

^{1,2}А.М. Жумакаева *, ¹О.В. Маслова , ¹С.М. Адекенов 

¹АО «Международный научно-производственный холдинг Фитохимия» Казахстан, г. Караганда

² НАО «Медицинский университет Караганды», Казахстан, г. Караганда

*e-mail: aynura_tuleuova@mail.ru

ВЛИЯНИЕ 1(10)В-ЭПОКСИ-5,7А,6В(Н)-ГВАЙ-3(4),11(13)-ДИЕН-6,12-ОЛИДА НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ОНКОБОЛЬНЫХ

На сегодняшний день известно большое количество иммуномодулирующих средств микробного, эндогенного, синтетического и растительного происхождения. На фармацевтическом рынке присутствует достаточный ассортимент иммуотропных препаратов. Однако, наличие широкого выбора иммуномодуляторов их использование в клинике ограничено наличием побочных действий и ряда противопоказаний к применению.

В настоящее время не выявлено цитокинов со строго специфической активностью. Такие особенности функционирования иммунной системы делают практически невозможным существование иммуномодулятора с абсолютно селективным конечным влиянием на иммунитет.

В статье рассматривается влияние растительного иммуномодулятора 1(10)β-эпокси-5,7α,6β(Н)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олида (далее – эпоксигваянолид) на иммунную систему онкобольных. По результатам рандомизированных клинических исследований подтверждено иммуномодулирующее действие эпоксигваянолида и определено его положительное влияние на показатели системы ПОЛ-АОЗ и окислительные модификации белков.

В работе показана важность проведения иммунофенотипического анализа мононуклеарных клеток периферической крови онкопациентов.

Определено иммуномодулирующее действие эпоксигваянолида, проявляющееся преимущественным влиянием на Т-клеточное звено иммунитета. Эпоксигваянолид обладает свойством корректировать иммунодепрессивный эффект цитостатиков. Таким образом, результаты исследований эпоксигваянолида свидетельствуют о потенциальной возможности разработки на его основе нового препарата с выраженным цитостатическим действием, тем самым стимулирующей иммунную систему.

Ключевые слова/словосочетания: 1(10)β-эпокси-5,7α,6β(Н)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олида, иммунная система, иммуномодулятор, рак молочной железы, химиотерапия.

^{1,2}А.М. Zhumakayeva*, ¹О.В. Maslova, ¹С.М. Adekenov

¹JSC “International Research and Production Holding Phytochemistry”, Kazakhstan, Karaganda

²NAO “Medical University of Karaganda”, Kazakhstan, Karaganda

*e-mail: aynura_tuleuova@mail.ru

The effect of 1(10)β-epoxy-5,7α,6β(H)-guai-3(4),11(13)-diene-6,12-olide on the immune system of cancer patients

Today, a large number of immunomodulatory agents of microbial, endogenous, synthetic and plant origin are known. There is a sufficient range of immunotropic drugs on the pharmaceutical market. However, the availability of a wide range of immunomodulators and their use in the clinic is limited by the presence of side effects and a number of contraindications for use.

Currently, no cytokines with strictly specific activity have been identified. Such features of the functioning of the immune system make the existence of an immunomodulator with an absolutely selective final effect on immunity practically impossible.

The article discusses the effect of the plant immunomodulator 1(10)β-epoxy-5,7α,6β(H)-guai-3(4),11(13)-diene-6,12-olide (hereinafter referred to as epoxyguaianolide) on the immune system of the cancer patients. According to the results of randomized clinical trials, the immunomodulatory effect of epoxyguaianolide was confirmed and its positive effect on the indicators of the LPO-AOD system and oxidative modification of proteins was determined.

The paper shows the importance of immunophenotypic analysis of peripheral blood mononuclear cells of cancer patients.

The immunomodulatory effect of epoxyguaianolide was determined, which manifests itself as a predominant effect on the T-cell link of immunity. Epoxyguaianolide has the ability to correct the immu-

nosuppressive effect of cytostatics. Thus, the results of studies of epoxyguaianolide indicate the potential for the development of a new drug based on it with a pronounced cytostatic effect, thereby stimulating the immune system.

Key words/phrases: 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олид, immune system, immunomodulator, breast cancer, chemotherapy.

^{1,2}А.М. Жұмақаева*, ¹О.В. Маслова, ¹С.М. Әдекенов

¹«Фитохимия» халықаралық ғылыми-өндірістік холдингі» АҚ, Қазақстан, Қарағанды қ.

²«Қарағанды медицина университеті» КЕАҚ, Қазақстан, Қарағанды қ.

*e-mail: aynura_tuleuova@mail.ru

1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олидтің онкологиялық науқастардың иммундық жүйесіне әсері

Бүгінгі таңда микробтық, эндогендік, синтетикалық және өсімдік тектес көптеген иммун-түрлендіруші құралдар белгілі. Фармацевтикалық нарықта иммунотропты препараттардың жеткілікті сұрыпталымы орын алуда. Алайда иммуномодуляторлардың кең таңдауы мен оларды клиникада қолдану жанама әсерлердің және қолдануға бірқатар қарсы көрсетілімдердің болуымен шектеледі.

Қазіргі уақытта қатаң спецификалық белсенділігі бар цитокиндер анықталған жоқ. Иммундық жүйе қызметінің мұндай ерекшеліктері иммунитетке абсолютті селективті соңғы әсері бар иммуномодулятордың болуын іс жүзінде мүмкін емес етеді.

Мақалада өсімдік иммуномодуляторы 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олидтің (бұдан әрі – эпоксигваянолид) онкологиялық науқастанған адамдардың иммундық жүйесіне әсері қарастырылады. Рандомизацияланған клиникалық зерттеулердің нәтижелері бойынша эпоксигваянолидтің иммунтүрлендіруші әсері расталды, сондай-ақ оның ЛАТ-АОҚ жүйесінің көрсеткіштеріне және ақуыздардың тотығу модификациясына оң әсері анықталды.

Жұмыста онкологиялық емделушілердің перифериялық қанының мононуклеарлы жасушаларына иммунофенотиптік талдау жүргізудің маңыздылығы көрсетілді.

Эпоксигваянолидтің иммунитеттің Т-жасушалық буынына басым әсер ететін иммунтүрлендіруші әсері анықталды. Эпоксигваянолид цитостатиктердің иммунитетті тежейтін әсерін түзету қасиетіне ие. Осылайша, эпоксигваянолидті зерттеу нәтижелері оның негізінде цитостатикалық әсері бар, сол арқылы иммундық жүйені ынталандыратын жаңа препаратты жасаудың әлеуетті мүмкіндігін көрсетеді.

