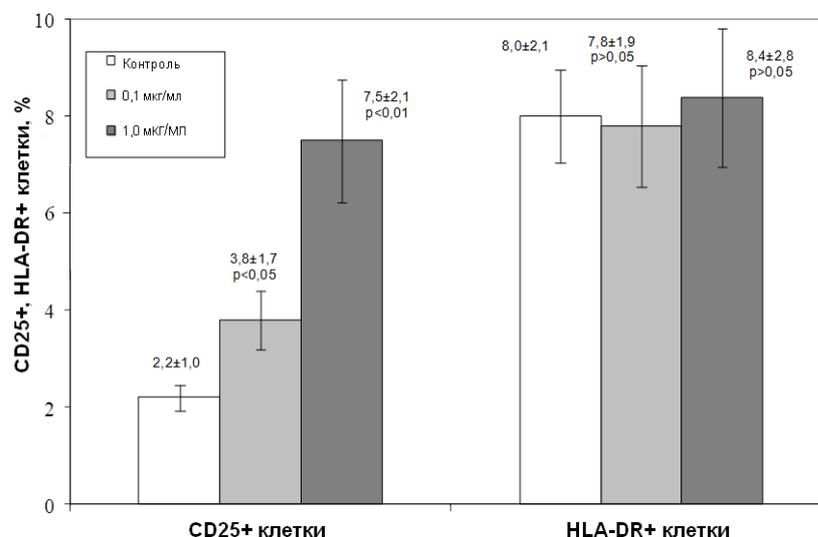


Рис. 41. Экспрессия активационных антигенов на лимфоцитах периферической крови доноров, инкубированных с кумазидом

Факт усиления экспрессии CD-антигенов, исходно сниженной, в особенности в ранние периоды после активации клеток, имеет большое значение. Клетки с повышенной экспрессией мембранноассоциированных структур, опосредующих прямые межклеточные взаимодействия в первые часы после активации, могут способствовать дополнительной активации взаимодействующих клеток, проявляя тем самым свою функциональную активность клеток-регуляторов.

3.5.8. Влияние кумазида на накопление антителообразующих клеток у мышей

В этих экспериментах кумазид вводили подкожно в дозах от 0,1 до 100,0 мкг/мышь за 3 часа до иммунизации животных эритроцитами барана (ЭБ). На четвертые сутки методом локального гемолиза в геле агарозы определяли количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенках. Одновременно подсчитывали количество ядросодержащих клеток (ЯСК). Результаты выражали в виде числа АОК на селезенку, на 1 миллион ЯСК селезенки и в виде индекса модуляции (ИМ) иммунного ответа по сравнению с контрольной группой.

Из данных, представленных в таблице 26, видно, что кумазид проявляет выраженные иммуностимулирующие свойства, а при введении его в дозах 1–100 мкг на мышь вызывает дозозависимую стимуляцию гуморального иммунного ответа. Число АОК к ЭБ 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 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 26. Влияние препарата кумазид на гуморальный иммунный ответ мышей

Доза препарата, мкг/мышь	АОК/селезенка ($m \pm sd$)		АОК/ 10^6 ЯСК селезенка ($m \pm sd$)		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

Примечание: * – $p < 0,05$. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

3.5.9. Влияние кумазида на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей

При изучении влияния кумазида на гиперчувствительность замедленного типа мышей изначально иммунизировали подкожно эритроцитами барана, а через 3 часа после этого подкожного вводили кумазид в дозах от 0,1 мкг до 100,0 мкг на мышь.

Таблица 27. Влияние препарата кумазид на реакцию гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана

Доза препарата, мкг/мышь	Вес опытной лапы, мг	Вес контрольной лапы, мг	Индекс реакции	Кол-во животных
0 (ЭБ-)	143 ± 3,30	132 ± 2,99	8,6 ± 0,83	10
0 (ЭБ+)	171 ± 2,51	134 ± 2,23	27,9 ± 1,96	10
0,1	174 ± 3,41	134 ± 2,48	30,3 ± 1,84	10
1	176 ± 3,48	135 ± 3,19	31,1 ± 1,86	10
10	177 ± 3,14	137 ± 2,42	29,8 ± 1,59	10
100	180 ± 6,39	134 ± 4,32	34,1 ± 2,58*	10

Примечание: * – $p < 0,05$. Данные представлены как средние значения ± стандартные отклонения

На пятые сутки в правую лапку мышей опытных и контрольной группы проводили разрешающую инъекцию антигена, а в другую лапку в том же объеме вводили физраствор. Через сутки регистрировали ответ путем определения массы «опытной» и «контрольной» лап. Индекс реакции выражали в процентах прироста массы лапки, в которую вводили ЭБ, по отношению к массе «контрольной» лапки. Результаты представлены в таблице 27.

Полученные данные свидетельствуют, что кумазид в исследованных дозах практически не влияет на выраженность ГЗТ к эритроцитам барана. Только в максимальной из использованных доз (100,0 мкг/мышь) отмечено небольшое, но достоверное повышение реакции.

3.5.10. Влияние кумазида на антиинфекционную резистентность мышей

Мы исследовании влияния 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.

Таблица 28. Влияние кумазида на выживаемость и среднюю продолжительность жизни неинbredных мышей с экспериментальной инфекцией, индуцированной *S. typhimurium*

Группа животных	Выживаемость %	СПЖ
Кумазид 0,01 мкг/кг	20	9,4
Кумазид 0,1 мкг/кг	0	9,3
Кумазид 1,0 мкг/кг	0	8,5
Контроль	30	9,3

Таблица 29. Влияние кумазида на выживаемость и среднюю продолжительность жизни неинbredных мышей с экспериментальной инфекцией, индуцированной *L. monocytogenes*

Группа животных	Выживаемость %	СПЖ
Кумазид 0,01 мкг/кг	20	11,6
Кумазид 0,1 мкг/кг	18	14,2
Кумазид 1 мкг/кг	22	16,8
Контроль	20	16,7

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*. Данные представлены в таблицах 28, 29 и 30.

Таблица 30. Влияние кумазид на выживаемость и среднюю продолжительность жизни неинбредных мышей с экспериментальной инфекцией, индуцированной *Y. pseudotuberculosis*

Группа животных	Выживаемость %	СПЖ
Кумазид 0,01 мкг/кг	50	13,5
Кумазид 0,1 мкг/кг	50	13,5
Кумазид 1 мкг/кг	50	13,8
Контроль	0	8,7

Результаты исследования устойчивости мышей к стафилококковой инфекции представлены в таблице 31. Из таблицы 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 или гликопина, 100 мкг/мышь).

Таблица 31. Влияние кумазид на устойчивость мышей линии СВА×ВL к стафилококковой инфекции, индуцированной *S. aureus*

Препарат	Доза, мкг/кг	Кол-во погибших мышей	% выживших	Продолжитель -ность жизни, сут.	Кратность увеличения продолжитель -ности 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

Из четырех исследованных видов микроорганизмов два вида относятся к внутриклеточным паразитам. Так, в соответствии с современными представлениями, возбудителей иерсиниоза относят к факультативно-внутриклеточным паразитам. Проникнув в организм алиментарным путем, иерсинии, проявляя адгезивные свойства в отношении эпителиоцитов (преимущественно М-клеток), колонизируют кишечник, в дальнейшем поражая его лимфоидный аппарат, и могут захватываться фагоцитами с инициацией незавершенного фагоцитоза. Это нередко сопровождается выраженными инфекционно-аллергическими реакциями и длительной персистенцией. Кроме того, хорошо известно, что опсонизированные клетки стафилококка *S. aureus* легко захватываются нейтрофилами и макрофагами. Большинство фагоцитированных стафилококков быстро погибает благодаря выбросу фагосомами свободных радикалов кислорода. Часть стафилококков выживает внутри фагоцитов за счет того, что каталаза стафилококков превращает перекись водорода в молекулярный кислород и воду, обезвреживая свободные радикалы и способствуя выживанию фагоцитов и их последующему размножению.

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).

Подводя итог по изучению специфической иммуностимулирующей активности кумазида можно заключить, что препарат в опытах *in vitro* повышает поглотительную и бактерицидную активность нейтрофилов и моноцитов крови человека. Кумазид (10,0 мкг/мл) заметно усиливал продукцию активных форм кислорода, регистрируемую по люминол- и люцигенинзависимой хемилюминисценции нейтрофилов крови человека, в том числе и при дополнительной стимуляции клеток зимозаном. Установлено, что малые дозы препарата (0,1 и 1,0 мкг/мл) не влияют на пролиферативную активность лимфоцитов. В то же время показано, что в опытах *in vitro* кумазид вызывает достоверное дозозависимое повышение продукции фактора некроза опухолей- α мононуклеарными клетками здоровых добровольцев и стимулирует синтез интерлейкина 6. На продукцию основных Th1-цитокинов интерферона γ и интерлейкина 12 препарат достоверно не влияет. Кроме того, препарат увеличивает экспрессию ряда мембраноассоциированных белков (CD3, CD4, CD8), предварительно сниженных иммунодепрессантом, и уровень экспрессии активационного антигена CD25 (рецепторы цитокинов) лимфоцитов периферической крови человека. Обнаружено, что кумазид вызывает дозозависимую

стимуляцию гуморального иммунного ответа в опытах *in vivo*, существенно увеличивая число антителообразующих клеток к эритроцитам барана. Данный эффект препарата реализуется не за счет увеличения числа ядросодержащих клеток в селезенках, а за счет увеличения количества активных антителопродуцентов. Кроме того, кумазид в исследованных дозах практически не влияет на выраженность ГЗТ к эритроцитам барана. Помимо этого обнаружено, что в опытах *in vivo* кумазид достоверно повышает устойчивость мышей к экспериментальным инфекциям, вызываемых бактериями иерсиниями и стафилококками с преимущественным внутриклеточным паразитированием в клетках иммунной системы. Анализируя представленный материал, можно констатировать, что препарат кумазид обладает выраженным иммуностимулирующим эффектом, проявляющимся в активации фагоцитарной и поглотительной способности лейкоцитов периферической крови, продукции АФК и повышении устойчивости к бактериальной инфекции. Можно предположить, что эффекты препарата *in vivo* опосредуются действием ФНО- α , продукция которого была подтверждена в опытах *in vitro*.

Таким образом, препарат кумазид является биологически активным иммуностимулирующим агентом с выраженным иммуностимулирующим эффектом как *in vitro* так и *in vivo*.

3.5.11. Исследование радиозащитного действия кумазида

В последнее время постоянно расширяется контингент лиц, сталкивающихся с радиационными воздействиями в малых дозах в виде профессионального, диагностического и терапевтического облучения, а также с риском воздействия больших доз радиации, которые возникают в некоторых аварийных ситуациях. Поэтому исключительно актуальными являются исследования, направленные на поиски эффективных противолучевых средств (радиопротекторов) как радиопрофилактического, так и радиотерапевтического (лечебного) действия. Целью настоящего исследования явилось изучение радиопротекторных свойств препарата кумазид.

Влияние профилактического введения кумазида на выживаемость и среднюю продолжительность сублетально облученных мышей. 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 (рис. 42, Таблица 31).

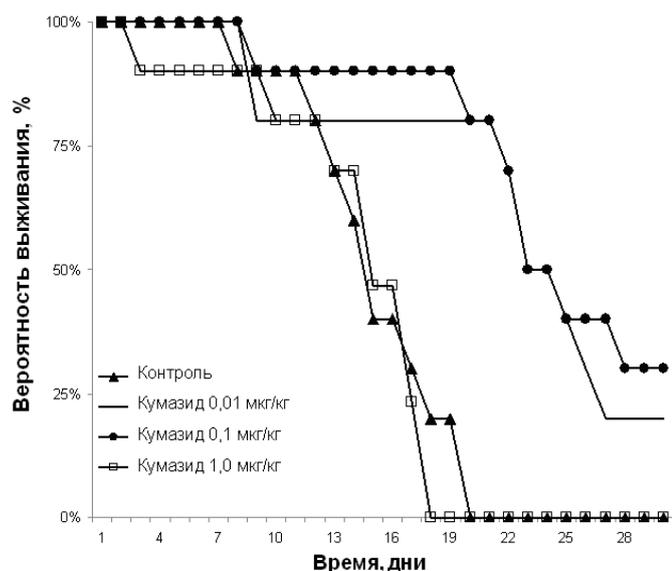


Рис. 42. Выживаемость мышей, облученных сублетальной дозой гамма-излучения 6,5 Гр. Кумазид в дозе 0,01, 0,1 или 1,0 мкг/кг вводили однократно подкожно за 4 дня до облучения

Таблица 32. Влияния профилактического введения кумазида за 4 дня до облучения (однократное подкожное введение) на выживаемость и среднюю продолжительность жизни сублетально облученных мышей в дозе 6,5 Гр

Группа животных	К-во выживших животных / общее к-во животных	Выживаемость, %	Медиана выживаемости	Лог-ранговый тест					СПЖ
				Uw	σ	z	p	p*	
Кумазид, 0,01 мкг/кг	2/10	20	23,0	5,193	1,621	3,205	0,001	0,004	16,8
Кумазид, 0,1 мкг/кг	2/10	20	23,0	5,715	1,565	3,653	0,000	0,000	16,3
Кумазид, 1,0 мкг/кг	1/10	10	15,0	1,165	1,872	0,622	0,534	0,723	13,0
Контроль	0/10	0	15,0						15,2

Примечание: Uw-число объединенных рангов, σ – стандартная ошибка, z – Z-критерий, p – значимость различий показателя для Z-критерия по сравнению с показателями в контрольной группе, p* – значимость различий показателя для z-критерия с поправкой Йейтса по сравнению с показателями в контрольной группе

При профилактическом однократном подкожном введении препарата кумазид до процедуры облучения отмечено его позитивное влияние на среднюю продолжительность жизни и выживаемость мышей, получивших сублетальную дозу облучения. Установлено, что выживаемость мышей в контрольной группе и в группах мышей, получавших кумазид в дозах 0,1 и 1,0 мкг/кг, статистически значимо различается. При этих дозах кумазида процент выживания облученных животных составил 20%, а средняя продолжительность жизни (СПЖ) увеличилась на 1,6 дня. Медиана выживаемости для мышей контрольной

группы составила 15 дней, а для мышей, получавших кумазид в дозах 0,1 и 1,0 мкг/кг, – 23 дня (рис. 42, Таблица 32).

Влияние профилактического введения кумазида на кроветворение сублетально облученных мышей. 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, сопровождающегося 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 33). На 9-й день после облучения наибольшую эффективность препарат кумазид проявлял в дозе 0,1 мкг/кг ($p < 0,05$).

Таблица 33. 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								
	4	9	17	4	9	17	4	9	17
Кумазид 0,01 мкг/кг	1,0±0,2	1,8±0,5 *	4,9±0,2	60±4,6	61±5,3	43±5,0	40±3,5	39±4,8	52±4,6
Кумазид 0,1 мкг/кг	1,3±0,3	2,5±0,6 *	5,7±0,8 *	67±5,2	80±5,6 *	54±3,7 *	32±2,8	40±3,1 *	44±3,1
Кумазид 1,0 мкг/кг	0,9±0,2	0,6±0,2	5,0±0,3	63±5,0	71±4,1	42±3,9	37±3,4	28±3,1	56±3,0
Контроль 2 (облученные мыши)	0,9±0,1	0,8±0,4	4,0±0,8	66±3,8	64±5,5	43±2,8	34±4,7	35±3,5	52±4,2
Контроль 1 (интактные мыши)	5,0±1,0			44±2,2			56±2,1		

Примечание: *- $p < 0,05$; (по отношению к контролю 2). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=8

Было установлено, что радиоактивное облучение приводит к существенному уменьшению веса иммунокомпетентных органов. Так, вес тимуса облученных мышей уменьшался практически в 6 раз, а селезенки – в 3,3 раза (Таблица 34). Также существенно было понижено и количество клеток в тимусе, селезенке и костном мозге (Таблица 35) облученных мышей по сравнению с интактными необлученными мышами.

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 (но недостоверно) увеличивал вес селезенки (Таблица 34). 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; в остальные дни отмечена тенденция к увеличению клеточности этого органа (Таблица 35).

Таблица 34. Влияния профилактического введения кумазида (четырёхкратное введение) на массу кроветворных и лимфоидных органов сублетально облученных мышей

Группа животных	Тимус (мг)			Селезенка (мг)		
	Дни после облучения					
	4	9	17	4	9	17
Кумазид, 0,01 мкг/кг	8,5±0,2**	24,6±2,3**	42,4±3,8**	47,5±3,8**	60,6±5,5	85,2±7,2
Кумазид, 0,1 мкг/кг	10,0±1,0*	22,4±3,0**	44,7±4,0**	50,3±5,6*	56,1±5,0	82,6±2,8
Кумазид, 1,0 мкг/кг	10,0±1,1*	25,7±2,8**	42,0±3,1**	53,6±4,2**	64,6±3,6	76,3±4,9
Контроль 2 (облученные мыши)	7,3±0,1	7,5±0,4	28±2,0	30,4±4,1	60,3±4,1	76,9±5,1
Контроль 1 (интактные мыши)	45,0±4,8			98,5±5,2		

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; (по отношению к контролю 2). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $n=8$

Таблица 35. Влияния профилактического введения кумазида (четырёхкратное введение) на клеточность кроветворных и лимфоидных органов сублетально облученных мышей

Группа животных	Тимус ($\times 10^6$)			Селезенка ($\times 10^6$)			Костный мозг ($\times 10^6$)		
	Дни после облучения								
	4	9	17	4	9	17	4	9	17
Кумазид 0,01 мкг/кг	0,9±0,1	23,1±2,3**	33,5±4,2	50,4±5,7*	100±7,5	160±11,2	22,5±4,3	20,0±2,2	12,0±1,9
Кумазид 0,1 мкг/кг	1,0±0,2	26,3±4,2**	36,7±3,3	59,4±6,6*	140±8,9**	170±10,6	24,8±4,4*	26,8±3,7	14,0±2,1
Кумазид 1,0 мкг/кг	1,0±0,1	22,9±4,5*	41,5±5,5	56,2±8,4*	120±8,8	170±13,2	22,5±5,1	25,3±3,8	15,6±3,3
Контроль 2 (облученные мыши)	0,7±0,1	11,1±2,2	20,0±4,4	31,2±4,9	100±9,5	140±11,5	12,5±3,8	20,6±2,2	10,0±2,0
Контроль 1 (интактные мыши)	47,5±0,9			190±19			29 ± 3,3		

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; (по отношению к контролю 2). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, $n=8$

Влияние профилактического введения кумазида на количество полипотентных стволовых кроветворных клеток в селезенке сублетально облученных мышей. При однократном введении кумазида в дозе 0,1 мкг/кг за 4 суток до облучения отмечено достоверное увеличение эндогенных колоний в селезенке сублетально облученных мышей с $22,0 \pm 1,4$ (в контроле) до $26,9 \pm 1,3$ в опыте (Таблица 36). Увеличение численности полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК), формирующих эндогенные колонии, является определяющим фактором для повышения выживаемости облученных животных (Чертков, Гуревич, 1984).

Таблица 36. Влияния профилактического введения кумазида (однократное введение) на количество полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) в селезенке сублетально облученных мышей на 8-й день после облучения

Группа животных	Количество ПСКК
Кумазид 0,01 мкг/кг	$24,2 \pm 1,2$
Кумазид 0,1 мкг/кг	$26,9 \pm 1,3^*$
Кумазид 1,0 мкг/кг	$23,3 \pm 2,0$
Контроль(облученные мыши)	$22,0 \pm 1,4$

Примечание: * – $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=8$

Согласно данным литературы (Bona, Bonilla, 1996; Patchen et al., 1987), основным и определяющим фактором в генезе лучевой болезни является поражение системы кроветворения. Исход лучевой болезни во многом зависит от способности применяемых средств блокировать механизмы, приводящие к опустошению кроветворной ткани, что способствовало бы сохранению большего числа кроветворных элементов и более быстрому восстановлению кроветворения за счет неповрежденных или нелетально поврежденных стволовых клеток.

При облучении в летальных и сублетальных дозах радиопротекторы снижают смертность подопытных животных. Все большее внимание привлекают так называемые биологические радиопротекторы – вещества природного происхождения с разнообразными фармакологическими свойствами (адаптогенными, антиоксидантными, гемо- и иммуностимулирующими, антимуtagenными, витаминными и др.). Биологические радиопротекторы отличаются от химических более мягким и продолжительным действием, практической нетоксичностью, возможностью перорального приема, эффективны после облучения. Некоторые из них имеют корректирующее действие по отношению к радиочувствительным органам и системам. Интересно отметить, что в числе прочих факторов, радиозащитные свойства препаратов сочетаются со способностью к

стимуляции неспецифической резистентности организма по отношению к инфекционным агентам (Гончаренко, Кудряшов, 1985; Кудряшов, 1987).

Природные вещества активизируют защитные ресурсы организма, воздействуя в основном на нейрогуморальную и иммунно-гематопозитическую (кроветворную) регуляторные системы. В результате повышается общая неспецифическая резистентность организма, стимулируется эндогенный фон радиорезистентности – сложный комплекс эндогенных биологически активных соединений: аминов, тиолов и других антиокислителей, осуществляющих защитные функции и подавляющих накопление губительного для живых клеток избытка продуктов лучевого перекисного окисления (Patchen, 1998).

Противолучевое действие цитокинов (полипептидов, регулирующих рост, дифференцировку, функциональную активность клеток и их радиорезистентность) определяется их гемо- и иммуностимулирующей активностью, а также способностью повышать эндогенный фон радиорезистентности. Одна из важных особенностей цитокинов – их способность сохранять повышенную радиорезистентность длительное время, до нескольких суток. Противолучевым действием обладают следующие интерлейкины: лимфокины, монокины, колониестимулирующий фактор, интерфероны. Полагают, что, по крайней мере, один из интерлейкинов – интерлейкин-1 β может быть использован для экстренной противолучевой терапевтической помощи при аварийных облучениях человека. Как генно-инженерный адаптоген естественного стимулятора иммуногемопоэза, он удовлетворительно переносится человеком в эффективных дозах, и его уже применяют в клинике (Neta, 1998).

Вероятно, стимулирующее влияние кумазида на показатели клеточного состава периферической крови, функции кроветворения и клеточности кроветворных (костный мозг бедренной кости) и лимфоидных (тимус, селезенка) органов и на количество полипотентных стволовых кроветворных клеток обеспечивает защитный эффект в тесте выживаемости сублетально облученных мышей при введении малых доз препарата. Способность кумазида обеспечивать быстрое восстановление кроветворения облученных мышей (по сравнению с контролем) и умеренный радиозащитный эффект при профилактическом применении препарата могут быть использованы для выяснения эффективности препарата при применении его в профилактической и лечебной схемах и сочетанного действия с известными радиопротекторами.

3.6. Противоопухолевая активность *in vivo*

3.6.1. Изучение превентивной противоопухолевой активности кукумариозида А₂-2 и фрондозид А

Изучение превентивной противоопухолевой активности кукумариозида А₂-2 и фрондозид А проводили на белых беспородных мышах с привитой карциномой Эрлиха, солидный вариант. Опухолевые клетки прививали животным подкожно под правую лопатку в количестве 5×10^6 клеток на мышь. Лечение мышей начинали за 7 дней до прививки опухоли («профилактическая» схема введения) по 10 животных в группе. Раствор гликозида вводили внутривентриально по 0,5 мл, ежедневно, в течение 7 дней. Ежедневная доза вещества составляла 0,2 мкг/мышь. Эффект вещества оценивали по изменению роста опухоли по сравнению с контролем методом магнитно-резонансной томографии высокого разрешения, начиная с седьмого дня после инокуляции опухоли.

Обнаружено, что кукумариозид А₂-2 на 7-й день эксперимента тормозит рост солидной опухоли на 52%, на 14 день эксперимента на 48%, на 21 день – на 46%, на 28 день – на 44%. Динамика изменения объема опухоли у контрольных мышей и у мышей, получавших кукумариозид А₂-2, представлена на рис. 43А.

Сходную динамику подавления роста опухоли у мышей наблюдали и при применении фрондозид А по «профилактической» схеме введения. Было показано, что этот гликозид на 7 день эксперимента тормозит рост солидной опухоли на 22%, на 14 день эксперимента на 40%, на 21 день – на 50%, на 28 день – на 55% (рис. 43Б).

Одновременно методами МРТ была проведена оценка морфологических изменений состояния органов иммунной системы животных. Было проведена оценка объема селезенки мышей на 7-й день после получения кукумариозида А₂-2 по сравнению с контрольными животными. Было показано, что кукумариозид А₂-2 практически не влиял на геометрические показатели селезенки мышей. Размер селезенки у контрольных животных составил $181,12 \pm 3,81$ мм³, а у мышей, получавших ежедневно в течение недели кукумариозид А₂-2, он составил $173,10 \pm 6,5$ мм³ (рис. 44). Аналогичные результаты были получены и в случае применения фрондозид А.

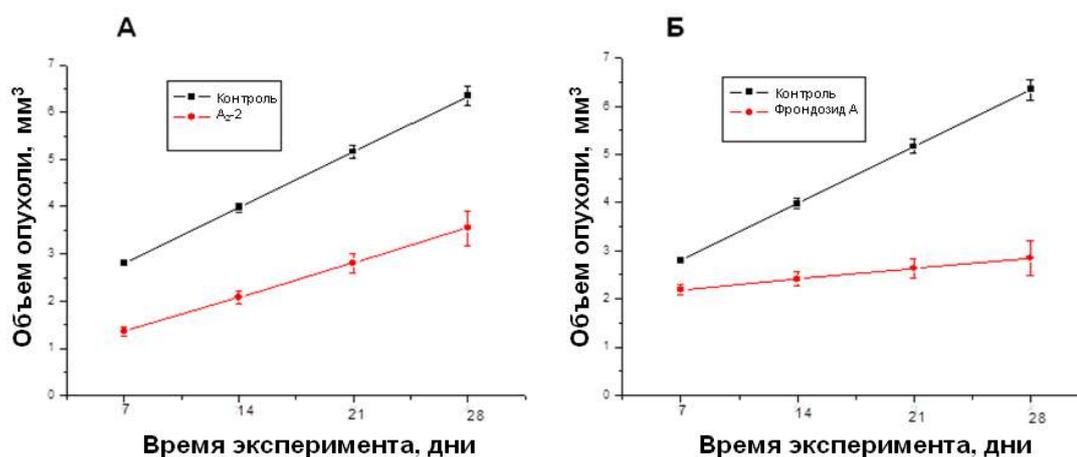


Рис. 43. Влияние кукумариозида A₂-2 (А) и фрондозида А (Б) на динамику роста солидной формы карциномы Эрлиха. Гликозид вводили за 7 дней до инокуляции опухоли внутривентриально ежедневно в течение 7 дней в дозе 0,2 мкг/мышь. Объем опухоли оценивали методом МРТ

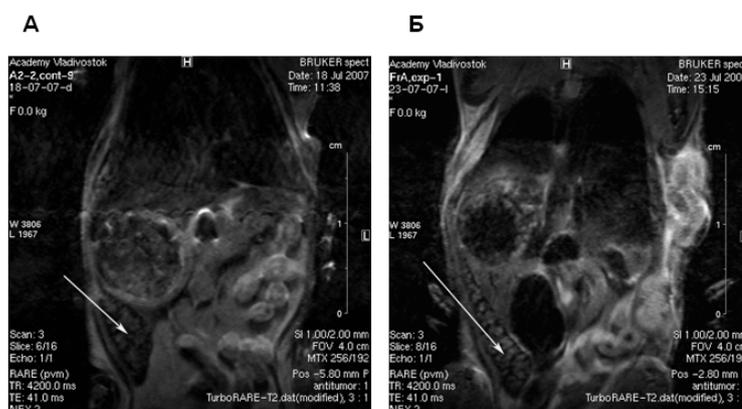


Рис. 44. Влияние кукумариозида A₂-2 на морфологию селезенки у мышей. А – контрольные животные, Б – животные, получавшие кукумариозид A₂-2 в дозе 0,2 мкг/мышь в течение 7 дней до инокуляции опухоли. Объем селезенки оценивали методом МРТ

3.6.2. Противоопухолевая активность кумазида

Увеличение продолжительности жизни мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха при внутривентриальном способе введения кумазида.

После двукратного внутривентриального введения суспензии кумазида по «профилактической» схеме в дозе 0,2 мкг/мышь в четырех различных группах животных (по 7 мышей в группе) у некоторых животных (от двух до пяти животных, в среднем три) на десятый день после инокуляции опухолевых клеток не наблюдалось видимых признаков развития опухоли. В то же время у всех животных в контрольной группе к 10-му дню экспериментов наблюдалась четкая картина развития асцитной формы карциномы Эрлиха (Таблица 37).

Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей с привитой асцитной карциномой Эрлиха, получавших кумазид, увеличилась в среднем на 3,5 дня по сравнению с контролем ($p = 0,093$). В разных экспериментах увеличение продолжительности жизни (УПЖ) варьировала от 4,4% до 25% со средним значением $13,60 \pm 4,37\%$ (Таблица 37).

Таблица 37. Влияние кумазида на среднюю продолжительность жизни у мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха. Кумазид вводили внутрибрюшинно дважды по «профилактической» схеме (за 4 и за 1 день до инокуляции опухоли в дозе 0,2 мкг/мышь

Вещество	Среднее количество животных без опухоли/общее количество животных	СПЖ, дни	УПЖ, %
Контроль	0/7	$25 \pm 0,9$	-
Кумазид	3/7	$28,50 \pm 1,50$ ($p = 0,093$)	$13,60 \pm 4,37$

Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 7$)

На следующем этапе исследований противоопухолевой активности кумазида было проведено два типа экспериментов, в которых были смоделированы поздняя и ранняя стадии заболевания мышей асцитной формой карциномы Эрлиха. В первом типе экспериментов по моделированию *поздней* стадии заболевания мышам внутрибрюшинно инокулировали опухолевые клетки в количестве 20×10^6 клеток на мышь. Препарат вводили дважды внутрибрюшинно в дозе 0,2 мкг/мышь за 4 дня и за 1 день до инокуляции опухоли. Затем препарат вводили внутрибрюшинно через 1 день и на 4-й день после инокуляции опухоли («комбинированная» схема). На протяжении последующих 30 дней ежедневно проводился подсчет количества погибших животных. Схема эксперимента и результаты по подсчету средней продолжительности жизни (СПЖ) представлены в таблице 38.

В результате проведенных экспериментов было показано, что в контрольной группе животных последние 2 мыши погибли на 17 день эксперимента. Средняя продолжительность жизни в контрольной группе составила 16 дней. При применении кумазида увеличения СПЖ мышей не наблюдали. В группе с использованием кумазида первые 4 животных погибли на 15 день после введения опухоли, а оставшиеся 2 мыши на 16 день, СПЖ в данной группе составило 15,33 дня. Таким образом, в экспериментах с инокуляцией большого количества опухолевых клеток (20 млн клеток на одно животное), которое может соответствовать *поздним* стадиям развития заболевания, кумазид,

вводимый по «комбинированной» схеме, не показал достоверного увеличения средней продолжительности жизни животных.

Таблица 38. Зависимость влияния кумазида, вводимого внутрибрюшинно по «комбинированной» схеме в дозе 0,2 мкг/мышь, на среднюю продолжительность жизни мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха от количества инокулированных опухолевых клеток

Вещество	20×10 ⁶ кл / мышь		2×10 ⁶ кл / мышь	
	СПЖ, сутки	УПЖ, %	СПЖ, сутки	УПЖ, %
Контроль	16,0±0,89	-	24,6±2,08	-
Кумазид	15,33±0,52	-	29,0±1,7*	17,3±7,5

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 7). * (p < 0,05)

На рисунке 45А показана динамика выживаемости мышей с карциномой Эрлиха при моделировании *поздней* стадии заболевания (20 млн клеток на животное) в контрольной группе и в группе, получавшей кумазид по «комбинированной» схеме.

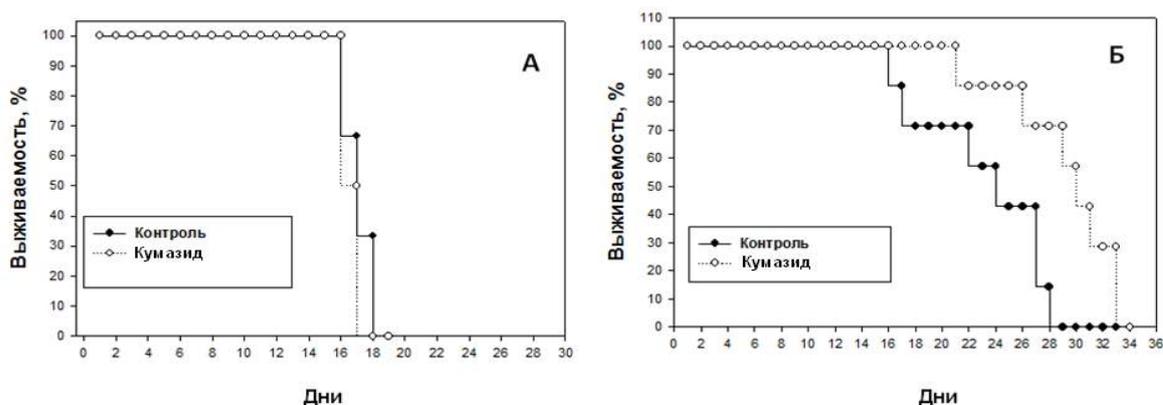


Рис. 45. Выживаемость мышей с асцитной карциномой Эрлиха (20 млн клеток/мышь (А) и 2 млн клеток/мышь (Б) в контрольной группе и в группе, получавшей кумазид в дозе 0,2 мкг/мышь внутрибрюшинно по «комбинированной» схеме

В следующей серии экспериментов проводили оценку противоопухолевого эффекта кумазида, применяемого по «комбинированной» схеме, на животных, которым прививали 2×10⁶ клеток на мышь. Анализ результатов проведенного исследования показал, что препарат в дозе 0,2 мкг/мышь тормозит развитие опухоли в течение первых 10-ти суток после инокуляции опухоли. Примерно в 25-30% случаев развитие опухоли визуально не выявляли, в то время как в контрольной группе животных развитие опухоли констатировали в 100% случаев. Тем не менее, к 20 дню развитие опухоли наблюдали уже во всех группах мышей. СПЖ для контрольной группы составило 24,67 дня, в то время

как при применении препарата наблюдали статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение продолжительности жизни до 29 дней. В этом случае УПЖ составило 17,33% по отношению к контрольным животным (Таблица 38). В качестве примера на рисунке 45Б показана динамика выживаемости мышей с карциномой Эрлиха (2 млн клеток на животное) в контрольной группе и в группе, получавшей кумазид по «комбинированной» схеме. Статистический анализ полученных данных методом оценки лог-рангового критерия Каплан-Мейера выявил статистически значимые различия в показателе медианы выживаемости для контрольной группы животных (медиана = $22,0 \pm 0,2$) и группы животных, получавших кумазид (медиана = $29,0 \pm 0,2$).

Таким образом, в экспериментах с инокуляцией опухолевых клеток в количестве 2 млн клеток на одно животное, что соответствует *ранним* стадиям заболевания, кумазид показал достоверное увеличение средней продолжительности жизни животных.

Увеличение продолжительности жизни мышей с асцитной формой карциномы Эрлиха при пероральном способе введения кумазида. Препарат кумазид при пероральном способе введения в дозе 0,2 мкг/мышь тормозил рост асцитной формы опухоли в «профилактической» группе животных на 27%. При введении кумазида до и после перевивки опухоли («комбинированная схема») процент торможения роста достигал 43% к 15-му дню после инокуляции опухоли, в то время как в «лечебной» группе ингибирования роста опухоли не наблюдали (Таблица 39).

Таблица 39. Влияние препарата кумазид при пероральном способе введения на рост асцитной формы опухоли карцинома Эрлиха

Воздействие	Объем опухоли, мл	Число клеток в мл, $\times 10^6$	Число клеток/на мышь, $\times 10^6$	% клеток к контролю	% ингибирования
Кумазид «до» прививки опухоли, 7 дней	$0,9 \pm 0,3$	126 ± 36	114 ± 25	73	27
Кумазид «до» прививки опухоли, 7 дней + «после», 7 дней	$0,78 \pm 0,4$	115 ± 28	$90 \pm 26^*$	57^*	43^*
Кумазид «после» прививки опухоли, 7 дней	$1,8 \pm 0,6$	93 ± 30	167 ± 38	107	-
Контроль	$1,5 \pm 0,4$	104 ± 25	156 ± 30	100	-

Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=10); * $p < 0,05$

Увеличение продолжительности жизни мышей с солидной формой карциномы Эрлиха при пероральном способе введения кумазида. 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 (Таблица 40).

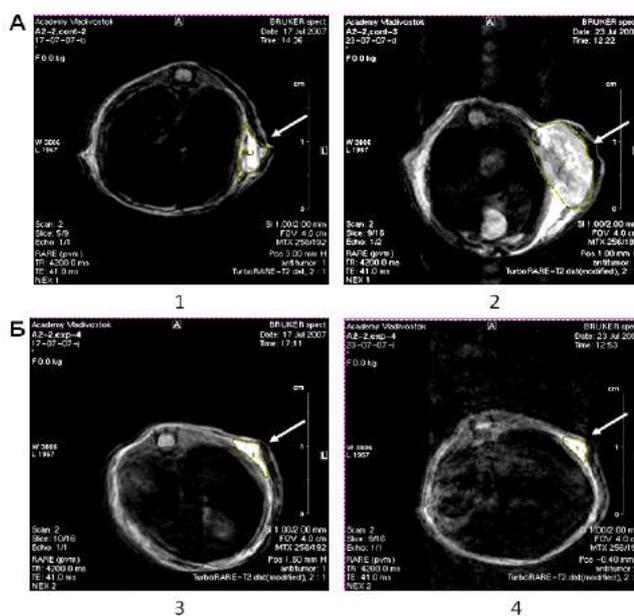


Рис. 46. Влияние препарата кумазид в дозе 0,2 мкг/мышь на рост солидной формы карциномы Эрлиха при пероральном «комбинированном» способе введения. Исследование выполнено методом МРТ. А – Контроль (1 – 8-й день развития опухоли, 2 – 14-й день развития опухоли); Б – кумазид, «профилактическая» схема введения (3 – 8-й день развития опухоли, 4 – 14-й день развития опухоли). Показано аксиальное МРТ-изображение. Стрелки указывают на локализацию опухоли

На аксиальном томографическом изображении (рис. 46) 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 на четырнадцатый день после инокуляции у экспериментальных мышей, которым вводили кумазид по «комбинированной» схеме.

Применение кумазида по схеме «лечение» приводило к незначительному недостоверному уменьшению размера опухоли по сравнению с контролем, начиная с четырнадцатого дня. Задержка в развитии опухоли достигала примерно 20% на двадцать первый день эксперимента. Практически никакого достоверного ингибирования роста не наблюдали при пероральном введении кумазида по «профилактической схеме» на протяжении 21 дня эксперимента (Таблица 40).

Таблица 40. Влияние препарата кумазид при пероральном способе введения на динамику развития солидной формы карциномы Эрлиха мышей. Приводятся значения объема опухоли (мм³)

Воздействие	День после инокуляции опухоли				
	8	11	14	18	21
Контроль	1,97±0,21	4,66±0,10	10,60±0,31	15,92±0,22	20,79±0,32
Кумазид, «профилактическая» схема введения	1,81±0,14	4,34±0,14	10,53±0,28	15,44±0,23	20,34±0,16
Кумазид, схема введения «лечение»	1,99±0,12	3,78±0,11	9,29±0,24	12,61±0,51	16,67±0,17
Кумазид, «комбинированная» схема введения	2,00±0,10	3,51±0,19	3,52±0,12*	3,55±0,14*	3,55±0,20*

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=6); * p < 0,05

Увеличение продолжительности жизни мышей с солидной формой карциномы Эрлиха при сочетанном действии кумазида с 5-фторурацилом при внутрибрюшинном способе введения. В следующей серии экспериментов мы изучили сочетанное действие кумазида с известным цитостатиком 5-фторурацилом при внутрибрюшинном способе введения. Развитие солидной формы карциномы Эрлиха у контрольной группы мышей по оценкам MRT приводит к значительному увеличению геометрических размеров опухоли. В ходе эксперимента объем опухоли у контрольных животных увеличился с 2,0±0,3 мм³ (восьмой день эксперимента) до 26,0±0,4 мм³ на 50-й день после инокуляции (рис. 47). Применение кумазида по «профилактической» схеме лечения в дозе 0,2 мкг/мышь при внутрибрюшинном способе введения в течение 7 дней ежедневно до прививки опухоли приводило к достоверной задержке роста солидной опухоли в среднем на 27% по сравнению с контролем.

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. 47).

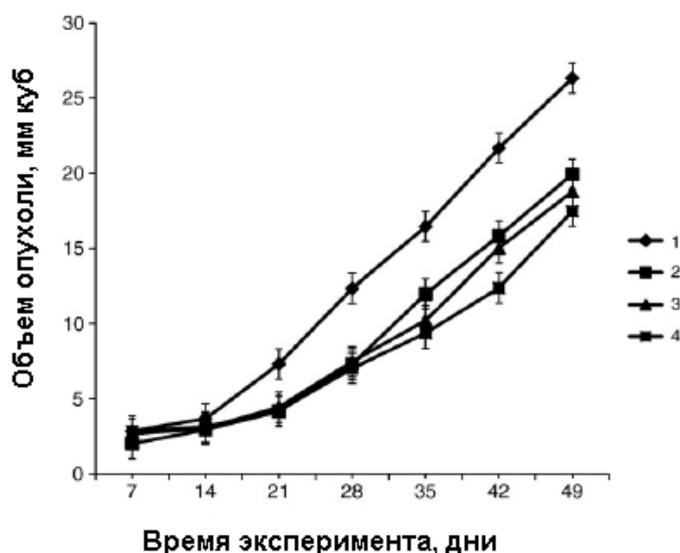


Рис. 47 Влияние препарата кумазид (0,2 мкг/мышь), 5-фторурацила (50 мкг/кг) и их комбинированного применения при внутрибрюшинном способе введения на динамику развития солидной формы карциномы Эрлиха мышей. **1** – контроль; **2** – кумазид; **3** – 5-фторурацил; **4** – совместное применение кумазида + 5-фторурацила. Приводятся значения объема опухоли (мм^3)

Таким образом, препарат кумазид, имея значительно более низкую цитотоксическую активность и токсичность, чем исходные гликозиды, тем не менее, обладает противоопухолевым действием *in vivo* при различных способах введения. Сочетанное применение кумазида с другими противоопухолевыми препаратами приводит к синергизму в их противоопухолевом действии.

Противоопухолевый эффект препарата может быть связан как с иммуномодулирующими свойствами тритерпенового гликозида, проявляющимися наиболее ярко при «профилактическом» и «комбинированном» способах введения, так и со способностью препарата индуцировать в опухолевых клетках апоптоз, ингибировать в них биосинтез ДНК и блокировать клеточный цикл и пролиферацию, что имеет место при

«комбинированной» схеме и схеме «лечение». Такой механизм противоопухолевого действия тритерпеновых гликозидов голотурий описан в настоящем литературном обзоре.

3.7. Фармакокинетические исследования кумазида

Фармакокинетические исследования являются важным этапом создания новых лекарственных препаратов (Мирошниченко, 2002). 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. Для качественного и количественного анализа содержания субстанций в органах и тканях применяют различные подходы, в том числе масс-спектроскопический и хроматографический (жидкостная и газо-жидкостная высокоэффективная хроматография) (Холодов, Яковлев, 1985; Белоусов и др., 1997). Широко используются при этом и радиоактивно меченые субстанции (радиохимический метод), в особенности в тех случаях, когда удается получить целевые соединения с высокой удельной радиоактивностью, а при введении радиоактивных атомов избежать существенных изменений в исходных химических структурах. Эффективная замена отдельных протонов на тритий в принципе позволяет решить такую задачу (Шевченко и др., 2003).

Тритерпеновые гликозиды являются активными субстанциями ряда лекарственных средств и многочисленных биологически активных добавок к пище. В их числе – препараты из женьшеня, солодки и других фармакопейных растений (Толстиков и др., 2007). Поэтому разработка методов получения меченных тритием производных из этих веществ является актуальной задачей.

В рамках данного исследования был разработан метод получения высокомеченного радиоактивного производного активной субстанции препарата кумазид на примере основного тритерпенового моносulfатированного гликозида кукумариозида A₂-2. Удельная активность полученного соединения составила 22 Ки/ммоль, радиохимическая чистота 96–98%. На основании тритий меченого тритерпенового гликозида был получен радиоактивно-меченный препарат ³H-кумазид, как описано в патенте РФ (Стоник и др., 2004). Были проведены фармакокинетические исследования при нескольких способах введения препарата лабораторным животным.

