

МОСАЛЕВ КИРИЛЛ ИГОРЕВИЧ

**КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО
ДЕЙСТВИЯ КОНЬЮГАТА БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ С 9-(4-МЕТИЛПИПЕРАЗИН-
1-ИЛМЕТИЛ)-2-(4-МЕТИЛЕН-1,2,3-ТРИАЗОЛ-1-ИЛ) ОРЕОЗЕЛОНОМ**

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ).

Научный руководитель: кандидат биологических наук Иванов Игорь Диадорович.

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН Вавилин Валентин Андреевич.

Официальные оппоненты:

Сорокина Ирина Васильевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований ФБГУН Новосибирского института органической химии им. Н.Н.Ворожцова СО РАН.

Чересиз Сергей Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории молекулярной патологии, доцент кафедры фундаментальной медицины ИММТ ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет».

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», г. Москва.

Защита состоится _____ 2026г в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.02 при федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, 630060.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ ФТМ и на сайте <https://frcftm.ru/>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Русских Г.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Компоненты растительного сырья подвергаются в настоящее время интенсивным исследованиям в рамках различных научных дисциплин [Imtiaz I., 2024; Yang S., 2013]. Изучение иммуноактивных средств растительного происхождения остаётся одной из важных задач в современной фармакологии, ввиду достаточно большой распространённости воспалительных заболеваний различного генеза [Pahwa R., 2025]. Бетулоновая кислота (БК) известна благодаря своим противовоспалительным [Ci X., 2017], противоопухолевым [Pyo J. S., 2009] и антибиотическим [Oloyede H. O., 2017] свойствам. Фурукумарины (ФК) проявляют фотосенсибилизирующую активность и применяются для лечения аутоиммунных и гиперпролиферативных заболеваний кожи [De Morais M. C., 2018]. Поэтому представляется логичным анализ влияния их конъюгатов на иммунную систему. Одним из таких веществ является соединение БК с 9-(4-метилпиперазин-1-илметил)-2-(4-метилен-1,2,3-триазол-1-ил) ореозелоном (в предыдущих публикациях упоминается как «Соед», далее по тексту – БК-ФК) [Мосалев К. И., 2023]. БК-ФК было выбрано ввиду того, что на модели гистамин-индуцированного воспаления лапы у крыс оно не оказывало классического противовоспалительного эффекта, присущего терпеноид-кумариновым гибридам [Липеева, А.В., 2020]. Это наблюдение, предположительно, указывает на наличие иммуномодулирующего действия у данного вещества.

Изучая действие подобных веществ, важно иметь представление об изменениях, протекающих на молекулярном и клеточном уровнях в очаге воспаления. Одними из главных регуляторов воспалительного процесса являются цитокины – белки, координирующие деятельность иммунной системы. Большой интерес представляют цитокины, регулирующие процесс воспаления: IL-12, IL-10, IL-6, IL-4, IL-1 β и TNF- α . Многие цитокины не только регулируют защитные реакции организма на внедрение патогенов, но и поддерживают гомеостаз. Например, колониестимулирующие факторы – стимуляторы пролиферации и дифференцировки предшественников клеток периферической крови, такие как GM-CSF и G-CSF, а также TGF- β [Кетлинский С. А., 2008]. Помимо цитокинов важная роль в инициации иммунной реакции принадлежит ядерному фактору kB (NF-kB), состоящему из двух субъединиц – p65 и p50, образующих гетеродимер. В неактивном состоянии он находится в цитоплазме в комплексе с ингибитором kB. При воздействии определённых сигналов, например, при связывании Toll-like рецепторов с компонентами потенциальных патогенов, комплекс NF-kB-ингибитор распадается и NF-kB мигрирует в ядро, запуская экспрессию генов, вовлечённых в процессы воспаления и антителообразования [Cogswell J.P., 1994].

Важным в изучении новых потенциально лекарственных соединений является оценка их влияния на печень как основного ксенобиотик-метаболизирующего органа. Известно, что в реакциях биотрансформации значительную долю составляют цитохром Р450-зависимые реакции. В этих процессах участвуют также ферменты конъюгации, или ферменты 2 фазы – глутатионтрансферазы, N-ацетилтрансферазы и др. Важно также, что некоторые ксенобиотики при попадании в организм могут увеличивать или, наоборот, снижать активность ферментов, осуществляющих их метаболизм. Результирующая соотношения активностей цитохром Р450-зависимых реакций и реакций конъюгации формирует выраженность токсических повреждений. Все эти процессы в отношении БК и ФК до настоящего времени недостаточно изучены. 75% лекарств метаболизируются, главным образом, цитохромами Р450, причем лишь 5 изоформ цитохрома Р450: 1А2, 2С9, 2С19, 2Д6, и 3А4 осуществляют 90% этих реакций. Из них наибольший вклад, достигающий 46%, вносят цитохромы подсемейства Р450 3А [Rendic S., 2015]. Этот факт позволяет значительно сузить фронт экспериментальных работ без значительной потери полноты информации.

Анализ *in silico* позволяет существенно дополнить перечень вероятных мишеней изучаемой субстанции. Данный подход также был использован в настоящей работе. Поэтому работа посвящена экспериментальному изучению иммуотропных, гепатотропных свойств БК-ФК с учётом роли системы метаболизма ксенобиотиков.