Түйінді сөздер/сөз тіркестері: 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олид, иммундық жүйе, иммуномодулятор, сүт безі обыры, химиотерапия.

Введение

На сегодняшний день известно большое количество иммуномодулирующих средств микробного, эндогенного, синтетического и растительного происхождения. При наличии широкого выбора иммуномодуляторов их использование в клинике ограничено в силу побочного действия и ряда противопоказаний к применению [1].

В настоящее время не выявлено цитокинов со строго специфической активностью. Такие особенности функционирования иммунной системы делают практически невозможным существование иммуномодулятора с абсолютно селективным конечным влиянием на иммунитет [2, 3].

По результатам клинических исследований определено, что 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олид (далее – эпоксигвая-

нолид) (1) обладает низкой общей токсичностью вследствие быстрой инактивации в организме, что позволяет предположить отсутствие у него супрессорного эффекта на НК-клетки [4].

Однако, его влияние на систему противоопухолевого иммунитета до конца не известно. Между тем именно противоопухолевой активности НК-клеток при различных видах рака придают огромное значение ввиду хорошо установленных обратных корреляций между НК-активностью и прогрессией метастазов. Кроме того, показана прямая корреляция между продолжительностью жизни пациентов после удаления опухолей и НК-клеточной активностью у них.

Растительные препараты (препараты эхинацеи, элеутерококка, женьшеня, родиолы розовой, тонзилгон Н и другие) достаточно широко используют в клинической практике в качестве адаптогенов и мягких иммуностимуляторов. Од-

нако, механизмы их действия до конца не изучены [5].

Отечественные и зарубежные исследователи [6-14] уделяют значительное внимание определению молекулярно-клеточных механизмов трансформации клеток, развитию стадии промоции и опухолевой прогрессии. Однако, как известно, малигнизация клетки еще не означает развития опухолевого процесса и тем более онкологического заболевания. В условиях нормы опухолевые клетки подвергаются элиминации за счет неспецифических механизмов резистентности и специфических иммунологических механизмов защиты.

Результаты многолетних исследований сесквитерпеновых лактонов показали, что гваянолиды являются наиболее сильными ингибиторами NF- κ B и их эффективность в основном обусловлена α,β -ненасыщенной карбонильной группой [15-19].

Существуют обоснованные представления о том, что прогрессия первичной опухоли в молочной железе напрямую зависит от цитолитической активности лимфоцитов, таких как натуральные киллерные (NK) клетки и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) [20]. При этом особая роль отводится NK-клеткам, представляющим

популяцию больших гранулярных лимфоцитов, распознающих ряд поверхностных клеточных молекул, экспрессирующихся на раковых клетках, и уничтожающих клетки-мишени посредством «цитолитического удара» без предварительной сенсibilизации [21-23].

Эпоксигваянолид (1) действует как противоопухолевое средство, ингибируя фарнезилпротеинтрансферазу, которая является ферментом, участвующим в образовании злокачественных опухолей (рисунок 1). Кроме того, данное соединение оказывает ингибирующее действие на вирус гриппа А, оно может восстанавливать синтез цитокинов и других противовоспалительных медиаторов, действующих как противовоспалительные в моделях воспаления *in vivo* (модели каррагинана, гистама и формалина), и оно обладает иммуномодулирующей активностью [24-25]. Abderrazak A. с соавторами [26] определили, что эпоксигваянолид снижает воспаление в β -клетках поджелудочной железы *in vivo* и в клеточной линии INS-1 *in vitro*. Таким образом, эпоксигваянолид (1) может представлять собой новое перспективное соединение для лечения онкопациентов и больных с воспалительными процессами и сахарным диабетом 2 типа.

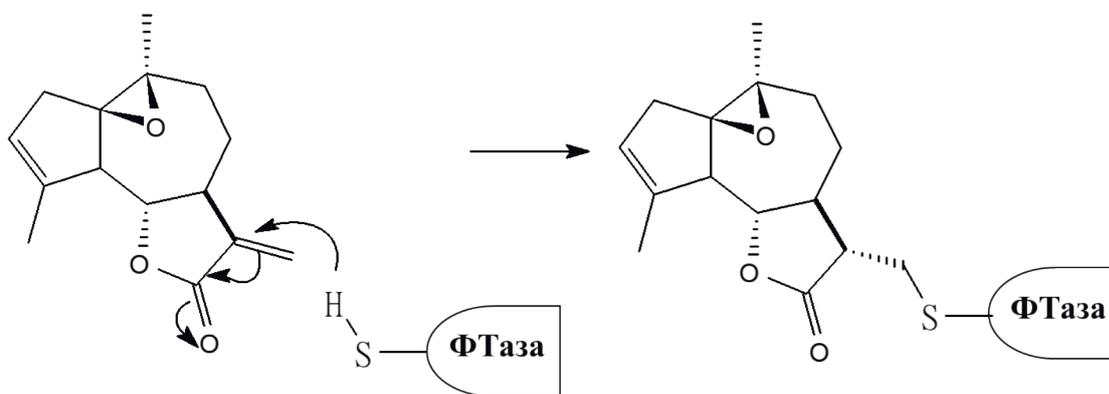


Рисунок 1 – Механизм взаимодействия эпоксигваянолида (1) с фарнезилпротеинтрансферазой

Рандомизированные клинические исследования позволили подтвердить иммуномодулирующее действие эпоксигваянолида (1) и при этом определено его положительное влияние на показатели системы ПОЛ-АОЗ и окислительные модификации белков [27].

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о важной роли иммуносупрессии в нарушениях элиминации опухолевых клеток, развитии стадии промоции и метастазирования при раке. И как следствие, высокоперспективной является разработка препаратов,

механизм действия которых, направлен на коррекцию иммунной системы.

Цель исследования – выявление влияния 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олида на показатели иммунной системы у больных раком молочной железы.

2. Материалы и методы

2.1 Исследуемый материал

В работе использованы образцы периферической крови здоровых женщин и пациенток с диагнозом рак молочной железы. Периферическую кровь собирали натощак из локтевой вены в объеме 5 мл в стерильные пробирки с антикоагулянтом EDTA.