3.7.1. Исследование фармакокинетики ³H-кумазида

Для изучения фармакокинетики меченого тритием кумазида суспензию препарата в воде в дозе 100 мкг на животное (5 мг/кг) вводили однократно мышам линии Balb/c.

Каждая подопытная группа состояла из 5 животных. Препарат вводили двумя способами: внутривенно или перорально. Через определенные промежутки времени после введения препарата мышам забивали и определяли содержание кумазида в органах и крови животных.

Исследование фармакокинетики ³H-кумазида при внутривенном способе введения мышам линии Balb/c. При однократном внутривенном введении ³H-кумазида время выведения препарата составляет в среднем около 72-х часов. К этому моменту концентрация препарата практически во всех органах достигает своего минимального значения. Графическое отображение динамики изменения концентрации ³H-кумазида в плазме крови при однократном внутривенном представлено на рисунке 48А. Фармакокинетические параметры ³H-кумазида в различных органах и тканях мышам линии Balb/c после однократного внутривенного введения представлены в таблице 41.

Таблица 41. Фармакокинетические параметры ³H-кумазида в различных органах и тканях мышам линии Balb/c после однократного внутривенного 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
V_{ss}, мкл	1705,9	528,2	859,7	846,9	808,9

Указаны средние значения (n=5)

Во внимание принимали следующие рассчитанные параметры и константы: время достижения максимальной концентрации (T_{max}); максимальную концентрацию (C_{max}); период полувыведения препарата (T_{1/2}); площадь под кривой «концентрация – время» (AUC); общий клиренс (Cl); среднее время удерживания препарата в организме (MRT) и стационарный объем распределения (V_{ss}).

Из данных таблицы 41 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).

Исследование фармакокинетики ³H-кумазида при пероральном способе введения мышам линии Balb/c. При однократном пероральном введении динамика всасывания и выведения препарата кумазид в желудке исследуемых животных несколько отличалась от динамики, наблюдаемой в остальных органах. Главное отличие связано с наибольшей скоростью всасывания в желудке и максимальным накоплением препарата в этом органе.

Таблица 42. Фармакокинетические параметры ³H-кумазида в различных органах и тканях мышей линии Balb/c после однократного перорального введения

Парметр	C _{max}	T _{max}	AUC	T _{1/2}	MRT	Cl	Vss
Ед.изм	мкг/г	час	мкг*час/мл	час	час	мкг/час	мкл
Сердце	96,16	0,33	4260	0,318	0,379	1377,77	522,1
Печень	58,01	0,33	3060	0,478	0,521	1990,61	1037,4
Почки	70,57	0,33	3480	0,402	0,447	1720,02	768,9
Селезенка	52,00	0,67	2760	0,574	0,476	2173,22	1034,3
Желудок	93,91	0,33	7560	1,437	1,745	792,96	1383,9
Кровь	74,44	0,67	1680	0,354	0,699	3519,93	2460,3

Указаны средние значения (n=5)

Фармакокинетические параметры при пероральном однократном ведении кумазида представлены в таблице 42. Установлено, что при однократном пероральном введении мышам ³H-кумазид всасывался довольно быстро: максимальная концентрация ³H-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 ³H-кумазида, возможно, вследствие его быстрого связывания и быстрого насыщения в тканях желудка. Динамика

изменения концентрации ^3H -кумазида в плазме крови мышей при однократном пероральном введении представлена на рисунке 48Б.

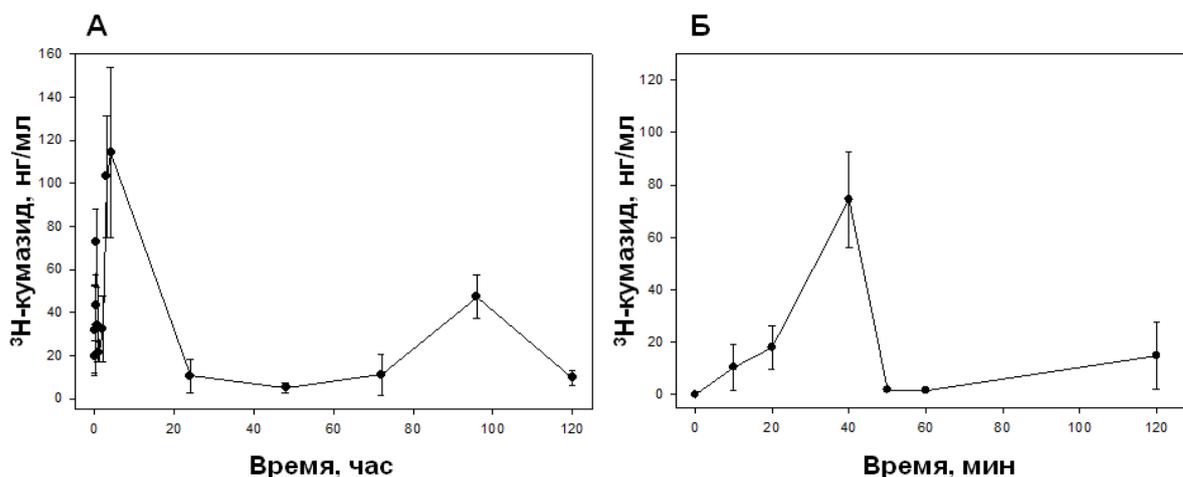


Рис. 48. Динамика изменения концентрации ^3H -кумазида в плазме крови мышей линии Valb/c при однократном внутрибрюшинном (А) и пероральном (Б) введении в дозе 5 мг/кг. Указаны значения $M \pm m$ ($n=5$)

В результате проведенных исследований установлено, что полученные меченые производные могут успешно использоваться при фармакокинетических исследованиях кумазида. Вероятно, их можно будет использовать и при дальнейшем изучении механизмов физиологического действия этих веществ. Проведено исследование распределения ^3H -кумазида в различных органах и тканях мышей при однократном внутрибрюшинном и однократном пероральном способах введения. Установлено, что препарат кумазид быстро всасывается при внесосудистых способах введения его мышам. Самое быстрое время достижения максимальной концентрации наблюдается при внутрибрюшинном способе введения. Очевидно, это происходит благодаря непосредственному быстрому контакту препарата с органами в момент внутрибрюшинной инъекции. При пероральном способе введения максимальную концентрацию в органах детектировали за более длительный период, что, вероятно, обусловлено первоначальной сорбцией препарата в желудке. Однако, максимальная концентрация кумазида в крови при его пероральном введении или внутрибрюшинном введении была достигнута примерно за одинаковое время (0,6 часа). Высокая скорость всасывания кумазида при обоих способах введения может быть связана с его липофильностью и отсутствием выраженных кислотно-основных свойств. Время выведения препарата из организма мышей зависит от способа введения препарата. Минимальные значения были отмечены при однократном пероральном способе введения. Периоды полувыведения препарата ($T_{1/2}$) составляют 0,3–1,4 часа. При внутрибрюшинном способе время выведения увеличивается в несколько раз

по сравнению с пероральным способом введения. Периоды полувыведения препарата составляют 9–22 часа.

Таким образом, изучение экспериментальной фармакокинетики кукумаризида у мышей показало, что препарат быстро всасывается при внесосудистых способах введения. Скорость выведение препарата в значительной степени зависит от способа его введения и является максимальной при пероральном способе введения.

3.7.2. Исследование фармакокинетического поведения кукумариозида А₂-2 в гомогенате селезенки мышей методом радиоспектроскопии

Исследование поведения биологически активного вещества или лекарственного средства в организме животных и человека в целом и его распределение в определенных органах в частности представляет большой интерес, так как результаты таких исследований дают представление о том, как быстро препарат поступает в организм, через какое время он достигает ткани- или органа-мишени, на который направлено основное фармакологическое действие препарата, как быстро и в каком количестве накапливается там, с какой скоростью препарат выводится из организма и подвергается ли препарат биотрансформированию в течение своего пребывания в организме (Кукес, 2009).

Данное исследование проводили для изучения динамики распределения кукумариозида А₂-2 в селезенке мыши, являющейся одним из органов-мишеней действия препарата. С этой целью мы провели экспериментальную оценку стабильности препарата и изучение зависимости количественного содержания препарата от времени в ткани селезенки мышей. Кроме того, мы провели исследование пространственного распределения кукумариозида А₂-2 в срезах ткани селезенки с использованием нескольких экспериментальных подходов.

Одним из таких подходов было изучение динамики изменения содержания ³H-кукумариозида А₂-2 в селезенке методом радиоспектроскопии. Для описания фармакокинетики радиоактивно-меченного гликозида была использована двухкамерная модель первого порядка. Показано, что после однократного внутрибрюшинного введения гликозида в комплексе с холестерином в дозе 5 мг/кг наблюдается быстрое всасывание вещества. Время достижения максимальной концентрации (Т_{max}) в гомогенате ткани составило 10–30 минут, а максимальная концентрация (С_{max}) составляла около 100 нг/мг сырого веса ткани.

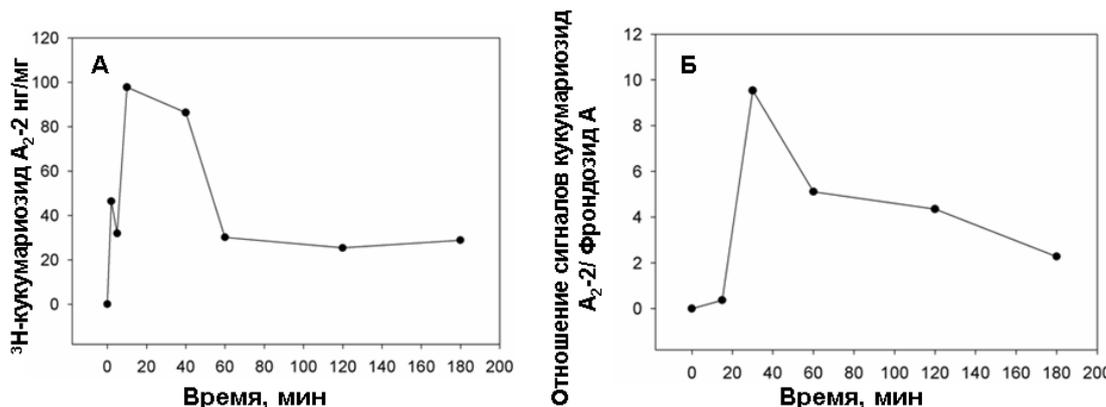


Рис. 49. Зависимость концентрации кукумариозида A₂-2 в селезенке мышей линии Balb/c от времени после однократной внутрибрюшинной инъекции гликозида в комплексе с холестерином в дозе 5 мг/кг. Содержание гликозида определяли: **А** – радиоспектроскопически и **Б** – методом MALDI-TOF-MS

Выяснено, что скорость выведения гликозида 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 A₂-2 в селезенке от времени показаны на рис. 49А, а рассчитанные значения фармакокинетических параметров включены в таблицу 43.

Таблица. 43. Фармакокинетические параметры поведения кукумариозида A₂-2 в селезенке мышей после однократного внутрибрюшинного введения препарата в дозе 5 мг/кг, полученные методами радиоспектроскопии и MALDI-TOF-MS анализа

Метод	C _{max} нг/мг	T _{max} мин	AUC мин × нг	K _e (Lz) 1/ мин	MRT мин	Cl мл/ мин	T _{1/2} мин
Радиоспектроскопия, ³ H-кукумариозид A ₂ -2	97,77	10	104381	0,0076	134,5	21,475	91,61
	отн.ед.	мин	мин ×отн.ед.	1/ мин	мин	мл/ мин	мин
MALDI-TOF-MS, отношение Кукумариозид A ₂ -2 / Фрондозид А	95,37	30	104222	0,0085	141,5	23,363	82,01

3.7.3. Идентификация и количественное определение кукумариозида A₂-2 в гомогенате селезенки мыши методом MALDI-TOF-MS

На первом этапе была проведена масс-спектрометрическая характеристика кукумариозида A₂-2. Показано, что в MALDI-TOF-MS спектре кукумариозида A₂-2 в режиме регистрации отрицательных ионов присутствует пик псевдомолекулярного иона с m/z 1295.537 [M_{Na} – Na]⁻. Это в свою очередь позволило определить молекулярную

формулу кукумариозида A_2-2 как $C_{59}H_{91}O_{29}SNa$. В MS-спектре кукумариозида A_2-2 в режиме регистрации положительных ионов наблюдали пики псевдомолекулярных ионов при m/z 1341.513 $[M_{Na} + Na]^+$ и m/z 1357.491 $[M_{Na} + K]^+$, а также пик при m/z 1239.580 $[M_{Na} + Na - NaSO_3 + H]^+$. Эти данные демонстрируют отрыв сульфатной группы. Химическая структура кукумариозида A_2-2 и его масс-спектр в гомогенате селезенки мыши показаны на рис. 50А и Б.

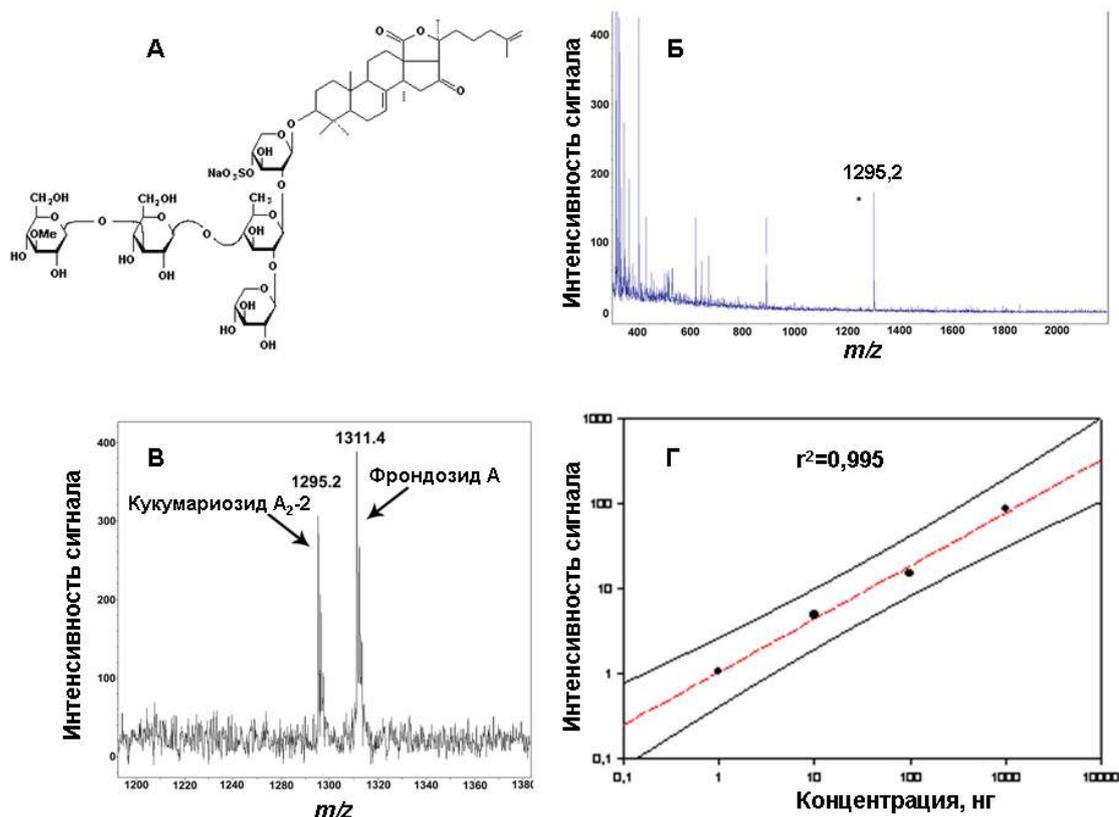


Рис. 50. А – Химическая структура кукумариозида A_2-2 ; Б – полный масс-спектр кукумариозида A_2-2 (область отрицательных ионов); В – масс-спектр кукумариозида A_2-2 (слева) и фрондозид А (справа) как внутреннего стандарта в гомогенате ткани селезенки мыши; Г – зависимость интенсивности сигнала кукумариозида A_2-2 в масс-спектре от его концентрации в диапазоне 1–1000 нг/мл

Обнаружена линейная зависимость интенсивности сигнала кукумариозида A_2-2 от его концентрации в диапазоне 1–1000 нг/мл ($r^2 = 0,995$). Предел обнаружения определен как 1 нг/мл (рис. 50Г). В качестве внутреннего стандарта был использован тритерпеновый гликозид фрондозид А, что позволило более точно количественно определить изменения содержания кукумариозида A_2-2 в ткани селезенки. На рис. 50В показаны масс-спектры кукумариозида A_2-2 , обнаруживаемого в гомогенате ткани после перитонеального

введения, и фрондозида А, введенного в последствии в гомогенат ткани в качестве внутреннего стандарта.

Показано, что при однократном внутрибрюшинном введении кукумариозид А₂-2 накапливался в гомогенате ткани селезенки уже в первые 30 мин после введения, а минимальные значения концентрации гликозида были зарегистрированы через 3 часа. Установлено, что кукумариозид А₂-2 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-кукумариозид А₂-2, полученными с использованием радиоактивно-меченного препарата (см. раздел 3.7.2, рис. 49Б и Таблица 43).

3.7.4. Исследование стабильности кукумариозид А₂-2 в тканях селезенки

Нами обнаружено, что кукумариозид А₂-2 проявляет стабильность и практически не претерпевает метаболических превращений в тканях селезенки. Стабильность кукумариозид А₂-2 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 кукумариозид А₂-2 (рис. 51).

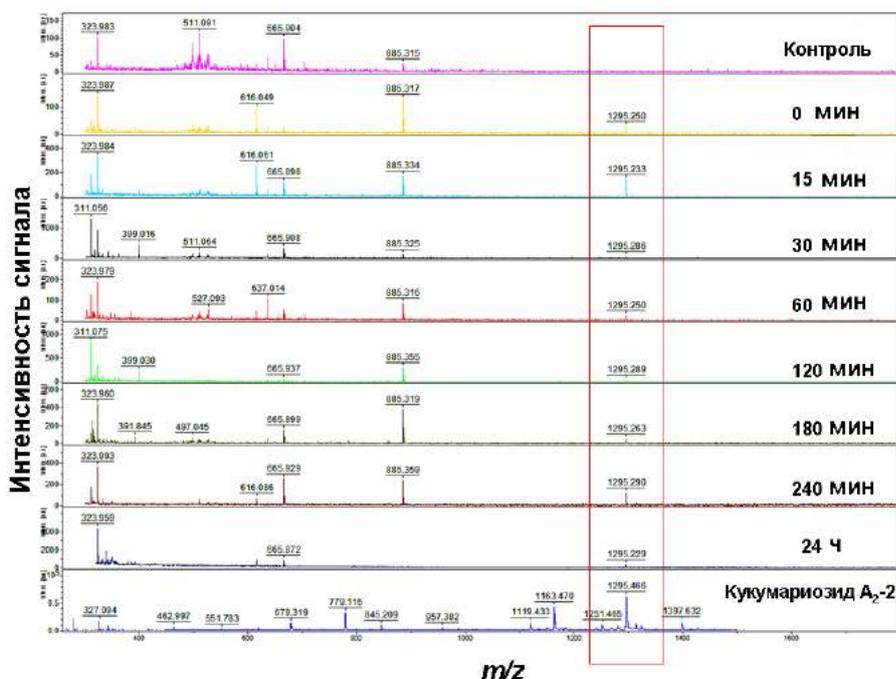


Рис. 51. MALDI-TOF-MS спектры кукумариозид А₂-2, полученные в гомогенате ткани селезенки мышей, инкубированных *in vitro* с гликозидом в течение различного времени при 37°C. Пики, соответствующие сигналу гликозида, выделены в красном прямоугольнике

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

MALDI-IMS (МАЛДИ-визуализация) представляет собой новейший, чувствительный и хорошо воспроизводимый метод, с помощью которого в настоящее время осуществляют анализ всевозможных химических соединений в биологических и клинических образцах ткани. Метод позволяет изучать фармакодинамику лекарственных соединений и отыскивать белковые/пептидные биомаркеры различных заболеваний, а также следить за различными метаболическими процессами, минуя процедуры гомогенизации ткани и экстракции аналита (Seeley, Caprioli, 2008).

Мы провели исследование пространственного распределения кукумариозида A_2-2 в ткани селезенки с помощью метода MALDI-IMS. С этой целью раствор гликозида вводили внутривенно мышам в дозе 5 мг/кг, через 15 мин выделяли селезенки и получали криогенные срезы тканей из центральной части органа. Окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином (H&E) (рис. 52А) позволило выявить определенные участки тканей – серозную оболочку, красную и белую пульпы (рис. 52Б и В).

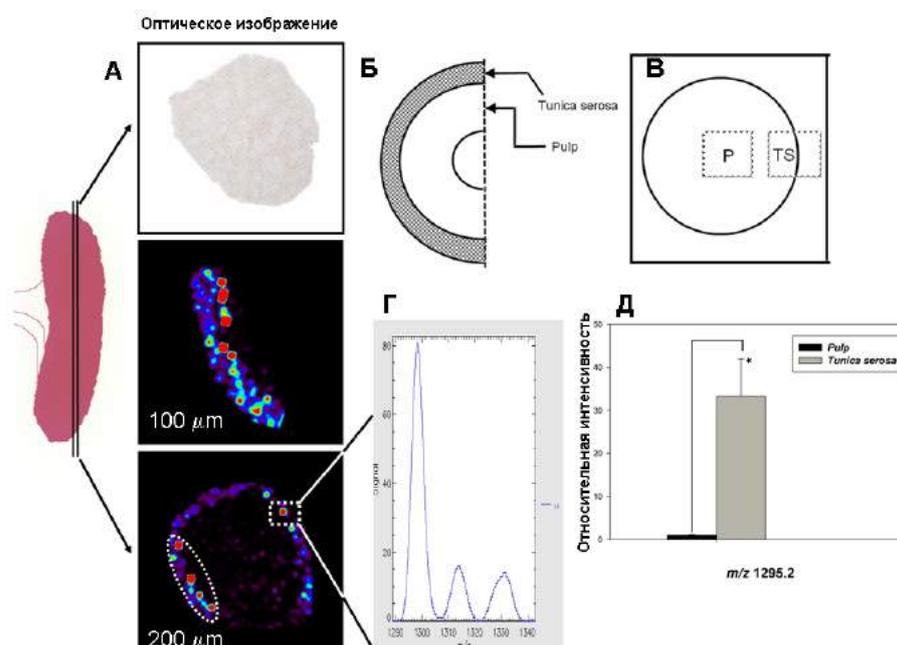


Рис. 52. Пространственное распределение кукумариозида A_2-2 , определенное методом MALDI-IMS в срезах ткани селезенки мышей через 15 мин после однократной внутривенной инъекции гликозида. **А** – оптическое изображение среза селезенки, окрашенного гематоксилином-эозином (верх) и полученное методом MALDI-IMS со срезов селезенки при разрешении 100 мкм и 200 мкм (середина и низ); **Б** – регионы изучаемых областей срезов; **В** – области внутри ROI, где проводили измерение интенсивности масс-спектров в пульпе (P) и серозной оболочке (TS); **Г** – спектр кукумариозида A_2-2 , полученный из ROI на срезе селезенки с помощью программы BioMar; **Д** – интенсивности масс-спектров из различных областей среза селезенки

Были получены реконструкции графического изображения масс-спектров локализованного в ткани гликозида, который с уверенностью можно было детектировать при m/z 1295,2 (рис. 52Г). Изображения, полученные при различных разрешениях прибора (100 мкм или 200 мкм), свидетельствуют о том, что гликозид концентрируется главным образом в области серозной оболочки, и его распределение носит практически равномерный характер.

Для установления зависимости распределения гликозида в ткани селезенки от времени проводили однократную внутрибрюшинную инъекцию кукумариозида А₂-2 в дозе 5 мг/кг. Через определенные промежутки времени (15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч и 3 ч) селезенки отбирали и с помощью криотома получали их криосрезы. Распределение кукумариозида А₂-2 в ткани оценивали методом MALDI-IMS, как описано выше. Для полуколичественной оценки распределения гликозида проводили сопоставление интенсивностей пиков гликозида в различных участках ткани селезенки.

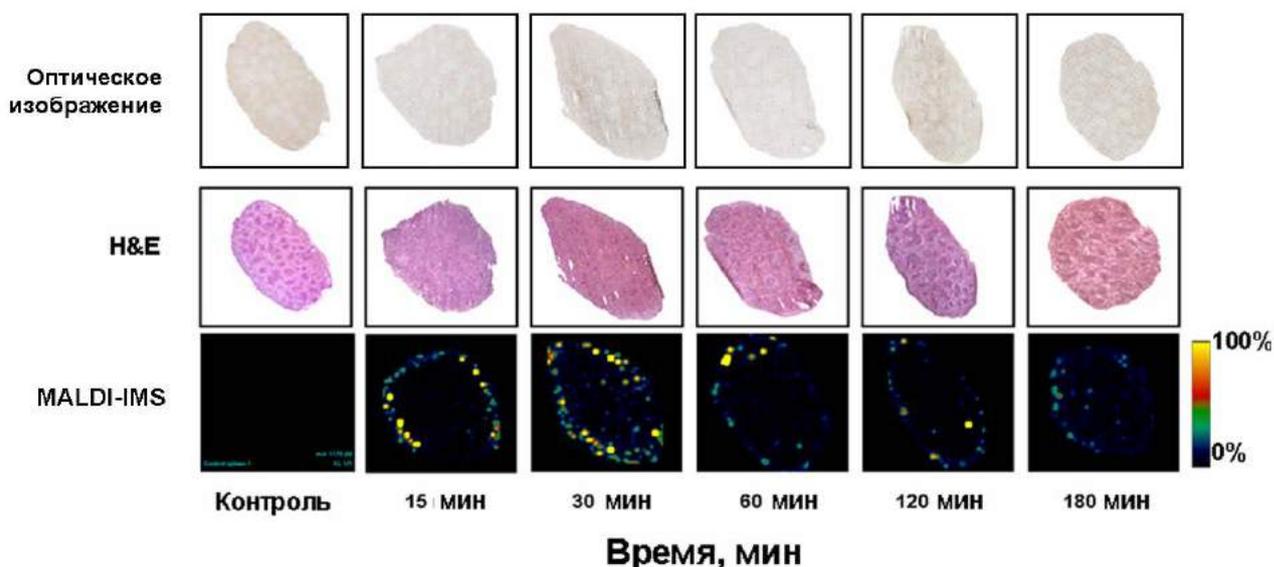


Рис. 53. Изображение распределения кукумариозида А₂-2 в срезах селезенки мышей после однократного внутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг, полученное методом MALDI-IMS. Верхняя строка отображает оптические изображения срезов селезенок, взятые для анализа. В средней строке представлены срезы селезенки, взятые для анализа и окрашенные гематоксилином-эозином. Нижняя строка показывает пространственное распределение гликозида в ткани селезенок, отобранных в различное время после инъекции препарата

Максимальный по интенсивности сигнал гликозида мог быть зарегистрирован уже в первые 15–30 мин после введения препарата в области серозной оболочки. Затем на протяжении 60–180 мин наблюдалось постепенное уменьшение интенсивности пика кукумариозида А₂-2 в области серозной оболочки и его незначительное перераспределение в область красной и белой пульпы. Зависимость распределения

кукумариозида A_2-2 в срезах селезенки мышей от времени после однократного внутрибрюшинного введения представлены на рис. 53 и 54.

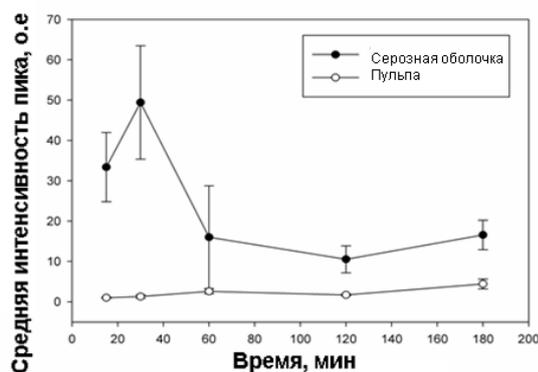


Рис. 54. Количественная оценка интенсивности сигналов кукумариозида A_2-2 в масс-спектрах гликозида, полученных методом MALDI-IMS на определенных участках ткани селезенки (ROI). Полученные значения были нормализованы на единицу площади ROI. Величины выражены как среднее значение \pm ошибка среднего ($n = 10$)

Одним из основных недостатков использования радиоактивно-меченых соединений в фармакологических исследованиях является отсутствие уверенности в том, что мы отслеживаем изменение содержания в органах первоначального соединения, а не продуктов его метаболической трансформации, т.к. регистрация радиоактивности вещества с помощью сцинтилляционного счетчика не позволяет сделать заключение о химической структуре меченого соединения. В то же время применение метода MALDI-TOF-MS позволило проследить за динамикой распределения ананта и его выведением из органа-мишени. Поскольку ранее был установлен факт стабильности гликозида в тканях, мы с полной уверенностью можем заключить, что уменьшение его содержания в селезенке отражает его вывод из органа, а не метаболическую деграцию. Фармакологические параметры поведения кукумариозида A_2-2 , такие как T_{max} , $T_{1/2}$, AUC, общий клиренс, Ke и MRT, рассчитанные с помощью двух подходов, хорошо согласуются друг с другом.

Полученные нами результаты коррелируют с опубликованными ранее экспериментальными данными исследований ряда гликозидов растительного происхождения, таких как элеутерозид В (Bezdetko et al., 1981), астрагалозид IV и сапонины женьшеня, гинзенозиды Rb1 и Rg1 (Zhang et al., 2005; Xu et al., 2003), а также тритерпенового гликозида голотурии фрондозид А (Shemali et al., 2016). Исходя из наших данных, можно заключить, что динамика всасывания и выведения кукумариозида A_2-2 сопоставима с опубликованными ранее результатами для других гликозидов. Преимуществом используемого нами метода MALDI-IMS является возможность

наблюдения за пространственным распределением и судьбой гликозида в органе-мишени. Установлено, что при внутрибрюшинном введении препарат быстро аккумулируется преимущественно на поверхности селезенки в области серозной оболочки, но впоследствии проникает через барьер серозной оболочки и незначительно перераспределяется в белой и красной пульпе органа. Очевидно, такое поведение гликозида может быть связано со способом его введения. При попадании в брюшную полость гликозид контактирует с наружной поверхностью и концентрируется в серозной оболочке. Его дальнейшее проникновением в глубокие слои ткани, перераспределение и постепенное выведение приводит к постепенному снижению концентрации гликозида в селезенке.

Три различных экспериментальных подхода, используемые в данном исследовании, позволили нам оценить динамику распределения и элиминации кукумариозида А₂-2 в селезенке мыши. Метод MALDI-IMS делает возможным достаточно быстро и точно локализовать в ткани участок накопления препарата при сохранении пространственной целостности самой ткани.

3.8. Исследование фармакодинамики

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

Селезенка является одним из главных органов иммунной системы, где происходят важные процессы иммунного ответа. Популяция клеток из селезенки (спленоциты) состоит из Т-клеток, В-клеток, НК-клеток, мононуклеарных фагоцитов, макрофагов и моноцитов, и ряда других типов клеток, характеризующихся экспрессией различных маркеров. Все типы этих клеток непосредственно участвуют в иммунных реакциях организма, и их функции связаны в основном с фагоцитозом, продукцией и высвобождением различных цитокинов и выработкой антител. Вспомогательные клетки, составляющие этот орган, придают ему форму и размер.

Во время изучения фармакокинетики СА₂-2 нами было показано, что селезенка является одним из органов-мишеней иммуномодулирующего действия этого гликозида (см. раздел 3.7). На данном этапе 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). Результаты этих экспериментов были подтверждены функциональными исследованиями на первичных культурах спленоцитов, икубированных в присутствии или отсутствии тестируемых соединений. Исследование клеточного состава селезенки мыши было проведено методом проточной цитофлуориметрии.

Анализ клеточного состава первичной культуры спленоцитов. Для исследования молекулярных механизмов иммуностимулирующего действия тритерпеновых гликозидов методами протеомики в качестве клеточного материала использовали первичную культуру спленоцитов мышей линии Balb/c. Из каждого животного выделяли селезенку, из которой далее получали индивидуальную клеточную суспензионную культуру. Анализ методом проточной цитофлуориметрии клеточной композиции был проведен со всеми выделенными первичными культурами спленоцитов по отдельности для того, чтобы охарактеризовать клеточный состав культур перед проведением и после проведения экспериментов по стимуляции клеток гликозидами *in vitro*. Пример подсчета клеток в субпопуляциях представлен на рисунке 55.

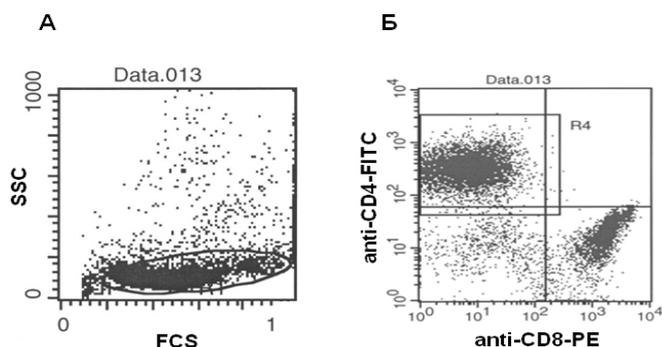


Рис. 55. Определение количества клеток в субпопуляциях лимфоцитов в первичной культуре спленоцитов мыши линии Balb/c методом проточной цитофлуориметрии (FACS анализ). **А** – выделение (гейтирование) зоны популяции спленоцитов в координатах прямого и бокового рассеивания; **Б** – определение количества клеток в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов с помощью антител, окрашенных различными флуорохромами

По нашим данным первичная культура спленоцитов состояла примерно из 3% моноцитов, гранулоцитов и NK-клеток. Количество CD8⁺ Т-клеток составляло около 22%, количество CD4⁺ Т-клеток порядка 40% и количество В-клеток было приблизительно 23% (Таблица 44). Индивидуальные данные по клеточному составу спленоцитов практически совпадали для всех исследованных животных, что указывает на высокую воспроизводимость результатов. Вследствие этого, мы сочли целесообразным объединение суспензии клеток от разных животных в один клеточный пул.

Таблица 44. Клеточный состав в первичной культуре спленоцитов мышей линии Balb/c, определенный методом проточной цитофлуориметрии

Вещества	Гранулоциты, моноциты, НК-клетки ^{а)}	В-клетки ^{а)}	Т-клетки CD8 ⁺ ^{а)}	Т-клетки CD4 ⁺ ^{а)}	Общее количество клеток ^{б)}
	[%]	[%]	[%]	[%]	
Контроль	2,55 ± 1,59	23,71 ± 5,10	22,01 ± 2,15	38,98 ± 5,82	3,96×10 ⁶
Кукумариозид А₂-2	2,01 ± 0,46	23,02 ± 5,26	21,70 ± 2,02	41,21 ± 5,02	7,02×10 ⁶
Фрондозид А	2,65 ± 0,55	20,72 ± 3,48	22,63 ± 3,45	42,90 ± 0,47	3,06×10 ⁶

а). Указано среднее ± стандартное отклонение (n=3);

б). Окончательное количество клеток после объединения трех независимых культур в один пул

Эти данные согласуются с известными результатами по изучению клеточной композиции первичных культур спленоцитов мыши (например, Noubade et al., 2014) и указывают, что полученные 2D-гели должны, в основном, содержать белки из В- и Т-лимфоцитов. Кроме того, нами было показано, что инкубирование спленоцитов с тритерпеновыми гликозидами в иммуностимулирующих концентрациях не приводит к изменениям в композиционном составе первичной культуры клеток. После проведения экспериментов по стимуляции в культуре спленоцитов в трех повторностях мы объединили клетки из селезенок от трех животных в каждой группе, получив около 4×10⁶ клеток в контроле, 7×10⁶ клеток, инкубированных с кукумариозидом А₂-2, и 3×10⁶ клеток, инкубированных с фрондозидом А соответственно.

Общий протеомный анализ всей ткани селезенки. На первом этапе протеомного анализа были проведены исследования протеома всей ткани селезенки целиком. На рисунке 56 показано изображение отсканированного геля после проведенного 2D-электрофореза белков из общей ткани селезенки. Видны хорошо разрешенные пятна белков, а также районы с менее разрешенными кластерами белков. Такую картину, как правило, наблюдали при анализе 2D-гелей белков, получаемых из тканей (Lorenz et al., 2003), когда образцы содержали довольно большое количество крови, так же как и в ткани селезенки. На 2D-гелях, получаемых при анализе ткани селезенки, обнаруживается порядка 700 пятен, из которых методом случайной выборки мы отобрали 96 пятен для идентификации белков с помощью масс-спектрометрии.

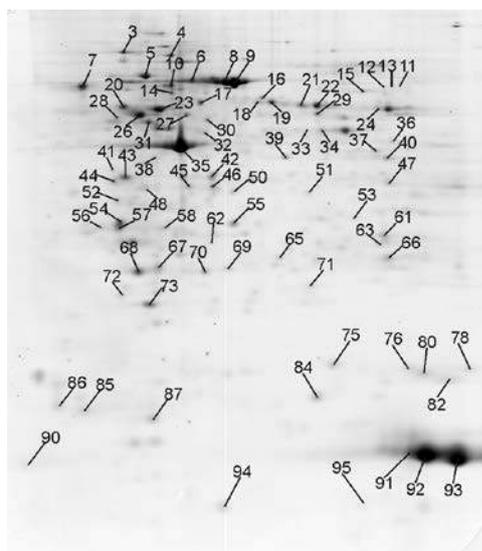


Рис. 56. Изображение 2D-геля белков, полученных из общей ткани селезенки мыши линии Valb/c. Окрашивание с помощью Coomassie Brilliant Blue G-250, загрузка 500 мкг белка, рН 3–10, нелинейный стрип

Из белков, которые были идентифицированы в этих гелях с помощью MALDI-TOF-MS/MS, структуры 51 белка были подтверждены в независимых исследованиях масс-спектрометрическим методом электроспрея (или ионизации распылением в электрическом поле, ESI-MS/MS, данные не представлены). Белковые кластеры в получаемых нами 2D-гелях состояли, главным образом, из групп белков, экспрессирующихся в нескольких изоформах. Они включали в себя сывороточный альбумин (пятна от **6** до **9**), виментин (пятно **23**), α -енолаза (пятна **33** и **34**), актин (пятна **35** и **42**) и гемоглобин (пятна от **90** до **95**). Еще ряд белков с высокой интенсивностью окрашивания на 2D-гелях был идентифицирован как тропомиозин 3 (пятна **54**, **56** и **57**), ламин В1 (пятно **10**), GRB2-related adaptor protein 2 (пятно **68**), коронин 1А (пятно **21** и **22**), и hnRNP К (пятно **14**). Из этих идентифицированных белков коронин 1А и GRB2-related adaptor protein 2 являются одними из характерных белков клеток иммунной системы. На рисунке 54 представлен типичный пример идентификации белка hnRNP К на 2D-геле после электрофоретического разделения белков ткани селезенки мыши (пятно **14** на рис. 56).

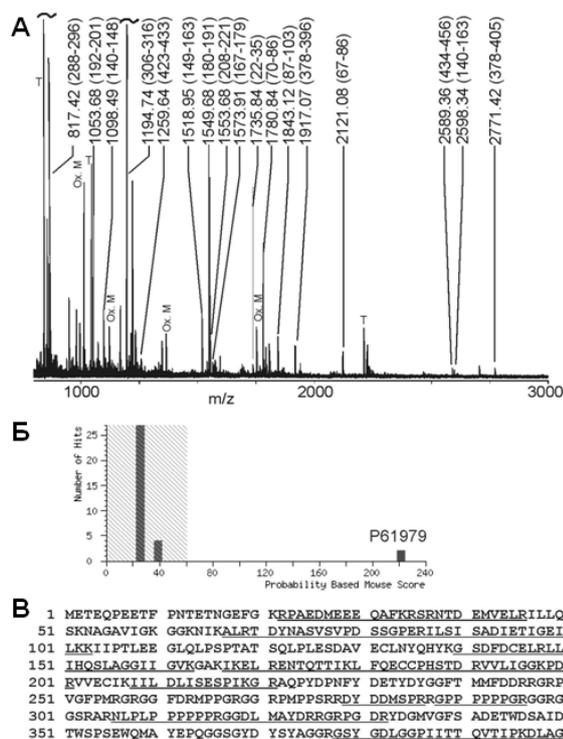


Рис. 57. Масс-спектр (А), оценка вероятности методом MOWSE (MOlecular Weight Search) (Б) и аминокислотная последовательность (В) белка hnRNP К в пятне 14 геля, представленного на рисунке 53

На приведенном масс-спектре (рис. 57А) белка из пятна 14 (см. рис. 56) показан целый ряд сигналов, соответствующих последовательности белка hnRNP К, что позволяет идентифицировать его с высокой степенью достоверности (вероятность правильной идентификации равна 222-м баллам) (рис. 57Б). Сравнение полученной аминокислотной последовательности с известной аминокислотной последовательностью белка hnRNP К выявило более 50% совпадения, что является дополнительным подтверждением правильной идентификации белка в пятне 14 (рис. 57В).

Дифференциальный протеомный анализ первичных культур спленоцитов, иммуностимулированных гликозидами.

а) Стимулирование спленоцитов мыши кукумариозидом А₂-2

Клетки первичной культуры спленоцитов селезенки мыши инкубировали с кукумариозидом А₂-2. Эксперимент проводили в трех независимых повторностях и затем объединенные белковые экстракты из спленоцитов наносили на 2D-гели. Аналогичным образом получали белковые экстракты из контрольных клеток, не инкубированных со стимуляторами. Схема проведения экспериментов представлена на рисунке 58.

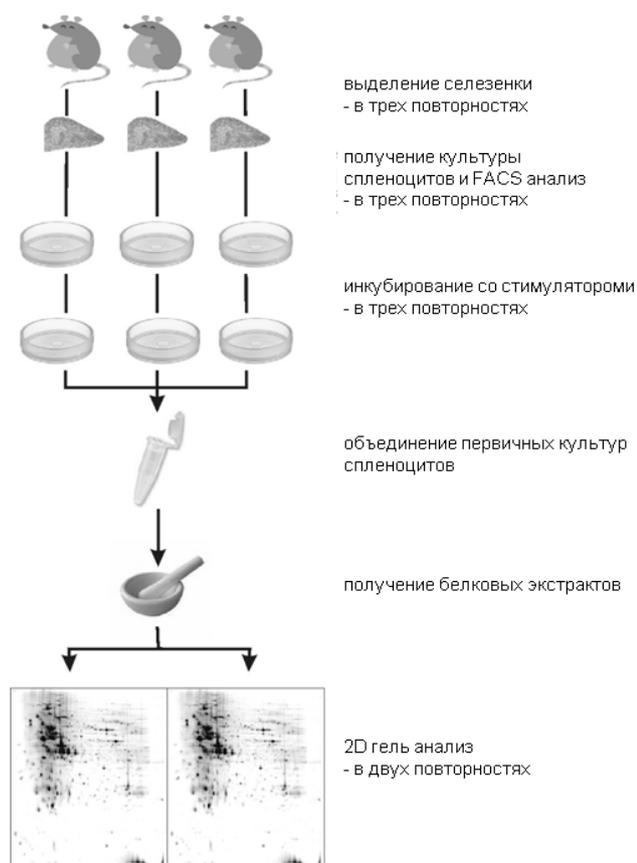


Рис. 58. Схема проведения экспериментов. Стимулирование клеток в первичной культуре проводили в трех повторностях. Затем суспензии спленоцитов объединяли и получали объединенный белковый экстракт. 2D-гель электрофорез и последующий масс-спектрометрический анализ был выполнен в двух повторах

В общей сложности получали по два 2D-геля на каждую экспериментальную группу с загрузкой в 500 мкг общего белка на каждый гель. 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 (рис. 59).

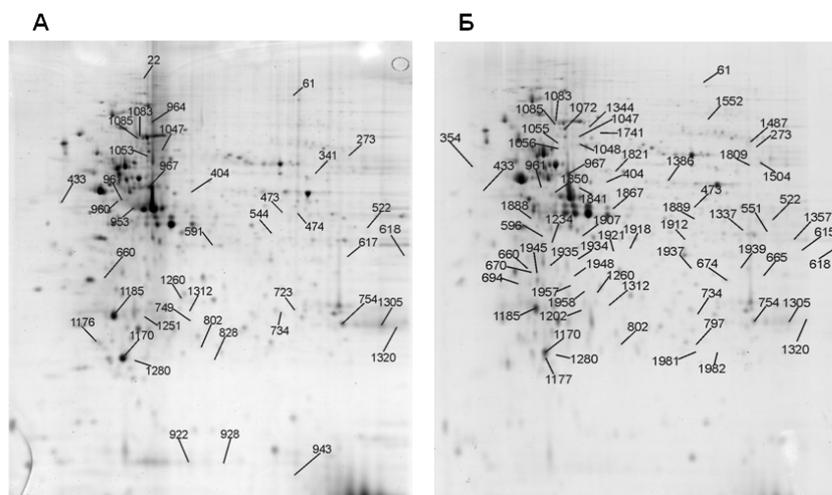


Рис. 59. Изображения 2D-гелей белков спленоцитов мыши линии Balb/c в контроле (А) и после инкубирования с кукумариозидом А₂-2 (Б). Около 1000 белковых пятен визуализировано с помощью окрашивания Coomassie Brilliant Blue G-250, загрузка 500 мкг белка. Нелинейный стрип, рН 3-10 (первое направление) и электрофорез SDS-PAGE, 12% (второе направление). Отмеченные и пронумерованные пятна вырезали и подвергали трипсинолизу в геле с последующим масс-спектрометрическим анализом и идентификацией белков (Таблица 45)

Сравнение 2D-гелей из первичной культуры спленоцитов (рис. 59) и из ткани селезенки (рис. 5б) показало наличие существенных различий между этими гелями. Самое большое различие связано с наличием в гелях от культуры клеток незначительного количества слабоокрашенных пятен кластера в правой нижней части гелей, где был идентифицирован гемоглобин. Этот результат указывает на то, что ткань селезенки содержит гораздо больше крови, чем первичная культура спленоцитов. Во-вторых, количество обнаруживаемых белковых пятен из спленоцитов (около 1000 пятен) существенно больше количества белковых пятен, появляющихся на гелях целой ткани селезенки (700 пятен). Это свидетельствует в пользу увеличения чувствительности метода при переходе от работы с целой тканью к клеточной культуре.

После сравнения изображений 2D-гелей из группы стимуляции с контрольными гелями выбирали один гель на группу для последующего дифференцированного анализа. Регионы с белковыми кластерами (верхние слева регионы в гелях, см. выше) были исключены из анализа. Всякий раз, когда были обнаружены различия между разными гелями, мы проверяли и второй набор гелей на присутствие этих различий. Белки считали дифференциально экспрессированными только если в обоих случаях обнаруживали одинаковые различия в интенсивности белковых пятен. После дифференциального анализа изображений гелей, полученных от стимулированных спленоцитов и контрольных спленоцитов, было выбрано 81 белковое пятно для последующего масс-

спектрометрического анализа. Среди идентифицированных белков из стимулированных кукумариозидом A₂-2 и контрольных спленоцитов были белки, которые также были найдены в 2D-гелях из целой ткани селезенки (смотри выше). Это, например, GRB2-related adaptor protein 2 (пятно **1185**), hnRNP K (пятно **1047**) и ламин B1 (пятна **1083** и **1085**).

В результате дифференциального анализа изображений контрольных и экспериментальных гелей было выявлено порядка 21 белковых пятна, отличающихся уровнем экспрессии (Таблица 45). 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 A₂-2 (рис. 61). 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.

Таблица 45. Дифференциально экспрессируемые белки в спленocyтocyтaх мыши линии Valb/c под действием кукумариозидa A₂-2. Номера белков соответствуют номерам пятен на рисунке 59

№ пятна	Код доступа	Название белка	Контроль		Кукумариозид A ₂ -2		Регуляция	
			Mean	Std. Dev.	Mean	Std. Dev.	quant. ^{a)}	qual.
273	P52480	Pyruvate kinase isozyme M2 (EC 2.7.1.40)	0,017	0,008	0,005	n.a.	0,3	down
433	Q9EQU5	Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A)	0,084	0,009	0,033	0,018	0,4	down
522	Q8CAY6	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	0,033	0,027	0,017	0,010	0,5	down
670	P60710	Actin, cytoplasmic 1 / Actin, cytoplasmic 2	0,063	n.a.	0,018	n.a.	0,3	down
734	P47968	Ribose-5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6)	0,081	0,005	0,018	0,005	0,2	down
961	Q9CZ44	NSFL1 cofactor p47	0,057	0,021	0,020	0,005	0,3	down
961	P60710	Actin, cytoplasmic 1	0,057	0,021	0,020	0,005	0,3	down
1047	P61979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0,210	n.a.	0,028	n.a.	0,1	down
1260	P63260	Actin, cytoplasmic 1 / Actin, cytoplasmic 2	0,104	n.a.	0,026	n.a.	0,2	down
473	P42208	Septin-2	0,004	0,001	0,012	0,005	2,9	up
615	O88569	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	0,012	0,006	0,086	n.a.	6,9	up
665	P68040	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	0,010	n.a.	0,042	0,003	4,0	up
694	P62259	14-3-3 protein epsilon	0,005	n.a.	0,012	0,010	2,6	up
797	P11352	Glutathione peroxidase 1	0,005	0,002	0,027	0,008	5,1	up
1177	Q61171	Peroxiredoxin-2 (EC 1.11.1.15)	0,039	n.a.	0,222	n.a.	5,6	up
1312	Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	0,003	n.a.	0,018	n.a.	5,5	up
1809	Q03265	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	n.d.	-	0,044	n.a.	b)	up
1912	O89100	GRB2-related adaptor protein 2	n.d.	-	0,010	n.a.	b)	up
1948	P60710	Actin, cytoplasmic 1 / Actin, cytoplasmic 2	n.d.	-	0,014	n.a.	b)	up
1957	P60710	Actin, cytoplasmic 1 / Actin, cytoplasmic 2	n.d.	-	0,008	n.a.	b)	up
1958	P60710	Actin, cytoplasmic 1 / Actin, cytoplasmic 2	n.d.	-	0,006	n.a.	b)	up

n.d.: не обнаружено; n.a.: не применимо; а) регулирование: среднее (кукумариозид A₂-2) / среднее (контроль); б) подсчет дифференциальной экспрессии не был выполнен, поскольку не было соответствующих значений в контрольных гелях

б) Стимулирование спленоцитов мыши фрондозидом А

Сходные результаты протеомного анализа были получены нами в экспериментах по стимулированию спленоцитов мыши фрондозидом А (рис. 60). Поскольку оба соединения обладают определенным структурным сходством, то мы предполагали определенное сходство в реакциях иммунных клеток на стимулирующее действие обоих гликозидов. С помощью дифференциального анализа изображения 2D-гелей белков, выделенных из контрольных и инкубированных с фрондозидом А клеток, было обнаружено, что общее число белковых пятен, полученных на гелях из экстрактов клеточных культур, равнялось порядка 1000.

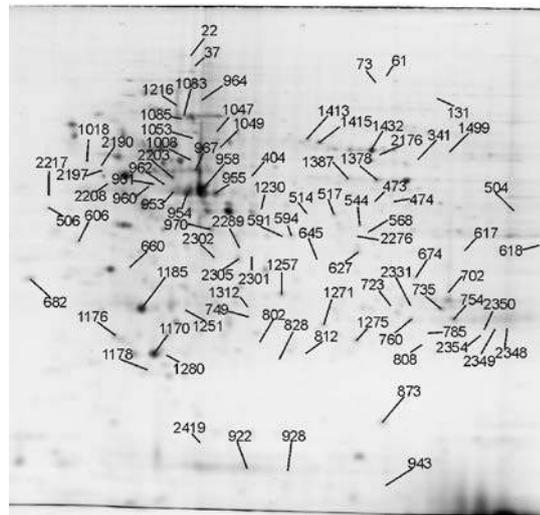


Рис. 60. Изображение 2D-геля с пятнами белков спленоцитов мыши линии Balb/c после инкубирования с фрондозидом А. Около 1000 белковых пятен визуализировано с помощью окрашивания Coomassie Brilliant Blue G-250, загрузка 500 мкг белка. Нелинейный стрип, рН 3–10 (первое направление) и электрофорез SDS-PAGE, 12% (второе направление). Отмеченные и пронумерованные пятна вырезали и подвергали трипсинолизу в геле с последующим масс-спектрометрическим анализом и идентификацией белков (Таблица 46)

Таблица 46. Дифференциально экспрессируемые белки в спленоцитах мыши линии Balb/c под действием фрондозид А. Номера белков соответствуют номерам пятен на рисунке 60

№ пятна	Код доступа	Название белка	Контроль		Фрондозид А		Регуляция	
			Mean	Std. Dev.	Mean	Std. Dev.	quant. ^{a)}	Qual.
22	Q9JKR6	Hypoxia up-regulated protein 1 precursor	0,133	0,128	0,044	n.a.	0,3	down
73	Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein	0,030	n.a.	0,011	0,005	0,4	down
474	Q99LB4	Capping protein	0,098	0,019	0,019	0,004	0,2	down
514	Q9D154	Leukocyte elastase inhibitor A	0,029	0,017	0,015	n.a.	0,5	down
568	O08915	AH receptor-interacting protein	0,037	0,014	0,035	0,022	0,9	down
591	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	0,049	0,043	0,043	0,015	0,9	down
645	Q91WN1	DnaJ homolog subfamily C member 9	0,010	0,003	0,004	n.a.	0,4	down
660	P60710	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	0,064	n.a.	0,013	n.a.	0,2	down
723	P63158	High mobility group protein B1	0,064	0,001	0,013	n.a.	0,2	down
785	P11352	Glutathione peroxidase 1	0,005	n.a.	0,003	0,002	0,6	down
808	P11352	Glutathione peroxidase 1	0,021	0,004	0,019	0,017	0,9	down
828	P29391	Ferritin light chain 1	0,042	0,005	0,017	0,005	0,4	down
960	P60710	Actin, cytoplasmic 1	0,041	n.a.	0,006	n.a.	0,2	down
961	Q9CZ44	NSFL1 cofactor p47	0,057	0,021	0,036	0,018	0,6	down
961	P63260	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	0,057	0,021	0,036	0,018	0,6	down
964	P63260	Actin, cytoplasmic 2	0,303	n.a.	0,087	n.a.	0,3	down
1047	P61979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0,210	n.a.	0,053	n.a.	0,2	down
1053	P60710	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	0,080	n.a.	0,023	n.a.	0,3	down
1251	P60710	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	0,009	n.a.	0,002	n.a.	0,3	down
473	P42208	Septin-2	0,004	0,001	0,010	0,006	2,4	up
504	P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor	0,032	n.a.	0,063	0,048	1,9	up
504	A2AL12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	0,032	n.a.	0,063	0,048	1,9	up
544	Q9DAR7	Scavenger mRNA-decapping enzyme DcpS	0,019	0,005	0,042	0,030	2,2	up
544	Q9QXD6	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	0,018	0,005	0,042	0,030	2,2	up
617	Q9D7G0	Ribose-phosphate pyrophosphokinase I	0,009	n.a.	0,031	0,003	3,3	up
922	Q64475	Histone H2B type 1-B	0,364	0,063	0,583	0,421	1,6	up
928	Q64475	Histone H2B type 1-B	0,057	0,006	0,094	0,063	1,7	up
953	Q9QZ83	Gamma actin-like protein	0,230	0,043	0,541	0,057	2,3	up
953	P60710	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	0,230	0,043	0,541	0,057	2,3	up
1312	Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	0,003	n.a.	0,103	n.a.	31,2	up
2217	P60710	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	n.d.	-	0,056	n.a.	b)	up
2276	O89100	GRB2-related adaptor protein 2	n.d.	-	0,003	n.a.	b)	up
2289	P60710	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	n.d.	-	0,117	n.a.	b)	up
2419	P60710	Actin, cytoplasmic 1/Actin, cytoplasmic 2	n.d.	-	0,077	n.a.	b)	up

n.d.: не обнаружено; n.a.: не применимо; а) регулирование: среднее (фрондозид А) / среднее (контроль); б) подсчет дифференциальной экспрессии не был выполнен, поскольку не было соответствующих значений в контрольных гелях

Список идентифицированных белков в этом эксперименте был аналогичен описанному выше. Тем не менее, были обнаружены некоторые различия, которые включали, например, белок SET (пятно **506**). Cofilin-1 (пятно **873**), и Leukocyte elastase inhibitor A (пятна **514**, **517** и **543**). Однако следует отметить, что в этом случае белки Cofilin-1 и Leukocyte elastase inhibitor A были идентифицированы также и в ткани селезенки. 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 экспрессия 15 белков была ап-регулирована, а экспрессия 19 белков была даун-регулирована (Таблица 46, рис. 61).

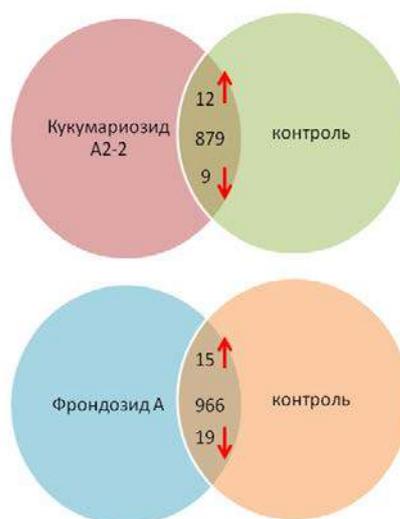


Рис. 61. Влияние кукумариозида А₂-2 и фрондозида А на экспрессию белков в спленоцитах селезенки мышей линии Valb/c. Цифрами указано количество обнаруженных белковых пятен на 2D-геле. Стрелками указаны направления регулирования экспрессии

Среди дифференциально экспрессированных белков были обнаружены даун-регулируемые NSFL1 cofactor p47 (пятно **961**) и hnRNP К (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**). Все эти белки, экспрессированные таким же образом, также были найдены и в экспериментах с использованием стимуляции клеток кукумариозидом А₂-2 (см выше). На рисунке 62 представлены увеличенные изображения пятен на 2D-гелях, соответствующие регулируемым белкам-мишеням в спленоцитах мыши, экспрессия которых значительно изменялась под действием кукумариозида А₂-2 и фрондозида А соответственно.

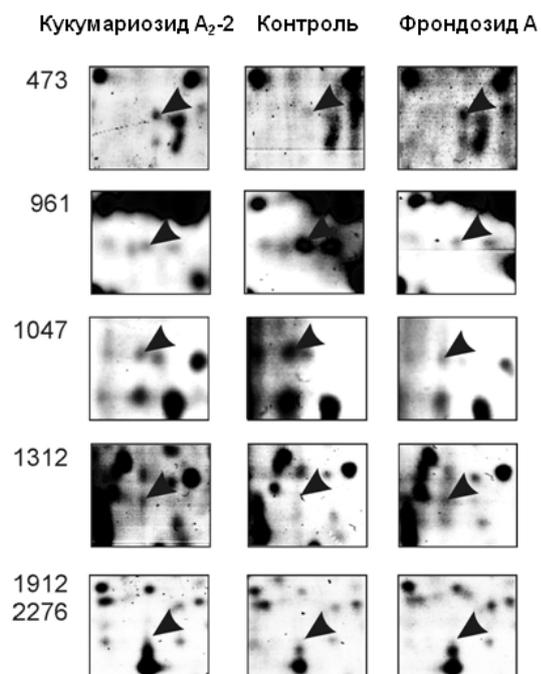


Рис. 62. Увеличенные изображения пятен на 2D-гелях, соответствующие регулируемым белкам-мишеням в спленоцитах мыши под действием кукумариозид A₂-2 и фрондозид А, в сравнении с контролем

Участие идентифицированных нами регулируемых гликозидами белков в биологических процессах и их соответствующее влияние на клеточные процессы мы будем обсуждать в следующем разделе.

в) Роль регулируемых гликозидами белков в процессах иммуностимуляции и пролиферации клеток

Septin-2

Одним из белков, экспрессия которых увеличивалась в ответ на действие тритерпеновых гликозидов в первичных культурах спленоцитов, был Septin-2 (пятно **473** на рис. 59 и 60). Дифференциальная экспрессия этого белка и ряда других регулируемых белков продемонстрирована на увеличенном изображении участков 2D-гелей (рис. 62. Таблица 45 и 46). В литературе Septin-2 описывается как белок, принимающий активное участие в цитокинезе (García et al., 2006). Цитокинез является заключительным этапом клеточного деления и приводит к физическому разделению дочерних клеток. Было обнаружено, что актин и Septin-2 совместно колокализуются в борозде деления эмбриональных фибробластов мыши. Во время митоза индуцируется формирование комплекса Cdc42, p85 и Septin-2, регулирующего цитокинез. Дальнейшие исследования выявили, что вследствие модулирования активности Rab35-регулируемого сигнального пути происходит перемещение белка Septin-2 и липида PIP2 в межклеточный мостик на

конечной стадии цитокинеза. Благодаря этому стало понятным, как формируются липидные домены, имеющие важное значение для терминальных стадий цитокинеза (Kouranti et al., 2006). Вероятно, белок Septin-2 играет роль в регуляции мембранного трафика (Huang et al., 2008). Белки Septin-2 и Septin-11 колокализуются с мембранными структурами, обогащенными актином, на ранних стадиях FcγR-опосредованного фагоцитоза. Фагоцитоз микроорганизмов является важнейшим иммунным ответом целого «оркестра» таких клеток, как нейтрофилы и моноциты/макрофаги. Следовательно, появление сверхэкспрессии белка Septin-2, обнаруженной в наших экспериментах, может быть связано с усилением пролиферации в первичной культуре спленоцитов мыши и усилению фагоцитоза перитонеальных макрофагов при воздействии тритерпеновых гликозидов.

hnRNP K

Белок hnRNP K участвует в переключении клеток млекопитающих от пролиферации к дифференцировке (Yano et al., 2005). Было установлено, что даун-регуляция экспрессии hnRNP K приводит к увеличению трансляции мРНК белка p21. Как следствие, количество p21 в клетках повышается. Такая регуляция экспрессии белка p21 была описана для процесса пролиферации Т-клеток (Nourse et al., 1994). Кроме того, известно, что белок hnRNP K играет важную роль в формировании филоподий и распластывания эмбриональных фибробластов мыши (Yoo et al., 2006). Было установлено, что коэкспрессия белков hnRNP K и N-WASP приводит к отмене распластывания клеток, которая первоначально была N-WASP-стимулирована. Сделано предположение, что ингибирование распластывания клеток с помощью белка hnRNP K опосредовано его способностью взаимодействовать с белком N-WASP и негативно регулировать образование филоподий, стимулированное N-WASP. Хорошо известно, что белок N-WASP является регулятором полимеризации актина путем его взаимодействия с комплексом $\text{arp } 2/3$, участвуя в его нуклеации в клетках. Таким образом, полученные нами результаты хорошо согласуются с предположением о том, что взаимодействие тритерпеновых гликозидов со спленоцитами приводит к перегруппировке цитоскелета в клетках.

NSFL-1 cofactor p47

Белок NSFL-1 cofactor p47 (пятно **961** на рис. 59 и 60) участвует в процессах слияния мембран и перестройки аппарата Гольджи после митоза (Kondo et al., 1997). Во время митоза аппарат Гольджи исчезает и собирается снова уже в дочерних клетках.

Белок p47 является важным кофактором для белка p97 и связывается с рецептором SNARE (soluble NSF attachment protein receptor, syntaxin 5) в процессе слияния мембран

(Dreveny et al., 2004; Uchiyama, Kondo, 2005). Установленный нами факт понижения экспрессии белка NSFL-1 cofactor p47 может означать уменьшение слияния мембран спленоцитов под воздействием тритерпеновых гликозидов и отражает ускорение процессов пролиферации.

GRB2-related adaptor protein 2

Известно, что связывание цитокина M-CSF с внеклеточной частью рецептора M-CSFR вызывает пролиферацию и дифференциацию моноцитов в макрофаги путем инициации определенного сигнального каскада (Glocker et al., 1996). Белок GRB2-related adaptor protein 2 (или Mona/Gads) (пятно **1912** в Таблице 45 и **2276** в Таблице 46) принимает участие в процессах дифференцировки моноцитов путем связывания с рецептором M-CSFR в цитозольной области, передавая, таким образом, внешний стимулирующий сигнал во внутриклеточное пространство (Bourgin et al., 2002). Во время дифференцировки клеток костного мозга, стимулированной цитокином M-CSF, в макрофаги происходит индуцирование экспрессии Mona и Gab3; эти белки взаимодействуют между собой и формируют мультимолекулярный комплекс. Эти данные свидетельствуют о том, что ассоциация Mona и Gab3 играет существенную роль в проведении сигнала дифференциации. Кроме того, установлено, что белки Mona/Gads участвуют в процессах пролиферации. Обнаружено, что для CD4⁺ Т-клеток мышей, дефицитных по Gads, характерен высокий уровень спонтанной гибели клеток и высокая восприимчивость к CD95-индуцированному апоптозу. Это свидетельствует о важной роли белка GRB2-related adaptor protein 2 в поддержании гомеостаза CD4⁺ Т-клеток (Yankee et al., 2004). Таким образом, наблюдаемое нами увеличение экспрессии этого белка в спленоцитах мыши в ответ на действие тритерпеновых гликозидов может быть интерпретировано как увеличение времени жизни CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток под действием исследуемых веществ.

NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3

Митохондрии являются динамическими внутриклеточными органеллами, играющими центральную роль в клеточном метаболизме и генерирующими АТФ посредством окислительного фосфорилирования. Убихинон оксидоредуктаза (комплекс I) является первым ферментным комплексом в электронно-транспортной цепи митохондрий, при этом частью этого комплекса является белок NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3. Его повышенную экспрессию в спленоцитах мыши (пятно **1312** на рис. 59 и 60) вследствие действия тритерпеновых гликозидов можно рассматривать как показатель интенсификации энергоснабжения клеток, что является необходимым

условием для усиления таких клеточных функций, как пролиферация и иммуностимуляция.

г) Верификация дифференциальной экспрессии белков иммуноферментным методом

В результате проведенных работ по анализу регулируемых белков, мы выбрали два белка (Septin-2 и hnRNP K), экспрессия которых одинаково регулируется как кукумариозидом A₂-2, так и фрондозидом А, для их верификации иммуноферментным анализом (ИФА).

В результате проведенного ИФА анализа было установлено, что стимуляция спленоцитов кукумариозидом A₂-2 приводила к достоверному снижению содержания белка hnRNP K в клетках ($p < 0,05$), что согласуется с данными протеомных исследований (рис. 63А). 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 кукумариозида A₂-2.

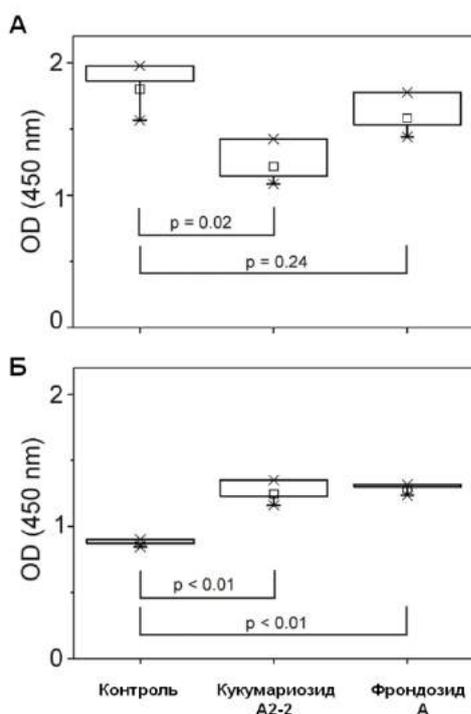


Рис. 63. Влияние кукумариозида A₂-2 и фрондозида А на количественное содержание белков hnRNP K (А) и Septin-2 (Б) в спленоцитах мышей линии Balb/c Результаты получены с помощью ИФА анализа (sandwich-ELISA) и представлены в виде «box-and-whiskers» диаграммы, указывающей срединные значения (медиана) и значения разброса в выборке

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 (рис. 63Б). 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.

Таким образом, результаты регулирования ряда белков в спленоцитах мыши после их инкубирования с иммуномодулирующими дозами тритерпеновых гликозидов, полученные методами протеомики, были подтверждены в независимых экспериментах методом иммуноферментного анализа.

д) 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 фрондозид А на пролиферацию спленоцитов в экспериментах *in vitro*.

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

Таблица 47. Влияние тритерпеновых гликозидов кукумариозида А₂-2 и фрондозид А на уровень включения [³H]-тимидина в ДНК спленоцитов мышей линии Balb/c

Митоген	Индекс стимуляции (ИС) ^{а) б)}		
	Контроль	Фрондозид А	Кукумариозид А ₂ -2
-	1 (775,6 ± 94,1)	1,7* (1287,0 ± 46,7)	1,7* (1331,6 ± 139,9)
ЛПС	4,2** (3249,4 ± 136,6)	5,2** (4017,2 ± 589,8)	5,3**/**** (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 спленоцитов мыши, инкубированных с кукумариозидом А₂-2 либо с фрондозидом А. Уровень пролиферации спленоцитов 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 47). 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, экспрессия которых одинаковым образом регулируется в спленоцитах после их инкубирования с тритерпеновыми гликозидами. 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 описания 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. Для подтверждения молекулярных механизмов действия гликозидов и выявления мишеней их иммуностимулирующего действия, были проведены эксперименты по выявлению влияния кукумариозид А₂-2 и фрондозид А на процессы клеточной пролиферации и адгезии. Методом радиоспектроскопии меченых предшественников биосинтеза ДНК в клетках было установлено, что в иммуностимулирующих дозах оба гликозида вызывают достоверное усиление пролиферации (бласт-трансформацию) изолированных спленоцитов, инкубируемых как в присутствии митогенов (ЛПС), так и без них. Обнаружено, что в этих же концентрациях гликозиды усиливают адгезию и подвижность спленоцитов на одном из компонентов внеклеточного матрикса – коллагене I (флуоресцентная спектроскопия).

Селезенка является одним из основных органов-мишеней, в которых происходит процесс иммуностимулирования. Попавшие в организм антигены с током крови

направляются в этот орган, где зрелые лимфоциты, происходящие из клеток костного мозга или тимуса, контактируют с циркулирующими антигенами, например, гемотрансмиссивными бактериями. Контакт лимфоцитов с антигенами является первым этапом, который необходим для того, чтобы привлечь внимание лимфоцитов для целенаправленного иммунного ответа (Fathman et al., 2005). На втором этапе для начала пролиферации антиген-активированных лимфоцитов, которую можно рассматривать как одну из основных реакций иммунного ответа, поступают сигналы от Т-хелперов. Кроме того, описан и ряд других последующих процессов костимуляции, имеющих важное значение для инициирования иммунного ответа (Ermann, Fathman, 2003). Иммуностимулирование включает в себя сложные клеточные процессы, в частности, пролиферацию лимфоцитов, которую можно рассматривать как одну из основных реакций иммунного ответа. Известно, что природные митогены, такие как ЛПС, вызывают интенсивное усиление трансформации лимфоцитов и последующую пролиферацию. Такие митогены часто используются в качестве положительного контроля в исследованиях митогенных эффектов и иммуномодулирования.

Оценивая пролиферацию клеток после воздействия тритерпеновых гликозидов голотурий, мы установили, что эти препараты могут вызывать стимуляцию спленоцитов. Следует отметить, что когда спленоциты инкубировали с кукумариозидом A₂-2 или фрондозидом А в присутствии ЛПС, то наблюдали дополнительную стимуляцию клеток. Результаты нашего анализа протеома стимулированных спленоцитов мыши показали, что белки, принимающие участие в формировании цитоскелета, в клеточной адгезии и подвижности, экспрессированы дифференцированно. Хотя мы не получили полную картину участия актина в этих процессах, очевидно, что экспрессия актина (и его изоформ) также существенно меняется при стимуляции спленоцитов тритерпеновыми гликозидами. Было обнаружено порядка 13 пятен белков, соответствующих актинам, экспрессия которых либо подавляется, либо остается неизменной. Актины совместно с септинами (septins) представляют собой группы белков, которые координируют многие внутриклеточные функции, в основном, реорганизацию цитоскелета, моторику и фагоцитоз (Spiliotis, Nelson, 2006; Huang et al., 2008).

В процессе протеомного анализа мы, в основном, делали акцент на водорастворимые (цитоплазматические) белки, в то время как нерастворимые белковые мембранные рецепторы, как правило, обнаружить на 2D-гелях не удалось. Поэтому такие белковые рецепторы, как ICAM, VCAM и ряд других, не попали в список белков, анализируемых с помощью данного подхода. Тем не менее, обнаружение белков, экспрессия которых в спленоцитах регулируется тритерпеновыми гликозидами, позволяет

глубже понять субклеточные и молекулярные процессы, вовлеченные в иммуностимуляцию спленоцитов. Результаты анализа протеома спленоцитов ясно показывают, что тритерпеновые гликозиды голотурий стимулируют в клетках иммунной системы мышей процессы пролиферации. Благодаря нашим исследованиям стало очевидно, что гликозиды регулируют экспрессию ряда белков, участвующих в клеточном цикле и в контроле за клеточным циклом. Можно предположить, что тритерпеновые гликозиды голотурий способствуют усилению клеточного иммунитета, который необходим для борьбы с патогенными микроорганизмами.

3.8.2. Исследование эстрогенной активности тритерпеновых гликозидов

Известно, что основной мишенью в клетках для эстрогена и эстрогеноподобных соединений является ядерный стероидный рецептор (ER-рецептор), связывающий специфически стероидные гормоны и регулирующий экспрессию эстроген-индуцибельных генов (Mainwaring, 1980). В клетках теплокровных животных и человека инактивированные ER-рецепторы существуют в больших комплексах, ассоциированные с белками теплового шока. После связывания эстрогена с ER-рецептором белки теплового шока диссоциируют, приводя тем самым к конформационному изменению комплекса; это изменение активирует рецептор и вызывает его димеризацию. Получившийся гомодимерный комплекс проявляет высокое сродство к специфической последовательности ДНК, находящейся в регуляторном регионе эстроген-индуцибельных генов. Связывание с этим участком инициирует биосинтез транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, активируют экспрессию гена-мишени. Затем мРНК транслируется в белки, являющиеся окончательными эффекторами наблюдаемых ответов клетки. Путем индуцирования синтеза новых белков, влияющих на клеточные функции, эстрогены очень эффективно воздействуют на различные биохимические и физиологические процессы. Ксеноэстрогены или миметики могут действовать как ER-лиганды и связываться с рецепторами, модулируя таким образом эндокринные метаболические пути через рецептор-опосредованный процесс.

Используя созданную нами в рамках данной работы двугибридную дрожжевую тест-систему, содержащую эстрогенные рецепторы человека и репортерный ген β -галактозидазы, мы провели определение эстрогенной активности 17β -эстрадиола, который в такого рода исследованиях всегда применяют в качестве положительного контрольного соединения (рис. 64). Тест-система обнаруживает взаимодействие эстрадиола с эстрогенным рецептором уже при концентрации стероида 10^{-10} М. Дозозависимость носит практически линейный характер в диапазоне концентраций эстрадиола от 10^{-10} М до 10^{-5}

М. Затем при увеличении концентрации до 10^{-4} М наступает насыщение связывания лиганда с рецептором. Эффективная концентрация ($ЭК_{50}$) для эстрадиола равна примерно 5×10^{-8} М, что довольно близко к активности этого гормона, оцениваемой с помощью других тест-систем (Nishikawa et al., 1999; Nishihara et al., 2000).

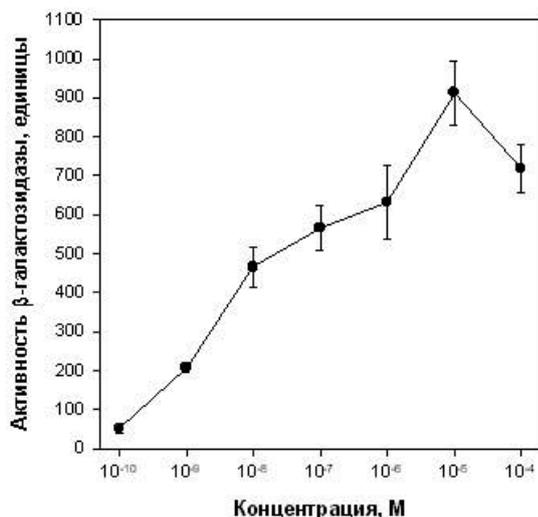


Рис. 64. Дозозависимая кривая активности 17β -эстрадиола в дрожжевой двугибридной тест-системе. Стероид был добавлен в культуру дрожжей в концентрациях от 10^{-10} М до 10^{-4} М. Через 4 часа инкубирования культуру анализировали на наличие активности β -галактозидазы. Время инкубирования дрожжевой культуры с ONPG 30 мин. Активность β -галактозидазы представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение из результатов трех независимых экспериментов

Таким образом, созданная нами дрожжевая двугибридная тест-система представляет очень удобную модель для скрининга и определения эстрогенной активности образцов, содержащих как индивидуальные вещества, так и сложные смеси соединений. Она позволяет оценить общую биологическую активность компонентов, которые действуют через механизм связывания с ядерными стероидными рецепторами и последующей активации экспрессии определенных генов. Чувствительность и воспроизводимость метода сопоставима с уже существующими тест-системами на основе дрожжевых клеток.

Ряд авторов связывает наблюдаемые физиологические эффекты тритерпеновых гликозидов с определенной структурной схожестью между гликозидами и стероидными гормонами, такими как глюкокортикоиды, и с их связыванием со стероидными рецепторами (Odashima et al., 1985; Lee et al., 1993; Попов и др., 1994). В связи с этим обстоятельством мы исследовали взаимодействие некоторых гликозидов морских животных и растений со стероидными рецепторами с использованием дрожжевой

двугибридной тест-системы, содержащей рецептор эстрогена человека hER α и репортерный ген β -галактозидазы, чтобы проверить и оценить это предположение.

С этой целью было проведено сравнительное исследование эстрогенной активности нескольких тритерпеновых гликозидов голотурий и растений. Использовали следующие соединения: гликозиды голотурий, такие как голотурин А, голотоксин А₁, фрондозид А, кукумариозид А₂-2 и гликозиды растительного происхождения, такие как каулозид С и гинзенозид Rh₂. Эстрогенную активность исследуемых соединений сравнивали с активностью 17 β -эстрадиола при концентрации 10⁻⁷ М (положительный контроль) и дрожжевых клеток без какой-либо химической обработки (отрицательный контроль). Активность тестируемых соединений считали положительной только при значении $p < 0,05$ (t -критерий Стьюдента) по сравнению с отрицательным контролем.

Полученные результаты представлены на рисунке 65. Установлено, что из всех исследованных соединений только один растительный гликозид из женьшеня, гинзенозид Rh₂, проявлял умеренную достоверную эстрогенную активность в диапазоне концентраций 10⁻⁷-10⁻⁶ М. При применении в концентрации 10⁻⁷ М его эффект составил примерно 30% от активности 17 β -эстрадиола, применяемого в полумаксимальной эффективной концентрации 10⁻⁷ М. Для двух гликозидов, выделенных из голотурий, а именно голотурина А (10⁻⁶-10⁻⁸ М) и голотоксина А₁ (10⁻⁶-10⁻⁸ М), обнаружена лишь незначительная тенденция к проявлению эстрогенной активности в этом анализе и слабая (недостоверная) стимуляция экспрессии β -галактозидазы.

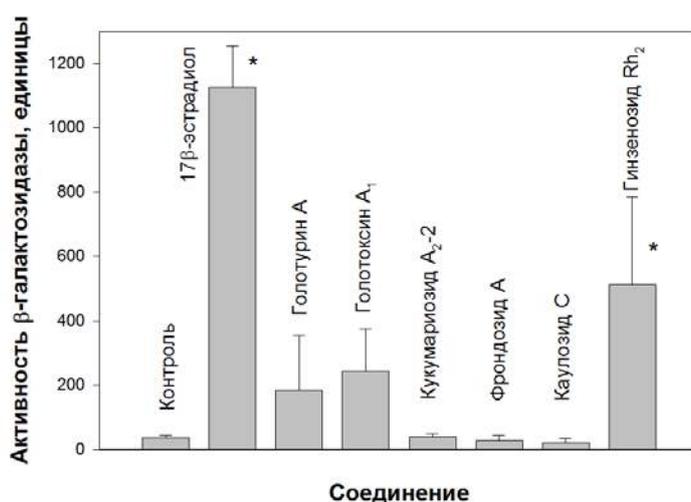


Рис. 65. Эстрогенная активность ряда тритерпеновых гликозидов (оценка с помощью дрожжевой двугибридной тест-системы, содержащей hER α рецептор). Активность выражали в единицах активности репортерного гена β -галактозидазы (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 5$). Эффект низких концентраций соединений 10⁻⁷ М (*) указывает на достоверное отличие от отрицательного контроля

Никаких положительных результатов не было обнаружено при исследовании эстрагенной активности кукумариозида А₂-2, фрондозид А и каулозида С в диапазоне концентраций 10⁻⁹-10⁻⁵ М.

В литературе существует лишь ограниченная информация относительно гормональной активности тритерпеновых или стероидных гликозидов. Некоторые исследования показали, что растительный тритерпеновый гликозид глицирризин проявляет эстрогенную активность в тестах с лабораторными животными и стимулирует выделение гормонов коры надпочечников (British Herbal Compendium, 1992). Глицирризин имеет химическую структуру, сходную со структурой кортикостероидов, синтезируемых в коре надпочечников. В ряде исследований было показано, что это свойство гликозида может оказаться полезным для улучшения функции гормональных лекарств. Кроме того, гликозид может использоваться в качестве вспомогательного средства для уменьшения или отмены зависимости от некоторых кортикостероидных гормонов (Quaschnig et al., 2001).

Было оценено связывание биологически активных гликозидов женьшеня *Panax ginseng* гинзенозида Rh₁ и гинзенозида Rb₁ с рецепторами стероидных гормонов в сравнении с эстрогеном, глюкокортикоидами, андрогенами и ретиноевой кислотой (Lee et al., 2003a, 2003b; Cho et al., 2004). Обнаружено, что гинзенозиды Rh₁ и Rb₁ способны активировать транскрипцию эстроген-зависимого репортерного гена люциферазы в MCF-7 клетках рака молочной железы при концентрации 50 мкМ. Такая активация ингибировалась специфическим антагонистом ER-рецептора ICI 162 780. Это свидетельствует о том, что эстрогенный эффект гинзенозидов является рецептор-зависимым. Тем не менее, гинзенозиды оказались неспособны активировать глюкокортикоидные рецепторы, андрогенные рецепторы или рецептор ретиноевой кислоты в CV-1 клетках, трансфицированных соответствующими генами. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что гинзенозиды могут действовать как слабые фитоэстрогены, вероятно, за счет связывания с ER-рецептором и его последующей активации (Lee et al., 2003a, 2003b). Аналогичные результаты получены для гинзенозида Rg₁, выделенного из женьшеня *P. notoginseng*. Было показано, что гинзенозид Rg₁ может выступать в качестве аналога эстрогена в стимуляции роста клеток рака молочной железы человека, а также в активации элемента ответа на эстроген – влияет на активность люциферазы в трансгенных клетках HeLa-luc и на пролиферацию рецептор-положительных MCF-7 клеток. Такую стимуляцию можно было блокировать с помощью антагониста ICI 162 780 (Chan et al., 2002). С другой стороны, в тестах по радиолигандному взаимодействию обнаружено, что гинзенозиды Rb₁ и Rg₁ неспособны вытеснить [³H]-17β-

эстрадиол из мест его связывания с ER-рецепторами в MCF-7 клетках. Эти результаты указывают на то, что эстроген-подобная активность этих гинзенозидов не зависит от непосредственной ассоциации с эстрогеновым рецептором, и эти соединения следует классифицировать как новый класс потенциальных фитоэстрогенов (Chan et al., 2002; Cho et al., 2004). Посредством методов аффинной ультрафильтрации и ЖХ/МС было показано, что тритерпеновые гликозиды, такие как цимицифугозид, цимицифугозид F и 27-деоксиактеин (содержится в растении *Cimicifuga racemosa*) или их ферментативно полученные агликоны и метаболиты агликонов, не связываются достоверно с лиганд-связывающим доменом эстрогенового рецептора ER β , за исключением агликона 27-деоксиактеина, который показал слабую аффинность связывания (4%) (Onorato, Henion, 2001).

Взаимосвязь между химической структурой и эстрогенной активностью интенсивно изучали с использованием дрожжевой двугибридной тест-системы для оценки гормоноподобных свойств большого количества веществ, в том числе природных соединений, лекарственных средств, пестицидов и промышленных химикатов (Nishihara et al., 2000). Результаты этих исследований показали, что большинство соединений, продемонстрировавших «положительный» эффект, имели в своем составе фенольное кольцо с соответствующим гидрофобным фрагментом в *para*-положении. Но замена локализации фрагмента на *ortho*-положение снижала активность соединений. В некоторых случаях растворимость химических веществ в воде и плохая проницаемость соединений в дрожжевые клетки были основной причиной снижения или отсутствия эстрогенной активности.

В наших экспериментах только один гликозид растительного происхождения, гинзенозид Rh₂, обладал умеренной эстрогенной активностью. Этот результат хорошо согласуется с приведенными выше данными об эстрогеноподобном действии некоторых гликозидов женьшеня со сходными химическими структурами. Мы показали, что тестируемые тритерпеновые гликозиды голотурин и гликозид растительного происхождения каулозид С не индуцировали значимое увеличение экспрессии β -галактозидазы.

Очевидно, что исследуемые нами тритерпеновые гликозиды не проявляли никакой эстрогенной активности из-за существенных различий в их химических структурах по сравнению с 17 β -эстрадиолом. Гликозиды голотурин А, голотоксин А₁, кукумариозид А₂-2 и фрондозид А имеют агликоны с 18(20)-лактонным циклом и длинные углеводные

цепи. Каулозид С отличается от 17β-эстрадиола еще больше, поскольку он имеет шестичленное кольцо D в сочетании с шестичленным кольцом E (рис. 66).

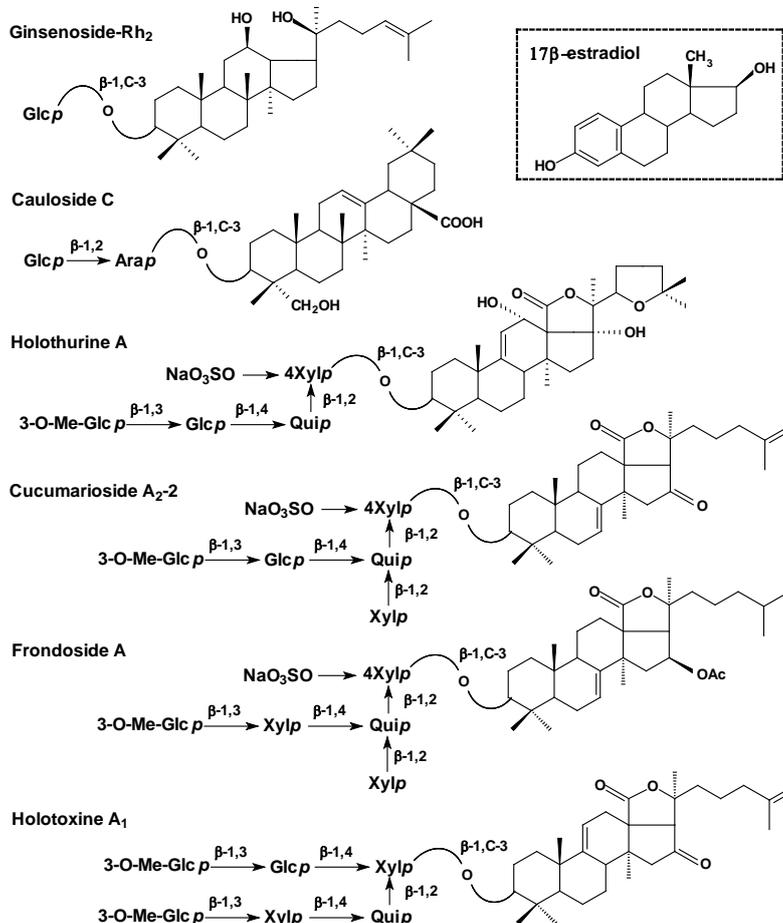


Рис. 66. Химические структуры тритерпеновых гликозидов

В то же время гинсенозид Rh₂ имеет некоторое сходство с 17β-эстрадиолом: он имеет гидроксильную группу, присоединенную к C-20, и кольцо D, сходное с таковым у 17β-эстрадиола, имеющего гидроксил, прикрепленный в 17β-положении кольца D. Следовательно, наличие достоверной эстрогенной активности у гинсенозида Rh₂, а также практическое отсутствие эстрогенной активности у каулозида С, фрондозид А и кукумариозида А₂₋₂ и наличие очень ограниченной активности у голотоксина А₁ и голотурин А не является фактом, вызывающим удивление. Два последних вещества имеют 9(11)-двойную связь, которая отвечает за конфигурацию колец С и D в их агликонах. Это также может иметь решающее значение для проявления эстрогенной активности. Наши результаты показывают, что характер кольца D в стероидо-подобном тритерпеновом агликоне тестируемых сапонинов и окружение кольца D являются весьма существенными факторами для эстрогенной активности. Таким образом, нами было

показано, что тритерпеновые гликозиды голотурий, и кукумариозид A_2-2 в частности, не взаимодействуют с эстрагенными рецепторами и не обладают эстрогенной гормоноподобной активностью.