2.2 Реагенты

В ходе экспериментов использовали следующие реактивы: культуральная среда (culture medium) RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), L-глутамин (L-glutamine) (Sigma-Aldrich), стрептомицин/пенициллин (Streptomycin/penicillin) (Sigma-Aldrich), фетальная бычья сыворотка (Fetal Bovine Serum, FBS) (Sigma-Aldrich), трипановый синий (Trypan Blue) (Sigma-Aldrich), перкол (Percoll) (Sigma-Aldrich), фосфатно-солевой буферный раствор (Phosphate Buffer Saline, PBS), лизирующий раствор (BD Biosciences), флуоресцентно-меченные моноклональные антитела к CD56-PE (Miltenyi Biotec), CD3-PerCP (BD Biosciences), CD8-PE (BD Biosciences), CD44-FITC, CD62L-FITC (BD Biosciences), этилендиаминотетраацетат (EDTA) (Serva, Германия), диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma-Aldrich),

2.3 Приготовление культуральной среды

Жидкую культуральную среду RPMI-1640 готовили из сухого препарата, растворяя его в деионизированной воде и доводя pH до 7,4, согласно прописи фирмы-производителя (Sigma-Aldrich, Германия), стерилизуя конечный продукт путем ультрафильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

2.4 Выделение мононуклеарной фракции

5 мл цельной крови наслаивали на 5 мл с плотностью 1,076, центрифугировали 20 мин при 1400g при 20°C. Мононуклеарные клетки интерфазного кольца отмывали 20-кратным объемом среды RPMI-1640 при 200g в течение 10 мин при 20°C. Подсчитывали живые клетки с использованием метода исключения трипанового синего [28].

2.5 Культивирование клеток

В качестве клеток-мишеней для НК использовали линию клеток эритролейкемии человека K-562, хранящуюся в криобанке лаборатории молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А.Айтхожина. Размораживание клеток осуществляли стандартным способом [28]. Криопробирку с клетками переносили из сосуда Дьюара в водяную баню с температурой 37°C, предварительно выдержав при комнатной температуре для испарения из пробирки остатков жидкого азота. После полного размораживания суспензию клеток подвергали отмывке от DMSO и FBS в 20-кратном избытке среды RPMI-1640 при центрифугировании при 160 g в течение 10 мин. Затем клетки ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ME/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. После этого определяли жизнеспособность клеток методом исключения трипанового синего и подвергали культивированию в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

2.6 Оценка цитолитической активности НК-клеток

О цитолитической активности НК-клеток судили по изменению цитоплазматических дегидрогеназ, оцениваемых в МТТ-тесте. Мононуклеарные клетки (2,5x10⁵ кл./лун.) кокультивировали с клетками мишенями (5x10⁴ кл./лун.) в 96-луночных круглодонных планшетах в 200 мкл 10-процентной среды RPMI-1640 в течение 12 ч. За 4 ч до окончания культивирования в каждую ячейку вносили по 500 мкг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид). По окончании опыта из лунок удаляли супернатант, образовавшиеся кристаллы формазана после полного высушивания растворяли в DMSO и колориметрировали при 492/630 нм. Индекс цитотоксичности (ИЦ) клеток вычисляли по формуле: ИЦ=(К-О)/Кx100%, где К – среднее значение экстинкции в контроле, О – то же самое в опыте. К вычисляли, суммируя значения экстинкции в лунках с мононуклеарами и клетками-мишенями (K-562).

2.7 Проточная иммуноцитофлуориметрия

Фенотип клеток оценивали путем определения CD-маркеров с помощью проточной иммуноцитофлуориметрии. Для этого цельную кровь с гемостабилизатором (EDTA) обрабатывали лизирующим раствором для удаления эритро-

цитов согласно протоколу фирмы-производителя. Затем клетки метили моноклональными антителами к CD-маркерам, конъюгированными с фикоэритрином (PE), флуоресцеин-изоцианатом (FITC) или пиридин хлорофилл протеином (PerCP), согласно протоколу фирм-производителей (BD Biosciences или Milenyi Biotech). Неспецифическую флуоресценцию контролировали с помощью моноклональных мышинных флуоресцентно-меченных IgG соответствующих изотипов. Полученные суспензии клеток пропускали через проточный цитометр FACS Calibur и оценивали процент клеток, несущих соответствующие маркеры, а также среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), как показатель уровня экспрессии маркера.

2.8 Статистическая обработка данных

Для статистической обработки использовали прикладную программу Microsoft Excel.

Вычисляли среднюю арифметическую, среднюю квадратическую ошибку средней арифметической, достоверность различия средних P_t по t -критерию Стьюдента (ТТЕСТ) и достоверность различия дисперсий P_f по f -критерию Фишера (ФТЕСТ).

3. Результаты и их обсуждение

Оценка содержания НК-клеток

Анализ содержания CD3-CD56+ НК-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных до лечения и в ходе лечения показал, что уровень содержания этих клеток в среднем был одинаков во всех исследуемых группах (рисунок 2) и соответствовал норме. Очевидно, что этот показатель не может быть использован в качестве критерия состояния противоопухолевого иммунитета у онкологических больных до и после специфической терапии.

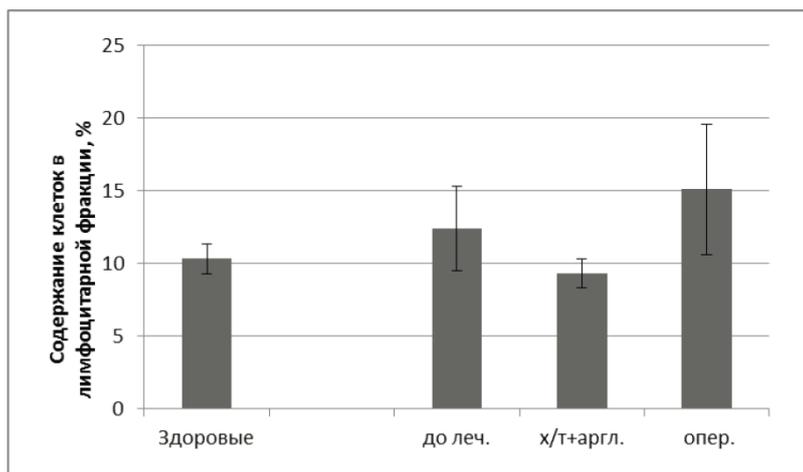


Рисунок 2 – Содержание CD3-CD56+ НК-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

Оценка цитолитической активности НК-клеток

Золотым стандартом для оценки активности НК-клеток человека является тест на цитолитическое повреждение эритролейкемических клеток человека линии K-562 в усло-

виях совместного культивирования *ex vivo*. Проведенные исследования показали, что цитолитическая активность НК-клеток больных людей по отношению к клеткам K-562 не отличалась от таковой у здоровых доноров и не изменялась в динамике лечения (рисунок 3).

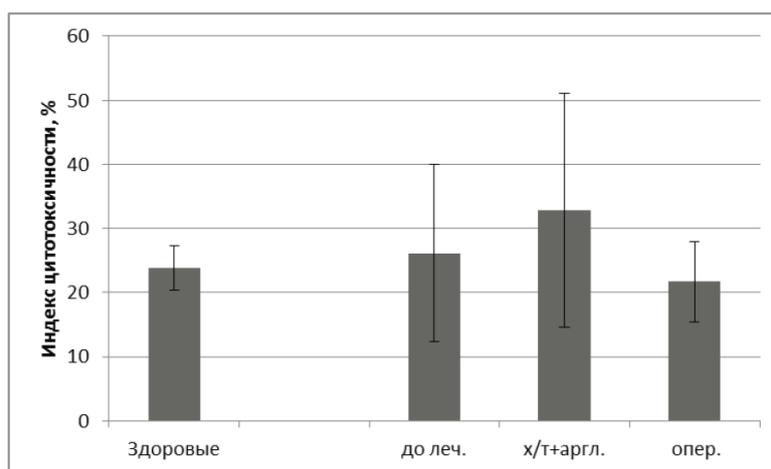


Рисунок 3 – Цитолитическая активность NK-клеток в отношении эритролейкемической клеточной линии K-562 у больных в сравнении со здоровыми донорами.

Оценка уровня NK-клеток, экспрессирующих молекулу адгезии CD62L

Имунофенотипический анализ мононуклеарных клеток периферической крови показал, что CD3-CD56+ CD62L+ популяция NK-клеток у здоровых женщин составляла

3,6±0,8% от общего количества лимфоцитов в циркуляции. У больных раком молочной железы до начала терапии этот показатель статистически значимо не отличался от показателя здоровых доноров ($P_t=0,391$) и составлял 2,8±0,5% (рисунок 4).

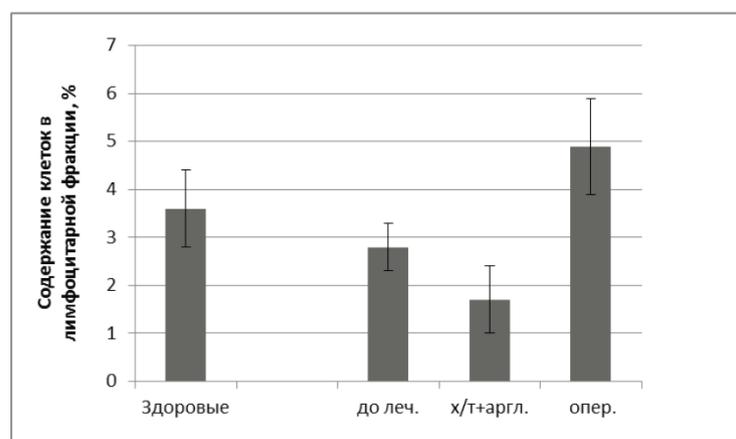


Рисунок 4 – Содержание CD3-CD56+CD62L+ NK-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения.

После химиотерапии с использованием эпоксигва-янолида (1) наблюдалось некоторое снижение (статистически незначимое) среднего значения содержания в крови этих клеток (1,7±0,7%, $P_t=0,088$), однако после хирургической операции произошло повышение ($P_t=0,040$) его уровня до нормы (4,9±1,0%, $P_t=0,372$).

Аналогичная картина наблюдалась при анализе экспрессии молекулы CD62L на поверхности NK-клеток (рисунок 5), о которой судили по средней интенсивности флуоресценции клеток, меченных антителами к CD62L.

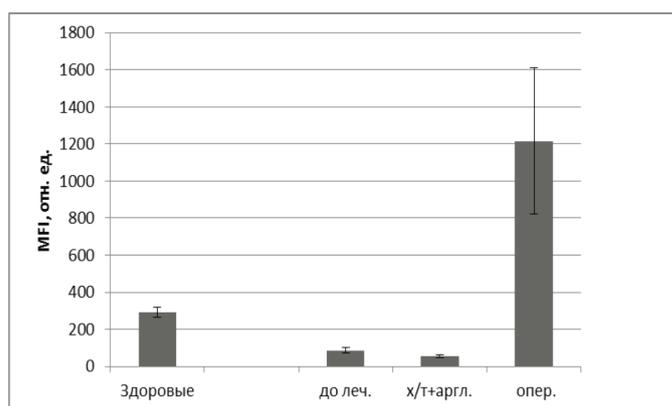


Рисунок 5 – Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) NK-клеток, несущих молекулу адгезии и хоуминга CD62L, в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

Невысокий показатель MFI для CD62L+ NK-клеток здоровых доноров (294 ± 27 отн.ед.) свидетельствовал о низкой экспрессии этого маркера в норме. У больных до лечения наблюдалась тенденция к снижению его уровня (86 ± 14 отн. ед., $P_t = 0,074$), после четырех курсов химиотерапии с использованием эпоксигваянолида его уровень достоверно был ниже нормы (55 ± 6 отн. ед., $P_t = 0,021$). После хирургической операции это показатель значительно превышал уровень нормы (1216 ± 396 отн.ед., $P_t = 0,011$).

Оценка уровня NK-клеток, экспрессирующих молекулу адгезии CD44

При анализе содержания в крови здоровых доноров CD44+ NK-клеток (рисунок 6) выяснилось, что эта клеточная популяция обширнее, чем популяция CD62L+ NK-клеток ($7,8 \pm 1,0\%$ из $10,3 \pm 1,0\%$). У нелеченных больных практически все NK-клетки были CD44+ ($12,3 \pm 3,0\%$ из $12,4 \pm 2,9\%$), однако статистически значимого различия с нормой не было ($P_t = 0,231$). Химиотерапия снижала уровень этих клеток ниже нормы ($1,3 \pm 0,3\%$, $P_t < 0,001$), а после хирургической операции наблюдалось опять повышение их содержания до нормальных показателей ($14,8 \pm 4,5\%$, $P_t = 0,222$).

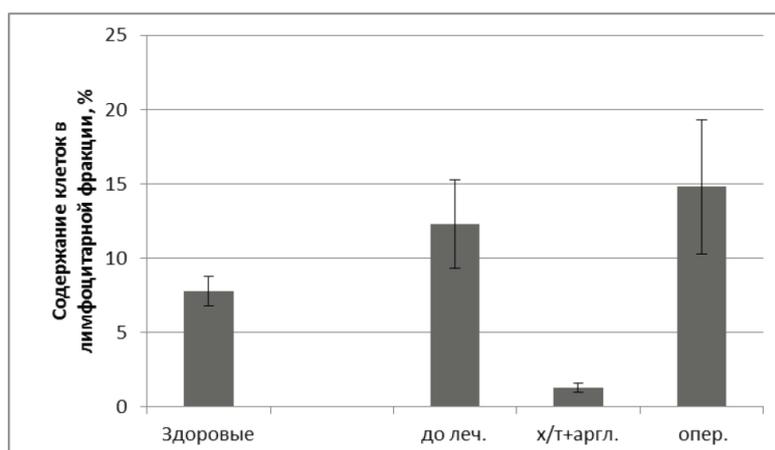


Рисунок 6 – Содержание CD3-CD56+CD44+ NK-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных раком молочной железы в динамике лечения

Общая картина изменений уровня экспрессии маркера CD44 на NK-клетках доноров и больных в ходе лечения похо-

дила на картину изменений содержания CD44+ клеток в популяции NK-клеток (рисунок 7).