3.8.3. Взаимодействие кукумариозида A_2-2 с мембранами иммунокомпетентных клеток

Связывание 3H -кукумариозида A_2-2 с перитонеальными макрофагами мыши

Одним из самых распространенных способов поиска рецепторов и изучения их взаимодействия со специфическими лигандами является радиолигандный (или радиорецепторный) метод. В основе метода лежит количественное определение радиоактивно-меченного специфического лиганда, связанного либо с мембранами, обогащенными рецепторами, либо с самими рецепторами (Варфоломеев, Гуревич, 1999).

В данном исследовании мы изучали специфику связывания 3H -кукумариозида с перитонеальными макрофагами мыши, культивируемыми в монослое *in vitro*. При концентрации радиоактивно-меченного гликозида в культуральной среде, равной 455 нМ, равновесие при комнатной температуре было достигнуто достаточно быстро - за 90-120 мин, а максимальное насыщение связывания было достигнуто за 2 ч (рис. 67).

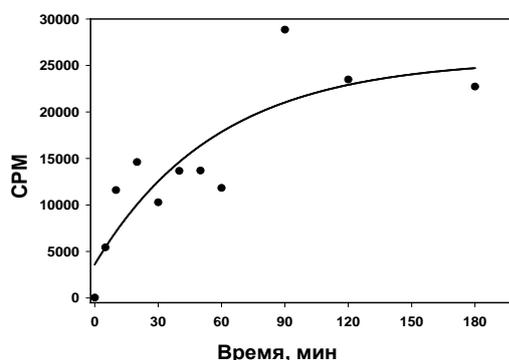


Рис. 67. Зависимость связывания 3H -кукумариозида A_2-2 (455 нМ) с перитонеальными макрофагами мышей линии BALB/c от времени инкубации при комнатной температуре. Указаны средние значения из 3-х экспериментов

Концентрационная зависимость связывания 3H -кукумариозида A_2-2 с клетками (рис. 68А) носит нелинейный S-образный характер: при концентрации гликозида порядка 400–500 нМ кривая зависимости достигает «плато». Расчет параметров связывания свидетельствует о сложном характере взаимодействия гликозида с макрофагами. Данные, представленные в координатах Скэтчарда (рис. 68Б), 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 ($Kd_1 HI = 3,07 \text{ нМ}$) и низкой аффинностью ($Kd_2 LO = 489,6 \text{ нМ}$) (Таблица 48).

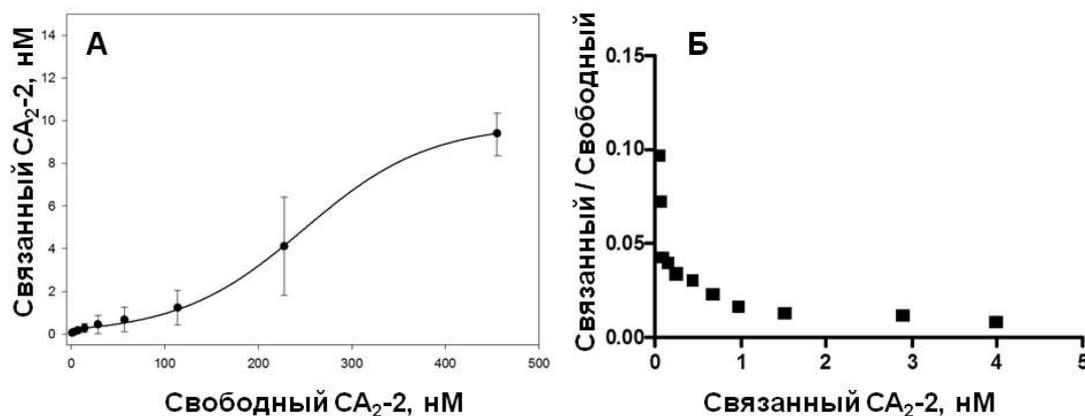


Рис. 68. А – Связывание ³Н-кукумариозида А₂-2 (СА₂-2) с перитонеальными макрофагами мышей линии BALB/с. Среда: 145 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, рН 7.4. Комнатная температура, время инкубации 2 часа. 96-луночные планшеты, объем инкубационной среды – 100 мкл (2×10⁵ клеток/мл). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 7). Б – Определение параметров связывания ³Н-кукумариозида А₂-2 с перитонеальными макрофагами мыши в координатах Скэтчарда

Таблица 48. Параметры связывания ³Н-кукумариозида А₂-2 с перитонеальными макрофагами мыши

Параметры связывания	Рассчитанные значения
$B_{max} HI$	0,195 нмоль/ 2×10 ⁵ клеток
$Kd_1 HI$	3,07 нМ
$B_{max} LO$	7,97 нмоль/ 2×10 ⁵ клеток
$Kd_2 LO$	489,6 нМ

Ранее мы показали, что кукумариозид А₂-2 при взаимодействии с макрофагами мыши проявляет бифункциональную активность. С одной стороны, это цитотоксическое соединение, проявляющее свои мембранолитические свойства в микромолярном диапазоне концентраций. Полумаксимальная цитотоксическая концентрация для кукумариозида А₂-2 в отношении макрофагов мыши составляет порядка 3 мкМ. В результате взаимодействия с мембранным холестерином гликозид формирует ионопроводящий комплекс, обуславливающий проницаемость биомембран с их последующим лизисом и гибелью клеток в целом. Существует мнение, что холестерин выступает в роли акцептора гликозидов голотурий на биомембранах и является одним из необходимых молекулярных элементов для проявления цитотоксичности гликозидов

голотурий. Вероятнее всего, что именно низкоаффинная константа связывания Kd_2 LO, равная примерно 0,5 мкМ, характеризует взаимодействие гликозида с холестерином мембран макрофагов.

С другой стороны, в супернизких наномолярных концентрациях кукумариозид A_2-2 выступает в качестве эффективного иммуностимулятора, активируя разнообразные функции иммунокомпетентных клеток. С большой долей вероятности можно утверждать, что на мембранах макрофагов существуют определенные специфические рецепторы, благодаря связыванию с которыми кукумариозид A_2-2 индуцирует иммуностимулирующий ответ клеток. Для связывания с этими рецепторами характерна высокая аффинность с константой Kd_1 HI, равной 3 нМ.

3.8.4. Влияние кукумариозид A_2-2 на микровязкость биомембран

Режим функционирования биологических мембран в значительной степени зависит от микровязкости липидного бислоя, подвижности фосфолипидных молекул в мембране и фазового состояния мембранных липидов (Бажурин, Панов, 1986). Хорошо известно, что изменение микровязкости (текучести или вязкости липидной фазы мембраны) биомембран существенно сказывается на функционировании различных мембранных процессов, включая образование олигомерных ансамблей ферментов, скорости протекания ферментативных реакций, эффективность функционирования трансмембранных переносчиков, конформационные преобразования рецепторов при взаимодействии со специфическими лигандами и целый ряд других. Помимо этого, изменение микровязкости может быть связано с непосредственным встраиванием мембранотропных соединений в липидный бислой.

Одним из распространенных флуоресцентных зондов, используемым для измерения микровязкости мембран, является пирен. Он концентрируется в гидрофобных компартментах мембраны между остатками жирных кислот липидов, и его эксимеризация пропорциональна подвижности молекул в бислое и, следовательно, микровязкости мембраны. Известно, что фазовые переходы липидного бислоя, так же как и ориентация ацильных цепей, вносят значительный вклад во флуоресцентные характеристики пирена, локализованного в клеточных мембранах. Поэтому изменение параметров эксимеризации пирена после добавления тестируемого соединения к клеткам может происходить за счет изменений в структурной анизотропии биологических мембран вследствие встраивания вещества в мембраны или отражать конформационные изменения определенных мембранных структур (Владимиров, Добрецов, 1980; Болдырев и др., 1986).

В данном исследовании мы использовали пирен для регистрации влияния кукумариозида A₂-2 на изменения микровязкости биомембран спленоцитов мыши. Было установлено, что инкубирование иммунных клеток с гликозидом приводит к существенному изменению микровязкости мембран, регистрируемому по степени эксимеризации пирена (рис. 69А). В присутствии кукумариозида A₂-2 наблюдали выраженное уменьшение степени эксимеризации флуоресцентного зонда, отражающее увеличение микровязкости клеточных мембран.

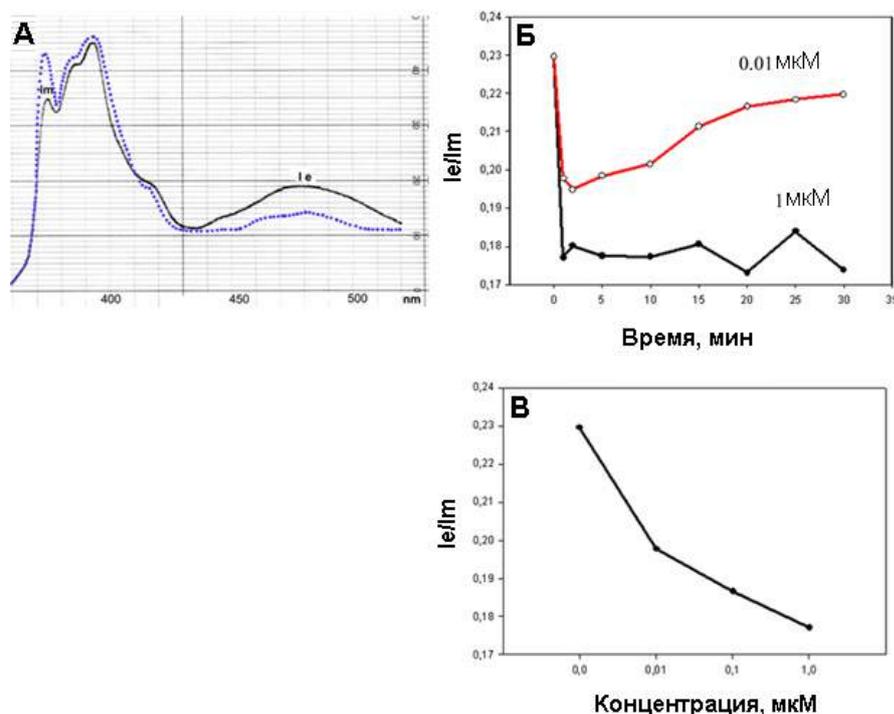


Рис. 69. Влияние кукумариозида A₂-2 на эксимеризацию пирена в спленоцитах селезенки мышей линии Balb/c. **А** – спектр флуоресценции пирена в клеточных мембранах: контроль (сплошная линия) и после экспозиции с гликозидом (прерывистая линия); **Б** – зависимость степени эксимеризации пирена от времени инкубирования клеток с кукумариозидом A₂-2; **В** – зависимость степени эксимеризации пирена от концентрации гликозида. Время инкубирования с клетками 1 мин

Влияние тестируемого гликозида на микровязкость биомембран носило линейный дозозависимый характер. Минимальное изменение параметров эксимеризации пирена наблюдали при концентрации гликозида 0,01 мкМ, а максимальное – при концентрации гликозида 1 мкМ (рис. 69В). Изменение микровязкости клеточных мембран при взаимодействии с гликозидом происходило достаточно быстро: максимальное увеличение микровязкости регистрировали в течение первых 2 мин после добавления гликозида в инкубационную среду независимо от применяемой концентрации гликозида (рис. 69Б).

В то же время, динамика изменения микровязкости биомембран во времени зависела от концентрации гликозида. Так, при концентрации 1 мкМ гликозид вызывал резкое

увеличение микровязкости – высокий уровень микровязкости оставался неизменным на протяжении длительного времени (30 мин). Однако при концентрации 10 нМ наблюдали выраженную обратимость действия гликозида кукумариозида А₂-2. В этом случае было зарегистрировано восстановление степени эксимеризации зонда почти до исходного уровня примерно через 15 мин после начала эксперимента.

Такое обратимое изменение микровязкости биомембран спленоцитов в присутствии наномолярных концентраций гликозида может отражать ряд различных событий:

- спустя определенное время гликозид может мигрировать и перераспределяться в мембранах внутриклеточного компартмента;
- кукумариозид А₂-2 может подвергаться трансформации и деградации в биомембранах с участием гликозидаз; и наконец
- гликозид может взаимодействовать со специфическими рецепторами на мембранах, что приводит к временной и обратимой конформационной трансформации последних и изменению микровязкости липидного окружения.

В случае применения микромолярных концентраций кукумариозида А₂-2 (1 мкМ) наблюдаемое изменение микровязкости было необратимо на протяжении существенного отрезка времени. Это может отражать проявление мембранотропных свойств гликозида, его связывание с биомембранами и образование стабильного комплекса с холестерином.

3.8.5. Влияние кукумариозида А₂-2 на мембранный потенциал перитонеальных макрофагов мыши

Мембранный потенциал (МП) представляет собой разность электрических потенциалов, существующую у живых клеток между их цитоплазмой и внеклеточной жидкостью. Его величина формируется за счет разности концентраций потенциал-образующих ионов, а также избирательной ионной проводимости мембраны. Взаимодействие определенных медиаторов со специфическими рецепторами, ионными каналами, ионными насосами и обменниками сопровождается изменением МП вследствие возникновения трансмембранных токов, что обеспечивает начальные этапы передачи различных сигналов в клетку, регуляцию ряда физиологических процессов клеточного метаболизма и запуск широкого спектра внутриклеточных сигнальных событий (Шемарова, 2007).

Применение селективных флуоресцентных зондов и методов цитофлуориметрии является одним из чувствительных методов изучения МП клеток (Владимиров, Добрецов, 1980). Используемый в данном исследовании потенциал-чувствительный флуоресцентный

зонд DiOC2(3) позволяет регистрировать МП после его нагрузки в клетки методом оптического имаджинга при возбуждении с $\lambda_{ex}=488$ нм и максимумом эмиссии при $\lambda_{em}=500$ нм (рис. 70А).

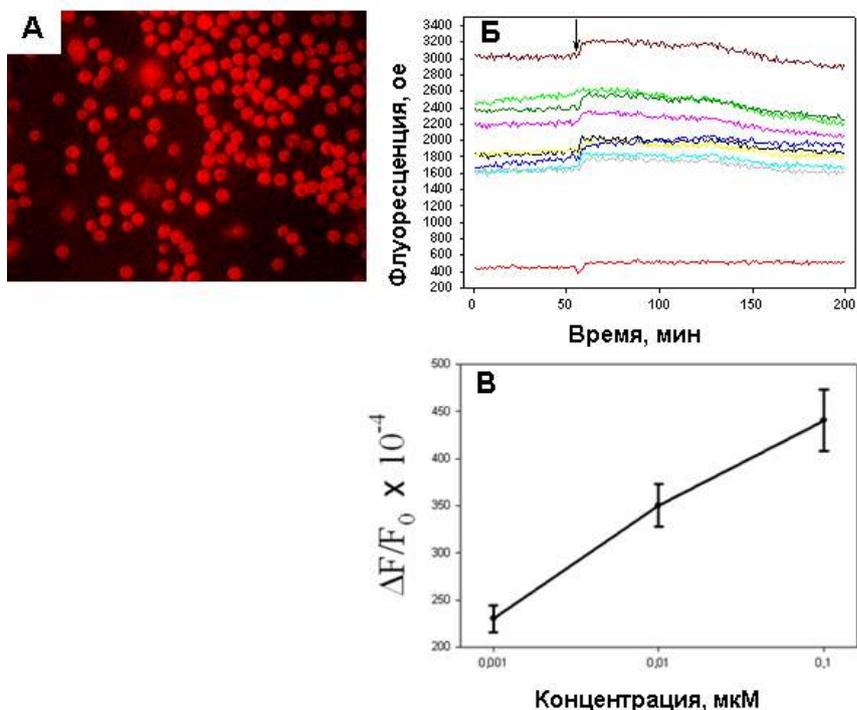


Рис. 70. Влияние кукумуриозида A_2-2 на мембранный потенциал перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c. **А** – изображение клеток, нагруженных флуоресцентным потенциал-чувствительным зондом DiOC2(3); **Б** – регистрация изменения мембранного потенциала перитонеальных макрофагов мыши, нагруженных флуоресцентным зондом DiOC2(3). Стрелками указано время введения раствора кукумуриозида A_2-2 ; каждая кривая соответствует изменению МП в отдельной клетке; нижняя кривая красного цвета отражает базовый уровень МП; **В** – зависимость изменения МП перитонеальных макрофагов от концентрации кукумуриозида A_2-2

Флуоресценция клеток, нагруженных зондом DiOC2(3), в состоянии покоя была достаточно интенсивной и составила в среднем $1021,7 \pm 68,7$ отн. ед. При добавлении селективного ионофора, грамицидина, в концентрации 1 мкМ к клеткам, нагруженным соответствующим флуоресцентным зондом, наблюдали максимальное увеличение флуоресценции клеток, соответствующее их полной деполяризации. Внесение в инкубационную смесь кукумуриозида A_2-2 приводило к обратимой деполяризации (рис. 68Б), что выразалось во временном (на протяжении 100–150 с) увеличении интенсивности флуоресценции клеток и последующем восстановлении МП до исходных значений. 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 (Таблица 49, рис. 70В).

Таблица 49. Изменения мембранного потенциала перитонеальных макрофагов мыши под действием кукумариозида А₂-2, регистрируемые с помощью зонда DiOC2(3)

Концентрация кукумариозида А ₂ -2, мкМ	Изменение мембранного потенциала, $\Delta F/F_0 \times 10^{-4}$
1,0	1098,66 ± 66,40
0,1	440,53 ± 33,05
0,01	350,11 ± 22,41
0,001	229,93 ± 14,31

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего

В результате проведенных исследований было показано, что воздействие кукумариозида А₂-2 на перитонеальные макрофаги мыши вызывало выраженную деполяризацию клеточных мембран. Этот эффект может быть обусловлен следующими причинами:

во-первых, тритерпеновые гликозиды голотурий в микромолярном диапазоне концентраций могут выступать в качестве ионофоров и формировать в клеточных мембранах неселективные ион-проводящие комплексы, способные вызывать существенное нарушение ионной проницаемости биомембран (Kalinin et al., 2005; Kalinin et al., 2008);

во-вторых, в наномолярных концентрациях кукумариозид А₂-2 может взаимодействовать с какими-либо мембранными рецепторами, сопряженными с ионными каналами, вследствие чего происходит изменение трансмембранного ионного транспорта, сопровождаемого выраженной деполяризацией. Изменение ионного тока через мембрану может служить триггером запуска каскада внутриклеточных процессов, приводящих к активации макрофагов.

3.8.6. Влияние кукумариозида А₂-2 на транспорт Са²⁺ в перитонеальных макрофагах мышей

В настоящее время молекулярные механизмы воздействия различных биологически активных веществ, включая гормоны, факторы роста, нейромедиаторы и другие сигнальные молекулы, на клетки-мишени достаточно хорошо изучены. В большинстве случаев эти молекулы не проникают в цитоплазму клеток, а связываются со специфическими мембранными рецепторами. Среди многочисленных открытых к сегодняшнему дню типов рецепторов довольно много рецепторов, связывание лиганда с

которым и активация которых приводит к входу ионов Ca^{2+} в цитоплазму из внеклеточной среды или выбросу Ca^{2+} из внутриклеточных депо, таких как митохондрии и саркоплазматический ретикулум. Особая роль Ca^{2+} как вторичного мессенджера и большое количество Ca^{2+} -транспортирующих систем, принимающих участие в регуляции уровня ионов кальция в клетке, позволяют выделить кальциевую систему сигнализации в отдельную область внутриклеточной сигнализации. Ионы кальция служат посредниками в огромном разнообразии внутриклеточных процессов, в том числе секреторных процессов и пролиферации. Изменение концентрации ионов кальция в специализированных клетках приводит к множеству биологических эффектов на уровне органов и тканей и активации внутриклеточных биоэнергетических процессов, обеспечивающих реализацию физиологических функций этих клеток (Авдонин, Ткачук, 1994; Berridge, 1997; Ткачук, 2001). Целью данного этапа исследований было установление участия и роли ионов Ca^{2+} в процессах иммуноактивации макрофагов при воздействии кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$.

Мы провели сравнительное исследование влияния ряда тритерпеновых гликозидов из голотурии *S. japonica* (кукумариозид $\text{A}_2\text{-2}$, кукумариозид $\text{A}_7\text{-1}$ и их агликон) на кальциевый гомеостаз перитонеальных макрофагов мыши.

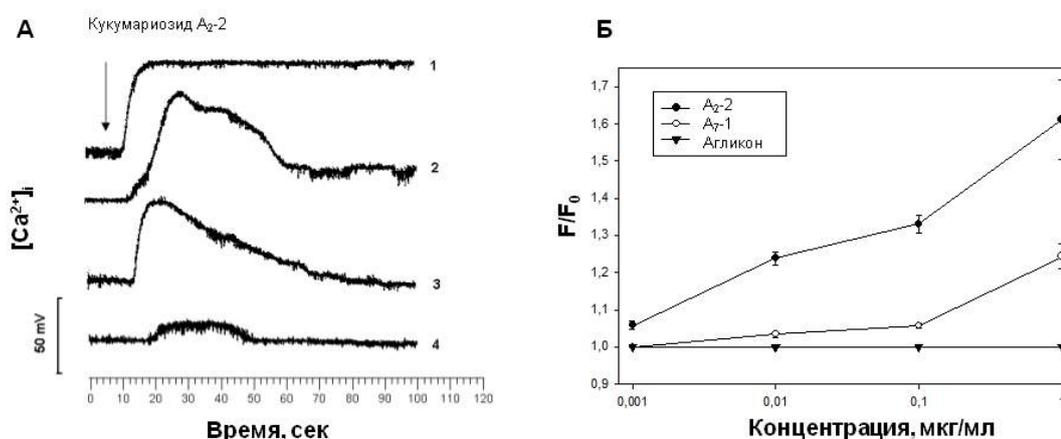


Рис. 71. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в одиночных макрофагах мыши линии Balb/c, предварительно нагруженных флуоресцентным зондом Calcium Green-1/AM, под действием кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$. Концентрации кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$: 1 – 1 мкг/мл; 2 – 0,1 мкг/мл; 3 – 0,01 мкг/мл; 4 – 0,001 мкг/мл (А). Зависимость уровня увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в одиночных макрофагах мыши линии Balb/c, предварительно нагруженных флуоресцентным зондом Green-1/AM, от концентрации исследуемых гликозидов в инкубационной среде (Б). Интенсивность флуоресценции клеток определяли методом микроцитометрии. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение ($n = 10$)

При использовании кальций-чувствительного флуоресцентного зонда Calcium Green-1/AM с помощью метода микроцитометрии мы установили, что моносульфатированный тритерпеновый гликозид кукумариозид $\text{A}_2\text{-2}$ вызывает

увеличение концентрации внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме клеток. Динамика изменения $[Ca^{2+}]_i$ в одиночных макрофагах в зависимости от концентрации гликозида показана на рисунке 71А.

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 мкг/мл наблюдали резкое обратимое увеличение $[Ca^{2+}]_i$, максимум которого был достигнут за 20–30 сек. Вслед за этим регистрировали плавное понижение $[Ca^{2+}]_i$, доходящее до первоначального уровня за 50-100 сек. Однако применение цитотоксической концентрации кукумариозида A_2-2 в 1 мкМ вызывало резкий и необратимый подъем внутриклеточного уровня кальция.

Зависимость уровня изменения $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах от концентрации кукумариозида A_2-2 в диапазоне 0,001–0,1 мкг/мл носит практически линейный характер (рис. 71Б). В то же время полисульфатированный гликозид кукумариозид A_7-1 вызывал едва заметный эффект, а агликон был полностью не активен (рис. 71Б). Цитотоксические концентрации кукумариозида A_7-1 (1 мкг/мл и выше) приводили к резкому и необратимому увеличению внутриклеточного уровня кальция.

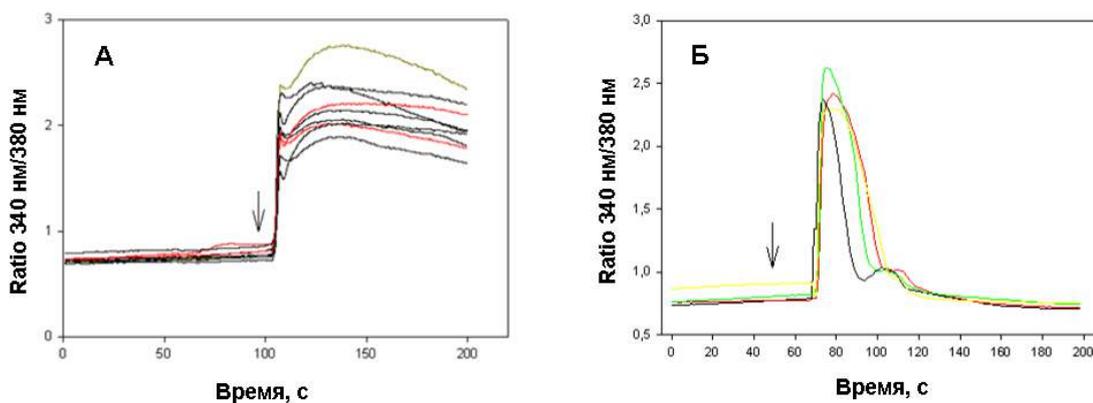


Рис. 72. Изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в цитоплазме перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c, нагруженных флуоресцентным зондом Fura-2/AM, **А** – под действием кальциевого ионофора иономицина 10 мкМ, **Б** – и кукумариозида A_2-2 , 0,1 мкМ

Более подробное изучение воздействия кукумариозида A_2-2 на кальциевый транспорт методом оптического имаджинга с использованием ратиометрического зонда Fura-2/AM подтвердило, что низкие наномолярные иммуностимулирующие концентрации кукумариозида A_2-2 в диапазоне 0,002–0,2 мкМ вызывают в макрофагах обратимое увеличение базального уровня $[Ca^{2+}]_i$. После аппликации гликозида через несколько секунд концентрация цитоплазматического кальция резко возрастала, а затем постепенно снижалась до исходного уровня (рис. 72Б, 73А и Б). Такое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ было

кратковременным и обратимым. Например, кукумариозид A_2-2 в концентрации $0,01$ мкМ вызывал кальциевый спайк, длящийся на протяжении $5-10$ сек (контроль $0,72 \pm 0,05$ отн.ед. по сравнению с гликозидом $1,48 \pm 0,07$ о.е., значения показателя внутриклеточной концентрации Ca^{2+} измерены после 10 сек, $p < 0,05$, $n = 5$). Затем в течение последующих $40-60$ с наблюдали постепенную элиминацию сигнала. Зависимость внутриклеточной концентрации кальция (интенсивности сигнала зонда) от концентрации гликозида имела куполообразный характер; максимум наблюдали при концентрации $0,02$ мкМ (рис. 73В).

При введении раствора кукумариозида A_2-2 наблюдалось два вида Ca^{2+} -ответов макрофагов. В первом случае, регистрировали однократное кратковременное повышение $[Ca^{2+}]_i$, в то время как во втором случае довольно редко в клетках наблюдали кальциевую осцилляцию с амплитудой от $0,9$ до $1,2$ отн. ед. и периодичностью в $1-3$ /мин (рис. 73Г).

В качестве препарата сравнения мы использовали кальциевый ионофор иономицин, добавление которого приводило к резкому и необратимому увеличению уровня Ca^{2+} в цитоплазме клетки, что, как правило, приводило к последующей гибели клеток (рис. 72А).

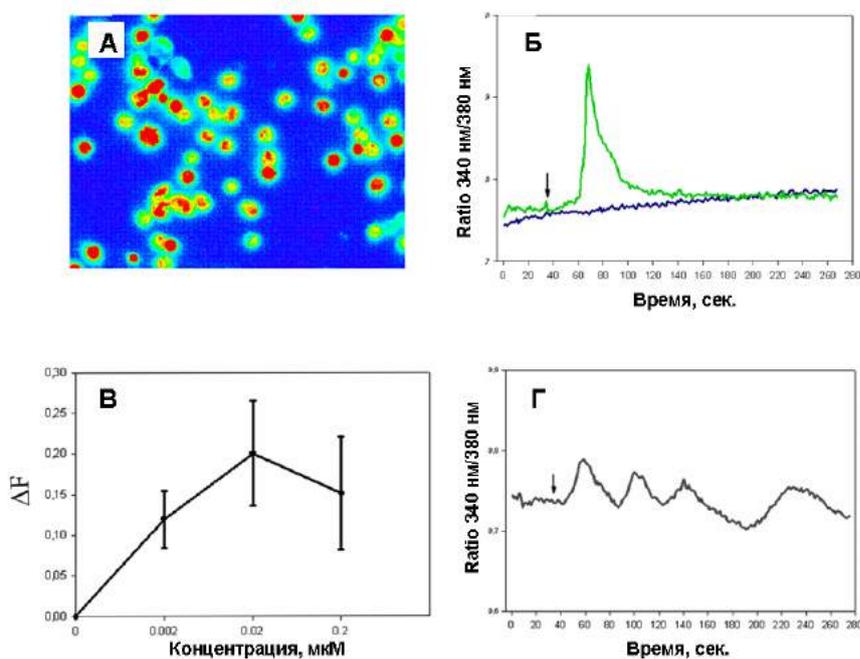


Рис. 73. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах, нагруженных флуоресцентным зондом Fura-2/AM, вызванное кукумариозидом A_2-2 . **А** – Псевдоцветное флуоресцентное изображение макрофагов, активированных кукумариозидом A_2-2 ($0,01$ мкМ); **Б** – изменения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} после применения гликозида. Синим цветом обозначено изменение базовой концентрации ионов кальция в клетке; **В** – зависимость изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (ΔF) от концентрации гликозида. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение; **Г** – осцилляция Ca^{2+} в одиночном макрофаге, инициированная гликозидом. Стрелки указывают время введения кукумариозида A_2-2

В следующей серии экспериментов мы выяснили активируемые кукумариозидом A₂-2 пути поступления Ca²⁺ в цитоплазму клеток. На начальном этапе мы установили, что под действием гликозида ионы кальция поступают в цитоплазму из внеклеточного пространства, а не из внутриклеточных депо (например эндоплазматического ретикулаума или митохондрий). В качестве доказательства мы провели хелатирование Ca²⁺ во внешней культуральной среде с помощью хелатора двухвалентных катионов – ЭГТА (5 мМ). Установлено, что в этих условиях стимулирующий эффект гликозида полностью отсутствует (рис. 74А), что доказывает направление маршрута поступления ионов кальция извне в клетку.

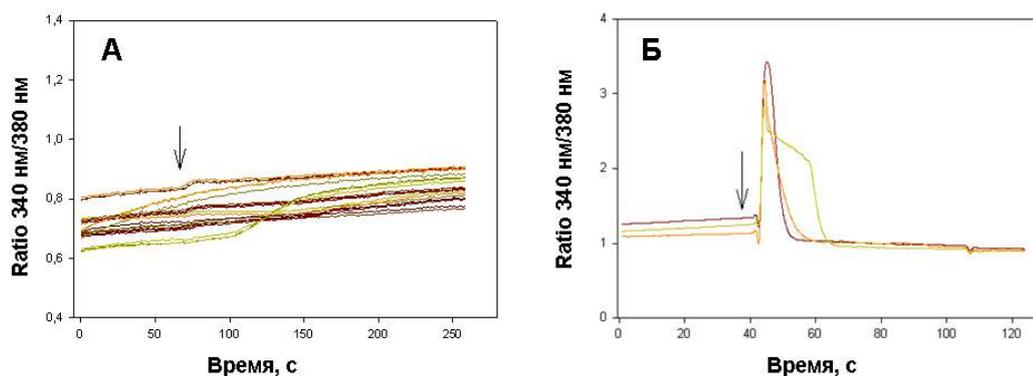


Рис. 74. Изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ в цитоплазме перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c, нагруженных флуоресцентным зондом Fura-2/AM, под действием кукумариозида A₂-2 (0,1 мкМ) **А** – в присутствии ЭГТА (5 мМ); **Б** – в присутствии дилтиазема (10⁻⁶ М) во внешней среде

Затем был проведен ингибиторный анализ ряда мембранных структур, участвующих в переносе Ca²⁺. Известно, что вход Ca²⁺ в клетки из внешней среды опосредуется несколькими возможными механизмами. Этот сигнальный путь может быть обеспечен транспортом кальция по градиенту концентрации за счет различных по структуре и способам управления селективных Ca²⁺ каналов, а также благодаря системе ионных обменников и переносчиков Ca²⁺, осуществляющих активный транспорт Ca²⁺ против градиента концентрации (например, Na⁺/Ca²⁺ переносчик). В связи с этим, был подобран и использован набор специфических блокаторов, ингибирующих данные пути.

Блокаторы потенциал-чувствительных кальциевых каналов. Потенциал-чувствительные (потенциал-управляемые, потенциал-зависимые) ионные каналы отвечают за распространение потенциала действия, они открываются и закрываются в ответ на изменение мембранного потенциала. Было обнаружено, что блокаторы потенциал-чувствительных ионных каналов, верапамил, нифедипин и дилтиазем, являющиеся наиболее изученными представителями антагонистов кальция и

селективными блокаторами Ca^{2+} каналов L-типа, не оказывают блокирующего действия в эффективной концентрации 10^{-6} М на вход ионов кальция в перитонеальные макрофаги мыши при аппликации кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ (рис. 74Б).

Ингибитор $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортера. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник является системой выведения Ca^{2+} из цитоплазмы. При натрий-кальциевом обмене три иона Na^+ обмениваются на один Ca^{2+} . Эта система может работать обратимо: при понижении внеклеточной концентрации Na^+ либо при повышении концентрации этого иона в цитоплазме может происходить вход Ca^{2+} снаружи в обмен на внутриклеточный натрий. Было установлено, что амилорид (50 мкМ), который чаще всего используют для подавления транспорта Ca^{2+} по этому механизму, не влиял на активацию входа кальция в макрофаги под действием кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ (данные не показаны).

Блокаторы G-белков. Сигнальные G-белки (ГТФ-связывающие белки) являются универсальными посредниками при передаче гормональных сигналов от рецепторов клеточной мембраны к эффекторным белкам, вызывающим конечный клеточный ответ. В последние годы выяснены механизмы участия G-белков в регуляции активности K^+ и Ca^{2+} каналов. Используемый нами селективный блокатор G-белков (тиопроизводное гуанозин дифосфата) блокировал вход Ca^{2+} в макрофаги при действии гликозида только в нефизиологическом диапазоне концентраций (концентрации >1 мМ, данные не показаны).

Таким образом, в данной серии экспериментов было установлено, что кукумариозид $\text{A}_2\text{-2}$ 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, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник и рецептор-управляемые Ca^{2+} каналы, сопряженные с G-белком (например, пуриnergические рецепторы P_2Y семейства).

Известно, что фагоцитирующие клетки (макрофаги, нейтрофилы) отвечают на воздействие разнообразных стимуляторов, быстро гидролизуют мембранные фосфолипиды, что приводит к генерации большого числа внутриклеточных и экстраклеточных мессенджеров. Одним из наиболее ранних событий, запускаемых в этих клетках при стимуляции, является активация сигнальных путей с участием фосфоинозитид-специфической фосфолипазы C и фосфолипазы A2, что играет ключевую роль в запуске или модуляции хемотаксиса, секреции, фагоцитоза и образования супероксидов (Крутецкая и др., 2000). При этом общим признаком активации клеток и первоначальным и быстрым ответом макрофагов на стимуляцию является увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле (Morel et al., 1991; Forehand et al., 1993; Авдонин, Ткачук, 1994; Клебанов, Владимиров, 1999).

Обнаружено, что некоторые тритерпеновые гликозиды инициируют активацию клеток и потенцирование ряда клеточных функций. Показано, что некоторые гликозиды голотурий потенцируют фагоцитоз полиморфноядерных лейкоцитов человека (Lasley, Nigrelli, 1970), проявляют митогенные свойства и модулируют иммунный ответ Т- и В-лимфоцитов (Попов и др., 1994). Установлено, что некоторые тритерпеновые гликозиды растительного происхождения способны активировать поступление Ca^{2+} в клетки из внеклеточного пространства. Например, действие каулозида С из растения *C. robustum* Maxim на фибробласты человека, вызывало увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и существенную стимуляцию их пролиферации. Оказалось, что этот стимулирующий эффект был опосредован активацией мембранных Ca^{2+} -каналов (Aminin et al., 1999). Стероидный сапонин, дигитонин, в низких концентрациях усиливал сократительную активность кардиомиоцитов и увеличивал уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с одновременным изменением показателя микровязкости биомембран (Ishida et al., 1993). Гликозид женьшеня, Rg1, модулировал функционирование K^+ -зависимых Ca^{2+} -каналов и K^+ , Na^+ и Ca^{2+} трансмембранного транспорта, что сопровождалось изменением микровязкости цитоплазматических мембран и стимуляцией пролиферации лимфоцитов. Кроме того, действие этого гликозида приводило к защите кардиомиоцитов от повреждений при экспериментальной ишемии (Yamasaki et al., 1987; Li et al., 1987; Ким и др., 1995; Awang, 1999).

Таким образом, мы установили, что аппликация кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ приводит к быстрому изменению МП и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах. Деполяризация мембран макрофагов и резкое поступление Ca^{2+} в цитозоль под действием гликозида носит обратимый характер, амплитуда Ca^{2+} спайков зависит от дозы вносимого в клеточную культуру гликозида, а некоторым клеткам присуща осцилляция Ca^{2+} . Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах происходит благодаря входу Ca^{2+} из внеклеточной среды, минуя потенциал-чувствительные Ca^{2+} каналы, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортер и G-белок сопряженные ионные каналы. Наблюдаемая в клетках кальциевая осцилляция, очевидно, обусловлена возникновением циклических изменений в транспорте Ca^{2+} между ЭПР и цитоплазмой, опосредованных рецепторами инозитол (1,4,5)-трифосфата и Ca^{2+} -АТФазой, как это было обнаружено в клетках микроглии (Dolmetsch et al., 1998; Shigemoto-Mogami et al., 2001).

3.8.7. Влияние кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ на функционирование пуриновых рецепторов в макрофагах

В последние годы стало понятным, что во многих типах клеток и периферических тканях АТФ играет значимую роль модулятора клеточной сигнализации и

нейротрансмиттера. Не вызывает сомнения, что АТФ является не только важнейшим внутриклеточным метаболитом, но и служит важным объектом межклеточного взаимодействия. Попадая во внеклеточное пространство с помощью различных механизмов, АТФ взаимодействует со специфическими мембранными пуринорецепторами. Пуринергическая сигнализация в различных типах клеток и АТФ опосредованная Ca^{2+} -сигнализация являются важным звеном в целом ряде физиологических и патологических процессов. Они включают активацию пуринергических рецепторов клетки, последующую передачу сигнала и регуляцию клеточных функций. В настоящее время пуриновые рецепторы классифицированы, известен целый ряд агонистов пуринергических рецепторов, к которым относятся пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды. Пуринергические рецепторы P2 типа представлены двумя различными семействами, P2Y и P2X. По механизму действия рецепторы семейства P2Y имеют G-протеин-опосредованный механизм, тогда как пуриновые рецепторы P2X семейства являются лиганд-оперирующими ионными каналами, регулирующими, главным образом, вход Ca^{2+} в клетки (Burnstock, Williams, 2000; North, 2002; Burnstock, 2004).

Данный раздел исследования посвящен изучению взаимодействия кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ ($\text{CA}_2\text{-2}$) с пуриновыми рецепторами P2X семейства как с возможными молекулярными мишенями иммуномодулирующего действия гликозида. 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в цитозоле клеток (рис. 75Б). Обнаружено определенное сходство в активации входа ионов кальция в клетки под действием АТФ и кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ – одинаковая длительность кальциевого спайка во времени и одинаковая величина амплитуды Ca^{2+} ответа клеток (рис. 75А-Г). В то же время для индукции увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ нужна концентрация АТФ, превышающая практически в 1000 раз эффективную концентрацию гликозида.

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 кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ в монослое макрофагов регистрировали только порядка 20-25% клеток, реагирующих на аппликацию резким входом Ca^{2+} (рис. 76А; 77А и Б). При увеличении концентрации гликозида от 2 нМ

до 200 нМ или АТФ от 30 мкМ до 100 мкМ не наблюдали достоверного изменения количества отвечающих клеток (рис. 76Б; 77А и Б).

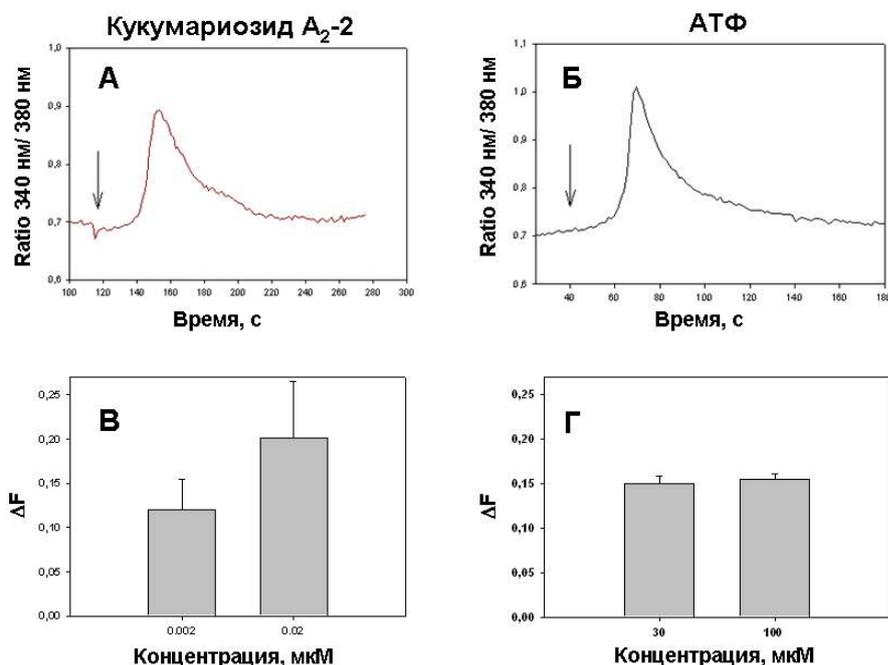


Рис. 75. Влияние кукумариозида А₂-2 (0,02 мкМ) и АТФ (30 мкМ) на динамику изменения Са²⁺ ответа перитонеальных макрофагов мыши, нагруженных зондом Fura-2/AM. Изменение продолжительности (А, Б) и амплитуды (В, Г) Са²⁺ ответа клеток (ΔF) под воздействием индукторов. Стрелки указывают время введения индукторов. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение

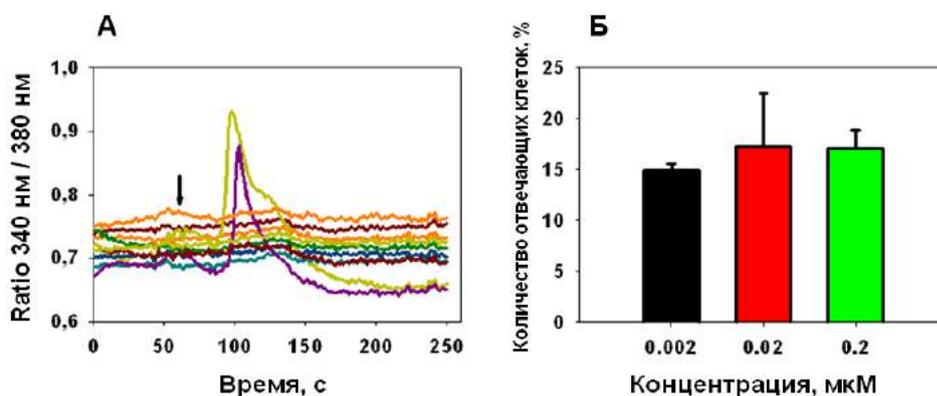


Рис. 76. Увеличение [Са²⁺]_i в цитоплазме перитонеальных макрофагов мыши. А – эффект инкубирования с кукумариозидом А₂-2 (20 нМ), регистрируемый с помощью флуоресцентного зонда Fura-2/AM. Стрелка указывает момент введения кукумариозида А₂-2 в культуральную среду. Каждая цветная линия отражает регистрацию внутриклеточного Са²⁺ в одиночной клетке. Б – количество клеток, отвечающих на действие кукумариозида А₂-2 в зависимости от концентрации гликозида в клеточном монослое

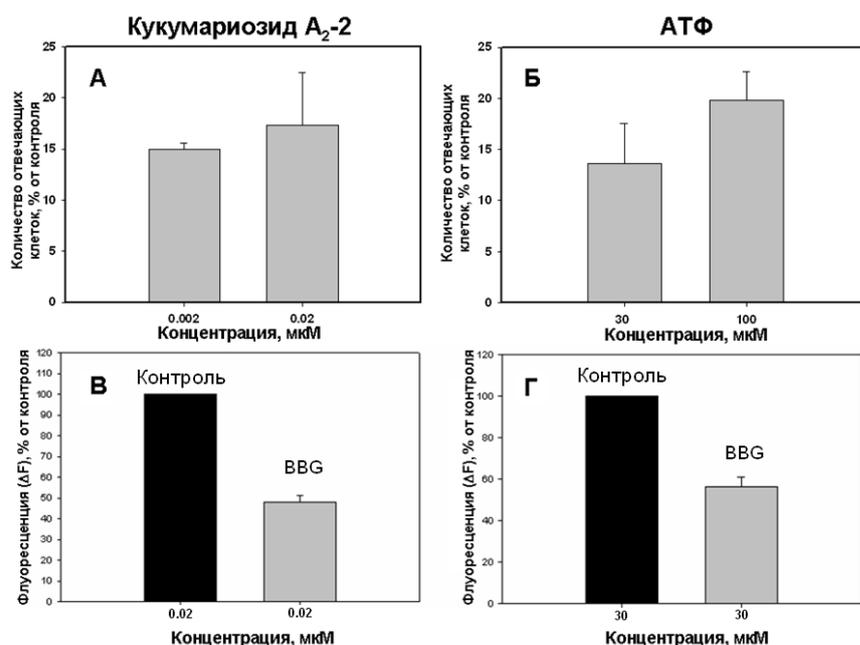


Рис. 77. Зависимость количества перитонеальных макрофагов мыши, отвечающих изменением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на действие индукторов, от концентрации: **А** – кукумариозида A_2-2 и **Б** – АТФ. Число макрофагов, активированных с помощью: **В** – кукумариозида A_2-2 в концентрации 0,02 мкМ и **Г** – АТФ в концентрации 30 мкМ, и ингибированных с блокатром P2X рецепторов B2G в концентрации 100 мкМ. Указан процент ингибирования Ca^{2+} сигнала в клетках. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

Для перитонеальных макрофагов мыши характерно содержание лишь нескольких типов пуринергических рецепторов P2X семейства: P2X1, P2X4 и, по некоторым данным, P2X7 (Sim et al., 2007). Для проведения ингибиторного анализа с целью определения конкретных P2X рецепторов, участвующих в Ca^{2+} ответе макрофагов на действие гликозида, мы использовали набор селективных блокаторов P2X рецепторов: сурамин (Sur, для P2X1), PPADS (для P2X1), феноловый красный (PhR, для P2X1), фенолфталеин (Phph, для P2X4), бриллиантовый голубой G-250 (или B2G) (для P2X4, P2X7) и KN-62 (для P2X7) (Sigma-RBI eHandbook).