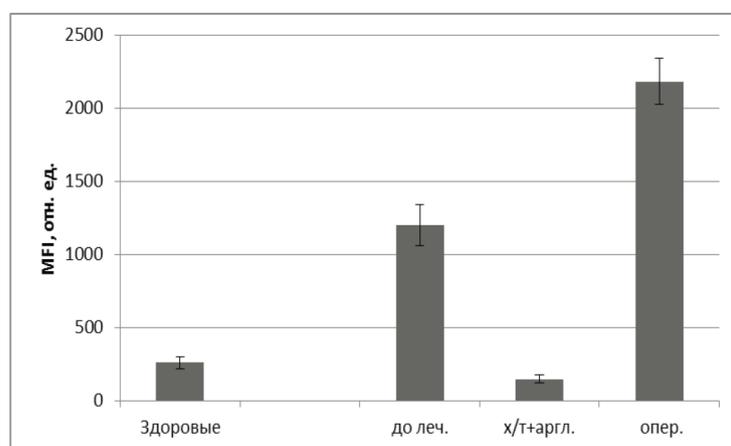


Рисунок 7 – Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) NK-клеток, несущих молекулу адгезии CD44, в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

В целом следует отметить более высокую экспрессию CD44 по сравнению с CD62L, хотя динамика изменения экспрессии обоих маркеров была сходной. Так, у больных MFI был существенно выше (1199 ± 139 отн.ед., $P_f \ll 0,016$), чем у здоровых доноров (258 ± 38 отн.ед.). После химиотерапии MFI снижался ниже уровня нормы (148 ± 28 отн.ед., $P_t = 0,033$), а после хирургической операции значительно повышался (2183 ± 158 отн.ед., $P_t = 0,005$).

Оценка уровня экспрессии молекул адгезии CD62L и CD44 цитотоксическими T-лимфоцитами (CTL) с фенотипом CD8+

CTL определяли как клетки мононуклеарной фракции, выделяемые в лимфоцитарном гейте, несущие на своей поверхности молекулу CD8. Данные проточной цитофлуориметрии CD8+ клеток здоровых доноров и больных раком молочной железы в динамике лечения представлены на рисунке 8.

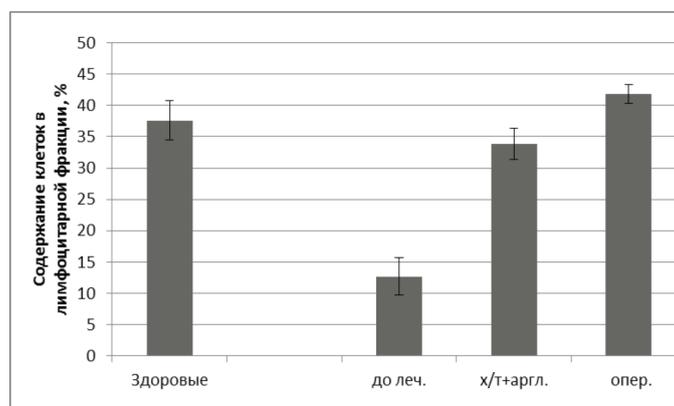


Рисунок 8 – Содержание CD8+ T-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

Как следует из рисунка 7, между здоровыми донорами (37,6 \pm 3,1%) и больными перед началом лечения (12,7 \pm 3,0%) по содержанию CD8+T-клеток наблюдалось существенное отличие в сторону снижения ($P_t < 0,001$). Но показатель нормализовался после химиотерапии

(33,9 \pm 2,5%, $P_t = 0,211$) и сохранялся на этом уровне после хирургического лечения (41,8 \pm 1,5%, $P_t = 0,504$).

Аналогичная картина наблюдалась при анализе содержания CD8+ T-клеток, экспрессирующих адгезивные молекулы (рисунках 9, 10).

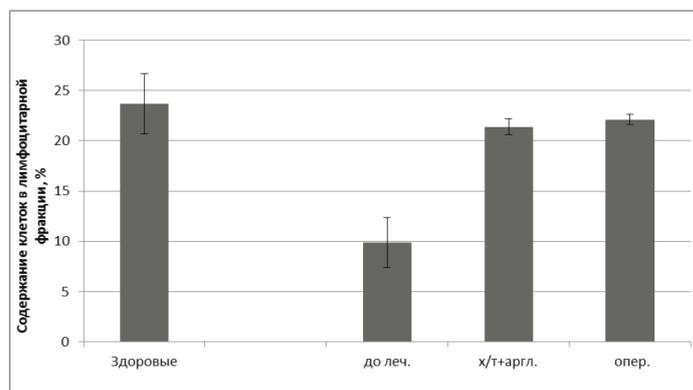


Рисунок 9 – Содержание CD8+CD62L+ T-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

Уровень как CD62L+, так и CD44+ CD8+T-клеток был достоверно более низким у больных до начала лечения (CD62L – 9,9 \pm 2,5%, $P = 0,005$, CD44 – 12,0 \pm 3,2%, $P < 0,001$) по сравнению со здоровыми донорами и возвращался к нормаль-

ным значениям после химиотерапии (CD62L – 21,4 \pm 0,8%, $P = 0,495$ и CD44 – 32,7 \pm 2,5%, $P = 0,241$) и хирургической операции (CD62L – 22,1 \pm 0,5%, $P = 0,627$ и CD44 – 41,7 \pm 1,4%, $P = 0,264$).

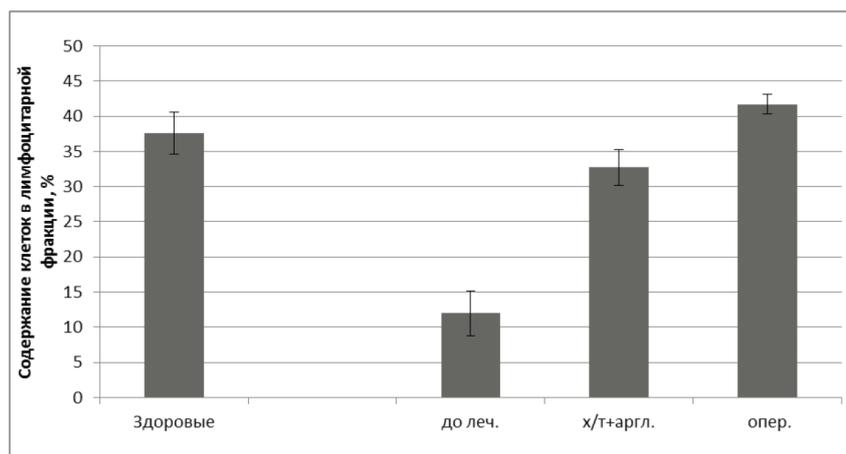


Рисунок 10 – Содержание CD8+CD44+ T-клеток в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

Оценка степени экспрессии молекул клеток показала следующую картину (рисунках 11, 12).