Было обнаружено, что при регистрации ответа макрофагов на добавление гликозида, наиболее эффективно ингибировали Ca^{2+} - сигнализацию лишь два блокатора: B2G (селективен в отношении P2X4 и P2X7 рецепторов) и фенолфталеин (наиболее селективен к P2X4 рецепторам). В микромолярных концентрациях эти антагонисты блокировали стимулирующее действие кукумариозида A_2-2 на 50% и 100% соответственно. Наряду с этим блокаторы пуриновых рецепторов P2X1 сурамин и PPADS совсем не ингибировали кальциевую сигнализацию при действии гликозида на макрофаги, а при предварительном инкубировании клеток с феноловым красным (селективен к P2X1 рецепторам) наблюдали незначительное 30%-ное ингибирование

входа Ca^{2+} в клетки. В том случае, если применяли высоко селективный блокатор P2X7 рецепторов KN-62, значимых изменений в динамике транспорта Ca^{2+} также не наблюдали (рис. 78А).

Мы провели исследование роли внеклеточной АТФ, содержащейся в культуральной среде с клетками, в активации кальциевого транспорта под действием гликозида. Известно, что выброс АТФ в результате механического повреждения части клеток или высвобождение АТФ из клеток по нелигандному механизму (например, через Pannexin-1 каналы) приводит к постоянному присутствию его незначительного количества во внешней культуральной среде (Locovei et al., 2006). В первичной культуре перитонеальных макрофагов постоянное содержание АТФ во внешней среде колеблется в пределах 0,1–10,0 нМ (Beigi, Dubyak, 2000; Lazarowski et al., 2003; Dubyak, 2011). Фермент аденозиндифосфатаза (апираза), относящийся к классу гидралаз, отщепляет остатки фосфорной кислоты от АТФ и тем самым устраняет АТФ из инкубационной среды. Нами было установлено, что предварительное инкубирование монослоя перитонеальных макрофагов мыши с апиразой на протяжении 3 час, приводящее к полному исчезновению АТФ в инкубационной среде, вызывало практически 100%-ное ингибирование входа Ca^{2+} в макрофаги при аппликации кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ (рис. 78А).

Таким образом, проведенный ингибиторный анализ с помощью селективных агонистов пуриновых рецепторов позволяет сделать заключение, что рецепторы P2X1 типа и, главным образом, P2X4 типа являются в макрофагах мыши основными мишенями действия кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$, а активирующее действие гликозида на клетки проявляется только в присутствии незначительных количеств АТФ во внешней среде.

Для подтверждения этого предположения были проведены дополнительные эксперименты по блокированию рецепторов P2X типа в макрофагах с помощью специфических антител к P2X1 или P2X4 рецепторам. Было 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 кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ на макрофаги (рис. 78Б). Максимальный ингибирующий эффект был обнаружен при использовании анти-P2X4 антител. Полученные результаты также соответствуют предположению о том, что P2X4 рецепторы являются основными молекулярными мишенями действия этого тритерпенового гликозида.

В следующей серии экспериментов было проведено подавление (нокдаун) в перитонеальных макрофагах экспрессии определенных пуриновых рецепторов с помощью техники малых интерферирующих РНК. С этой целью была выполнена трансфекция

перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c малыми интерферирующими РНК (siRNA) для нокдауна гена, кодирующего пуриновый рецептор P2X4. Степень ингибирования экспрессии контролировали с помощью ПЦР и соответствующих праймеров. Затем было проведено сопоставление чувствительности к действию гликозида у трансформированной культуры, нетрансформированной культуры перитонеальных макрофагов и у культуры клеток, трансфецированных неспецифичной РНК (scrambled siRNA). В трансфецированных клетках, нагруженных Ca^{2+} -чувствительным флуоресцентным зондом Fura-2/AM, оценили активацию входа Ca^{2+} под действием кукумариозида A_2 -2.

Обнаружено, что по сравнению с отрицательным контролем (неспецифичная scrambled siRNA) транзientная трансфекция клеток с помощью конструкции P2X4-siRNA приводит к ингибированию индуцированного гликозидом Ca^{2+} входа более чем в два раза (рис. 78В). Одновременно с помощью ПЦР было продемонстрировано, что трансфекция макрофагов такими малыми интерферирующими селективными РНК вызывала практически полное ингибирование экспрессии мРНК рецептора P2X4 в макрофагах (рис. 78Г). Таким образом, нокдаун экспрессии P2X4 рецептора в макрофагах приводил к существенному ингибированию кальциевой сигнализации в клетках при аппликации гликозида.

Для подтверждения непосредственного (прямого) взаимодействия кукумариозида A_2 -2 с пуринергическим рецептором нами был проведен анализ взаимодействия кукумариозида A_2 -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). Эффективность иммобилизации белка на оптическом чипе CM5 составила 3,3 нг/мм². Прямое взаимодействие кукумариозида A_2 -2 (CA_2 -2) с P2X4 рецептором было зарегистрировано и константа диссоциации (Kd) комплекса CA_2 -2/P2X4 составила $45,2 \times 10^{-6}$ М. Дозозависимая кривая кинетического анализа SPR показана на рис. 79А. Таким образом, было доказано прямое связывание кукумариозида A_2 -2 с пуринергическим рецептором мыши P2X4 типа.

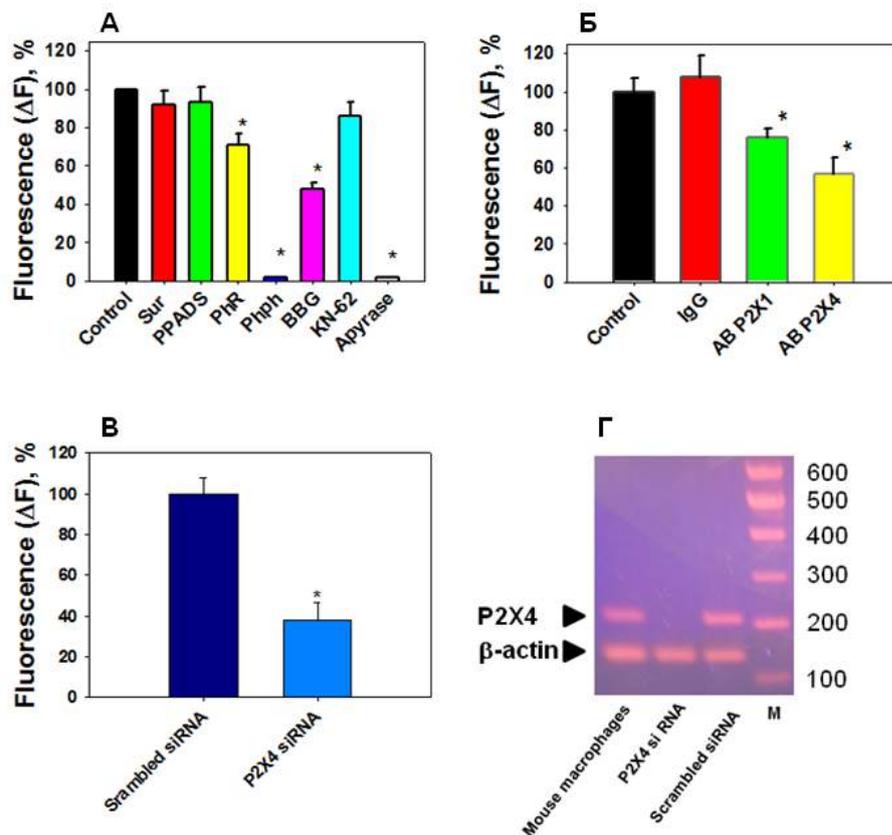


Рис. 78. Кукумариозид A_2-2 в наномолярных концентрациях вызывает обратимое увеличение уровня $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах путем взаимодействия с пуринергическими рецепторами P2X семейства. **А** – Преинкубирование клеток с различными блокаторами P2X рецепторов и с апиразой с последующей стимуляцией входа Ca^{2+} под действием CA_2-2 : 1 – контроль; 2 – сурамин, 100 мкМ; 3 – PPADS, 10 мкМ; 4 – PhR 10 мкМ; 5 – Phph, 10 мкМ; 6 – BBG 100 мкМ; 7 – KN-62, 10 мкМ; апираза, 2.0 U. **Б** – Эффект преинкубирования макрофагов в течение 30 мин со специфическими антителами к пуринергическим рецепторам (ab81122, rabbit polyclonal to P2X1, Abcam, 10 мкг/мл, orb100036, rabbit polyclonal to P2X4, Biorbyt, 10 мкг/мл) и с иммуноглобулином G кролика (IgG, 10 мкг/мл) на вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги мыши, вызываемый аппликацией CA_2-2 (100 нМ); в качестве контроля использовали клетки, не обработанные антителами. **В** – Эффект транзientной трансфекции клеток малыми интерферирующими РНК (siRNA), подтверждающий значительную роль P2X4 рецепторов в индукции Ca^{2+} входа под действием CA_2-2 . **Г** – Экспрессия P2X4 mRNA в макрофагах мыши и уменьшение содержания P2X4 mRNA в макрофагах путем трансфекции клеток с помощью P2X4 siRNA в сравнении с макрофагами, трансфицированными с помощью неспецифичной (scrambled) РНК (данные ПЦР). Контроль нагрузки осуществляли с помощью специфических праймеров к β -актину. М - Маркеры молекулярного веса ДНК. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, * $p < 0,05$

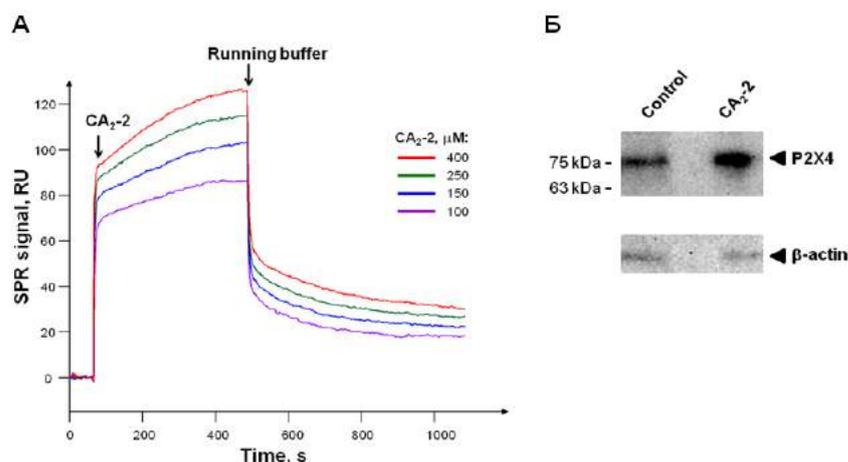


Рис. 79. Сенсорограммы взаимодействия CA₂-2 (100-150-250 и 400 мкМ) с иммобилизованным P2X4 рецептором. Стрелками указано начало введения гликозида и начало отмывки для диссоциации комплекса (А). Экспрессия P2X4 белка в перитонеальных макрофагах мыши в контрольных клетках и клетках, инкубированных с CA₂-2 (10 нМ) в течение 48 час. Показан результат вестерн-блот анализа P2X4 рецепторов и контроля нагрузки β-актина (Б)

Влияние CA₂-2 на рецептор P2X4 в макрофагах мыши было также подтверждено методом иммуноблоттинга на уровне экспрессии белка. С этой целью перитонеальные макрофаги мыши инкубировали в присутствии CA₂-2 (10 нМ) в течение 48 часов. После проведенного вестерн-блота пуриновые P2X4 рецепторы мыши на нитроцеллюлозной мембране выявили специфическими антителами в виде одной иммунореактивной полосы на уровне 75 kDa, что соответствует гликозилированной форме этой субъединицы. Мы обнаружили, что экспрессия P2X4 рецепторов в перитонеальных макрофагах мыши была несколько увеличена после инкубирования клеток с тритерпеновым гликозидом. Это свидетельствует о стимулирующем влиянии CA₂-2 на экспрессию и количественное содержание белка P2X4 и об активирующем эффекте CA₂-2 на иммунные клетки в целом (рис. 79Б).

В клетках иммунной системы (моноциты, макрофаги, лимфоциты и микроглия головного мозга) идентифицированы мРНК для P2X1, P2X4 и P2X7 рецепторов (North, 2002). Установлено, что АТФ-индуцированная кальциевая сигнализация в перитонеальных макрофагах мыши принимает участие в модуляции клеточной активности, синтезе и высвобождении различных цитокинов и формировании воспаления, в фагоцитозе, процессах хемотаксиса и инициации апоптоза.

Функционирование этих рецепторов нарушено при многих патологических состояниях, что позволяет рассматривать пуриновые рецепторы в качестве перспективных мишеней для лечения ряда заболеваний. Терапевтический потенциал агонистов и

антагонистов P2X рецепторов в настоящее время активно исследуют при терапии ряда расстройств. Но отсутствие эффективных и селективных активаторов и блокаторов пуринергических рецепторов по-прежнему сдерживают эти исследования. В связи с этим поиск новых потенциальных эффекторов P2X рецепторов является чрезвычайно актуальной задачей и может привести к созданию новых препаратов, эффективных в лечении различных заболеваний иммунной системы (Di Virgilio et al., 2001; Surprenant, North, 2009).

В ходе наших экспериментов были получены убедительные доказательства того, что иммуностимулирующее действие кукумариозида A₂-2 на иммунокомпетентные клетки связано с взаимодействием гликозида с пуринергическими рецепторами и их активацией. Установлено, что молекулярной мишенью действия кукумариозида A₂-2 являются пуринергические рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X₄ типа). Непосредственное взаимодействие кукумариозида A₂-2 с этими рецепторами приводит к активации АТФ-зависимого входа Ca²⁺ в клетки и временному увеличению [Ca²⁺]_i в цитозоле. Применение определенных селективных блокаторов этих рецепторов, антител к этим рецепторам или «выключение» экспрессии генов этих рецепторов ингибирует процесс активации кальциевого транспорта. Полное отсутствие влияния гликозида на вход ионов кальция в культуре макрофагов, предварительно инкубированных с апиразой, свидетельствует о необходимости и важности присутствия АТФ для проявления стимулирующего эффекта кукумариозида A₂-2. Это указывает на то, что гликозид не является непосредственным агонистом пуриновых рецепторов макрофагов, но может выступать в качестве аллостерического модулятора, проявляющего свой стимулирующий эффект в присутствии незначительных количеств специфического лиганда – АТФ.

3.8.8. Электрофизиологическое исследование ионных токов в одиночных макрофагах

Исследование влияния кукумариозида A₂-2 на динамику входа Ca²⁺ 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. 80А) при перфорировании этого участка каналоформером нистатином (whole cell performed patch-clamp). Этот метод дает возможность регистрировать трансмембранные ионные токи в целой интактной клетке, что позволяет оценить, каким образом определенные ионные каналы реагируют на специфическое электрическое или химическое воздействие.

На первом этапе мы использовали перитонеальные макрофаги мыши без предварительной обработки первичной культуры апиразой. В этих условиях токовые

ответы клеток на аппликацию АТФ регистрировали только при высоких концентрациях аденозинтрифосфата в диапазоне 0,1–1,0 мМ, а амплитуды ответов клеток были невысокими и достигали 200 пА (рис. 80Б). При этом некоторые клетки не реагировали на аппликацию, а некоторые были неспособны выдержать более одной аппликации АТФ. Мы предположили, что причиной такого поведения клеток является частичная инактивация пуринергических рецепторов под действием АТФ, который может появиться в культуральной среде в результате механических повреждений макрофагов во время их выделения.

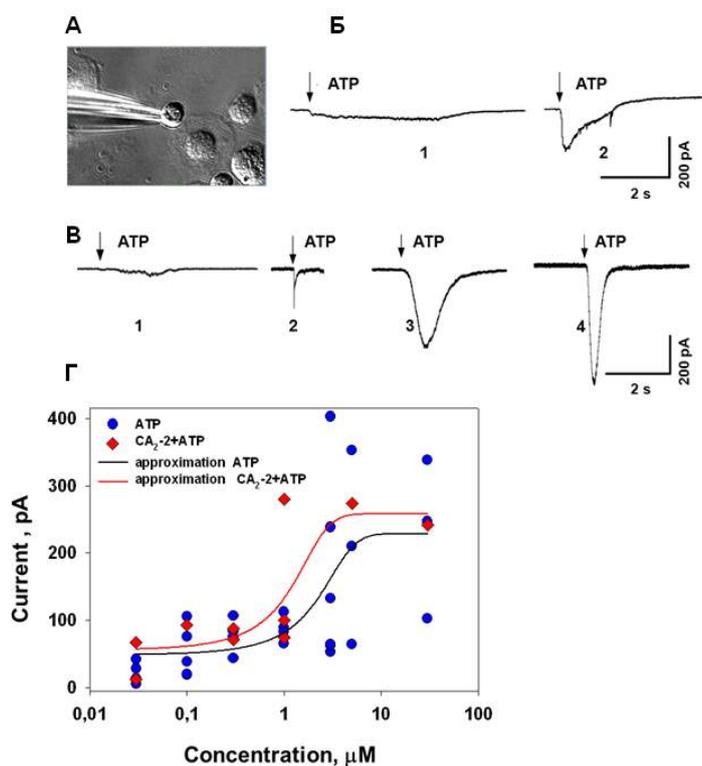


Рис. 80. Электрофизиологические свойства перитонеальных макрофагов мыши, изученные методом локальной фиксации потенциала «whole-cell patch-clamp». А – фотография микропипетки, изолирующей фрагмент мембраны одиночного перитонеального макрофага мыши; Б – ответы клеток без предобработки апиразой при действии АТФ в концентрациях 100 мкМ (1) и 1 мМ (2) соответственно; В – влияние АТФ в концентрациях 0,03 мкМ (1), 0,3 мкМ (2), 3 мкМ (3) и 5 мкМ (4) на перитонеальные макрофаги, предварительно инкубированные с апиразой (2 ед/мл); Г – зависимость амплитуды Ca²⁺ тока через мембрану макрофагов от концентрации АТФ в отсутствие (●) или присутствии (◆) кукумариозида А₂-2, 100 нМ

В таких условиях аппликация кукумариозида А₂-2 приводила к появлению резкого входящего кальциевого тока в одиночных макрофагах; этот ток эффективно блокировался блокатором ВВГ, селективным для пуриновых рецепторов P2X4 и P2X7 типа (рис. 81А).

В последующих электрофизиологических экспериментах мы проводили предварительное инкубирование клеток в среде, содержащей апиразу, отщепляющей остатки фосфорной кислоты от АТФ и АДФ. Такой подход исключал десенситизацию пуриnergических рецепторов макрофагов эндогенными АТФ и АДФ, которые могут выделяться из клеток в процессе получения и подготовки первичной культуры (Beigi, Dubyak, 2000).

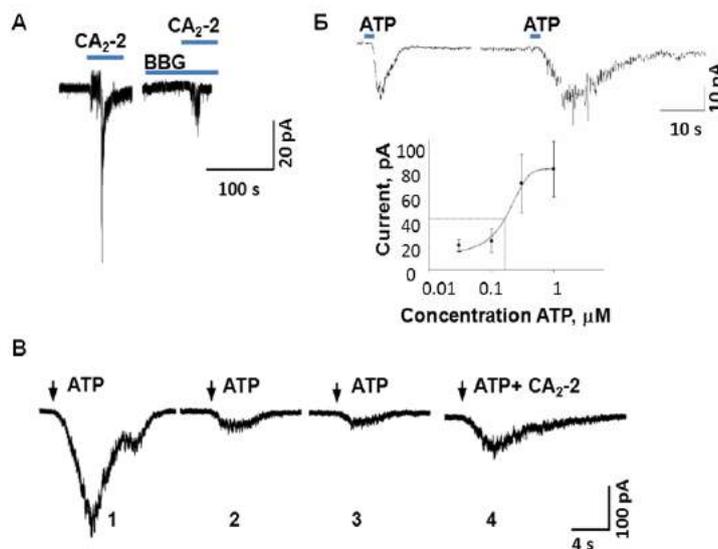


Рис. 81. Влияние кукумариозида A_2-2 на трансмембранный Ca^{2+} ток в одиночных перитонеальных макрофагах мыши. **А** – регистрация трансмембранных токов методом patch clamp в конфигурации «whole-cell». Мембранный потенциал -40 мВ. Регистрация Ca^{2+} тока в одиночном макрофаге в ответ на аппликацию кукумариозидом A_2-2 (100 нМ) и в присутствии блокатора BGG (100 мкМ); **Б** – регистрация трансмембранных токов при аппликации АТФ в концентрации 0,03 мкМ (2 секунды, слева) и аппликации АТФ в концентрации 0,03 мкМ (2 секунды) после 2 минутной аппликации кукумариозида A_2-2 в концентрации 0,3 мкМ (справа). Зависимость амплитуды тока через мембрану макрофагов от концентрации АТФ. Каждая точка построена по 3 испытаниям, $EC_{50}=0,16$ мкМ АТФ (внизу); **В** – снятие инактивации при обработке одиночного макрофага кукумариозидом A_2-2 . **1, 2 и 3** – последовательные ответы клетки на действие 0,3 мкМ АТФ с интервалом 2 минуты. Видна сильная инактивация после первого ответа. **4** – ответ клетки на действие 0,3 мкМ АТФ после предварительной 2-х минутной обработки клетки кукумариозидом A_2-2 . Клетки не обрабатывал апиразой (**А**) и после преинкубирования с апиразой (**Б-В**)

Такой экспериментальный подход позволил получать стабильные ответы практически от всех клеток. Ответ макрофагов на аппликацию АТФ регистрировали уже при концентрации 0,01 мкМ, а при концентрации АТФ 3 мкМ наблюдали ответ с амплитудой более 500 пА (рис. 80В). 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 P2X1 и P2X4 рецепторов, как описано в (Sim et al., 2007). На участие в ответе на аппликацию гликозидом преимущественно P2X1 и P2X4 рецепторов также указывает полученная нами концентрационная зависимость (рис. 81Б, нижняя вставка) с $EC_{50}=0,16$ мкМ АТФ, сопоставимая с ранее опубликованными данными (Coddou et al., 2011).

В этих экспериментальных условиях было продемонстрировано, что введение в систему регистрации только кукумариозида A₂-2 в концентрации 0,3 мкМ не вызывает заметного изменения проводимости мембраны. Но когда сразу после 2-х минутного введения кукумариозида A₂-2 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. 81Б, вставки слева и справа соответственно). Заметное увеличение амплитуды Ca²⁺ тока через мембрану макрофагов на аппликацию АТФ в присутствии кукумариозида A₂-2 (100 нМ) по сравнению с клетками, не обработанными гликозидом, обнаружено в широком диапазоне концентрации АТФ от 0,03 мкМ до 30,0 мкМ (рис. 80Г).

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. 81В; записи 1-3). Такое снижение амплитуды ответа клетки на последовательное введение АТФ является, вероятно, следствием десенситизации рецепторов.

Введение кукумариозида A₂-2 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 кукумариозидом A₂-2 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. 81В; запись 4). При этом следует отметить, что кукумариозид A₂-2 действует «однократно»: повторные аппликации АТФ в присутствии гликозида давали

ответы уменьшенной амплитуды в среднем на 34% относительно контрольного действия АТФ до применения кукумариозида А₂-2.

Таким образом, с помощью метода локальной фиксации мембранного потенциала мы установили, что наиболее вероятными молекулярными мишенями действия кукумариозида А₂-2 в мембранах перитонеальных макрофагов являются пуриновые рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X1 и P2X4 типы). При взаимодействии самого кукумариозида А₂-2 в наномолярных концентрациях с макрофагами в инкубационной среде без АТФ заметного изменения проводимости биомембран не зарегистрировано. В то же время аппликация АТФ после того, как клетки были проинкубированы в присутствии кукумариозида А₂-2, приводила к заметному увеличению как амплитуды ответа макрофагов, так и общего количества вошедших в клетку ионов Са²⁺. Помимо этого, инкубирование почти полностью инактивированных с помощью АТФ макрофагов с гликозидом приводило к частичному снятию десенситизации рецепторов и восстановлению проводимости мембран для Са²⁺.

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.

Известно, что пуринергические рецепторы P2X типа участвуют во многих патологических состояниях и могут являться молекулярными мишенями действия лекарственных соединений. Терапевтический потенциал агонистов и антагонистов P2X рецепторов в настоящее время интенсивно исследуют при ряде расстройств, в том числе при хронической невропатической и воспалительной боли, депрессии, кистозном фиброзе, сухости глаз, синдроме раздраженного кишечника, интерстициальном цистите, дисфункции мочевого пузыря, раке, внутриклеточных инфекциях и ряде патологий иммунной системы (Burnstock, Novak, 2012). Известно, что функции резидентных макрофагов нарушаются при длительном воздействии малых экстраклеточных концентраций АТФ в организме вследствие хронического течения каких-либо заболеваний и воспаления. Полученные нами экспериментальные данные по электрофизиологическим исследованиям свидетельствуют в пользу того, что одно из проявлений иммуностимулирующего действия тритерпенового гликозида голотурии, кукумариозида А₂-2, связано с восстановлением функции инактивированных P2X рецепторов и, следовательно, с восстановлением активности резидентных макрофагов.

3.8.9. Типирование популяции перитонеальных макрофагов мыши, принимающих участие в Ca^{2+} ответе на кукумариозид $\text{A}_2\text{-2}$

Данный раздел исследования посвящен определению композиционного состава популяции перитонеальных макрофагов мыши. Необходимость такого исследования продиктована ранее полученными результатами по изучению влияния кукумариозида $\text{A}_2\text{-2}$ на транспорт Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах. В них было установлено, что только часть клеток из всей популяции (порядка 25%) чувствительны к действию гликозида и отвечают на это воздействие увеличением входа ионов кальция в цитоплазму.

С помощью метода проточной цитофлуориметрии 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. 82А).

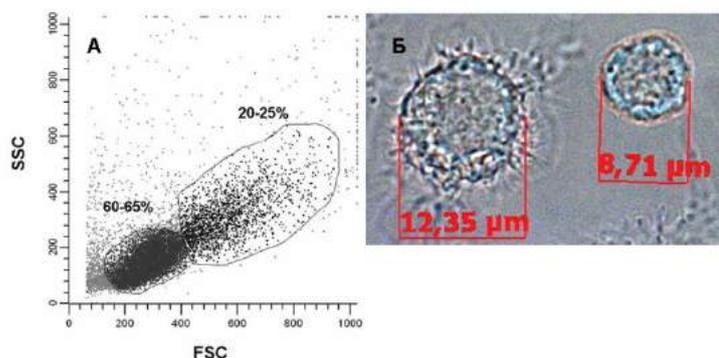


Рис. 82. Определение геометрических размеров клеток в популяции перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c методами: **А** – проточной цитофлуориметрии и **Б** – оптической микроскопии

Эти результаты подтверждены данными анализа изображений популяции перитонеальных макрофагов, полученных с помощью оптической микроскопии в проходящем свете. На микрофотографиях монослоя перитонеальных макрофагов отчетливо видны две субпопуляции клеток, различающиеся, прежде всего, своими геометрическими размерами. Одна субпопуляция представлена маленькими сферическими клетками со средним диаметром $7,13 \pm 0,88$ мкм, в то время как во вторую субпопуляцию входят крупные гранулированные макрофаги с шероховатой поверхностью, средний диаметр которых составляет $12,77 \pm 2,20$ мкм (рис. 82Б).

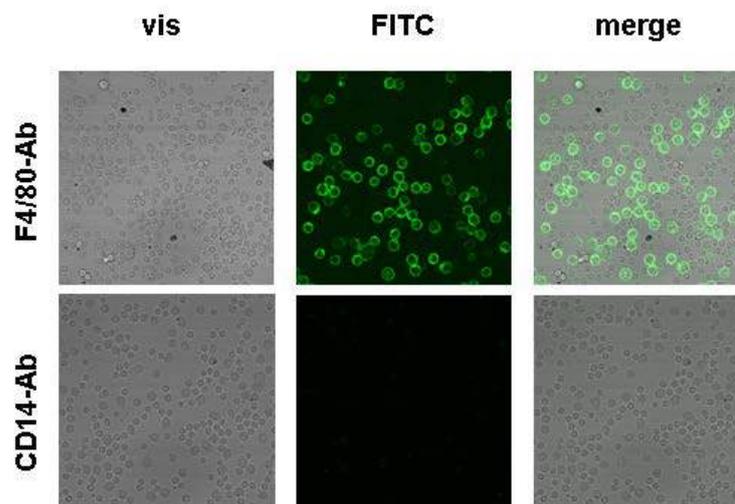


Рис. 83. Иммуноцитохимическое окрашивание популяции перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c антителами к поверхностным маркерам моноцитов ($CD14^+$) и зрелых макрофагов ($F4/80^+$). Вторичные антитела конъюгированы с FITC (зеленая флуоресценция). Изображения получены с помощью конфокального микроскопа LSM510 META (Carl Zeiss, Германия)

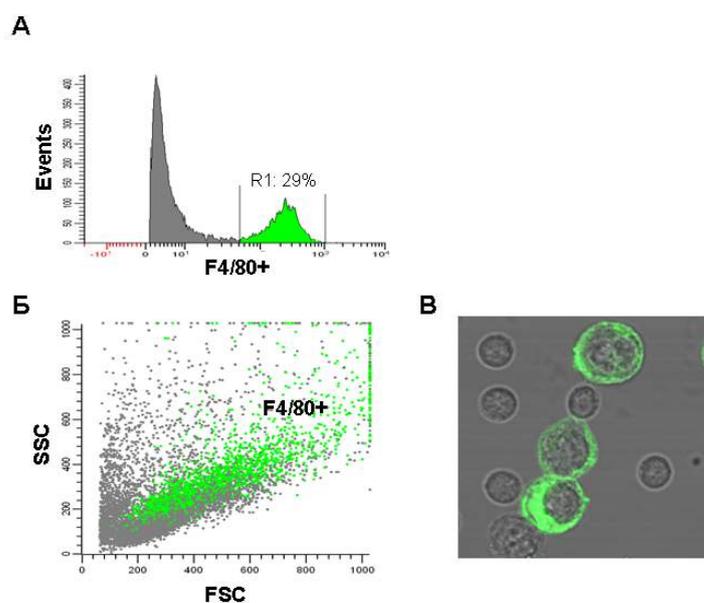


Рис. 84. Определение количества $F4/80^+$ клеток (зрелые макрофаги) в популяции перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c: **А**, **Б** – методом проточной цитофлуориметрии и **В** – конфокальной микроскопии. На дотограмме (**Б**, зеленое окрашивание) и конфокальном изображении (**В**, зеленая флуоресценция) хорошо видно, что это преимущественно крупные клетки с увеличенной зернистостью

Было проведено иммуноцитохимическое типирование популяции перитонеальных макрофагов мыши с помощью специфических антител к различным поверхностным маркерам для выявления моноцитов/макрофагов. Показано, что в популяции макрофагов отсутствуют $CD14$ -позитивные клетки, соответствующие незрелым макрофагам

(моноцитам) (рис. 83, нижняя панель). В то же время 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 (рис. 83, верхняя панель).

Полученные нами с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии 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. 84А). Эти же данные, представленные как дотограммы в координатах прямого и бокового рассеяния, 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. 84Б и В).

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. 85). 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. 85).

Факт варьирования плотности пуриновых рецепторов на мембранах макрофагов был подтвержден нами с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Анализ гистограмм и дотограмм (рис. 86) 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 $35,2 \pm 1,3$ и $35,9 \pm 0,2\%$ соответственно. Причем, макрофаги с повышенной плотностью данных рецепторов были локализованы главным образом в области крупных и гранулированных клеток (рис. 86).

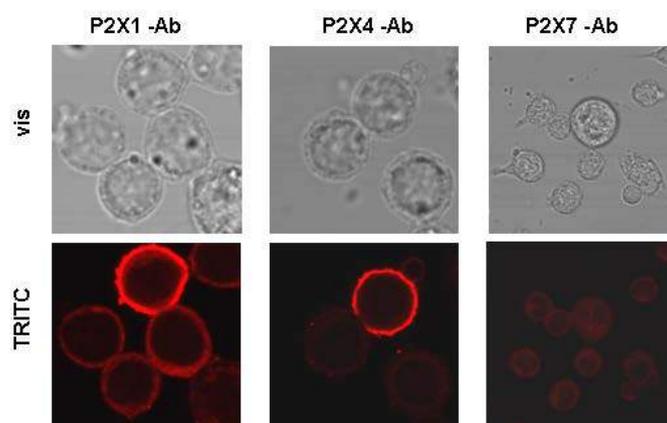


Рис. 85. Локализация пуриновых рецепторов P2X типа на поверхности перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c методом иммуноцитохимии и последующей конфокальной микроскопией. Вторичные антитела конъюгированы с TRITC (красная флуоресценция)

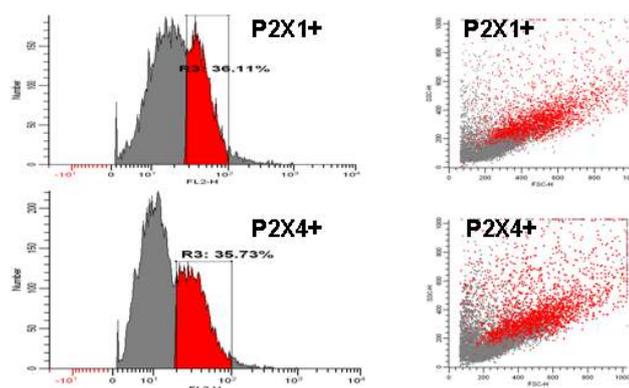


Рис. 86. Определение количества P2X1⁺ и P2X4⁺ клеток в популяции перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c. Вторичные антитела конъюгированы с TRITC (красное окрашивание)

Методом колоколизации 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. 87).

В настоящее время существует несколько способов классификации макрофагов. В одном случае макрофаги разделяют по типу их активации. Известно как минимум три типа, включающие классически активированные макрофаги (M1 макрофаги),

альтернативно активированные макрофаги (M2 макрофаги) и активированные по типу II макрофаги. Помимо этого, существует разделение макрофагов согласно их физиологическим свойствам. В этом случае различают воспалительные и противовоспалительные макрофаги. Некоторые исследователи идентифицируют различные макрофаги на основании фаз классического воспалительного иммунного ответа - цитотоксические, ранозаживляющие и регуляторные макрофаги. Кроме того, выделяют тканеспецифичные резидентные макрофаги и макрофаги, инфильтрующие развивающиеся опухоли (так называемые TAM – tumor associated macrophages) (Takahashi, 2000; Оноприенко, 2011).

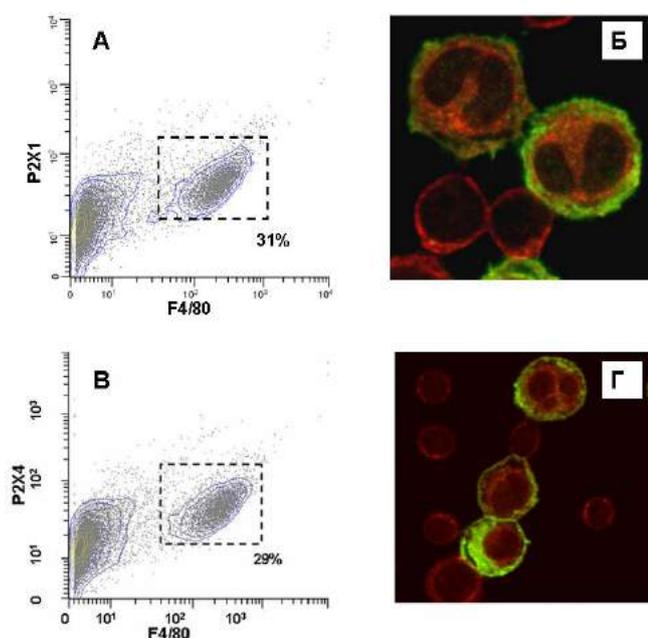


Рис. 87. Колокализация P2X⁺ / F4/80⁺ клеток в популяции перитонеальных макрофагов мыши линии Balb/c, установленная методами: **А, В** – проточной цитофлуориметрии; **Б, Г** – конфокальной микроскопии. **Б, Г** – иммуноцитохимическое окрашивание клеток антителами к F4/80 (FITC, зеленая флуоресценция) и к P2X1, P2X4 соответственно (TRITC, красная флуоресценция)

Совсем недавно перитонеальные макрофаги стали разделять по их геометрическим размерам. Для макрофагов разных размеров характерен специфический набор поверхностных CD маркеров. Обнаружено, что крупные макрофаги перитонеальной полости мышей (large peritoneal MØ, LPM) активно экспрессируют на своей поверхности CD11b и F4/80 маркеры. Этот тип макрофагов выделяют из перитонеальной полости интактных мышей, однако эти клетки фактически полностью исчезают из перитонеальной полости мышей, стимулированных липополисахаридом или тиогликолатом. Кроме того, такой фенотип макрофагов отсутствует у инфицированных животных (Ghosna et al., 2010; Hussain, Stohlman, 2012).

Другая субпопуляция макрофагов носит название малые макрофаги (small peritoneal MØ, SPM). У этих клеток очень низкий уровень CD11b и F4/80 маркеров, зато высоко экспрессирован маркер МНС-II, полностью отсутствующий в LPM макрофагах. Помимо этого, для малых макрофагов, в отличие от крупных, характерна незначительная экспрессия таких маркеров как CD11c (N418 MAb), CD40, CD80, CD86 и рецепторов TLR4. После инъекции индукторов воспаления, таких как ЛПС или тиогликолат, в перитонеальной полости мышей доминирующими клетками становятся малые макрофаги. Однако эти изменения не являются результатом дифференцировки крупных LPM макрофагов и превращения их в малые SPM макрофаги. Установлено, что SPM макрофаги происходят из незрелых моноцитов крови, проникающих в перитонеальную полость из кровяного русла при различной стимуляции или инфицировании. Затем в течение 2-4-х дней происходит дифференциация моноцитов в малые SPM макрофаги.

Отмечено, что перитонеальные макрофаги из обеих субпопуляций обладают способностью фагоцитировать, а также синтезировать оксид азота в ответ на соответствующий стимул *in vivo*. Только крупные LPM макрофаги чувствительны к прямой стимуляции бактериальным ЛПС в опытах *in vitro*. Данный факт свидетельствует о существенном различии функционирования клеток из этих субпопуляций (Ghosna et al., 2010; Hussain, Stohlman, 2012).

В своем исследовании мы также 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 (см. раздел 3.8.6). 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.

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

Для прогнозирования и установления механизма взаимодействия тритерпенового гликозида кукумариозида A₂-2 (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).

Пространственные структуры комплексов mP2X4 с АТФ и CA₂-2 были сгенерированы в результате проведенного молекулярного докинга гликозида относительно структуры полного внеклеточного домена рецептора. Поскольку подобное исследование проводили впервые, то активный сайт связывания для гликозида заранее известен не был, и поиск проводили по принципу «слепого докинга». В этом случае исходили из предположения, что наиболее энергетически выгодная конформация комплекса CA₂-2 с P2X4 с учетом комплементарности является искомой структурой. В процессе моделирования были сделаны следующие допущения: лиганд (гликозид) был гибким, с возможностью вращения двугранных углов, в то время как рецептор был конформационно неподвижным (жестким).

Генерирование модели структуры комплекса лиганда АТФ с mP2X4 позволило локализовать сайт связывания аденозинтрифосфата с рецептором, который находился в области т.н. «челюсти» в пространственной структуре рецептора, расположенной между смежными субъединицами (рис. 88). Анализ межмолекулярных контактов в предложенной модели пространственной структуры комплекса позволил выявить функционально значимые для образования комплекса и модуляции активности рецептора аминокислотные остатки и структурные элементы, наиболее тесно связанные с АТФ: Lys67, Lys69, Glu84, Thr186, Leu187, Leu211, Lys215, His213, Thr214, Val229 одной субъединицы и Ser284, Ser285, Asn288 Arg298, Arg295 и Lys313 другой субъединицы (нумерация соответствует аминокислотной последовательности mP2X4).

Эти результаты хорошо коррелируют с ранее полученными экспериментальными данными по молекулярному моделированию взаимодействия рецептора зебрафиш zfP2X4 с АТФ (Kawate et al., 2009; Kaczmarek-Hájek et al., 2012). В связи с этим, сгенерированная нами пространственная модель структуры комплекса mP2X4 рецептора с АТФ и условия, позволившие провести реконструкцию этого комплекса, были уверенно использованы нами для конструирования и дальнейшего исследования модели структуры комплекса CA₂-2-mP2X4 (рис. 88).

Расчетные данные, полученные при моделировании комплекса гликозида с пуриновым рецептором P2X4 типа методом молекулярного докинга, показали, что во взаимодействие с кукумариозидом A₂-2 вступают две (или более) субъединицы рецептора (рис. 88). 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 zP2X4 рецептора (Hattori, Gouaux, 2012).