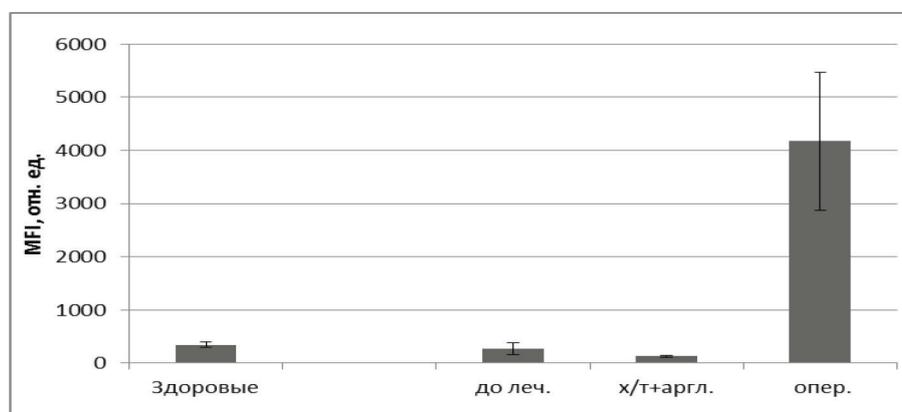


Рисунок 11 – Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD8+ Т-клеток, несущих молекулу адгезии CD62L, в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

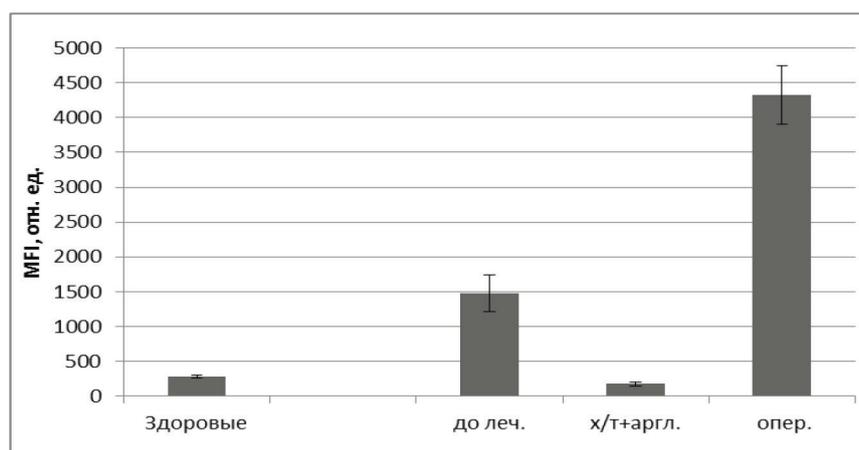


Рисунок 12 – Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CD8+ Т-клеток, несущих молекулу адгезии CD44, в периферической крови здоровых доноров и больных в динамике лечения

Экспрессия CD62L на поверхности CD8+ Т-клеток у больных людей не отличалась от таковой у здоровых доноров. После курсов химиотерапии наблюдалось ее достоверное снижение ($P=0,002$), а после операции – 12-кратное повышение ($P=0,014$). Похожая ситуация наблюдалась при оценке экспрессии CD44-маркера, за исключением того, что у не леченных больных она превышала нормальные значения в 5 раз ($P=0,033$). Химиотерапия, как и в случае с CD62L, приводила к достоверному небольшому снижению экспрессии CD44 по сравнению с нормой ($P=0,017$), а хирургическая операция

опять повышала ее в 15 раз по отношению к норме ($p=0,011$).

Таким образом, для нормального функционирования NK-клеток важен именно определенный уровень соотношения экспрессии двух адгезивных молекул CD44/CD62L. При раке молочной железы это соотношение существенным образом сдвигается в сторону увеличения за счет одновременного снижения экспрессии CD62L и увеличения экспрессии CD44 на поверхности циркулирующих NK-клеток. Нормализация этого соотношения, очевидно, наступает после полного удаления из ор-

ганизма опухолевых клеток, индуцирующих его повышение в ходе развития болезни.

Что касается цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, составляющих важнейшую часть адаптивного противоопухолевого иммунитета, то мы обнаружили снижение в их общем содержании в крови у больных раком молочной железы. Одновременно падал % содержания CD44+ и CD62L+ фракций в общем пуле лимфоцитов. Эти показатели нормализовались уже после химиотерапии и не изменялись после проведения хирургической операции.

Заключение

Проведенные нами исследования по растительному иммуномодулятору 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олид (1) свидетельствуют о важной роли иммуносупрессии в нарушениях элиминации опухолевых клеток, развитии стадии промоции и метастазирования при раке. И как следствие высокоперспективной является, разработка препаратов, механизм действия которых, направлен на коррекцию иммунной системы.

Эпоксигваянолид (1), обладает низкой общей токсичностью вследствие быстрой инактивации в организме, что позволяет предположить отсутствие его супрессорного эффекта на NK-клетки.

Установлена динамика изменения соотношения клеток CD8+CD44+/CD8+CD62L+, содержащихся в периферической крови.

Уровень иммунофенотипических клеток отражает состояние иммунной системы в зависимости от проводимого лечения. Химиотерапия снижала количество CD3-CD56+ CD62L+ популяция NK-клеток ниже нормы ($1,3 \pm 0,3\%$, $P_t < 0,001$) и как следствие, нарушала противоопухолевый ответ организма.

Однако, соотношение экспрессий маркеров CD44/CD62L на цитотоксических Т-лимфоцитах

было полностью идентичным с соотношением указанных маркеров на NK-клетках.

Так, наблюдалось значительное повышение (в 6 раз) соотношение цитотоксических Т-лимфоцитах к NK-клеткам у больных до начала терапии и последующее снижение до уровня нормы (у здоровых доноров) при применении эпоксигваянолида (1).

Таким образом, 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олид оказывает выраженное иммуномодулирующее действие, проявляющееся в повышении числа Т-лимфоцитов.

Анализ литературных данных и результаты проведенных нами экспериментов по изучению влияния 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олида (1) на иммунную систему онкопациентов, позволяют сделать вывод о необходимости разработки препаратов, способных оказывать влияние на иммунную систему и усиливать противоопухолевый иммунитет. Результаты иммуноцитологических исследований 1(10) β -эпокси-5,7 α ,6 β (H)-гвай-3(4),11(13)-диен-6,12-олида (1), свидетельствуют о потенциальной возможности разработки на его основе нового препарата с выраженным цитостатическим действием, корректирующий иммунную систему.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Финансирование предоставлено Министерством образования и науки Республики Казахстан в рамках подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований», по теме ИРН АР13067996 «Разработка растительного иммуномодулятора для профилактики вирусных инфекций», договор №125-КМУЗ от 20 мая 2022 года.

Литература

1. Steurer-Stey C., Bachmann L. M., Steurer J. Oral purified bacterial extracts in chronic bronchitis and COPD: systematic review // *Chest.* - 2004. - V. 126. - P. 1645-55.
2. Lee H. W., Lee J. I., Um S. H., Ahn S. H., Chang H. Y., Park Y. K., Hong S. P., Moon Y. M., Han K. H. Combination therapy of thymosin alpha-1 and lamivudine for HBeAg positive chronic hepatitis B: A prospective randomized, comparative pilot study // *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* - 2008, V. 23. - P. 729-735.
3. Shi L. Isolation, purification, and immunomodulatory activity in vitro of three polysaccharides from roots of *Cudrania tricuspidata* // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* - 2011. - Vol. 43, Is. 5. - P. 418-424.
4. Adekenov S.M. Chemical modification of arglabin and biological activity of its new derivatives // *Fitoterapia.* - 2016. - V.110. - P. 196-205.

5. Оковитый С.В. Клиническая фармакология иммуностимуляторов.-Санкт-Петербург: ФАРМиндекс, – 2002.- Вып.4. – С.104-150.
6. Барсуков В.Ю., Плохов В.Н., Чеснокова Н.П. Рак молочной железы: патофизиологические и клинические аспекты. – Саратов, 2007. – С. 268.
7. Канцерогенез: патофизиологические и клинические аспекты / под общ. ред. В.М. Попкова, Н.П. Чесноковой, В.Ю. Барсукова. – Саратов: Изд-во: СГМУ, 2011. – 600 с.
8. Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., Селезнева Т.Д., Злобнова О.А. Сравнительная оценка состояния иммунологических механизмов защиты при солитарном и синхронном билатеральном раке молочной железы // Успехи современного естествознания. – 2010. – №10. – С. 58-64.
9. Барсуков В.Ю., Плохов В.Н., Чеснокова Н.П. Закономерности паранеопластических расстройств при отечно-ин-фильтративной форме рака молочной железы // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – №1. – С. 13-18.
10. Злобнова О.А. Характеристика показателей красной и белой крови у больных раком молочной железы под влиянием комплексной цитостатической терапии // Материалы 71-й межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием: тезисы. – Саратов, 2010. – С. 44.
11. Henderson I.C., Berry D.A., Demetri G.D., et al: Improved outcomes from add-ing sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer// J. Clin. Oncol.-2003.-Vol. 21.-№6.- P. 967-83.
12. Moujir, L., Callies, O., Sousa, P. M. C., Sharopov, F., & Seca, A. M. L. Applications of Sesquiterpene Lactones: A Review of Some Potential Success Cases. Applied Sciences, 2020, 10(9), 3001. doi:10.3390/app10093001.
13. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. – 2000. – № 5. – С. 4 – 7.
14. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. – 1997. – № 5. – С. 7 – 14.
15. Ivanescu B., Miron A., and Corciova A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis // Journal of Analytical Methods in Chemistry 2015.- <https://doi.org/10.1155/2015/247685>.
16. Siedle B., Garcia-Pineres A. J., Murillo R. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- κ B // Journal of Medicinal Chemistry.-2004.- Vol. 47, № 24, P.6042–6054.
17. Rimpelová S., Jurášek M., Peterková L., Bejček J., Spiwok V., Majdl M., Jirásko M., Buděšinský M., Harmatha J., Kmoníčková E., Drašar P. and Ruml T. Archangelolide: A sesquiterpene lactone with immunobiological potential from *Laserpitium archangelica* // *Beilstein J. Org. Chem.* 2019, 15, 1933–1944. doi:10.3762/bjoc.15.189.
18. Schepetkin I. A., Ōzek G., Ōzek T., Kirpotina L. N., Khlebnikov A.I. and Quinn M.T. Chemical Composition and Immunomodulatory Activity of *Hypericum perforatum* Essential Oils // Biomolecules 2020, 10, 916; doi:10.3390/biom10060916.
19. Schepetkin I. A., Ōzek G., Ōzek T., Kirpotina L.N., Khlebnikov A.I. and Quinn M.T. Chemical Composition and Immunomodulatory Activity of Essential Oils from *Rhododendron albiflorum*. Molecules 2021, 26, 3652. <https://doi.org/10.3390/molecules26123652>.
20. Mozaffari F. Lindemalm C., Choudhury A., Granstam-Bjorneklett H., Helander I. NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy// British Journal of Cancer.-2007.-Vol.97.-P. 105-111.
21. Orange S.J., Balias K.Z. Natural killer cells in human health and disease// Clinical Immunology.-2006.- Vol.118.-P. 1-10.
22. Jia Q.-Q., Wang J.-C., Long J. Sesquiterpene lactones and their derivatives inhibit high glucose-induced NF- κ B activation and MCP-1 and TGF- β 1 expression in rat mesangial cells //Molecules,-2013.- Vol. 18,№ 10, P. 13061–13077.
23. Mammesier E., Aude S., Olive D Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity// The Journal of clinical investigation.-2011.-Vol.. 121, P.3609- 3622.
24. Sülsen V.P., Martino V.S. Sesquiterpene Lactones, Advances in their Chemistry and Biological Aspects – 2018. – 371 p.
25. Lone S.H., Bhat K.A., & Khuroo M.A. Arglabin: From isolation to antitumor evaluation // Chemico-Biological Interactions – 2015, 240, 180–198. doi:10.1016/j.cbi.2015.08.015.
26. Abderrazak A., El Hadri K., Bosc E., Blondeau B., Slimane M.-N., Buchele, B., Rouis M. Inhibition of the Inflammasome NLRP3 by Arglabin Attenuates Inflammation, Protects Pancreatic – Cells from Apoptosis, and Prevents Type 2 Diabetes Mellitus Development in ApoE2Ki Mice on a Chronic High-Fat Diet // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2016, 357(3), 487–494. doi:10.1124/jpet.116.232934.
27. Сирота В.Б. Окислительный метаболизм в крови при раке молочной железы. – Караганда, 2002. – 112 с.
28. Freshney R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique, Fifth Edition, Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey. – 2005, 642 p.