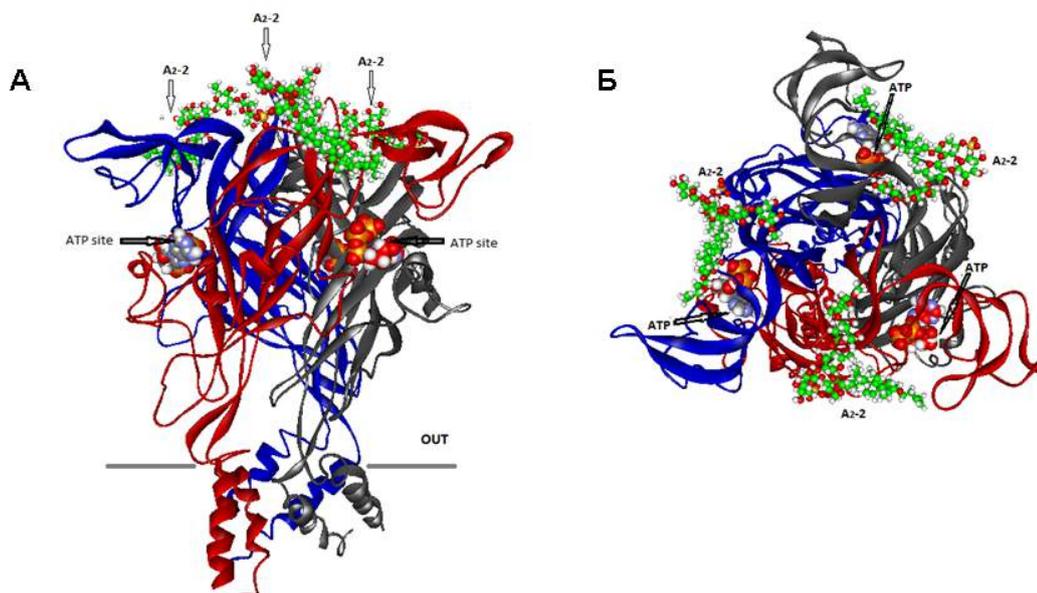


Рис. 88. Модель пространственной структуры комплекса mP2X4 рецептора (30–354 а.о.) с АТФ и кукумариозидом А₂-2. Структура рецептора представлена в виде ленточной диаграммы. **А** – вид сбоку параллельно плоскости мембраны, **Б** – вид сверху перпендикулярно плоскости мембраны. Субъединицы обозначены красным, синим и серым цветом. Локализация сайтов связывания АТФ и кукумариозида А₂-2 на mP2X4 рецепторе показана согласно результатам молекулярного докинга. Молекулы АТФ показаны в шаровом представлении, окрашены согласно типу атомов и их местоположение указано стрелками. Кукумариозид А₂-2 представлен в виде шаро-стержневой модели и окрашен зеленым, атом серы – желтым, кислород – красным, водород – белым цветом. Стрелками указаны сайты связывания АТФ и гликозида с рецептором

Установлено, что связывание гликозида СА₂-2 с mP2X4 не затрагивает сайт связывания рецептора с АТФ. Таким образом, показано отсутствие конкуренции двух лигандов (СА₂-2 и АТФ) за сайт связывания на рецепторе. Анализ теоретических расчетов сайта связывания СА₂-2 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.

Методом молекулярной динамики было установлено, что взаимодействие СА₂-2 с рецептором мыши mP2X4 стабилизируется водородными связями с аминокислотными остатками (рис. 89).

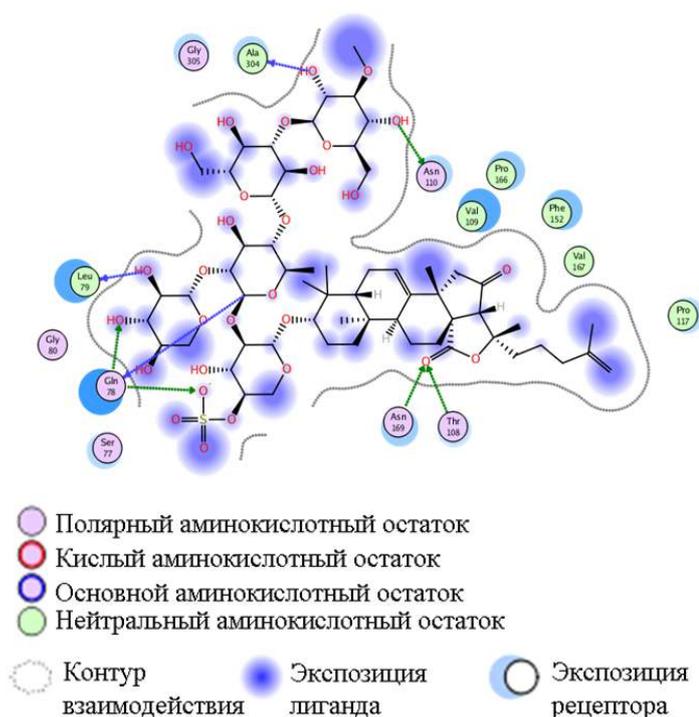


Рис. 89. Двумерная диаграмма контактов кукумариозида A₂-2 с центром связывания на mP2X4 рецепторе. Указаны цветовые обозначения схемы взаимодействия

Таблица 50. Параметры связывания кукумариозида A₂-2 с P2X4 рецептором

Лиганд	Рецептор	ΔG (ккал/мол)
C1	O Gln 78 Н-донор	-0.7
O62	O Leu 79 Н-донор	-0.5
O85	OD1 Asn 110 Н-донор	-3.0
O88	O Ala 304 Н-донор	-0.7
O20	NE2 Gln 78 Н-акцептор	-4.3
O48	OG1 Thr 108 Н-акцептор	-2.4
O48	ND2 Asn 169 Н-акцептор	-1.0
O63	NE2 Gln 78 Н-акцептор	-1.1
Суммарное значение		-13,7

Анализ вклада аминокислотных остатков рецептора, формирующих сайт связывания кукумариозида A₂-2, в изменение свободной энергии связывания при образовании комплекса (ΔG) позволил более детально описать комплекс CA₂-2 с mP2X4. Согласно величине свободной энергии связывания, такие аминокислотные остатки как Gln 78, Asn 110, Thr 108 и Asn 169, внося наибольший вклад во взаимодействие гликозида с рецептором. Суммарное значение свободной энергии связывания (ΔG) CA₂-2 с mP2X4

рецептором, рассчитанное на основе проведенного анализа, составило -13,7 ккал/мол (Таблица 50).

На основании исследования лиганд-рецепторного взаимодействия, выполненного методом молекулярной динамики, можно заключить, что в результате связывания гликозида с P2X4 рецептором мыши, пуринергический рецептор подвергается ряду конформационных преобразований (рис. 90).

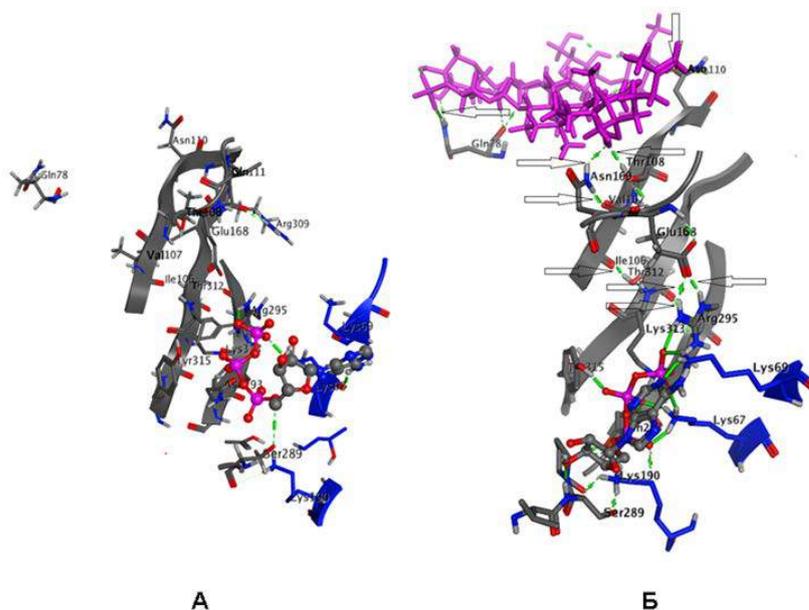


Рис. 90. Фрагменты структуры mP2X4 рецептора, содержащего β -лист, на котором локализованы сайты связывания АТФ и кукумариозида А₂-2. **А** – в начальном состоянии с небольшим количеством связей; **Б** – в модифицированном кукумариозидом А₂-2 состоянии. Элементы вторичной структуры представлены в виде ленточной диаграммы, а боковые цепи аминокислотных остатков, вовлеченных во взаимодействие, представлены в виде стержней и окрашены согласно субъединицам, серым и синим. Гликозид представлен в виде стержней (розовый цвет); АТФ представлен в шаро-стержневом виде и окрашен согласно элементам. Стрелками указана образованная сеть водородных и ионных взаимодействий двумя центрами связывания АТФ и СА₂-2

Прежде всего, происходит реорганизация внутримолекулярных взаимодействий, приводящая к контакту аминокислотных остатков, формирующих сайты связывания СА₂-2 и АТФ на рецепторе. Эта реорганизация осуществляется за счет образования сети водородных и ионных взаимодействий, пронизывающих жесткий β -лист субъединицы рецептора (рис. 90Б). Вероятнее всего, формирование этой новой сети водородных связей между двумя центрами связывания и определяет характер влияния СА₂-2 на взаимодействие АТФ с P2X4 рецептором. Возникновение именно этой сети сокращает время пребывания рецептора в десенситизированном состоянии и обеспечивает аллостерическую модуляцию его активации.

Хорошо известно, что с помощью кальциевой сигнализации происходит управление многими клеточными процессами, включая активацию макрофагов (Berridge et al., 1998), в то время как блокаторы транспорта кальция ингибируют эту активацию (Wright et al., 1985). Осцилляция концентрации ионов кальция в цитозоле клеток представляет собой специфическую сигнальную информацию, которая имеет решающее значение для различных ответов клеток и влияет на эффективность и специфичность экспрессии генов (Doletsch et al., 1998), а увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле фагоцитов – это общий признак активации клеток.

Большая часть ионов Ca^{2+} , входящих в клетку, практически немедленно связывается с цитоплазматическими мишенями связывания кальция. Обнаружено, что только менее 1% ионов кальция, которые проникают в цитозоль, остается в несвязанном состоянии. Цитозольные кальциевые буферы представлены главным образом Ca^{2+} -связывающими белками, такими как парвальбумин, кальмодулин, кальсеквестрин, кальретинин, кальциунеурин, тропонин-С, белок S-100. Вошедшие в клетку и провзаимодействовавшие с цитозольными мишенями ионы Ca^{2+} оказывают влияние на метаболическое и функциональное состояние клетки. В Ca -связывающих белках может быть несколько участков связывания Ca^{2+} , между которыми проявляется положительная кооперативность. При связывании Ca^{2+} в структуре белка может увеличиваться количество α -спиралей и часто на поверхности экспонируются функциональные группы, участвующие во взаимодействии Ca -связывающего белка с другими эффекторными белками, например протеинкиназами. Таким образом, Ca^{2+} вызывает взаимодействие двух белков, что приводит к изменению их активности или локализации в клетке, что в конечном итоге ведет к активации эффекторных ферментов и запуску кальций-опосредованных внутриклеточных реакций (Ткачук, 2001).

В нашем исследовании мы показали, что гликозиды из промысловых голотурий, такие как $\text{CA}_2\text{-2}$, взаимодействуют с рецепторами P2X семейства (преимущественно с P2X4 типа) в сверхнизких дозах, вызывая изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в зрелых макрофагах. Поскольку, в соответствии со структурными моделями комплексов mP2X4 с гликозидом, сайты связывания для $\text{CA}_2\text{-2}$ и АТФ локализованы в разных областях внеклеточного рецепторного домена, можно заключить, что данные лиганды не только не конкурируют за взаимодействие с макрофагальными пуринорецепторами, но и что гликозиды голотурий являются мощными аллостерическими модуляторами активности P2X рецепторов. В результате моделирования методами молекулярной динамики показано, что действие $\text{CA}_2\text{-2}$ на пуринергические рецепторы P2X4 типа трансформирует их сайты связывания с образованием сети водородных и ионных

взаимодействий между двумя сайтами связывания. Именно такая сеть, вероятно, обуславливает характер влияния CA_2-2 на взаимодействие АТФ с P2X4 рецепторами и отвечает за модуляцию рецепторной активности.

Вследствие регуляции транспорта Ca^{2+} гликозиды усиливают экспрессию ряда генов, участвующих в активации клеточного иммунитета. Более того, как мы показали ранее, не только CA_2-2 , но и фрондозид А из голотурии *C. frondosa* регулирует экспрессию белка Septin-2 и целого ряда других белков, тем самым участвуя в формировании иммунной реакции на инфекцию.

Поэтому употребление кукумарии в пищу с последующим проникновением CA_2-2 в кровь (что было подтверждено нами с помощью MALDI масс-спектрометрии), а затем взаимодействие CA_2-2 и/или родственных соединений с P2X рецепторами приводит к стимуляции макрофагов и объясняет ранее установленные положительные эффекты этих природных соединений, включая повышение резистентности организма к патогенным бактериям, противорадиационный эффект, усиление противоопухолевого действия цитостатиков и т. д.

Многие заболевания человека сопровождаются наличием АТФ во внеклеточной среде во время воспаления. Это приводит к инактивации пуринергических рецепторов на мембранах иммунных клеток, к неспособности макрофагов реагировать на еще более высокие концентрации АТФ и, наконец, к иммуносупрессии и блокированию противоинфекционного контроля (Bours et al., 2011). Применение CA_2-2 не только стимулирует макрофагальную активность, но также выводит часть рецепторов P2X из их инактивированного состояния, что, как следствие, возвращает иммунные реакции организма к исходному состоянию.

Пуринергические рецепторы, активность которых тесно связана с целым рядом жизненно-важных функций организма, можно рассматривать как значимые молекулярные мишени для поиска новых фармацевтических препаратов. Например, недавно было установлено, что P2X4 рецепторы в миокарде могут быть использованы в качестве новой мишени для поиска кардиопротекторов при сердечной недостаточности (Yang, Liang, 2012). Эти же рецепторы в головном мозге представляют собой новую мишень для разработки лекарств для профилактики и лечения расстройств, связанных с употреблением алкоголя (Franklin et al., 2014).

Наши экспериментальные данные указывают на то, что макрофагальные рецепторы P2X4 типа могут выступать в качестве молекулярной мишени, участвующей в регуляции клеточного иммунитета в борьбе с инфекциями и против некоторых других стрессовых факторов.

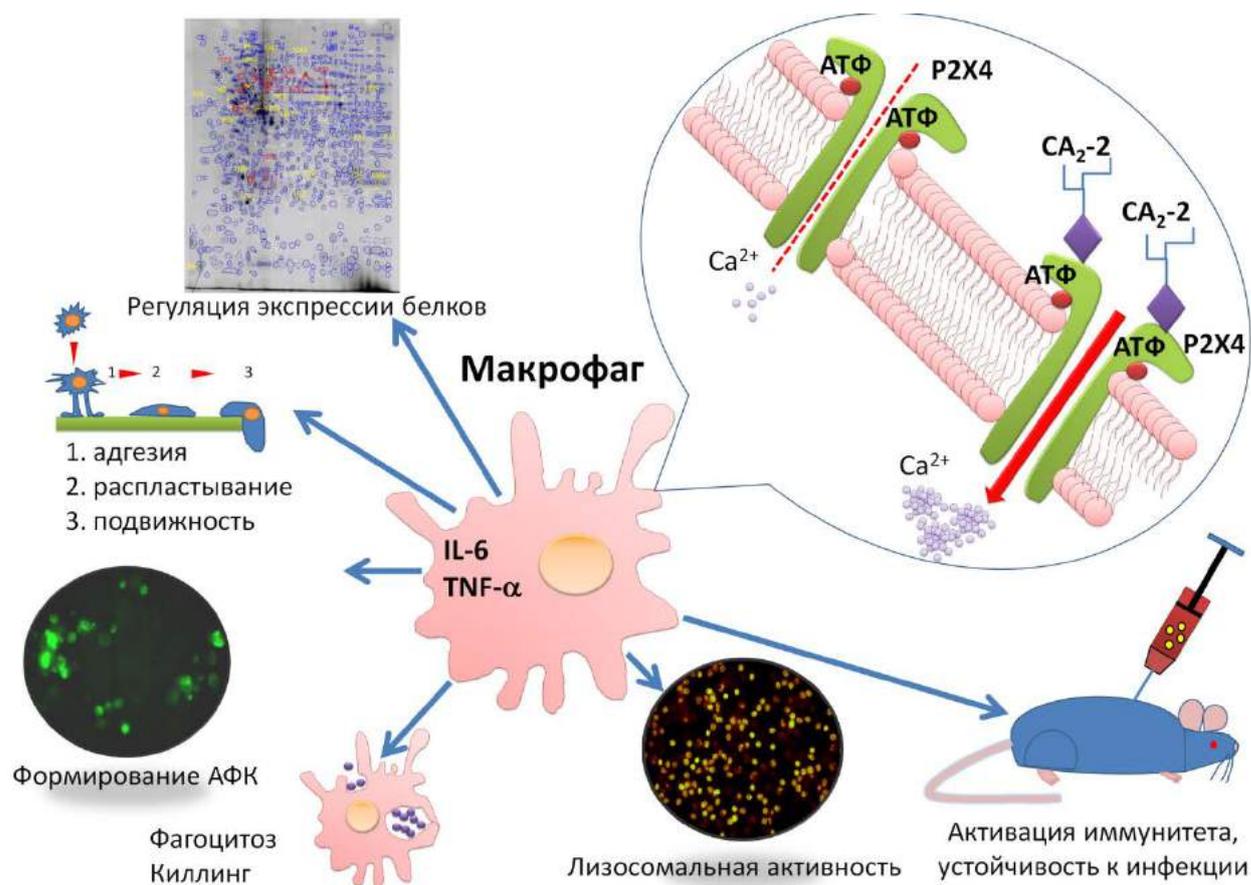


Схема 1. Общая схема взаимодействия кукумариозида A₂-2 с макрофагами. Кукумариозид A₂-2 (CA₂-2) может выступать в качестве регулятора, способного модулировать активацию пуринергических рецепторов P2X4 типа под действием внеклеточного АТФ и обеспечивать увеличение проводимости мембраны макрофагов для Ca²⁺. Такое взаимодействие может вызывать активацию Ca²⁺-опосредованного сигнального пути, который инициирует усиление экспрессии определенных внутриклеточных белков-мишеней, участвующих в ключевых этапах физиологии иммунных клеток. Это, в свою очередь, приводит к усилению адгезии, распластывания и подвижности макрофагов, увеличению образования АФК, повышению активности лизосом, усилению фагоцитоза, повышенному синтезу некоторых цитокинов (IL-6, TNF-α) и киллингу патогенных микроорганизмов. В итоге, под действием гликозида происходит активация клеточного иммунитета и увеличение резистентности организма к различным оппортунистическим инфекциям. В случае хронического воспаления, сопровождающегося инактивацией P2X рецепторов, после введения кукумариозида A₂-2 происходит восстановление первоначального иммунного ответа, и организм может выйти из состояния хронического воспаления

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В основе биологического действия многих физиологически активных соединений природного происхождения лежит их способность взаимодействовать с клеточными мембранами и изменять их функциональное состояние. Для тритерпеновых гликозидов голотурий характерно наличие целого ряда полезных с точки зрения медицины свойств, но, как правило, характер их активности строго зависит от применяемых доз. С одной стороны, это – ингибирующие свойства, которые могут выражаться в проявлении цитотоксической, противомикробной, гемолитической и т.п. активностей. С другой – проявление стимулирующей активности, что отражено, например, в стимулировании иммунной системы и усилении репаративных процессов в тканях и органах. Безусловно, эти свойства уже находят и еще найдут свое применение в медицинской практике. Кроме того, специфическое взаимодействие тритерпеновых гликозидов голотурий с мембранами, мембранными компонентами или внутриклеточными молекулами-мишенями делает возможным использование этих веществ в качестве тонких инструментов для изучения определенных биохимических процессов или практического применения их в биотехнологии и клеточной инженерии.

Изученный в данной работе тритерпеновый гликозид кукумариозид A_2-2 и созданное на его основе иммуномодулирующее лекарственное средство кумазид принадлежат как раз к таким препаратам. В настоящей работе различными методами установлено, что цитотоксическая активность кукумариозида A_2-2 является дозозависимой и проявляется в микромолярном диапазоне концентраций независимо от типа клеток, а зависимость эффективности цитотоксического действия гликозида от его концентрации носит линейный характер. В основе иммуностимулирующего действия кукумариозида A_2-2 лежит его способность взаимодействовать, прежде всего, с иммунными клетками. Зависимость иммуностимулирующей активности гликозида от концентрации носит куполообразный характер, а максимальный иммуностимулирующий эффект кукумариозида A_2-2 и ряда других тритерпеновых гликозидов голотурий лежит в наномолярном диапазоне концентраций, что примерно в 100 раз ниже диапазона концентраций его мембранолитического и цитотоксического действия.

На степень иммуномодулирующей активности гликозида оказывает влияние наличие и количество сульфатных групп в углеводной части молекулы. Среди всех исследованных кукумариозидов из голотурии *C. japonica* наиболее выраженным иммуностимулирующим действием обладает моносульфатированный гликозид кукумариозид A_2-2 , в то время как дисульфатированные гликозиды менее активны, а трисульфатированные гликозиды вообще не проявляют стимулирующий эффект. Агликон

практически не активен. Иммуномодулирующее действие гликозидов сопровождается усилением адгезии иммунных клеток, их подвижности и пролиферации, увеличением синтеза в них АФК и NO, усиления лизосомальной активности и фагоцитоза. Иммуномодулирующие свойства обнаружены и у других тритерпеновых гликозидов голотурий, принадлежащих отряду Dendrochirota: моносульфатированных гликозидов фрондозида А из *C. frondosa*, фрондозида А₁, серии охотозидов и кукумариозида А₂₋₅ из голотурии *C. okhotensis*, серии типикозидов из голотурии *A. typica* и некоторых гликозидов из голотурии *E. fraudatrix* (отряд Aspidochirota). Это свидетельствует в пользу общей закономерности и определенной общности проявления иммуностимулирующих свойств тритерпеновыми гликозидами голотурий.

Результатом исследований иммуностимулирующих свойств гликозидов голотурий стало создание на основе наиболее эффективных моносульфатированных тритерпеновых гликозидов из *C. japonica* (главным образом кукумариозида А₂₋₂) препарата кумазид, представляющего собой комплекс гликозида с холестерином. Существенным преимуществом данного препарата перед исходным гликозидом и ранее созданными ветеринарными препаратами является заметное снижение гемолитических, цитотоксических и токсических свойств при полном сохранении иммуномодулирующей активности.

На основании результатов исследования острой и кумулятивной токсичности кумазида сделано заключение, что препарат при внутрижелудочном введении по параметрам острой токсичности относится к практически безопасным соединениям, а при внутрибрюшинном способе введения – ко II классу опасности. 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 в диапазоне исследованных доз 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. В работе отмечено, что кумазид достоверно индуцирует продукцию цитокинов, ФНО-α и ИЛ-6, мононуклеарными клетками человека, вызывает

незначительное 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 врождённого и адаптивного иммунитета: препарат оказывает значительное дозозависимое влияние на гуморальный иммунитет в опытах *in vivo*, достоверно увеличивая количество антителообразующих клеток в селезенке животных.

Обнаружено достоверное радиозащитное действие малых доз кумазида, которое выражается в стимулирующем влиянии на показатели клеточного состава периферической крови, функции кроветворения, клеточность кроветворных и лимфоидных органов и количество полипотентных стволовых кроветворных клеток. Именно эти свойства обеспечивают защитный эффект препарата в тестах выживаемости сублетально облученных животных. Кумазид обладает противоопухолевым действием *in vivo*, которое проявляется наиболее выражено при «профилактической» и «комбинированной» схемах применения, что может быть связано с иммуномодулирующими свойствами тритерпенового гликозида. Сочетанное применение кумазида с другими противоопухолевыми препаратами приводит к синергизму в их противоопухолевом действии.

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. При внутрибрюшинном способе введения мышам гликозид достигает максимальной концентрации в органе-мишени, селезенке, за полчаса, а время полувыведения препарата составляет всего несколько часов. Кукумариозид А₂-2 в течение длительного времени не претерпевает метаболических трансформаций в ткани селезенки и локализуется главным образом в области серозной оболочки.

В результате сравнительного протеомного анализа идентифицирован набор белков, одинаковым образом экспрессирующихся в спленоцитах селезенки после их инкубирования с тритерпеновыми гликозидами. Наибольшее количество регулируемых гликозидами белков принимает непосредственное участие в регуляции пролиферации, адгезии и подвижности клеток, созревании фагосом и их слиянии с лизосомами, а также вовлечено в ремоделирование цитоскелета и сигнальную трансдукцию.

Фармакодинамические исследования кумазида показали, что в наномолярных концентрациях кукумариозид А₂-2 связывается с мембранами иммунных клеток, обратимо увеличивая микровязкость липидного бислоя. Взаимодействие гликозида с

перитонеальными макрофагами приводит к обратимому изменению мембранного потенциала и временной деполяризации, что сопровождается генерированием в цитозоле макрофагов кратковременного увеличения внутриклеточной концентрации кальция. Быстрый вход Ca^{2+} в цитоплазму клеток является обратимым, а поступление ионов кальция в клетки происходит из окружающей внеклеточной среды, а не из внутриклеточных депо. Взаимодействие гликозида с макрофагами происходит в двух местах связывания; наличие высокоаффинного сайта подразумевает присутствие на поверхности иммунокомпетентных клеток специфического рецептора. Оказалось, что кукумариозид $\text{A}_2\text{-2}$ не взаимодействует со стероидными рецепторами, и под действием гликозида кальций поступает в клетки, минуя потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортер и G-белок-сопряженные рецептор-управляемые Ca^{2+} -каналы.

Доказано, что мембранными мишенями для гликозида являются пуриновые рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающие Ca^{2+} проводимость в мембране макрофагов и поступление ионов кальция в цитоплазму клеток вследствие регуляции функционирования рецепторов. Кукумариозид $\text{A}_2\text{-2}$ 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.

Популяция перитонеальных макрофагов мыши неоднородна и состоит, как минимум, из двух субпопуляций клеток, различающихся по размеру, гранулированности и плотности ряда маркеров и рецепторов. Обнаружены макрофаги с повышенной плотностью пуриновых P2X1 и P2X4 рецепторов, локализованных на $\text{F4}/80^+$ макрофагах. Очевидно, именно зрелые $\text{F4}/80^+/\text{P2X}^+$ макрофаги принимают участие в Ca^{2+} ответе на аппликацию гликозида.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что кумазид относится к группе иммуностимулирующих препаратов, обладающих способностью стимулировать, главным образом, клеточное звено иммунитета. Входящий в состав кумазида тритерпеновый гликозид кукумариозид $\text{A}_2\text{-2}$ из голотурии *S. japonica* является низкомолекулярным биорегулятором, способным эффективно модулировать ионную проницаемость мембран иммунных клеток и Ca^{2+} -сигнализацию посредством взаимодействия со специфическими пуринергическими рецепторами. Вследствие этого воздействия происходит запуск каскада внутриклеточных реакций, приводящих к иммуностимулирующему ответу клеток. Первым звеном в этом каскаде является активация Ca^{2+} -сигнального метаболического пути, инициирующая впоследствии увеличение экспрессии набора внутриклеточных белков-мишеней, участвующих в ключевых этапах физиологии

иммунокомпетентных 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.

Обобщенная картина взаимодействия кукумариозида с иммунокомпетентными клетками представлена на схеме 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

крововетворения, обладает противоопухолевым действием и существенно повышает устойчивость животных к экспериментальным бактериальным инфекциям *in vivo*.

4) Изучен механизм иммуномодулирующего действия кукумариозида A₂-2. 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 A₂-2 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 A₂-2. 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.

б) Исследовано взаимодействие кукумариозида A₂-2 с биомембранами:

- Взаимодействие гликозида с макрофагами приводит к обратимому увеличению микровязкости липидного бислоя и временной деполяризации, и сопровождается обратимым увеличением внутриклеточной концентрации Ca²⁺.

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

- Установлено, что кукумариозид A₂-2 не взаимодействует с рецепторами к эстрогенам, и под действием гликозида кальций поступает в клетки из внеклеточной среды, минуя потенциал-чувствительные Ca²⁺-каналы, Na⁺/Ca²⁺-антипортер и G-белок-сопряженные рецептор-управляемые Ca²⁺-каналы.

7) Впервые доказано, что мембранными молекулярными мишенями иммуномодулирующего действия кукумариозида A₂-2 являются пуриновые рецепторы P2X семейства (преимущественно P2X4 типа), обеспечивающие Ca²⁺ проводимость в мембране макрофагов и поступление ионов кальция из окружающей внеклеточной среды в цитоплазму клеток. Показано, что кукумариозид A₂-2 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 Ca²⁺ ответе на действие гликозида.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D-PAGE – двумерный электрофорез в полиакриламидном геле,
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,
ЯМР – ядерный магнитный резонанс,
ASIC – кислотно-чувствительные ионные каналы,
DMEM – среда Игла, модифицированная Дульбекком,
EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация,
ENaC – эпителиальный Na⁺-канал,
ESI – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением,
FBS – эмбриональная сыворотка телят,
FITC – флуоресцеин изотиоцианат,
GPCR – рецепторы, сопряжённые с G-белком,
H&E – гематоксилин-эозин,
IC₅₀ – полумаксимальная ингибирующая концентрация,
ISCOM - иммуностимулирующий комплекс,
ITO – покрытие с помощью оксида индия и олова,
Kd – константа диссоциации,
LD₅₀ – полумаксимальная летальная доза,
MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация,
MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид,
³H-Thd – тимидин, меченый тритием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука. 1994. 288 с.
2. Авилов С.А., Стоник В.А., Калиновский А.И. Строение четырех новых тритерпеновых гликозидов из морской голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соед. 1990. № 6. С. 787–798.
3. Авилов С.А., Калинин В.И., Калиновский А.И., Стоник В.А. Кукумариозид G₂ – минорный тритерпеновый гликозид из голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Химия природ. соед. 1991а. № 3. С. 438–439.
4. Авилов С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А. Два новых тритерпеновых гликозида из голотурии *Duasmodyla kurilensis* // Химия природ. соед. 1991б. № 2. С. 221–226.
5. Авилов С.А., Калинин В.И., Дроздова О.А., Калиновский А.И., Стоник В.А., Гудимова Е.Н. Тритерпеновые гликозиды голотурии *Cucumaria frondosa* // Химия природ. соед. 1993. № 2. С. 260–263.
6. Авилов С.А. Тритерпеновые гликозиды голотурий отряда Dendrochirotida. Автореферат на соискание ученой степени доктора химических наук. Владивосток, 2000. 62 с.
7. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 264 с.
8. Акулин В.Н., Ковалев В.Г., Семенцов В.К., Слуцкая Т.Н., Тимчишина Г.Н. Общеукрепляющее неспецифическое иммуномодулирующее средство // Патент РФ RU 2147239С1. 10.04.2000. Приоритет от. 27.09.1996.
9. Аминин Д.Л. Исследование биологической функции голотоксина в организме голотурии *Stichopus japonicus* // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Владивосток, 1988. 20 с.
10. Аминин Д.Л., Анисимов М.М. Влияние голотоксина А₁ на транспорт Са²⁺ и мейотическое созревание ооцитов голотурии *Stichopus Japonicus* // Ж. эвол. биохим. физиол. 1990а. Т. 26, № 1. С. 9–13.
11. Аминин Д.Л., Анисимов М.М. Содержание голотоксина в тканях голотурии *Stichopus japonicus* S. в разные сезоны года и их влияние на созревание ооцитов // Ж. эвол. биохим. физиол. 1987. Т. 23, № 4. С. 545–547.
12. Аминин Д.Л., Анисимов М.М., Мокрецова Н.Д., Стригина Л.И., Левина Э.В. Влияние тритерпеновых и стероидных гликозидов на овоциты, яйца и эмбрионы голотурии *Stichopus japonicus* и морского ежа *Strongylocentrorus nudus* // Биол. моря. 1986. № 3. С. 49–52.
13. Аминин Д.Л., Лебедев А.В., Левицкий Д.О. Влияние голотоксина А₁ на перенос ионов кальция через липидные модели биологических мембран // Биохимия. 1990б. Т. 55, № 2. С. 270–275.

14. Аминин Д.Л., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Гладких Р.В., Капустина И.И., Лихацкая Г.Н., Авилов С.А., Стоник В.А. Использование в фармакокинетических исследованиях меченных тритием тритерпеновых гликозидов из голотурии *Cicumaria japonica* // Докл. АН. 2008. Т. 422, № 5. С. 710–713.
15. Анисимов М.М. Тритерпеновые гликозиды и структурно-функциональные свойства мембран // Биол. науки. 1987. № 10. С. 49–63.
16. Анисимов М.М., Аминин Д.Л., Ровин Ю.Г., Лихацкая Г.Н., Попов А.М., Кузнецова Т.А., Калиновская Н.И., Еляков Г.Б. Об устойчивости клеток голотурии *Stichopus japonicus* к действию эндотоксина – стихопозида А // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270, № 4. С. 991–993.
17. Анисимов М.М., Лихацкая Г.Н., Прокофьева Н.Г., Стехова С.И., Шенцова Е.Б., Стригина Л.И. Свободные и гликозилированные тритерпеноиды как модификаторы структурно-функциональных свойств биологических и модельных мембран // Успехи в изучении природных соединений. Владивосток: Дальнаука, 1999. С. 124–140.
18. Анисимов М.М., Стригина Л.И., Баранова С.И., Кульга А.Л., Четырина Н.С. Об антимикробной активности тритерпеновых гликозидов из *Caulophyllum robustum* Maxim. // Антибиотики. 1972. № 9. С. 834–837
19. Анисимов М.М., Стригина Л.И., Горовой П.Г., Аминин Д.Л., Агафонова И.Г. Химический состав и медико-биологические свойства тритерпеновых гликозидов дальневосточного растения *Caulophyllum robustum* (семейство Berberidaceae) // Раст. ресурсы. 2000. № 1. С. 107–129.
20. Анисимов М.М., Чирва В.Я. О биологической роли тритерпеновых гликозидов. // Успехи современной биологии. 1980. Т 6, № 3. С. 351–364.
21. Анисимов М.М., Щеглов В.В., Дзизенко С.Н., Стригина Л.И., Уварова Н.И., Ошипок Г.И., Кузнецова Т.А., Четырина Н.С, Сокольский И.Н. Влияние некоторых стероидов на антимикробную активность тритерпеновых гликозидов растительного и животного происхождения // Антибиотики. 1974. № 7. С. 625–628.
22. Анисимов М.М., Щеглов В.В., Кузнецова Т.А., Еляков Г.Б. Чувствительность клеток *Candida albicans* к действию тритерпеновых гликозидов дальневосточного трепанга *Stichopus japonicus* Selenka // Микробиология. 1973. В. 4. С. 667–671.
23. Анисимов М.М., Щеглов В.В., Стригина Л.И., Четырина Н.С., Уварова Н.И., Ошиток Г.И., Аладьина Н.Г., Вечерко Л.П., Зорина А.Д., Матюхина Л.Г., Салтыкова И.А. Химическое строение и антигрибковая активность некоторых тритерпеноидов // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1979. № 4. С. 570–575.
24. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962. 234 с.
25. Бажурина И.М., Панов М.Л. Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии. М.: ВИНТИ, 1986. Т. 3. 124 с.

26. Балынина Е.С., Березовская И.В. Сравнительная оценка методов определения ориентировочной реакции крыс в токсикологическом эксперименте // Фармакол. и токсикол. 1976. Т. XXXIX, № 5. С. 635/
27. Батраков С.Г., Гиршович Е.С., Дрожжина Н.С. Тритерпеновые гликозиды с антигрибковой активностью, выделенные из морской кубышки *Cucumaria japonica* // Антибиотики. 1980. № 6. С. 408–411.
28. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. Руководство для врачей. М., 1997. 532 с.
29. Блюгер А.Ф. Основы гепатологии. Рига: Изд-во "Эй-вайгане", 1975. 467 с.
30. Бойд У. Основы иммунологии. М.: Мир, 1969. 647 с.
31. Болдырев А.А., Куин П.Дж., Лушак В.И. Механизм термоиндуцированного функционального разобщения Ca^{2+} -насоса саркоплазматического ретикулума скелетных мышц // Биохимия. 1986. Т. 51, № 1. С.150–159.
32. Бузников Г.А., Подмарев В.К. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Объекты биологии развития. М.: Наука. 1975. С.188–216.
33. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.
34. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 1980. 320 с.
35. Гольдберг Е.Д., Гольдберг Д.И. Справочник по гематологии с атласом микрофотограмм. 5-е изд-е, доп. и перераб. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1975. 280 с.
36. Гончаренко Е.Н., Кудряшов Ю.Б. Химическая защита от лучевого поражения. М.: Изд-во МГУ, 1985. 147 с.
37. Гришин Ю.И., Авилов С.А. Влияние кукумариозида на пролиферацию и миграцию плюрипотентных стволовых клеток // Научн. конф. «Экспериментальная и клиническая иммунология на Востоке страны». Тез. докл. Красноярск. 1988б. Т. 1. С. 30.
38. Гришин Ю.И., Агафонова И.Г., Авилов С.А. Сравнительная оценка действия гликозидов природного происхождения на звенья кроветворной и иммунной систем // IX молодежная конф. по синтетическим и природным физиологически активным соединениям. Тез. докл. Ереван. 1988а. С. 70.
39. Гришин Ю.И., Анисимов М.М. Тритерпеновые гликозиды и структурно-функциональные свойства мембран // Биол. науки. 1987. № 10. С. 49–63.
40. Гришин Ю.И., Беседнова Н.Н., Стоник В.А., Ковалевская А.М., Авилов С.А. Регуляция гемопоэза и иммуногенеза тритерпеновыми гликозидами из голотурий // Радиобиология. 1990. Т. 30, № 4. – С. 556.

41. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. Новый эффективный препарат для ветеринарии КМ-2 (кукумариозид-2) // Новости звероводства. 1991а. № 2. С. 4.
42. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. Иммуностимуляторы для звероводства КМ и КМ-2 // Новости звероводства. 1991б. № 2. С. 19–23.
43. Гришин Ю.И., Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Влазнев В.П., Слугин В.С. Средство для профилактики и лечения алеутской болезни норок // Патент РФ RU 2036654С1. 09.09.1995. Приоритет 16.08.2001.
44. Деканосидзе Г.Е., Чирва В.Я., Сергиенко Т.В., Уварова Н.И. Биологическая роль, распространение и химическое строение тритерпеновых гликозидов. Исследование тритерпеновых гликозидов (установление строения и синтез). Тбилиси: Мецниереба, 1982. 352 с.
45. Дроздова О.А., Авилов С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А., Мильгром Ю.М., Рашкес Я.В. Трисульфатированные гликозиды из голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соед. 1993. № 3. С. 369–374.
46. Дыбан А.П. Некоторые актуальные задачи экспериментальной тератологии // Вестник АМН СССР. 1967. № 1. С. 18.
47. Еляков Г.Б., Стоник В.А. Терпеноиды морских организмов. М.: Наука. 1986. 270 с.
48. Зиганшин А.У. Роль рецепторов АТФ (P2-рецепторов) в нервной системе // Неврологический вестник. 2005. Т. XXXVII, № 1–2. С. 45–53.
49. Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. P2-рецепторы: перспективная мишень для будущих лекарств. М: ГЭО-ТАР-Медиа, 2009. 136 с.
50. Калинин В.И., Афиятуллов Ш.Ш., Калиновский А.И. Тритерпеновые гликозиды голотурии *Eurentacta pseudoquinquesemita* // Химия природ. соед. 1988. № 2. С. 221–225.
51. Калинин В.И. Морфологические закономерности в эволюции тритерпеновых гликозидов голотурий (*Holothurioidea, Echinodermata*) // Ж. общ. биол. 1992. Т. 53, № 5. С. 672–688.
52. Калинин В.И., Калиновский В.И., Стоник В.А., Дмитренко П.А., Елькин Ю.Н. Структура псолюсозида В – неголостанового тритерпенового гликозида из голотурии рода *Psolus* // Химия природ. соед. 1989. № 3. С. 361–368.
53. Калинин В.И., Левин В.С., Стоник В.А. Химическая морфология: тритерпеновые гликозиды голотурий (*Holothurioidea, Echinodermata*). Владивосток: Дальнаука, 1994. 284 с.
54. Калинин В.И., Стоник В.А. Химическая морфология – новый подход к изучению биохимической эволюции // Вест. ДВО АН СССР. 1991. № 1. С. 54–65.
55. Калинин В.И., Стоник В.А. Эволюция вторичных метаболитов морских организмов: параллелизмы, конвергенция, биохимическая координация, химическое детерминирование // Вест. ДВО АН СССР. 1990. № 2. С. 120–129.

56. Калинин В.И., Стоник В.А., Авилов С.А. Гомологическая изменчивость и направленность в эволюции тритерпеновых гликозидов голотурий (*Holothurioidea*, *Echinodermata*) // Ж. общ. биол. 1990. Т. 5, № 2. С. 247–260.
57. Ким И.А., Абдрасилов Б.С., Нуриева Р.И., Парк К.Д. Действие тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда и их агликонов K^+ H^+ ионные токи в эритроцитах, вызванные ионофором А23187 и дивалентными ионами // Антибиотики и химиотерапия. 1995. Т. 40. 20–24.
58. Клебанов Г.И., Владимиров Ю. А. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов // Успехи современной биологии. 1999. Т. 119, № 5. С. 462–475
59. Ковалев Н.Н., Баранова В.С. Лечебно-профилактическая композиция «ОСТЕОМАКС ЭКСТРА» для улучшения функционального состояния опорно-двигательного аппарата // Патент РФ RU 2220737 С1. 10.01.2004. Приоритет 07.03.2003.
60. Ковалевская А.М., Стоник В.А. Средство для лечения лучевой болезни // Патент РФ RU 2141833 С1. 27.11.1999. Приоритет 16.07.1997.
61. Ковалевская А.М., Стоник В.А., Авилов С.А., Гришин Ю.И. Средство, обладающее профилактическим и лечебным действием при заражении вирусом клещевого энцефалита // Патент РФ RU 2242238 С1. 20.12.2004. Приоритет 07.02.2003.
62. Ковалевская А.М., Стоник В.А., Гришин Ю.И. Средство, обладающее противовирусной активностью // Патент РФ RU 2184556 С1. 10.07.2002. Приоритет 16.08.2001.
63. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. 366 с.
64. Костецкий Э.Я., Попов А.М., Санина Н.М., Ли И.А., Цыбульский А.В., Шныров В.Л. Носитель и адъювант для антигенов // Патент РФ RU 2311926. 10.12.2007. Приоритет 15.02.2006.
65. Костецкий Э.Я., Санина Н.М., Мазейка А.Н., Цыбульский А.В., Воробьева Н.С., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Шныров В.Л. Иммуностимулирующий комплекс, способ его получения и применение // Патент РФ RU 2446822 С2. 10.04.2012. Приоритет 19.04.2010.
66. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. Механизмы Ca^{2+} сигнализации в перитонеальных макрофагах // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2000. Т. 86, № 8. С. 1030–1048.
67. Кудряшов Ю.Б. Лучевое поражение критических систем // Лучевое поражение. М., 1987. С. 5–72.
68. Кукес В.Г. Клиническая фармакокинетика: теоретические, прикладные и аналитические аспекты: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 432 с.

69. Лебская Т.К., Дубницкая Г.М., Байдалова Г.Ф. Способ обогащения рыбного жира биологически активными веществами из беспозвоночных гидробионтов // Патент РФ RU 2162647 С2. 10.02.2001. Приоритет 04.02.1999.
70. Лебская Т.К., Шаповалова Л.А. Пищевая биологически активная добавка (варианты) // Патент РФ RU 2225210 С1. 10.03.2004. Приоритет 25.07.2002.
71. Левин В.С. Дальневосточный трепанг. Владивосток: Дальневосточное книжное изд-во, 1982. 192 с.
72. Левин В.С. О биологической роли и происхождении токсичных гликозидов иглокожих // Журнал общей биологии. 1989. Т. 50, № 2. С. 207–212.
73. Левин В.С. Дальневосточный трепанг. Биология, промысел, воспроизводство. СПб.: Голанд, 2000. 200 с.
74. Ли И.А., Попов А.М., Цыбульский А.В., Санина Н.М., Костецкий Э.Я., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Мазейка А.В. Иммуностимулирующие свойства нового носителя антигенов на основе кукумариозида А₂-2 и моногалактозилдиацилглицерола // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44, № 6. С. 694–700.
75. Лирман А.В. / Лирман А.В., Бакман С.М, Яковлев Г.М. Регистрация и оценка ЭКГ у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1973, № 4. С.83–85.
76. Лихацкая Г.Н. Механизмы взаимодействия тритерпеновых и стероидных гликозидов с липидными мембранами. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук: 03.00.02. Владивосток, 2006. 23 с.
77. Лихацкая Г.Н. Тритерпеновые и стероидные гликозиды и мембраны. Молекулярные механизмы взаимодействия гликозидов с мембранами. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2011. 115 с.
78. Лихацкая Г.Н., Яровая Т.П., Руднев В.С., Попов А.М., Анисимов М.М., Ровин Ю.Г. Образование комплекса тритерпенового гликозида голотуринина А с холестерином в липосомальных мембранах // Биофизика. 1985. Т. 30, № 2. С. 358–359.
79. Лоенко Ю.Н., Голомовская Е.А., Артюков А.А., Бокарев А.В., Перминов Б.Н., Колей О.Н., Мазурик В.Г., Емец Ю.А. Композиция ингредиентов для водки особой «ЧУРИНЪ» // Патент РФ RU 2041935 С1. 20.08.1995. Приоритет 17.09.1993.
80. Любимова Н.Б., Леонова Г.Н., Мураткина С.М., Гришин Ю.Н. Действие иммуномодуляторов при экспериментальном энцефалите, вызванном высоко- и слабовирулентными штаммами вируса клещевого энцефалита // Рабочее совещание «Иммуномодуляторы природного происхождения». Тез. докл. Владивосток. 9–10 октября, 1990. С. 62.
81. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия. 1998. Т. 63, Вып. 7. С. 1007–1019.
82. Малашенко А.М., Суркова Н.И. Семенов Х.Х. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах (методические указания). М.: 1987.

83. Мальцев И.И., Стехова С.И., Шенцова Е.Б., Анисимов М.М., Стоник В.А. Противомикробная активность гликозидов из голотурий семейства *Stichopodidae* // Хим.-фарм. журн. 1985. № 1. С. 54–56.
84. Менчинская Е.С., Аминин Д.Л., Сильченко А.С., Андриященко П.В., Авилов С.А., Калинин В.И., Стоник В.А. Средство, ингибирующее множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток // Патент РФ RU 2494742 С1. 10.10.2013. Приоритет 10.08.2012.
85. Мирошниченко И. Основы фармакокинетики. М.: ГЭОТАР Медицина, 2002. 200 с.
86. Мясоедов Н.Ф., Стоник В.А., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Аминин Д.Л., Авилов С.А. Шевченко К.В. Равномерно меченные тритием гликозиды голотурий *Cusumaria* // Патент РФ RU 2351606 С1. 10.04.2009. Приоритет 04.10. 2007.
87. Некрасова В.Б., Горбунов В.Я., Никитина Т.В., Курныгина В.Т. Биологически активная добавка к пище // Патент РФ RU 2184464 С2. 10.07.2002. Приоритет 10.04.2000.
88. Озрина Р.Д., Ульянов А.М., Сарвачев К.Ф. Метод приготовления гомогенных образцов тканей и крови для жидкостного сцинтилляционного счета // Биологические науки. 1979. № 4. С. 100–103.
89. Поверенный А.М. Вероятные причины высокой радиочувствительности системы кроветворения // Радиобиология. 1990. Т. 30, №. 4. С. 538.
90. Поликарпова С.И., Волкова О.Н., Седов А.М., Стоник В.А., Лиходед В.Г. Цитогенетическое изучение мутагенности кукумариозида// Генетика. 1990. Т 26, № 9. С. 1682–1684.
91. Попов А. М., Калиновская Н. И., Кузнецова Т. А., Агафонова И. Г., Анисимов М. М. Роль стеринов в мембранотропной активности тритерпеновых гликозидов // Антибиотики. 1983. № 9. С. 656–659.
92. Попов А.М. Изучение мембранотропной активности некоторых тритерпеновых гликозидов: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.04. Владивосток, 1984. 24 с.
93. Попов А.М. Механизмы биологической активности гликозидов женьшеня: сравнение с гликозидами голотурий // Вестник ДВО РАН. 2006. № 6. С. 92–104.
94. Попов А.М., Атопкина Л.Н., Самошина Н. Ф., Уварова Н.И. Изучение иммуномодулирующей активности тетрациклических тритерпеновых гликозидов даммаранового и голостанового ряда // Антибиотики и химиотерапия. 1994. Т. 39, № 9–10. С. 19–25.
95. Попов А.М., Ли И.А., Костецкий Э.Я., Санина Н.М., Цыбульский А.В., Шныров В.Л., Мазейка А.Н. Носитель антигенов // Патент РФ RU 2322259. 20.04.2008. Приоритет 29.06.2006.

96. Попов А.М., Лоенко Ю.Н., Анисимов М.М. Изменение чувствительности опухолевых клеток к действию тритерпеновых гликозидов липосомами // Антибиотики. 1981. Т. 26, № 3. С. 127–129.
97. Прокофьева Н. Г., Лихацкая Г. Н., Волкова О. В., Анисимов М. М., Киселева М. И., Ильин С. Г., Будина Т. А., Похило Н. Д. Действие бетулафолиентетраола на эритроцитарные и модельные мембраны // Биологические мембраны. 1992. Т. 9, №. 9. С. 954–960.
98. Прокофьева Н.Г., Анисимов М.М., Стригина Л.И., Киселева М.И., Гафуров Ю.М. Влияние реакции среды на цитотоксическую и противоопухолевую активность тритерпенового гликозида каулозида С. // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Черногоровка. 1987. С. 37.
99. Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций // Иммунология. 2000. № 4. С. 9–20.
100. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 165 с.
101. Розанов Ю.М. Проточная цитометрия. В кн.: Методы культивирования клеток. Сборник научных трудов (Пинаев Г.П. Ред.) Л.: Наука. 1988. 320 с.
102. Рубцов Б.В., Ружницкий А.О., Клебанов Г.И., Седов А.М., Владимиров Ю.А. Влияние некоторых тритерпеновых гликозидов морских беспозвоночных на проницаемость биологических и искусственных мембран // Изв. АН СССР. Сер. Биол. 1980. № 3. – С. 436–445.
103. Санина Н. М., Костецкий Э. Я., Цыбульский А.В., Красильникова А.О., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Шныров В.Л. Богданов М.В. Способ регуляции иммуногенности антигена. Патент РФ RU 2440141 С1. 20.01.2012. Приоритет 31.05.2010.
104. Санина Н.М., Попов А.М., Ли И.А., Костецкий Э.Я., Цыбульский А.В., Шныров В.Л. Способ получения носителя антигенов на основе липидов из морских макрофитов и тритерпенового гликозида кукумариозида // Патент РФ RU 2319506 С2. 20.03.2008. Приоритет 12.10.2005.
105. Седов А.М. Характеристика иммуномодулирующих свойств тритерпеновых гликозидов голотурий. Автореф. канд. биол. наук. М.: 1984а. 26 с.
106. Седов А.М., Елкина С.И., Сергеев В.В., Калина Н.Г., Саканделидзе О.Г., Батраков С.Г., Гиршович Е.С. Способность тритерпеновых гликозидов из голотурий стимулировать антибактериальную устойчивость на модели экспериментального сальмонеллеза мышей // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1984б. № 5. С. 55–58.
107. Седов А.М., Шепелева И.Б., Захарова Н.С., Саканделидзе О.Г., Сергеев В.В., Мошиашвили И.Я. Влияние кукумариозида (тритерпенового гликозида из голотурий *Cicutaria japonica*) на развитие иммунного ответа мышей на корпускулярную вакцину // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 1984в. № 9. С. 100–104.
108. Седов А.М., Аполлонин А.В., Севастьянова Е.К., Козлова Н.Н., Стоник В.А., Авилов С.А., Купера Е.В. Кукумариозид – новый иммуномодулятор из дальневосточных

голотурий // Всес. совещ. «Биологически активные вещества при комплексной утилизации гидробионтов». Тез. докл. Владивосток, 1988. С. 70–72.

109. Седов А.М., Аполлонин А.В., Севастьянова Е.К., Алексеева И.А., Батраков С.Г., Саканделидзе О.Г., Лиходед В.Г., Стоник В.А., Авилов С.А., Купера Е.В. Стимуляция тритерпеновыми гликозидами голотурий неспецифической антибактериальной резистентности мышей к условно-патогенным грамотрицательным микроорганизмам // Антибиотики и химиотерапия. 1990а. Т. 35, № 1. С. 23–26.

110. Седов А.М., Виноградов И.В., Жоголева И.Б., Николаева Е.Н., Борисенко Е.В., Севастьянова Е.К., Соколова Т.В., Стоник В.А., Саканделидзе О.Г. Доклиническое изучение кукумариозида – нового иммуномодулятора, получаемого из дальневосточных голотурий. Исследование специфической иммунофармакологической активности // Всесоюзный симпозиум «Реабилитация иммунной системы». Тез. докл. Цхалтубо, 1990б. С. 354.

111. Сенченко Е. В., Шульгина Л. В. Способ производства пробиотического продукта // Патент РФ RU 2416201 С2. 20.04.2011. Приоритет 17.09.2008.

112. Сильченко А.С., Авилов С.А., Калинин В.И., Стоник В.А., Калиновский А.И., Дмитренко П.С., Степанов В.Г. Моносультатированные тритерпеновые гликозиды *Cucumaria okhotensis* Levin et Stepanov – нового вида голотурий из Охотского моря // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33, № 1. С. 81–90.

113. Слугин В.С. Алеутская болезнь норок и пути ее ликвидации. Автореф. докт. вет. наук. М.: 1982. 343 с.

114. Слущкая Т.Н., Тимчишина Г.Н., Павелъ К.Г. Способ комплексной переработки внутренностей голотурий с получением биологически активных добавок к пище и биологически активные пищевые добавки «ТИНГОЛ-2» и «Эрогол» // Патент РФ RU 02215532 С2. 10.11.2003. Приоритет 10.12.2001.

115. Соботович С.Л., Богуславский В.М. Перспективы лечения онкологических больных при совместном использовании БРТ и иммуномодулятора КД (кукумариозид) // Матер. 7 межд. конф. «Теоретические и клинические аспекты применения биорезонансной и мультirezонансной терапии» 20–22 апреля, 2001. М.: 2001. С. 98.

116. Сомова Л.М., Плехова Н.Г. Оксид азота как медиатор воспаления // Вестник ДВО РАН. 2006. № 2. С. 77–80.

117. Софьина З.П. Модели и методы, применяемые для отбора противоопухолевых препаратов в СССР и за рубежом // Вопр. онкологии. 1976. Т. 22, № 4. С. 82–96.

118. Стехова С.И., Анисимов М.М., Атопкина Л.Н., Самошина Н.Ф., Похило Н.Д., Уварова Н.И. Связь между химическим строением и антистафилококковой активностью полиолов даммаранового ряда и их глюкозидов // Раст. ресурсы. 1998. Вып. 1. С. 51–56.

119. Стоник В.А. Морские полярные стероиды // Успехи химии. 2001. Т. 70, № 8. С. 763–807.

120. Стоник В.А., Аминин Д.Л., Богуславский В.М., Авилов 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 С1. 20.03.2006. Приоритет 02.07.2004.
121. Стоник В.А.; Авилов С.А.; Федоров С.Н.; Богуславский В.М. Способ получения суммы тритерпеновых гликозидов (варианты) // Патент РФ № RU 2110522 С1. 10.05.1998. Приоритет 25.12.1996.
122. Тимчишина Г.Н., Бочаров Л.Н., Акулин В.Н., Слуцкая Т.Н., Павель К.Г., Каредина В.С., Иванов В.И. Способ повышения половой активности (потенции) человека и животных // Патент РФ RU 2210377 С1. 20.08.2003. Приоритет 10.12.2001.
123. Тимчишина Г.Н., Слуцкая Т.Н., Афанасьева А.Е., Павель К.Г., Андреев Н.Г. Способ комплексной переработки голотурий, биологически активная добавка «Акмар», кормовая биологически активная добавка // Патент РФ RU 2236155 С2. 20.09.2004. Приоритет 5.08.2002.
124. Ткачук В.А. Мембранные рецепторы и внутриклеточный кальций // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7, № 1. С. 10–15.
125. Толстикова Т.Г., Балтина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине. Новосибирск. Академическое издание «Гео», 2007. 308 с.
126. Трахтенберг И.М. Сова Р.Е. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте М.: Медицина, 1978. 155 с.
127. Федоров С.Н., Шубина Л.К., Капустина И.И., Авилов С.А., Стоник В.А., Шастина В.В., Квак Янг Йонг, Парк Джу Ин, Джин Джун О, Квон Янг Хи. Средство, стимулирующее апоптоз клеток лейкемии человека // Патент РФ RU 2360692 С1. 10.07.2009. Приоритет 21.12.2007.
128. Фисенко В.П. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Минздрав РФ, ЗАО «ИИА Ремедум», 2000. 398 с.
129. Хаитов Р.М., Гуцин И.С., Пинегин Б.В., Зебрев А.И. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ИИА «Ремедиум», 2000. С. 257–263.
130. Холодов Л.Е., Яковлев В.П. Клиническая фармакокинетика. М., Медицина, 1985.
131. Хэй Р. Сохранение и оценка качества клеток. В кн.: Культура животных клеток. Методы. (Фрейшни Р. Ред.) М.: Мир, 1989. 335 с.
132. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение. М.: Медицина, 1984. 238 с.
133. Шевченко В.П., Нагаев И.Б., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения. М: Наука, 2003. 246 с.

134. Шемарова И.В. Роль сдвигов мембранных потенциалов на начальных стадиях проведения сигнала в клетках низших эукариот // Цитология. 2007. Т. 49, № 11. С. 952–965.
135. Шенцова Е.Б., Анисимов М.М., Лоенко Ю.Н., Атопкина Л.Н., Самошина Н.Ф., Уварова Н.И. Влияние гликозидов бетулафолиентриола и его 3-эпимера на рост опухолевых клеток *in vitro* // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34, № 11. С. 831–833.
136. Шульгина Л.В., Блинов Ю.Г., Загородная Г.И., Сухотская Л.Ю., Тимчишина Г.Н., Усов В.В., Дугина В.М. Новые продукты для хирургических больных на основе гидролизата из кукумарии. // Сб. матер. Российской научн. конф. «Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок». 24–25 июня 1998 г. Владивосток, 1998. С.168-170.
137. Щеглов В.В., Баранова С.И., Анисимов М.М., Антонов А.С., Афиятуллов Ш.Ш., Левина Э.В., Шарыпов В.Ф., Стоник В.А., Еляков Г.Б. Изучение антимикробного спектра действия некоторых тритерпеновых и стероидных гликозидов // Антибиотики. 1979. № 4. С. 270–273.
138. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 606 с.
139. Abbraccio M.P., Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? // Pharmacol. Ther. 1994. V. 64, No. 3. P. 445–475.
140. Abbraccio M.P., Burnstock G., Boeynaems J.-M., Barnard EA, Boyer J.L., Kennedy C., Knight G.E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K.A., Weisman G.A. International Union of Pharmacology. Update and subclassification of the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy // Pharmacol. Rev. 2006. V. 58. P. 281–341.
141. Adrian T.E., Collin P.D. Anticancer glycoside compounds // Patent of the United States of America (2006) US 7144867, December 5.
142. Al Marzouqi N., Iratni R., Nemmar A., Arafat K., Al Sultan M.A.H., Collin P. Frondoside A inhibits human breast cancer cell survival, migration, invasion and the growth of breast tumor xenografts // Eur. J. Pharmacol. 2011. V. 651. P. 18–25.
143. Al Shemali J., Mensah-Brown E., Parekh K., Thomas S.A., Attoub S., Hellman B., Nyberg F., Adem A., Collin P., Adrian T.E. Frondoside A enhances the antiproliferative effects of gemcitabine in pancreatic cancer // Eur. J. Cancer. 2014. V. 50. P. 1391–1398.
144. Al Shemali J., Parekh K.A., Newman R.A., Hellman B., Woodward C., Abdu A., Collin P., Adrian T.E. Pharmacokinetics in mouse and comparative effects of frondosides in pancreatic cancer // Mar. Drugs. 2016. V. 14, No. 115. P. 1–9.
145. Allison A.C., Young M.R. Vital staining and fluorescence microscopy of lysosomes // Lysosomes in Biology and Pathology. V. 2 / Eds. Dingle J.T., Fell H.B. North Holland, Amsterdam, 1969. P. 600–628.
146. Althunibat O.Y., Ridzwan B.H., Taher M., Jamaludin M.D., Ikeda M.A., Zali B.I. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species // Eur. J. Sci. Res. 2009. V. 37. P. 376–387.

147. Aminin D.L., Anisimov M.M. Biological function of holotoxins in body of holothurian *Stichopus Japonicus* // Recent advances in toxinology research. V. 2 / Eds. Gopalakrishnakone P., Tan C.K. Singapore: Venom and Toxin Research Group, National University of Singapore., 1992. P. 562 – 575.
148. Aminin D.L., Agafonova I.G., Gnedoi S.N., Strigina L.I., Anisimov M.M. The effect of pH on biological activity of plant cytotoxin cauloside C // Comp. Biochem. and Physiol. 1999. V. 122A. P. 45–51.
149. Anisimov M.M., Fronert E.B., Kuznetsova T.A., Elyakov G.B., The toxic effect of triterpene glycosides from *Stichopus japonicus* Selenka on early embryogenesis of the sea urchin // Toxicon. 1973. V. 11. P. 109–111.
150. Anisimov M. M., Shcheglov V. V., Stonik V. A., Fronert E. B. and Elyakov G. B. The toxic effect of cucumarioside C from *Cucumaria fraudatrix* on early embryogenesis of the sea urchin // Toxicon. 1974. V. 12. P. 327–329.
151. Anisimov M.M., Cirva V.J. Die biologische Bewertung von Triterpenglykosiden // Pharmazie. 1980. V. 35, No. 12. P. 731–738.
152. Attoub, S., Arafat K., Gelaude A., Al Sultan M.A., Bracke M., Collin P., Takahashi T., Adrian T.E., De Wever O. Frondoside A suppressive effects on lung cancer survival, tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis // PLoS ONE. 2013. V. 8. P. 1–10.
153. Avilov S.A., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Aminin D.L., Agafonova I.G., Stonik V.A. Process for isolating sea cucumber Frondoside A, and immunomodulatory methods of use // U.S. Patent No. US 7163702 B1. 16.01.2007. Priority 14.06.2004.
154. Avilov S.A., Antonov A.S., Silchenko A.S., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Stonik V.A., Riguera R., Jimenes C. Triterpene glycosides from the Far Eastern sea cucumber *Cucumaria conicospermium* // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. P. 910–916.
155. Avilov S.A., Silchenko A.S., Antonov A.S., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Smirnov A.V., Dmitrenok P.S., Evtushenko E.V., Fedorov S.N., Savina A.S., Shubina L.K., Stonik V.A. Synaptosides A and A₁, triterpene glycosides from the sea cucumber *Synapta maculata* containing 3-O-methylglucuronic acid and their cytotoxic activity against tumor cells // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. P. 525–531.
156. Asswasuparerk K., Vanichviriyakit R., Chotwiwatthanakun C., Nobsatian S., Rawangchue T, Wittayachumnankul B. Scabraside D extracted from *Holothuria scabra* induces apoptosis and inhibits growth of human cholangiocarcinoma xenografts in mice // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2016a. V. 17. No. 2. P. 511–517.
157. Asswasuparerk K., Rawangchue T, Phonarknguen R. Scabraside D derived from sea cucumber induces apoptosis and inhibits metastasis via iNOS and STAT-3 expression in human cholangiocarcinoma xenografts // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2016b. V. 17. No. 4. P. 2151–2157.
158. Awang D.V.C. Immune stimulants and antiviral botanicals: Echinacea and ginseng // Perspectives on new crops and new uses / Ed. Janick J. Alexandria, VA: ASHS Press, 1999. P. 450–456.

159. Bahrami Y., Franco C.M.M. Acetylated triterpene glycosides and their biological activity from holothuroidea reported in the past six decades // *Mar. Drugs*. 2016. V. 14, No. 147. P. 1–38.
160. Bakus G.J. Defensive mechanisms and ecology of some tropical holothurians // *Mar. Biol.* 1968. V. 2. P. 23–32.
161. Bantscheff M., Ringel B., Madi A., Schnabel R., Glocker M.O., Thiesen H.-J. Differential proteome analysis and mass spectrometric characterization of germ line development-related proteins of *Caenorhabditis elegans* // *Proteomics*. 2004. V. 4. P. 2283–2295.
162. Baqi Y., Hausmann R., Rosefort C., Rettinger J., Schmalzing G., Müller C.E. Discovery of potent competitive antagonists and positive modulators of the P2X2 receptor // *J. Med. Chem.* 2011. V. 54. P. 817–830.
163. Barden J.A., Yuksel A., Pedersen J., Danieletto S., Delprado W. Functional P2X7: A novel and ubiquitous target in human cancer // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2014. V. 5. No. 4. P. 1–5.
164. Bardini M., Lee H.Y., Burnstock G. Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus // *Cell Tissue Res.* 2000. V. 299, No. 1. P. 105–113.
165. Baroni M., Pizzirani C., Pinotti M., Ferrari D., Adinolfi E., Calzavarini S., Caruso P., Bernardi F., Di Virgilio F. Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles // *FASEB J.* 2007. V. 21. No 8. P. 1926–1933.
166. Barrera N.P., Ormond S.J., Henderson R.M., Murrell-Lagnado R.D., Edwardson J.M. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. No 11. P. 10759–10765.
167. Basu N., Rastogi R. P. Triterpenoid saponins and sapogenins // *Phytochem.* 1967. V. 6. P. 1249–1270.
168. Beckmann J.S., Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly // *Am. J. Physiol.* 1996. V. 271. P. 1424–1437.
169. Beckmann J.S., Ye Yz, Anderson P.G. et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 1994. V. 375. P. 81–88.
170. Behrens B., Karber G. Wie sind reichenversuche fur biologische auswertungen am zweckmassigsten anzwordnen? // *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1935. V. 177. P. 379–388.
171. Beirne L., Fitzmier K., Miller M. "Holothuroidea" (On-line). Biological Diversity 2001. Accessed March 20, 2017; <http://www.earlham.edu/~beirnl/seaacucumber.htm>.
172. Berridge M.J. Elementary and global aspects of calcium signaling // *J. Physiol.* 1997. V. 499, No 2. P. 291–306.
173. Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. Calcium – a life and death signal // *Nature.* 1998. V. 395. P. 645– 648.

174. Bezdetko G.N., German A.V., Shevchenko V.P., Mitrokhin Y.I., Myasoedov N.F., Dardymov I.V., Todorov I.N., Barenboim G.M. Investigation of the pharmacokinetics and mechanism of action of glycosides of *Eleuterococcus*. I. Introduction of tritium into eleuterocide B. kinetics of its accumulation and elimination from the animal organism // *Pharm. Chem. J.* 1981. V. 15, No 1. P. 9–13.
175. Bikadi Z., Hazai E. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock // *J Cheminf.* 2009. V. 1, No 1. P. 1–15.
176. Bo X., Alavi A., Xiang Z., Oglesby I., Ford A., Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds // *Neuroreport.* 1999. V. 10, No 5. P. 1107–1111.
177. Bona C., Bonilla F. *Textbook of immunology*. Second Ed. Amsterdam: Harword Acad. Publ., 1996. 406 c.
178. Bordbar S., Anwar F., Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods. A Review // *Mar. Drugs.* 2011. V. 9. P. 1761–1805.
179. Bourgin C, Bourette R P, Arnaud S, Liu Y, Rohrschneider L R, Mouchiroud G. Induced expression and association of the mona/gads adapter and gab3 scaffolding protein during monocyte/macrophage differentiation // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 3744–3756.
180. Bours M.J. Dagnelie P.C., Giuliani A.L., Wesselius A., Di Virgilio F. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation // *Front. Biosci. (Schol Ed).* 2011. V. 1. P. 1443–1456.
181. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
182. *British Herbal Compendium*. V. 1. Bournemouth, UK: BHMA, 1992. P. 145–148.
183. Brusca R.C., Brusca G.J. *Invertebrates (second edition)*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2003. 936 p.
184. Bulanova E., Budagian V., Orinska Z., Koch-Nolte F., Haag F., Bulfone-Paus S. ATP induces P2X7 receptor-independent cytokine and chemokine expression through P2X1 and P2X3 receptors in murine mast cells // *J. Leukoc. Biol.* 2009. V. 85, No 4. P. 692–702.
185. Burnell, D.J., ApSimon, J.W. Echinoderm saponins // *Marine Natural Products Chemistry. Chemical and Biological Perspectives*. V. 5 / Ed. Scheuer P.J. New York: Academic Press, 1983. P. 287–389.
186. Burnstock G. Purinergic nerves // *Pharmacol. Rev.* 1972. V 24. P. 509–560
187. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors // *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach* / Eds. Straub R.W., Bolis L. N.-Y.: Raven Press, 1978. P. 107–118.
188. Burnstock G. P2X receptors in sensory neurones // *Br. J. Anaesth.* 2000. V. 84, No 4. P. 476–488.

189. Burnstock G. Expanding field of purinergic signaling // *Drug Dev. Res.* 2001. V. 52, No. 1–2. P. 1–10.
190. Burnstock G., Knight G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems // *Int. Rev. Cytol.* 2004. V. 240. P. 31–304.
191. Careaga V.P., Bueno C., Muniain C., Alche L., Maier M.S. Antiproliferative, cytotoxic and hemolytic activities of a triterpene glycoside from *Psolus patagonicus* and its desulfated analog // *Chemotherapy.* 2009. V. 55. P. 60–68.
192. Caresquero L., Esmerilda G.D., Bustillo D. P2X7 and P2X3 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes // *J. Neur.* 2009. V. 110. P. 879–889.
193. Chan R.Y., Chen W.F., Dong A., Guo D., Wong M.S. Estrogen-like activity of ginsenoside Rg1 derived from *Panax notoginseng* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 87, No. 8. P. 3691–3695.
194. Cheeke P.R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition // *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1999. P. 1– 10.
195. Chessell I.P., Michel A.D., Humphrey P.P. Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor // *Br. J. Pharmacol.* 1998. V. 124, No. 6. P. 1314–1320.
196. Childs E.W., Udobi K.F., Wood J.G., Hunter F.A., Smalley D.M., Cheung L.Y. *In vivo* visualization of reactive oxidants and leukocyte-endothelial adherence following hemorrhagic shock // *Shock.* 2002. V. 18. P. 423–427.
197. Chludil H.D., Muniain C.C., Seldes A.M., Maier M.S. Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Patagonian sea cucumber *Hemoiedema spectabilis*. // *J. Nat. Prod.* 2002. V. 65. P. 860–865.
198. Chludil H.D., Murray A.P., Seldes A.M., Maier M.S. Biologically active triterpene glycosides from sea cucumbers // *Studies in Natural Products Chemistry.* V. 28. Part I / Ed. Attar-Rahman. Elsevier Science B.V, 2003. P. 587–616.
199. Cho J., Park W., Lee S., Ahn W., Lee Y. Ginsenoside-Rb1 from *Panax ginseng* C.A. Meyer activates estrogen receptor-alpha and -beta, independent of ligand binding // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 89, No. 7. P. 3510–3515.
200. Choi C.Y., Kim H.S., Pan S.O., Lee G.O., Seol H.J., Jang W.J., Kim J.Y., Kang H.W., Jeong Y.Gi., Kim S.O., Kim J.G. Composition for prevention or treatment of benign prostatic hyperplasia comprising natural product extract // Patent of the Republic of Korea No. 1020160068401. 15.06.2016. Priority 12.05.2014.
201. Coddou C., Yan Z., Oblis T. Huidobro-Toro J.P., Stojilkovic S.S. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels // *Pharmacol. Rew.* 2011. V. 63. P. 641–683.
202. Coddou C., Stojilkovic S., Huidobro-Toro J. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels // *Rev. Neurosci.* 2011. V. 22, No.3. P. 335–354.

203. Codocedo, J.F., Rodriguez, F.E., and Huidobro-Toro, J.P. Neurosteroids differentially modulate P2X ATP-gated channels through non-genomic interactions // *J. Neurochem.* 2009. V. 110. P. 734 – 744.
204. Cohen S., Hatt H., Kubanek J., McCarty N.A. Reconstitution of a chemical defense signaling pathway in a heterologous system // *J. Exp. Biol.* 2008. V. 211. P. 599–605.
205. Cohen S.P., Haack K.K.V., Halstead-Nussloch G.E., Bernard K.F., Hatt H., Kubanek J., McCarty N.A. Identification of RL-TGR, a coreceptor involved in aversive chemical signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107, No. 27. P. 12339–12344.
206. Collin P.D. Inhibition of angiogenesis by sea cucumber fractions // Patent of the United States of America No. US 59853305985330, 16.11.1999. Priority 5.08.1996.
207. Collin P.D. Tissue fractions of sea cucumber for the treatment of inflammation // Patent of the United States of America No. US 5770205. 23.06.1998. Priority 5.08.1996.
208. Collo G., North R.A., Kawashima E., Merlo-Pich E., Neidhart S., Surprenant A., Buell G. Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels // *J. Neurosci.* 1996. V. 16, No 8. P. 2495–2507.
209. Davenpeck K.L., Chrest F.J., Sterbinskya S.A., Bickela C.A., Bochner B.S. Carboxyfluorescein diacetate labeling does not affect adhesion molecule expression or function in human neutrophils or eosinophils // *J. Immunol. Methods.* 1995. V. 188. P. 79–89.
210. De Groof R.C., Narahashi T. The effects of holothurin A on the resting membrane potential and conductance of squid axon // *Europ. J. Pharmacol.* 1976. V. 36. P. 337–346.
211. Dettbarn W.D., Higman H.B., Bartels E., Podleski T. Effects of marine toxins on electrical activity and K⁺ efflux of excitable membranes // *Biochem. Biophys. Acta.* 1965. V. 94. P. 472–478.
212. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome // *Trends Pharmacol. Sci.* 2007. V. 28, No. 9. P. 465–472.
213. Ding S., Sachs F. Ion permeation and block of P2X2 purinoceptors: Single channel recordings // *J. Membr. Biol.* 1999. V. 172, No 3. P. 215–223.
214. Ding X.Z., Adrian T.E., Collin P.D. Composition and methods for the treatment and prevention of cancer // Patent of the United States of America No. US 7335382. 26.02.2008. Priority 25.02.2004.
215. Doletsch R.E., Xu K., Lewis R.S. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression // *Nature.* 1998. V. 392. P. 933–936.
216. Donnelly-Roberts D.L., McGaraughty S., Shieh C.C., Honore P., Jarvis M.F. Painful purinergic receptors // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008. V. 324. P. 409–415.
217. Donnelly-Roberts D.L., Namovic M.T., Han P., Jarvis M.F. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors // *Br. J. Pharmacol.* 2009. V. 157. P. 1203–1214.

218. Dreveny I., Kondo H., Uchiyama K., Shaw A., Zhang X., Freemont P.S. Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47 // *EMBO J.* 2004. V. 23. P. 1030–1039.
219. Drozdova O.A., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Stonik V.A., Rigüero R., Jimenes C. Cytotoxic triterpene glycosides from Far-Eastern sea cucumbers belonging to the genus *Cucumaria* // *Liebigs Ann.* 1997. No. 11. P. 2351–2356.
220. Dunn P.M., Zhong Y., Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons // *Prog. Neurobiol.* 2001. V. 65. P. 107–134.
221. Dutton J.L., Poronnik P., Li G.H., Holding C.A., Worthington R.A., Vandenberg R.J., Cook D.I., Barden J.A., Bennett M.R. P2X1 receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras // *Neuropharmacol.* 2000. V. 39, No 11. P. 2054–2066.
222. 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.
223. Dyshlovoy S.A., Madanchi R., Hauschild J., Otte K., Alsdorf W.H., Schumacher U., Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Honecker F., Stonik V.A., Bokemeyer C., von Amsberg G. The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells // *BMC Cancer.* 2017. V. 17. No. 93. P. 1–10.
224. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. No. 13. P. 3413–3420.
225. Emmendorffer S.F., Hecht M., Lohman-Mattes M.-L., Roester J. A fast easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorodamine 123 // *J. Immunol. Methods.* 1990. V. 131. P. 269–275.
226. European Treaty Series – No. 123. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg, 18.03.1986.
227. Ermann J., Fathman C.G. Costimulatory signals controlling regulatory T-cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. V. 100. P. 15292–15293.
228. Eswar N., Webb B., Marti-Renom M.A., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A. Comparative protein structure modeling using modeller // *Current Protocols in Bioinformatics.*: John Wiley & Sons, Inc., 2002. Supplement 15, 5.6.1–5.6.30.
229. Fan T.J., Yuan W.P., Cong R.S., Yang X.X., Wang W.W., Jing Z. Studies on the purification of water-soluble holothurian glycosides from *Apostichopus japonicus* and their tumor suppressing activity // *Yao Xue Xue Bao.* 2009. V. 44. P. 25–31.
230. Fang F.C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 99, No. 12. P. 2818–2825.

231. Fathman C.G., Soares L., Chan S.M., Utz P.J. An array of possibilities for the study of autoimmunity // *Nature*. 2005. V. 435. P. 605–611.
232. Fedorov S.N., Dyshlovoy S.A., Kuzmich A.S., Shubina L.K., Avilov S.A., Silchenko A.S., Bode A.M., Dong Z., Stonik V.A. *In vitro* anticancer activities of some triterpene glycosides from holothurians of Cucumariidae, Stichopodidae, Psolidae, Holothuriidae and Synaptidae families // *Nat. Prod. Commun.* 2016. V. 11, No. 9. P. 1239–1242.
233. Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E., Lemoli R.M., Curti A., Idzko M., Panther E., Di Virgilio F. The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release // *J. Immunol.* 2006. V. 176, No 7. P. 3877–3883.
234. Fields R.D., Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions // *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. V. 7, No 6. P. 423–436.
235. Flynn A. Control of *in vitro* lymphocyte proliferation by copper, magnesium and zinc deficiency // *J. Nutr.* 1984. V. 114. P. 2034–2042.
236. Forehand J.R., Johnston Jr R.B., Bomalaski J.S. Phospholipase A2 activity in human neutrophils: Stimulation by lipopolysaccharide and possible involvement in priming for an enhanced respiratory burst // *J. Immunol.* 1993. V. 151, No. 9. P. 4918–4925.
237. Francis G, Kerem Z., Makkar H.P.S., Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review // *Br. J. Nutr.* 2002. V. 88. P. 587–605.
238. Franklin K.M., Asatryan L., Jakowec M.W., Trudell J.R., Bell R.L., Davies D.L. P2X4 receptors (P2X4Rs) represent a novel target for development of drugs to prevent and/or treat alcohol use disorders // *Front. Neurosci.* 2014. V. 8. article 176.
239. Frey D.G. The use of sea cucumber in poisoning fishes // *Copeia*. 1951. No 2. P. 175–176.
240. Fries S.L. Mode of action of marine saponins on neuromuscular tissues // *Fed. Proc.* 1972. V. 31. No. 3. P. 1146–1149.
241. Friess S.L., Standaert F.G., Whitcomb E.R., Nigrelli R.F., Chanley J.D., Sobotka H.J. Some pharmacologic properties of holothurin, an active neurotoxin from the sea cucumber // *Pharmacol. Exp. Therap.* 1959. V. 126. P. 323–329.
242. Friess S.L., Standaert F.G., Whitcomb E.R., Nigrelli R.F., Chanley J.D., Sobotka H. Some pharmacologic properties of holothurin A, a glycosidic mixture from the sea cucumber // *Ann. New York Acad. Sci.* 1960. V. 90. P. 893–901.
243. Friess S.L., Duran R.C., Chanley J.D., Mezzetti T. Some structural requirements underlying holothurin A interactions with synaptic chemoreceptors // *Biochem. Pharmacol.* 1965. V. 14. P. 1237–1247.
244. Friess S.L., Durant R.C., Chanley J.D., Fash F.J., Role of the sulphate charge center in irreversible interactions of holothurin A with chemoreceptors // *Biochem. Pharmacol.* 1967. V. 16. P. 1617–1625.

245. Friess S.L., Durant R.C., Chanley J.D. Further studies on biological actions of steroidal saponins produced by poisonous echinoderms // *Toxicon*. 1968. V. 6. P. 81–84.
246. Friess S.L., Chanley J.D., Hudak W.V., Weems H.B. Interaction of the Echinoderm toxin Holothurin A and its de sulfated derivative with the cat superior cervical ganglion preparation // *Toxicon*. 1970. No. 8. P. 211–219.
247. Froebel K.S., Pakker N.G., Aiuti F., Bofill M., Choremi-Papadopoulou H., Economidou J., Rabian C., Roos M.T.L., Ryder L.P., Miedema F., Raab G.M. Standardisation and quality assurance of lymphocyte proliferation assays for use in the assessment of immune function. European concerted action on immunological and virological markers of HIV disease Progression // *J. Immunol. Methods*. 1999. V. 227. P. 85–97.
248. Galla H.J., Sackmann E. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes // *Biochim. Biophys. Acta*. 1974. V. 339, No. 1. P. 103–115.
249. Gao Z. Mixed sea cucumber powder and production method thereof // Patent of the Chinese People Republic No. CN 102813240 A. 06.11.2012. Priority 28.08.2012.
250. García Z., Silio V., Marqués M., Cortés I., Kumar A., Hernandez C., Checa A.I., Serrano A., Carrera A.C. A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis // *EMBO J*. 2006. V. 25. P. 4740–4751.
251. Gayle S., Burnstock G. Immunolocalisation of P2X and P2Y nucleotide receptors in the rat nasal mucosa // *Cell Tissue Res*. 2005. V. 319, No. 1. P. 27–36.
252. Gever R.J., Soto R., Henningsen R.A Martin R.S., Hackos D.H., Panicker S., Rubas W., Oglesby I.B., Dillon M.P., Milla M.E., Burnstock G., Ford A.P. AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist // *Br. J. Pharmacol*. 2010. V. 60. P. 1387–1398.
253. Girard M., Belanger J., ApSimon J.W., Garneau F.-X., Harvey C., Brisson J.-R. // Frondoside A. A Novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa* // *Can. J. of Chem*. 1990. V. 68. P. 11–18.
254. Glocker M.O., Kalkum M., Yamamoto R., Schreurs J. Selective biochemical modification of functional residues in recombinant human macrophage colony-stimulating factor beta (rhM-CSF beta): identification by mass spectrometry // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 14625–14633.
255. Gorshkov B.A., Gorshkova I.A., Stonik V.A., Elyakov G.B. Effect of marine glycosides on adenosine triphosphatase activity // *Toxicon*. 1982. V. 20. No. 3. P. 655–658.
256. Gorshkova I.A., Gorshkov B.A., Stonik V.A. Inhibition of rat brain Na⁺-K⁺-ATPase by triterpene glycosides from holothurians // *Toxicon*. 1989a. V. 27. No. 8. P. 927–936.
257. Gorshkova I.A., Kalinovsky A.I., Ilyin S.G., Gorshkov B.A., Stonik V.A. Physicochemical characteristics of interaction of toxic triterpene glycosides from holothurians with rat brain Na⁺-K⁺-ATPase // *Toxicon*. 1989b. V. 27. No 8. P. 937–945.

258. Gorshkova I.A., Kalinin V.I., Gorshkov B.A., Stonik V.A. Two different modes of inhibition of the rat brain Na⁺-K⁺-ATPase by triterpene glycosides, psolusosides A and B, from the holothurian *Psolus fabricii* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1999. V. 122. No. 1. P. 101–108.
259. Gorshkova I.A., Ilyin S.G., Stonik V.A. Physicochemical characteristics of interaction of saponins from holothurians (sea cucumber) with cell membranes // *Saponin in food, feedstuffs and medicinal plants* / Eds. Oleszek W., Marston A. Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 219–225.
260. Greig A.V.H., Linge C., Terenghi G., McGrouther D.A., Burnstock G. Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes // *J. Invest. Dermatol.* 2003. V. 120. No. 6. P. 1007–1015.
261. Grinvald A., Hildesheim R., Farber I.C., Anglister L. Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential // *Biophys. J.* 1982. V. 39. No. 3. P. 301–308.
262. Grishin Y.I., Morozov E.A., Avilov S.A. Preliminary studies of antiviral activity of triterpene glycosides from holothurians // 8th conference young scientists on organic and bioorganic chemistry. Latvia, Riga, 1991. P. 181.
263. Grol M.W., Panupinthu N., Korcok J., Sims S.M., Dixon S.J. Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone // *Purinergic Signal.* 2009. V. 5. No. 2. P. 205–221.
264. Gröschel-Stewart U., Bardini M., Robson T., Burnstock G. Localisation of P2X5 and P2X7 receptors by immunohistochemistry in rat stratified squamous epithelia // *Cell Tissue Res.* 1999. V. 296. No 3. P. 599–605.
265. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. No. 6. P. 3440–3450.
266. Caulier G., Flammang P., Gerbaux P., Eeckhaut I. When a repellent becomes an attractant: harmful saponins are kairomones attracting the symbiotic Harlequin crab // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. Article numer 2639.
267. Guo D., von Kügelgen I., Moro S. Kim Y.C., Jacobson K.A. Evidence for the recognition of non-nucleotide antagonists within the transmembrane domains of the human P2Y1 receptor // *Drug Devel. Res.* 2002. V. 57. P. 173–181.
268. Guo I., Xu J., Liu X. Preparation method of holozoic sea cucumber biological wine // Patent of the Chinese People Republic No. CN 102352286 B. 24.10.2012. Priority 26.08.2011.
269. Habermehl G., Volkwein G. Aglycones of the toxins from the cuvierian organs of *Holothuria forskali* and a new nomenclature for the aglycones from *Holothurioideae* // *Toxicon.* 1971. V. 9. No. 4. P. 319–326.
270. Han, H., Xu Q.Z., Tang H.F., Yi, Y.H., Gong W. Cytotoxic holostane-type triterpene glycosides from the sea cucumber *Pentacta quadrangularis*. // *Planta Med.* 2010. V. 76. P. 1900–1904.

271. Hang H., H. Xu, Y. Wang, L. Yu; Y. Xue, J. Xu, Z. Li, Y. Cang, Q. Tang, J. Wang, Z. Xue. Composition for preparing products for improving hyperuricemia // Patent of the Chinese People Republic No. CN 102138938 A. 10.04.2013. Priority 31.03.2011.
272. Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. // *Nature*. 2012. V. 485. P. 207–12.
273. Hausmann R., Rettinger J., Gerevich Z., Meis S., Kassack M.U., Illes P., Lambrecht G., Schmalzing G. The suramin analog 4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis(carbonylimino)))tetra-kis-benzenesulfonic acid (NF110) potently blocks P2X3 receptors: subtype selectivity is determined by location of sulfonic acid groups // *Mol. Pharmacol.* 2006. V. 69. P. 2058–2067.
274. Hegde V.R., Chan T.-M., Pu H., Gullo V.P., Patel M.G., Das P., Wagner N., Parameswaran P.S., Naik C.G. Two selective novel triterpene glycosides from sea cucumber, *Telenata Ananas*: inhibitors of chemokine receptor-5 // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002. V. 12. P. 3203–3205.
275. Heitner J.C., Koy C., Reimer T., Kreutzer M., Gerber B., Glocker M.O. Differentiation of HELLP Patients from Healthy Pregnant Women by Proteome Analysis // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* // 2006. V. 840. P. 10–9.
276. Housley G.D., Bringmann A., Reichenbach A. Purinergic signaling in special senses // *Trends Neurosci.* 2009. V. 32, No 3. P. 128–141.
277. Huang Y.-W., Yan. M., Collins R.F., DiCiccio J.E., Grinstein S., Trimble W.S. Mammalian septins are required for phagosome formation // *Mol. Biol. Cell.* 2008. V. 19. P. 1717–1726.
278. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14, No 1. P. 33–38.
279. Ishida H., Hirota Y., Nakazava H. Effect of sub-skinning concentration of saponin on intracellular Ca²⁺ and plasma membrane fluidity in cultured cardiac cells // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1145. P. 58–62.
280. Jacobson K.A., Ivanov A.A., de Castro S. Harden T.K., Ko H. Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors // *Purinergic signal.* 2009. V. 5. P. 75–89.
281. Jakowska S., Nigrelli R.F., Murray P.M., Veltry A.M. Hemopoetic effect of holothurin, steroid saponin from sea cucumber *Actinopyga agassizi* on *Rana pipiens* // *Anat. Rec.* 1958. V. 132. P. 459.
282. Janakiram N.B., Mohammed A., Zhang Y., Choi C., Woodward C., Collin P., Steele V.E., Rao C.V. Chemopreventive effects of Frondanol A5, a *Cucumaria frondosa* extract, against rat colon carcinogenesis and inhibition of human colon cancer cell growth // *Cancer Prev. Res.* 2010. V. 3. P. 82–91.
283. Janakiram A.M., Bryant T., Lightfoot S., Collin P.D., Steele V.E., Rao C.V. Improved innate immune responses by Frondanol A5, a sea cucumber extract, prevent intestinal tumorigenesis // *Cancer Prev. Res.* 2015a. V. 8. P. 327–337.