References

1. Steurer-Stey C., Bachmann L. M., Steurer J. Oral purified bacterial extracts in chronic bronchitis and COPD: systematic review // Chest.- 2004.- V. 126.- P. 1645-55.
2. Lee H. W., Lee J. I., Um S. H., Ahn S. H., Chang H. Y., Park Y. K., Hong S. P., Moon Y. M., Han K. H. Combination therapy of thymosin alpha-1 and lamivudine for HBsAg positive chronic hepatitis B: A prospective randomized, comparative pilot study // Journal of Gastroenterology and Hepatology.- 2008, V. 23.- P. 729-735.

3. Shi L. Isolation, purification, and immunomodulatory activity in vitro of three polysaccharides from roots of *Cudrania tricuspidata* // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*.-2011.- Vol. 43, Is. 5. – P. 418-424.
4. Adekenov S.M. Chemical modification of arglabin and biological activity of its new derivatives // *Fitoterapia*. – 2016. – V.110. – 196-205 p.
5. Оковитый С.В. Клиническая фармакология иммуностимуляторов.-Санкт-Петербург: ФАРМиндекс, – 2002.- Вып.4. – С.104-150.
6. Barsukov V.Yu., Plokhov V.N., Chesnokova N.P. Breast cancer: pathophysiological and clinical aspects. – Saratov, 2007. – 268 p.
7. Carcinogenesis: pathophysiological and clinical aspects / ed. V.M. Popkova, N.P. Chesnokova, V.Yu. Barsukov. – Saratov: Publishing House: SGMU, 2011. – 600 p.
8. Chesnokova N.P., Barsukov V.Yu., Selezneva T.D., Zlobnova O.A. Comparative assessment of the state of immunological defense mechanisms in solitary and synchronous bilateral breast cancer // *Successes of modern natural science*. – 2010. – No. 10. – 58-64 p.
9. Barsukov V.Yu., Plokhov V.N., Chesnokova N.P. Patterns of paraneoplastic disorders in edematous-infiltrative form of breast cancer // *Modern problems of science and education*. – 2008. – No. 1. – 13-18 p.
10. Zlobnova O.A. Characteristics of indicators of red and white blood in patients with breast cancer under the influence of complex cytostatic therapy // *Proceedings of the 71st interregional scientific and practical conference of students and young scientists with international participation: theses*. – Saratov, 2010. – 44 p.
11. Henderson I.C., Berry D.A., Demetri G.D., et al: Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer// *J. Clin. Oncol.*-2003.-Vol. 21.-№6.- 967-83 p.
12. Moujir, L., Callies, O., Sousa, P. M. C., Sharopov, F., & Seca, A. M. L. Applications of Sesquiterpene Lactones: A Review of Some Potential Success Cases. *Applied Sciences*, 2020, 10(9), 3001. doi:10.3390/app10093001.
13. Khaitov R.M., Pinegin B.V. Modern immunomodulators: basic principles of their application // *Immunology*. – 2000. – No. 5. – 4 – 7 p.
14. Yarilin A.A. The system of cytokines and the principles of its functioning in normal and pathological conditions // *Immunology*. – 1997. – No. 5. – 7 – 14 p.
15. Ivanescu B., Miron A., and Corciova A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis // *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2015.- <https://doi.org/10.1155/2015/247685>.
16. Siedle B., Garcia-Pineres A. J., Murillo R. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- κ B // *Journal of Medicinal Chemistry*.-2004.- Vol. 47, № 24, P.6042–6054.
17. Rimpelová S., Jurášek M., Peterková L., Bejček J., Spiwok V., Majdl M., Jirásko M., Buděšínský M., Harmatha J., Kmoníčková E., Drašar P. and Ruml T. Archangelolide: A sesquiterpene lactone with immunobiological potential from *Laserpitium archangelica* // *Beilstein J. Org. Chem.* 2019, 15, 1933–1944. doi:10.3762/bjoc.15.189.
18. Schepetkin I. A., Özek G., Özek T., Kirpotina L. N., Khlebnikov A.I. and Quinn M.T. Chemical Composition and Immunomodulatory Activity of *Hypericum perforatum* Essential Oils // *Biomolecules* 2020, 10, 916; doi:10.3390/biom10060916.
19. Schepetkin I. A., Özek G., Özek T., Kirpotina L.N., Khlebnikov A.I. and Quinn M.T. Chemical Composition and Immunomodulatory Activity of Essential Oils from *Rhododendron albiflorum*. *Molecules* 2021, 26, 3652. <https://doi.org/10.3390/molecules26123652>.
20. Mozaffari F. Lindemalm C., Choudhury A., Granstam-Bjorneklett H., Helander I. NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy// *British Journal of Cancer*.-2007.-Vol.97.-P. 105-111.
21. Orange S.J., Balias K.Z. Natural killer cells in human health and disease// *Clinical Immunology*.-2006.- Vol.118.-P. 1-10.
22. Jia Q.-Q., Wang J.-C, Long J. Sesquiterpene lactones and their derivatives inhibit high glucose-induced NF- κ B activation and MCP-1 and TGF- β 1 expression in rat mesangial cells // *Molecules*.-2013.- Vol. 18,№ 10, P. 13061–13077.
23. Mammesier E., Aude S., Olive D Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity// *The Journal of clinical investigation*.-2011.-Vol.. 121, P.3609- 3622.
24. Sülsen V.P., Martino V.S. Sesquiterpene Lactones, Advances in their Chemistry and Biological Aspectsч – 2018. – 371 p.
25. Lone S.H., Bhat K.A., & Khuroo M.A. Arglabin: From isolation to antitumor evaluation // *Chemico-Biological Interactions* – 2015, 240, 180–198. doi:10.1016/j.cbi.2015.08.015.
26. Abderrazak A., El Hadri K., Bosc E., Blondeau B., Slimane M.-N., Buchele, B., Rouis M. Inhibition of the Inflammasome NLRP3 by Argabin Attenuates Inflammation, Protects Pancreatic – Cells from Apoptosis, and Prevents Type 2 Diabetes Mellitus Development in ApoE2Ki Mice on a Chronic High-Fat Diet // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2016, 357(3), 487–494. doi:10.1124/jpet.116.232934.
27. Sirota V.B. Oxidative metabolism in the blood in breast cancer. – Karaganda, 2002. – 112 p.
28. Freshney R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique, Fifth Edition, Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey. – 2005, 642 p.