284. Janakiram N.B., Mohammed A., Rao C.V. Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents // *Mar. Drugs* 2015b. V. 13. P. 2909-2923.
285. Jankowski A., Grinstein S. A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential. Quantification of the NADPH oxidase-induced depolarization in activated neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274, No. 37. P. 26098–26104.
286. Jarvis M.F., Burgard E.C., McGaraughty S. Honore P., Lynch K., Brennan T.J., Subieta A., Van Biesen T., Cartmell J., Bianchi B., Niforatos W., Kage K., Yu H., Mikusa J., Wismer C.T., Zhu C.Z., Chu K., Lee C.H., Stewart A.O., Polakowski J., Cox B.F., Kowaluk E., Williams M., Sullivan J., Faltynek C. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 17179–17184.
287. Jerne N.K., Nordin F.F. Plaque formation in agar by agar single antibody producing cells // *Science.* 1963. V. 140. P. 465–466.
288. Jian L., Li C., Lun S., Kuiwu S. Sea cucumber wine and brewing process thereof // Patent of the Chinese People Republic No. CN 101899380 A. 14.07.2010. Priority 01.12.2010.
289. Jiang L.H., Kim M., Spelta V., Bo X., Surprenant A., North R.A. Subunit arrangement in P2X receptors // *J. Neurosci.* 2003. V. 23, No 26. P. 8903–8910.
290. Jiang L.H., Mackenzie A.B., North R.A., Surprenant A. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors // *Mol. Pharmacol.* 2000. V. 58. P. 82–88.
291. Jin J.O., Shastina V.V., Shin S.W., Xu Q., Park J.I., Rasskazov V.A., Avilov S.A., Fedorov S.N., Stonik V.A., Kwak J.Y. Differential effects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A₂-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells // *FEBS Lett.* 2009. V. 583. P. 697–702.
292. Jindrichova M., Vavra V., Obsil T., Stojilkovic S.S., Zemkova H. Functional relevance of aromatic residues in the first transmembrane domain of P2X receptors // *J. Neurochem.* 2009. V. 109. P. 923 – 934.
293. Juan T., Xu J., Li Z.J., Wang Y., Wang J., Hu X., Xue Y., Xue C. Sea cucumber saponin-containing composition and its application in foods and drugs // Patent of the Chinese People Republic No. CN 102224924 A. 26.10.2011. Priority 27.04.2011.
294. Just T., Gafumbegete E., Gramberg J., Prüfer I., Mikkat S., Ringel B., Pau H.W., Glocker M.O. Differential proteome analysis of tonsils from children with chronic tonsillitis or with hyperplasia reveals disease-associated protein expression differences // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 384. P. 1134–1144.
295. Kaczmarek-Hájek K., Lörinczi É., Hausmann R., Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors-recent progress and persisting challenges // *Purinergic Signal.* 2012. V. 8, No. 3. P. 375–417.
296. Kalayani G.A., Kakiani H.K., Hukeri V.I. Holothurin - a review // *Indian Journ. Nat. Prod.* 1988. V. 4. P. 3–8.

297. Kalinin V.I., Volkova O.V., Likhatskaya G.N., Prokofieva N.G., Agafonova I.G., Anisimov M.M., Kalinovskiy A.I., Avilov S.A., Stonik V.A. Hemolytic activity of triterpene glucosides from the Cucumariidae family holothurians and evolution of this group of toxins // *J. Nat. Toxins*. 1992. V. 1. No. 2. P. 17–30.
298. Kalinin V.I., Anisimov M.M., Prokofieva N.G., Avilov S.A., Afiyatulloev S.S., Stonik V.A. Biological activities and biological role of triterpene glycosides from holothurians (Echinodermata) // *Echinoderm Studies* / Ed. Jangoux M., Lawrence J. M., Rotterdam, Brookfield: A.A. Balkema, 1996a. V. 5. P. 139–184.
299. Kalinin V.I., Prokofieva N.G., Likhatskaya G.N., Schentsova E.B., Agafonova I.G., Avilov S.A., Drozdova O.A. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order Dendrochirotrida: Some trends in the evolution of this group of toxins // *Toxicon*. 1996b. V. 34. No. 4. P. 475–483.
300. Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A. Triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) as taxonomic markers // *Nat. Prod. Commun.* 2015. V. 10. No. 1. P. 21–26.
301. Kalinin V.I., Stonik V.A. Application of morphological trends of evolution to phylogenetic interpretation of chemotaxonomic data // *J. Theor. Biol.* 1996. V. 180. No. 1. P. 1–10.
302. Kalinin V.I. System-theoretical (Holistic) approach to the modelling of structural-functional relationships of biomolecules and their evolution: an example of triterpene glycosides from sea cucumbers (Echinodermata, holothurioidea) // *J. Theor. Biol.* 2000. V. 206, No. 1. P. 151–168.
303. Kalinin V.I., Silchenko A.S., Avilov S.A., Stonik V.A., Smirnov A.V. Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy // *Phytochem. Rev.* 2005. V. 4, No. 2–3. P. 221–236.
304. 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)*. V. 35 / Ed. Attar-Rahman. The Netherlands: Elsevier Science Publishe, 2008. P. 135–196.
305. Kalinin V.I., Ivanchina N.V., Krasokhin V.B., Makarieva T.N., Stonik V.A. Glycosides from marine sponges (Porifera, Demospongiae): structures, taxonomical distribution, biological activities and biological roles // *Mar. Drugs*. 2012. V. 10. P. 1671–1710.
306. Kälvegren H., Skoglund C., Helldahl C., Lerm M., Grenegård M., Bengtsson T. Toll-like receptor 2 stimulation of platelets is mediated by purinergic P2X1-dependent Ca^{2+} mobilisation, cyclooxygenase and purinergic P2Y1 and P2Y12 receptor activation // *Thromb. Haemost.* 2010. V. 103, No. 2. P. 398–407.
307. Kaplan E., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation // *J. Am. Stat. Assoc.* 1958. V. 53. P. 457–481.
308. Kuznetsova T.A., Anisimov M.M., Popov A.M., Baranova S.I., Afiyatulloev S.S., Kapustina I.I., Antonov A.S., Elyakov G.B. Comparative study in vitro of physiological activity

- of triterpene glycosides of marine invertebrates of Echinoderm type // *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. V. 73. C. 41–43.
309. Kaul P.N., Daffari P. Marine pharmacology: bioactive molecules from the sea // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1986. V. 26. P. 117–142.
310. Kawate T., Michel J.C., Birdsong W.T., Gouaux E. Crystal structure of the ATP-gated P2X₄ ion channel in the closed state // *Nature*. 2009. V. 460, No. 7255. P. 592–598.
311. Kawate T., Robertson J.L., Li M., Silberberg S.D., Swartz K.J. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels // *J. Gen. Physiol.* 2011. V. 137. P. 579–590.
312. Khakh B.S., Barnard E.A., Burnstock G. The IUPHAR Compendium of receptor characterization and classification. // London: IUPHAR Media, 2001. P. 290–305.
313. Kim J.P., Choe I.S., Chung H., Kim S.Y., Choi Y.J., Kim M.H., Yeol Y. K., Jeong S.I., Chung C.H., Oh H.G., Kang Y.G., Kim O.J. Pharmaceutical composition for anticancer comprising extract of sea cucumber or its fraction as effective component // Patent of the Republic of Korea No. KR 101446784 B1. 7.10.2014. Priority 30.11.2011.
314. Kim S.K., Ryu B.M., Himaya S.W.A., Qian Z.J. Sea cucumber extract having anti-inflammatory and anti-inflammatory composition comprising same // Application of the Patent of the Republic of Korea No. KR 1020120028153. 22.03.2012.
315. Kim S.M., Choi S.H. Composition for preventing or treating colon cancer containing extract of sea cucumber // Patent of the Republic of Korea No. KR 101338532. 6.12.2013. Priority 18.04.2011.
316. Kim Y.C., Brown S.G., Harden T.K. Boyer J.L., Dubyak G., King B.F., Burnstock G., Jacobson KA. Structure-activity relationships of pyridoxal phosphate derivatives as potent and selective antagonists of P2X₁ receptors // *J. Med.Chem.* 2001. V. 44. P. 340–349.
317. Kim C.G.; Kwak J.-Y. Anticancer effect of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A₂-2 isolated from sea cucumbers // *Handbook of anticancer drugs from marine origin* / Ed.Kim S.-K. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. P. 673–682.
318. Kim S.K., Himaya S.W. Triterpene glycosides from sea cucumbers and their biological activities // *Adv. Food. Nutr. Res.* 2012. V. 65. P. 297–319.
319. King B.F., Burnstock G., Boyer J.L. The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification // London : IUPHAR Media, 2001. P. 306–320.
320. Kitagawa I., Sugawara T., Yosioka I. Antifungal glycosides from the sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. Structures of holotoxin A and holotoxin B // *Chem. Pharm. Bull.* 1976. V. 24. P. 275–284.
321. Kitagawa I., Nishino T., Kobayashi M., Kyogoku Y. Marine Natural Products. VIII. Bioactive Triterpene-Oligoglycosides from the Sea Cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt (2). Structure of Holothurin A // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29. No. 7. P. 1951–1956.
322. Kitagawa I., Kobayashi M., Inamoto T., Fuchida M., Kyogoku Y. Marine natural products. XIV. Structures of echinosides A and B, antifungal lanostane-oligosides from the sea

- cucumber *Actinopyga echinites* (Jaeger) // Chem. Pharm. Bull. 1985. V. 33. No. 12. P. 5214–5224.
323. Kitagawa I., Kobayashi M., Okamoto Y., Yoshikawa M., Hamamoto Y. Structures of sarasinosides A₁, B₁, and C₁ – new norlanostane triterpenoid oligoglycosides from the Palanan marine sponge *Sateropus sarasinus* // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35. No. 12. P. 5036–5039.
324. Kitagawa I. Bioactive marine natural products // Yakugaku Zasshi. 1988. V. 108. P. 398–416.
325. Kitagawa I., Kobayashi M., Hori M., Kyogoku Y. Marine Natural Products. XVIII. Four lanostane-type triterpene oligoglycosides, bivittosides A, B, C and D from the okinawa sea cucumber *Bohadsia Mitsukuri* // Chem. Pharm. Bull. 1989. V. 37. No. 1. P. 61–67.
326. Kobayashi N. Marine ecotoxicological testing with echinoderms // Ecotoxicological testing for the marine environment. V. 1 / Eds. Persoone, G., Jaspers, E., Claus, C. Bredene, Belgium: State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., 1984. P. 798.
327. Kobayashi M., Hori M., Kan K., Yasuzawa T., Matsui M., Suzuki Sh., Kitagawa I. Marine natural products. XXVII. Distribution of lanostane – type triterpene oligoglycosides in 10 kinds of okinawan sea cucumbers // Chem. Pharm. Bull. 1991. V. 39. No. 9. P. 2282–2287.
328. Kondo H., Rabouille C., Newman R., Levine T.P., Pappin D., Freemont P., Warren G. p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion // Nature. 1997. V. 388. P. 75–78.
329. Kostetsky E.Y., Sanina N.M., Mazeika A.N., Tsybulsky A.V., Vorobieva N.S., Shnyrov V.L. Tubular immunostimulating complex based on cucumarioside A₂-2 and monogalactosyldiacylglycerol from marine macrophytes // J. Nanobiotechnol. 2011. V. 9. No. 35. P. 1–9.
330. Kouranti I., Sachse M., Arouche N., Goud B., Echard A. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis // Curr. Biol. 2006. V. 16. P. 1719–1725.
331. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
332. Lammas D.A., Stober C., Harvey C.J., Kendrick N., Panchalingam S., Kumararatne D.S. ATP-Induced Killing of Mycobacteria by Human Macrophages Is Mediated by Purinergic P2Z(P2X7) Receptors // Immunity. 1997. V. 7. No. 3. P. 433–444.
333. Lasley B.J., Nigrelli R.F. The effects of crude holothurin on leucocyte phagocytosis // Toxicon. 1970. V. 8. P. 301–306.
334. Lecut C., Frederix K., Johnson D.M., Deroanne C., Thiry M., Faccinnetto C., Marée R., Evans R.J., Volders P.G.A., Bours V., Oury C. P2X1 ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation // J. Immunol. 2009. V. 183. No. 4. P. 2801–2809.
335. Lee H.Y., Kim S.I., Lee S.K., Chung H.Y., Kim K.W. Differentiation mechanism of ginsenosides in cultured murine F9 teratocarcinoma stem cells // Proc. Intern. Ginseng Symp. Seoul, Korea, 1993. P. 127–131.

336. Lee S.H., Kim M.J. Preparation method of cosmetic composition comprising saponin from sea slug and the cosmetic composition thereby // Patent of the Republic of Korea No. KR 1020130104930 A. 16.03.2013. Priority 16.03.2012.
337. Lee Y., Jin Y., Lim W., Ji S., Choi S., Jang S., Lee S. A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2003a V. 84. No. 4. P. 463–468.
338. Lee Y.J., Jin Y.R., Lim W.C., Park W.K, Cho J.Y., Jang S, Lee S.K. Ginsenoside-Rb1 acts as a weak phytoestrogen in MCF-7 human breast cancer cells // Arch. Pharm. Res. 2003b V. 26. No. 1. C. 58–63.
339. Lemaire I., Leduc N. Purinergic P2X7 receptor function in lung alveolar macrophages: Pharmacologic characterization and bidirectional regulation by Th1 and Th2 cytokines // Drug Dev. Res. 2003. V. 59. No. 1. P. 118–127.
340. Levitzki A. Quantitative aspects of ligand binding to receptors in: cellular receptors for hormones and neurotransmitters. John Wiley and Sons Ltd, 1980. 412 p.
341. Li Y.L., Deng H.-W., Chen X. The protective effective effect of ginsenosides and its components on myocytes anoxia/re oxygenation and myocardial reperfusion injury // Acta Pharm. Sin. 1987. V. 22. No. 1. P. 1–5.
342. Li, X., Roginsky A.B, Ding X., Woodward C., Collin P., Newman R.A., Bell R.H., Adrian T.E. Review of the apoptosis pathways in pancreatic cancer and the apoptotic effects of the novel sea cucumber compound, frondoside A // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1138. P. 181–198.
343. Li M., Miao Z.H., Chen Z., Chen Q., Gui, M., Lin L.P.; Sun P., Yi Y.H., Ding J. Echinaside A, a new marine-derived anticancer saponin, targets topoisomerase2 α by unique interference with its DNA binding and catalytic cycle // Ann. Oncol. 2010. V. 21. P. 597–607.
344. Li Y., Guo F., Zang L. Application of sea cucumber extract rich in triterpene sapogenin // Patent of the Chinese Republic No. CN 102935090 A. 20.02.2013. Priority 28.04.2012.
345. Liu J., Sun P., Zhang W., Zhang Y., Zhang Q., Yi Y., Li L., Zhong Y. Application of compound echinaside A in preparation of medicines for treating glioma // Patent of the Chinese People Republic No. CN 102614209 A. 1.08.2012. Priority 16.03.2002.
346. Liu S., Wen Z., Zhang H., Yi Y.H., Ling L., Hua T., Wang Z., Yuan W.. Triterpene glycosides antifungal compounds of sea cucumber Holotoxin D–I and preparation method thereof // Patent of the Chinese People Republic No. CN 101671385 B. 30.05.2012. Priority 23.09.2009.
347. Liu B.S., Yi Y.H., Li L., Sun P., Han H., Sun G.Q., Wang X.H., Wang Z.L. Argusides D and E, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia argus* Jaeger // Chem. Biodivers. 2008. V. 5. P. 1425–1433.
348. Llewellyn-Smith I.J., Burnstock G. Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons // NeuroReport. 1998. V. 9. No. 11. P. 2545–2550.

349. Loesch A., Burnstock G. Electron-immunocytochemical localization of P2X1 receptors in the rat cerebellum // *Cell Tissue Res.* 1998. V. 294. No. 2. P. 253–260.
350. Loesch A., Burnstock G. Immunoreactivity to P2X6 receptors in the rat hypothalamo-neurohypophysial system: an ultrastructural study with extravidin and colloidal gold-silver labelling // *Neuroscience.* 2001. V. 106. No. 3. P. 621–631.
351. Lorenz P, Bantscheff M, Ibrahim S M, Thiesen H-J, Glocker M O. Proteome analysis of diseased joints from mice suffering from collagen-induced arthritis // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003. V. 41. P. 1622–1632.
352. Ma X., Kundu N., Collin P.D., Goloubeva O., Fulton A.M. Frondoside A inhibits breast cancer metastasis and antagonizes prostaglandin E receptors EP4 and EP2 // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. V. 132. P. 1001–1008.
353. Maier M.S., Roccatagliata A.J., Kurriss A., Chludil H., Seldes A.M. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei* // *J. Nat. Prod.* 2001. V. 64. P. 732–736.
354. Mainwaring W.I.P. Cellular receptors for hormones and neurotransmitters. NY: John Wiley & Sons Ltd, 1980. P. 91–125.
355. Makoto T., Hidetoshi T.S., Kazuhide I. P2X4R and P2X7R in neuropathic pain // *WIREs Membr. Transp. Signal.* 2012. V. 1. P. 513–521.
356. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 453–461.
357. Menchinskaya E.S., Pislyagin E.A., Kovalchuk 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. V. 59. P. 181–191.
358. Meyer M.P., Gröschel-Stewart U., Robson T., Burnstock G. Expression of two ATP-gated ion channels, P2X5 and P2X6, in developing chick skeletal muscle // *Dev. Dynam.* 1999. V. 216. No. 4–5. P. 442–449.
359. Michel A.D., Xing M., Thompson K.M. Jones CA, Humphrey PP. Decavanadate, a P2X receptor antagonist, and its use to study ligand interactions with P2X7 receptors // *Eur. J. Pharmacol.* 2006. V. 534. P. 19–29.
360. Mikkat S., Koy C., Ulbrich M., Ringel B., Glocker M.O. Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin α chains in two-dimensional gel electrophoresis // *Proteomics.* 2004. V. 4. P. 3921–3932.
361. Miller C.M., Boulter N.R., Fuller S.J., Zakrzewski A.M., Lees M.P., Saunders B.M., Wiley J.S., Smith, N.C. The Role of the P2X7 Receptor in Infectious Diseases // *PLoS Pathogens.* 2011. V. 7. No. 11. P. 1–7.
362. Miller A.K., Kerr A.M., Paulay G., Reich M., Wilson N.G., Carvajal J.I., Rouse G.W. Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata) // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2017. V. 111. P. 110–131.

363. Millot C., Millot J.M., Morjani H., Desplacé A., Montait M. Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry // *J. Histochem. Cytochem.* 1997. V. 45. No. 9. P. 1255–1264.
364. Miyamoto T., Togawa K., Higuchi R., Komori T., Sasaki T. Constituents of Holothurioidea, II. Six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulfates from the sea cucumber *Cucumaria echinata* II // *Liebigs Ann. Chem.* 1990. P. 453–460.
365. Molleman A. Patch Clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology. N.Y.: John Wiley and Sons Ltd., 2003. P. 108–110.
366. Morandini A.C., Savio L.E.B., Coutinho-Silva R. The Role of P2X7 Receptor in Infectious Inflammatory Diseases and the Influence of Ectonucleotidases // *Biomed. J.* 2014. V. 37. No. 4. P. 169–177.
367. Morel F., Doussière J., Vignais P.V. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 201. No. 3. P. 523–546.
368. Mosser D.M., Edwards J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation // *Nat. Rev. Immunol.* V. 8. P. 958–969.
369. Murray A.P., Muniaín C., Seldes A.M., Maier M.S. Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus* // *Tetrahedron* 2001. V. 57. P. 9563–9568.
370. Nathan C., Shiloh M. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. No. 16. P. 8841–8848.
371. Neta R. Modulation of the radiation response by cytokines //: Radioprotectors. Chemical, biological and clinical perspectives /Ed. Bump E.A., Malaker K. CRC Press LLC, 1998. P. 237–247.
372. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250 // *Electrophoresis.* 1988. V. 9. P. 255–262.
373. Nicke A., Bäumert H.G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E., Schmalzing G. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: A novel structural motif of ligand-gated ion channels // *EMBO J.* 1998. V. 17. No. 11. P. 3016–3028.
374. Nigrelli R.F. The effects of holothurin on fish and mice with sarcoma 180 // *Zoologica (New York).* 1952. V. 37. P. 89–90.
375. Nigrelli R.F., Jakowska S. Effects of holothurin, a steroid saponin from the Bahamian sea cucumber (*Actinopyga agassizi*), on various biological systems // *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1960. V. 90. P. 884–892.
376. Nigrelli, R.F., Stempien, M.F.J., Ruggieri G.D., Liguori V.R., Cecil J.T. Substances of potential biomedical importance from marine organisms // *Fed. Proc.* 1967. V. 26. P. 1197–1205.

377. Nishihara T., Nishikawa J.-I., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa K., Takatori S., Kitagawa Y., Hori S., Usumi H. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay // *J. Health Sci.* 2000. V. 46. No. 4. P. 282–298.
378. Nishikawa J.-I., Saito K., Goto J., Dakeyama F., Matsuo M., Nishihara T. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator // *Toxicol. Appl. Pharm.* 1999. V. 154. P. 76–83.
379. Nordhoff E., Schürenberg M., Thiele G., Lübbert C., Kloeppe K.-D., Theiss D., Lehrach H., Gobom J. Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports // *Internat. J. Mass-Spectrom.* 2003. V. 226. P. 163–180.
380. Nori S., Fumagalli L., Bo X., Bogdanov Y., Burnstock G. Coexpression of mRNAs for P2X1, P2X2 and P2X4 receptors in rat vascular smooth muscle: An in situ hybridization and RT-PCR study // *J. Vasc. Res.* 1998. V. 35, No. 3. P. 179–185.
381. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82, No. 4. P. 1013–1067.
382. Nourse J., Firpo E., Flanagan W.M., Coats S., Polyak K., Lee M.-H., Massague J., Crabtree G.R., Roberts J.M. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin // *Nature.* 1994. V. 372. P. 570–573.
383. Nurden A.T. Does ATP act through P2X1 receptors to regulate platelet activation and thrombus formation // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. No. 5. P. 907–909.
384. Nussenzweig M., Golstein P. Lymphocyte activation and effector functions // *Curr. Opin. Immunol.* 2000. V. 12. No. 3. P. 239–241.
385. Odashima S., Ohta T., Arichi S., Abe H., Kitagawa I., Kohno H., Matsuda T. Control of phenotypic expression of cultured B-16 Melanoma cells by plant glycosides // *Cancer Res.* 1985. V. 45. No. 6. P. 2781–2784.
386. Olsen R.A. Triterpene glycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. Role of the sterol contents of some fungi // *Physiol. Plant.* 1973a. V. 28. P. 507–515.
387. Olsen R.A. Triterpene glycosides as inhibitors of fungal growth and metabolism. The effect of aescin on fungi with reduced sterol contents // *Physiol. Plant.* 1973b. V. 29. P. 145–149.
388. Onorato J., Henion J.D. Evaluation of triterpene glycoside estrogenic activity using LC/MS and immunoaffinity extraction // *Anal. Chem.* 2001. V. 73, No. 19. P. 4704–4710.
389. Osbourn A., Goss R.J., Field R.A. The saponins-polar isoprenoids with important and diverse biological activities // *Nat. Prod. Rep.* 2011. V. 28. P. 1261–1268.
390. Park J.-I., Bae H.-R., Kim C.G., Stonik V.A., Kwak J.-Y. Relationships between chemical structures and functions of triterpene glycosides isolated from sea cucumbers // *Front. Chem.* 2014. V. 2. P. 1–14.

391. Park S.Y., Kim Y.H., Kim Y., Lee S.J. Frondoside A has an anti-invasive effect by inhibiting TPA-induced MMP-9 activation via NF- κ B and AP-1 signaling in human breast cancer cells // *Int. J. Oncol.* 2012. V. 41. P. 933–940.
392. Patchen M.L. Immunomodulators and cytokines: their use in the migration of radiation-induced hemopoietic injury // *Radioprotectors. Chemical, biological and clinical perspectives* / Ed. Bump E.A., Malaker K. CRC Press LLC, 1998. P. 213–236.
393. Patchen W.L., D'Alesandro M.M., Brook I. Blakely W.F., MacWittie T.J. Glucan mechanisms involved in its radioprotective effect // *J. Leucocyte Biol.* 1987. V. 42. P. 95–105.
394. Patil T.D., Thakare S.V. *In silico* evaluation of selected triterpene glycosides as a human dna topoisomerase II alpha (α) inhibitor // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012. V. 4. P. 201–204.
395. Pawson D.L., Fell H.B. A revised classification of the dendrochiroside holothurians // *Breviora.* 1965. V. 214. P. 1-7.
396. Podolak I., Galanty A., Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: A review // *Phytochem. Rev.* 2010. V. 9. P. 425–474.
397. Poscidio G.N. The mutagenicity potential of holothurin of some Philippine holothurians // *Philipp. J. Sci.* 1983. V. 112. P. 1–12.
398. Quaschnig T., Ruschitzka F., Shaw S., Luscher T.F. Aldosterone receptor antagonism normalizes vascular function in liquorice-induced hypertension // *Hypertension.* 2001. V. 37. No. 2. P. 801–805.
399. Noubade R., Wong K., Ota N., Rutz S., Eidenschenk C., Valdez P.A., Ding J., Peng I., Sebrell A., Caplazi P., DeVoss J., Soriano R.H., Sai T., Lu R., Modrusan Z., Hackney J., Ouyang W. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity // *Nature.* 2014. V. 509. P. 235–239.
400. Rajput Z.I., Hu S., Xiao C., Arijo A.G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2007. V. 8. No. 3. P. 153–161.
401. Ralevic V. P2X receptors in the cardiovascular system // *WIREs Membr. Transp. Signal.* 2012. V. 1. P. 663–674.
402. Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines // *Pharmacol. Rev.* 1998. V. 50. No. 3. P. 413–492.
403. Roberts J.A., Evans R.J. ATP binding at human P2X1 receptors: Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. No. 10. P. 9043–9055.
404. Rodriguez J., Castro R., Riguera R. Holothurinosides: new antitumor non sulphated triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskali* // *Tetrahedron.* 1991. V. 47. P. 4753–4762.
405. Roginsky A.B., Ding, X., Woodward C., Ujiki M.B., Singh B., Bell R.H., Collin P., Adrian T.E., Woodward C. Anti-pancreatic cancer effects of a polar extract from the edible sea cucumber *Cucumaria frondosa* // *Pancreas.* 2010. V. 39. P. 646–652.

406. Rong W., Burnstock G., Spyer K.M. P2X purinoceptor-mediated excitation of trigeminal lingual nerve terminals in an in vitro intra-arterially perfused rat tongue preparation // *J. Physiol.* 2000. V. 524. No. 3. P. 891–902.
407. Ruggieri C.D., Nigrelli R.F. Physiologically active substances from Echinoderms // *Bioactive compounds from the sea / Eds. Humm, H.J., Lane C.H. N.-Y.: Dekker Inc., 1974. P. 183–195.*
408. Samstag Y., Eibert S.M., Klemke M., Wabnitz G.H. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration // *J. Leukoc. Biol.* 2003. V. 73. P. 30–48.
409. Samways D.S., Khakh B.S., Dutertre S., Egan T.M. Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 13800–13805.
410. Sanina N.M., Kostetsky E.Y., Shnyrov V.L., Tsybulsky A.V., Novikova O.D., Portniagina O.Y., Vorobieva N.S., Mazeika A.N., Bogdanov M.V. The influence of monogalactosyldiacylglycerols from different marine macrophytes on immunogenicity and conformation of protein antigen of tubular immunostimulating complex // *Biochimie.* 2012. V. 94, No. 4. P. 1048–1056.
411. Schulman E.S., Glaum M.C., Post T., Wang Y., Raible D.G., Mohanty J., Butterfield J.H., Pelleg A. ATP modulates anti-IgE-induced release of histamine from human lungs mast cells // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999. V. 20, No. 3. P. 530–537.
412. Seeley E.H., Caprioli R.M. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2008. V. 105. No. 47. P. 18126–18131.
413. Segal R., Mansour M., Zaitschek D.V. Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins and sapogenins // *Biochem. Pharmacol.* 1966. V. 15. No. 10. P. 1411–1416.
414. Sen D.K., Lin V.K. Effect of holothurin on *Trypanosoma duttoni* in swiss Webster mal mice // *J. Protozool.* 1975. V. 22. P. 25–26.
415. Sen D.K., Lin V.K. Effect of holothurin on *Trypanosoma duttoni* in mice response of trypanosomes to biotoxin // *Virginia J. Sc.* 1977. V. 28. P. 9–11.
416. Shen H., Nelson G., Kennedy S., Nelson D., Johnson J., Spiller D., White M.R.H., Kell D.B. Automatic tracking of biological cells and compartments using particle filters and active contours // *Chemometr. Intell. Lab.* 2006a. V. 82. P. 276–282.
417. Shen H., Nelson G., Nelson D.E., Kennedy S., Spiller D.G., Johnson J., Griffith T., Paton, N., Oliver S.G., White, M.R.H., Kell D.B. Automated tracking of gene expression in individual cells and cell compartments // *J. R. Soc. Interface.* 2006b. V. 3. P. 787–794.
418. Shibata S. Recent studies on biologically active constituents of medicinal plants- biologically active saponins and sapogenins and their chemical modifications // *Third International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products. Sofia, Bulgaria, 1985. V. 1. P. 148–167.*

419. Shigemoto-Mogami Y., Koizumi S., Tsuda M., Ohsawa K., Kohsaka S., Inoue K. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5 // *J. Neurochem.* 2001. V. 78. No. 6. P. 1339–1349.
420. Shimada S. Antifungal steroid glycoside from sea cucumber // *Science.* 1969. V. 163. No. 874. P. 1462–1465.
421. Shinozaki Y., Sumitomo K., Tsuda M., Koizumi S., Inoue K., Torimitsu K. Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X₄ receptors // *PLoS Biol.* 2009. V. 7. No. 5. e1000103.
422. Shiue T.W., Chen Y.H., Wu C.M., Singh G., Chen H.Y., Hung C.H., Liaw W.F., Wang Y.M. Nitric oxide turn-on fluorescent probe based on deamination of aromatic primary monoamines // *Inorg. Chem.* 2012. V. 51. P. 5400–5408.
423. Silchenko A.S., Avilov S.A., Kalinin V.I., Kalinovsky A.I., Dmitrenok P.S., Fedorov S.N., Stepanov V.G., Dong Z., Stonik V.A. Constituents of the Sea Cucumber *Cucumaria okhotensis*. Structures of Okhotosides B₁–B₃ and Cytotoxic Activities of Some Glycosides from this Species. // *J. Nat. Prod.* 2008. V. 71. P. 351–356.
424. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I. Triterpene glycosides from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Structure and biological activity of cucumariosides B₁ and B₂, two new minor non-sulfated unprecedented triosides // *Nat. Prod. Commun.* 2012a. V. 7. P. 1157–1162.
425. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I. Triterpene glycosides from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Structure and biological action of cucumariosides A₁, A₃, A₄, A₅, A₆, A₁₂ and A₁₅, seven new minor non-sulfated tetraosides and unprecedented 25-keto,27-norholostane aglycone // *Nat. Prod. Commun.* 2012b. V. 7. P. 517–525.
426. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I., Jayasandhya P., Rajan G.C., Padmakumar K.P. Structures and biological activities of typicosides A₁, A₂, B₁, C₁ and C₂, triterpene glycosides from the sea cucumbers *Actinocucumis typica* // *Nat. Prod. Commun.* 2013a. V. 8. No. 3. P. 301–310.
427. Silchenko A.S., Kalinovsky A.I., Avilov S.A., Andryjaschenko P.V., Dmitrenok P.S., Martyyas E.A., Kalinin V.I. Triterpene glycosides from sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Structure and biological action of cucumariosides I₁, I₃, I₄, three new minor disulfated pentaosides // *Nat. Prod. Res.* 2013 b. V. 8. No. 8. P. 1053–1058.
428. Silchenko A.S., Kalinovsky 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 c. V. 27. No. 19. P. 1776–1783.
429. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S., Ringel B., Drynda S., Kekow J., Thiesen H.-J., Glocker M.O. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis // *Electrophoresis.* 2002. V. 23. P. 3445–3456.

430. Sommer J.A., Fiset P.L., Hu Y., Denlinger L.C., Guerra A.N., Bertics P.J., Proctor R.A. Purinergic receptor modulation of LPS-stimulated signaling events and nitric oxide release in RAW 264.7 macrophages // *J. Endotoxin Res.* 1999. V. 5, No. 1–2. P. 70–74.
431. Sperlagh B., Illes P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases // *Trends Pharmacol. Sci.* 2014. V. 35. No. 10. P. 537–547.
432. Spiliotis E.T., Nelson W.J. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization // *J. Cell. Sci.* 2006. V. 119. P. 4–10.
433. Stonik V.A. Some terpenoid and steroid derivatives from echinoderms and sponges // *Pure and Appl. Chem.* 1986. V. 58. No. 3. P. 423–436.
434. Stonik, V.A., Elyakov G.B. Structure and biologic activities of sponge and sea cucumber toxins // *Handbook of natural toxins and venoms / Ed. Tu A. N.-Y.: Marcel Dekker Inc., 1988. V. 3. P. 107–120.*
435. Stonik V.A., Kalinin V.I., Avilov S.A. Toxins from sea cucumbers (*Holothuroids*): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution // *J. Nat. Toxins.* 1999. V. 8. No. 2. P. 235–248.
436. Styles T.J. Effect of holothurin on *Trypanosome lewisi* infections in rats // *J. Protozool.* 1970. V. 17. P. 196–198.
437. Sullivan T.D., Ladue K.T., Nigrelli R.F. The effects of holothurin, a steroid saponin of animal origin, on Krebs-2 ascites tumors in Swiss mice // *Zoologica.* 1955. V. 40. P. 49–52.
438. Sullivan T.D., Nigrelli R.F. The antitumor action of biologics of marine origin I. Survival of Swiss mice inoculated with Krebs-2 ascites tumor and treated with holothurin, a steroid saponin from the sea cucumber, *Actinopyga agassizi* // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1956. V. 2. P. 151–155.
439. Sun H, Yang Z, Ye Y. Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng* // *Int. Immunopharmacol.* 2006. V. 6. P. 14–25.
440. Sun P., Liu B.S., Yi Y.H., Li L., Gui M., Tang H.F., Zhang D.Z., Zhang S.L. New cytotoxic lanostane-type triterpene glycoside from the sea cucumber *Holothuria impatiens* // *Chem. Biodivers.* 2007. V. 4. P. 450–457.
441. Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E., North R.A., Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7) // *Science.* 1996. V. 272, No. 5262. P. 735–738.
442. Surprenant A., North R.A. Signaling at Purinergic P2X Receptors // *Annu. Rev. Physiol.* 2009. V. 71. P. 333–359.
443. Thron C.D. Hemolysis by holothurin A, digitonin and quiiiaia saponin: estimates of the required cellular lysin uptakes and free lysin concentrations // *J. Pharm. Exp. Therap.* 1964a. V. 145, No. 2. P. 194–202.

444. Thron C.D., Durant R.C., Friess S.L. Neuromuscular and cytotoxic effects of holothurin A and related saponins at low concentration levels. III // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1964b. V. 6. P. 182–196.
445. Tian F., Zhang X., Tong Y., Yi Y., Zhang S., Li L., Sun P., Lin L., Ding J. PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo* // *Cancer Biol. Therapy.* 2005. V. 48. P. 874–882.
446. Tian F., Zhu C.H., Zhang X.W., Xie X., Xin X.L., Yi Y.H., Lin L.P., Geng, M.Y., Ding J. Philinopside E, a new sulfated saponin from sea cucumber, blocks the interaction between kinase insert domain-containing receptor (KDR) and alphavbeta3 integrin via binding to the extracellular domain of KDR // *Mol. Pharmacol.* 2007. V. 72. P. 545–552.
447. Tong Y., Zhang, X., Tian F., Yi Y., Xu Q., Li L., Tong L., Lin L., Ding J. Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenetic and anti-tumor effects // *Int. J. Cancer.* 2005. V. 114. P. 843–853.
448. Törnquist K. Depolarization of the membrane potential decreases the ATP-induced influx of extracellular Ca^{2+} and the refilling of intracellular Ca^{2+} stores in rat thyroid FRTL-5 cells // *J. Cell. Physiol.* 1991. V. 149, No. 3. P. 485–491.
449. Uchiyama K, Kondo H. p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER // *J. Biochem.* 2005. V. 137. P. 115–119.
450. Uff C.R., Pockley A.G., Phillips R.K: A rapid microplate-based fluorometric assay for phagocytosis // *Immunol. Invest.* 1993. V. 22. P. 407–413.
451. Ullmann H., Meis S., Hongwiset D., Marzian C., Wiese M., Nickel P., Communi D., Boeynaems J.M., Wolf C., Hausmann R., Schmalzing G, Kassack M.U. Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. P. 7040–7048.
452. Van Dyck S., Caulier G., Todesco M., Gerbaux P., Fournier I., Wisztorski M., Flammang P. The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: Usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish // *J. Exp. Biol.* 2011. V. 214. No. 8. P. 1347–1356.
453. Van Dyck S., Flammang P., Meriaux C., Bonnel D., Salzet M., Fournier I., Wisztorski M. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: Contribution of MALDI MSI for the study of saponins in Cuvierian tubules of *H. forskali* // *PLoS ONE.* 2010. V. 5. No. 11. e13923
454. Verbist J.E. Pharmacological effects of compounds from echinoderms // *Echinoderm studies.* V. 4. / Eds. Jangoux M., Lawrence J.M. Rotterdam: A.A. Balkema, 1993. P. 111–186.
455. Virginio C., Robertson G., Surprenant A., North R.A. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors // *Mol. Pharmacol.* 1998. V. 53. P. 969–973.
456. Virginio C., Church D., North R.A., Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor // *Neuropharmacology.* 1997. V. 36. P. 1285–1294.

457. Wang J., Yu Y. Insights into the channel gating of P2X receptors from structures, dynamics and small molecules // *Acta Pharmacol. Sin.* 2016. V. 37. P. 44–55.
458. Wargasettia T.L. and Widodo S.P. The role of sea cucumber active compound and its derivative as an anti-cancer agent // *Curr. Pharmacol. Rep.* 2018. V. 4. No. 1. P. 27–32.
459. Wilkinson W.J., Kemp P.J. The carbon monoxide donor, CORM-2, is an antagonist of ATP-gated, human P2X₄ receptors // *Purinergic Signal.* 2011. Vol. 7. P. 57–64.
460. Wolf C., Rosefort C., Fallah G., Kassack M.U., Hamacher A., Bodnar M., Wang H., Illes P., Kless A., Bahrenberg G., Schmalzing G., Hausmann R. Molecular determinants of potent P2X₂ antagonism identified by functional analysis, mutagenesis, and homology docking // *Mol. Pharmacol.* 2011. V. 79. P. 649–661.
461. Wright B., Zeidman I., Greige R., Poste G. Inhibition of macrophage activation by calcium channel blockers and calmodulin antagonists // *Cell Immunol.* 1985. V. 95. P. 46–53.
462. Wu J., Yi Y.H., Tang H.F., Wu H.M., Zhou Z.R. Hillasides A and B, two new cytotoxic triterpen glycosides from the sea cucumber *Holothuria hilla* // *J. Asian. Nat. Prod. Res.* 2007. 9. P. 609–615.
463. Xu Q.F., Fang X.L., Chen D.F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats // *J. Ethnopharmacol.* 2003. V. 84. No. 2–3. P. 187–192.
464. Yamanouchi T. On the poisonous substance contained in holothurians // *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 1955. V. 4. No. 2–3. P. 183–203.
465. Yamasaki Y., Ito K., Enomoto Y., Sutko J. Alterations by saponins of passive Ca²⁺ permeability and Na⁺/Ca²⁺ exchange activity of canine cardiac sarcolemmal vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. V. 897. P. 481–487.
466. Yang R., Liang B.T. Cardiac P2X₄ receptors targets in ischemia and heart failure? // *Circulation Res.* 2012. V. 111. 397–411.
467. Yankee T.M., Yun T.J., Draves K.E., Ganesh K., Bevan M.J., Krishna K.M., Clark E.A. The gads (GrpL) adaptor protein regulates T cell homeostasis // *J Immunol.* 2004. V. 173. P. 1711–1720.
468. Yano M, Okano H.J., Okano H. Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 12690–12699.
469. Yi M. Preparation method of sea cucumber and fresh oyster health wine // Patent of the Chinese People Republic No. CN 104312865 A. 28.01.2015. Priority 21.10.2014.
470. Yi Y., Ding J., Sun P., Miao Z., Li L., Lin L., Tang H., Li M., Liu B.. Use of saponins compound echinoside A in sea pumpkin in preparing tumor topoisomerase II α inhibitor // Patent of the Chinese People Republic No. CN 101336928 A. 7.01.2009a. Priority 8.07.2005.

471. Yi Y., Sun G., Li L., Sun P. Triterpenoid saponins antineoplastic compound griseaside A in ash sea cucumber and preparation method thereof // Patent of the Chinese People Republic No. CN 101157718. 7.01.2009b. Priority 23.10.2007.
472. Yoo Y., Wu X., Egile C., Li R., Guan J.-L. Interaction of N-WASP with hnRNPK and its role in filopodia formation and cell spreading // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 15352–15360.
473. Yun S.H., Park E.S., Shin S.W., Na Y.W., Han J.Y., Jeong J.S., Shastina V.V., Stonik V.A., Park J.I., Kwak J.Y. Stichoposide C induces apoptosis through the generation of ceramide in leukemia and colorectal cancer cells and shows *in vivo* antitumor activity // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 5934–5948.
474. Zamora R., Vodovotz V., Billiar T.R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases // *Mol. Med.* 2000. V. 6, No. 5. P. 347–373.
475. Zhang W., Zhang C., Liu R., Li H., Zhang J., Mao C., Chen C. Quantitative determination of Astragaloside IV, a natural product with cardioprotective activity, in plasma, urine and other biological samples by HPLC coupled with tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2005. V. 822, No. 1–2. P. 170–177.
476. Zhang S.L., Li L., Yi Y.H., Sun P. Philinopsides E and F, two new sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Pentacta quadrangularis* // *Nat. Prod. Res.* 2006. V. 20. P. 399–407.
477. Zhang S.Y., Tang H.F., Yi Y.H. Cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Pseudocolochirus violaceus* // *Fitoterapia.* 2007. V. 78. P. 283–287.
478. Zhang Y., Yi Y. Studies on antitumor activities of triterpene glycoside colochiroside A from sea cucumber *Colochirus anceps* // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2011. V. 36. P. 504–507.
479. Zhao Q., Xue Y., Liu Z., Li H., Wang J., Li Z., Wang Y., Dong P., Xue C. Differential effects of sulfated triterpene glycosides, Holothurin A₁, and 24-Dehydroechinoside A, on antimetastatic activity via regulation of the MMP-9 signal pathway // *J. Food Sci.* 2010. V. 75. P. 280–288.
480. Zhao Q., Liu Z., Xue Y., Wang J., Li H., Tang Q., Wang Y., Dong P., Xue C. Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions // *J. Zhejiang Univ. Sc. B.* 2011. V. 12. P. 534–544.
481. Zhao Q., Xue Y., Wang J.F., Li H., Long T.T., Li, Z., Wang Y.M., Dong P., Xue C. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor activities of echinoside A and ds-echinoside A from *Pearsonothuria graeffei* // *J. Sci. Food Agric.* 2012. V. 92. P. 965–974.
482. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2000. V. 362. No. 4–5. P. 299–309.
483. Zoccarato F., Cavallini L., Alexandre A. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes // *J. Neurochem.* 1999. V. 72. P. 625–633.

484. Zou Z., Yi Y., Wu H., Wu J., Liaw C., Lee K. Intercedensides A–C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. P. 1055–1060.