Степень разработанности темы диссертации

За последние 5 лет работ, посвящённых исследованию биологической активности производных БК, было опубликовано значительно меньше, чем исследований, направленных на изучение свойств соединений бетулиновой кислоты (923 против 4231 публикации на сайте.ncbi.gov). В настоящее время целью подобных работ в основном является исследование эффекта БК, замещённой в положениях С-3 (например, 1-, 2-, 3-триазольные производные), С-20 и С-28 [Cai S., 2025], а предметом поиска чаще всего является противоопухолевая и антибактериальная активность [Tsepaeva O. V., 2020]. Во множестве подобных работ методологическая часть представлена главным образом работами с клеточными линиями, а число публикаций, содержащих результаты вивальных экспериментов, крайне невелико.

Цель исследования:

Изучить иммуномодулирующие, противовоспалительные, гепатотоксические свойства конъюгата БК-ФК и его влияние на систему детоксикации в условиях циклофосфамид (ЦФ)-индуцированной иммуносупрессии.

Задачи исследования:

1. Исследовать *in vitro* цитотоксичность конъюгата БК-ФК и его влияние на экспрессию генов цитокинов на культуре клеток линии U-937.

2. Изучить *in vivo* влияние конъюгата БК-ФК на экспрессию генов, ассоциированных с иммунным ответом, в перитонеальных клетках, костном мозге и печени мышей в условиях ЦФ-индуцированной иммуносупрессии.
3. Изучить влияние БК-ФК на лимфоцитарное звено иммунной системы в гистологических препаратах тимуса и селезёнки, а также провести типирование фракций Т-лимфоцитов в крови мышей с индуцированной иммуносупрессией.
4. Провести анализ экспрессии ряда генов 1 и 2 фазы биотрансформации ксенобиотиков (*Cyp*, *Gstp1* и *Nat1*) и сопоставить с содержанием белков глутатион-S-трансферазы-π (Gst-π) и N-ацетилтрансферазы-1 (NAT-1) в печени, оценить гистологические и биохимические признаки гепатотоксичности БК-ФК и ЦФ.
5. Выполнить поиск молекулярных мишеней конъюгата БК-ФК методом докинга в активные центры микросомальных ферментов и лиганд-активируемых ксенорецепторов.

Научная новизна

Новизна данной работы обусловлена практически полным отсутствием в мировой научной литературе работ, посвящённых исследованиям ковалентного соединения БК и ФК. Впервые показано, что изучаемая субстанция способствует увеличению жизнеспособности моноцитоподобных клеток U-937 и влияет на экспрессию ими генов *IL12A* и *IL10*. Обнаружено влияние субстанции на экспрессию генов цитокинов на животной модели. Установлено, что исследуемый конъюгат повышает относительное содержание Т-лимфоцитов в крови животных, которые были подвержены иммуносупрессии. Проведена оценка уровней экспрессии генов и белков, участвующих в метаболизме лекарств, в печени животных, обработанных данной субстанцией. В результате докинг-анализа обнаружены несколько потенциальных мишеней БК-ФК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведённое исследование выявило иммунотропный эффект у представителя нового класса потенциальных ЛС – ковалентных соединений БК и ФК. Результаты данной работы позволяют рассматривать БК-ФК в качестве иммуномодулирующего средства, проявляющего вначале элементы противовоспалительного (в виде снижения экспрессии гена *Rela* в костном мозге), а затем – иммуностимулирующего эффектов (снижение в костном мозге экспрессии гена, кодирующего ингибитор NF-κB и усиление экспрессии гена *Rela* к 6-ому дню) на модели *in vivo*. Повышение содержания Т-хелперов и Т-киллеров у животных с иммуносупрессией говорит о стимулирующем влиянии данного вещества на лимфоцитарный росток кроветворения.

Помимо изучения иммунотропного действия, в данной работе выявлен потенциальный путь метаболизма данного вещества. Обнаружена связь между введением исследуемой

субстанции и усилением экспрессии генов *Cyp3a11* и *Cyp2b10* в печени мышей. Продукт последнего гена является активатором ЦФ. Это может свидетельствовать о влиянии БК-ФК на фармакокинетику ЦФ, что может быть перспективно в плане улучшения баланса его терапевтического и побочного эффектов.

Положения, выносимые на защиту

1. БК-ФК повышает выживаемость иммунных клеток U-937, угнетая апоптоз и снижая вероятность некроза, а также способствует усилению экспрессии ими *IL12A*.

2. БК-ФК обладает иммуномодулирующим действием *in vivo*. В костном мозге животных под его влиянием первоначально снижается, а затем повышается экспрессия *Rela*, (в среднем в 2 раза), кратно возрастает экспрессия генов цитокинов *Csf2*, *Il4*, *Il6*, *Il10*. У животных с иммуносупрессией после воздействия БК-ФК в крови повышается относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов (в 3,8 и 2,9 раз соответственно), а в перитонеальных клетках повышается экспрессия гена, кодирующего IL-12a.

3. БК-ФК повышает в печени содержание мРНК генов цитохромов P450 2B10 и 3A11, принимающих участие в метаболизме лекарств и самого БК-ФК. Вещество обладает выраженным сродством к конститутивному андростановому рецептору (CAR) и прегнановому X-рецептору (PXR), контролирующим экспрессию этих генов.

4. БК-ФК не обладает значимой гепатотоксичностью на отрезках времени и в интервале доз, при которых наблюдаются его иммуностропные эффекты и эффекты в отношении генов, кодирующих ферменты метаболизма лекарств.

5. Исследуемая субстанция влияет не только на системный, но и на органнй иммунитет, что находит отражение в повышении экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Tnf*) и усилении выработки р65-субъединицы NF-κB в печени.

Степень достоверности

Работа выполнена с соблюдением требований к валидации методов культивирования и паспортизации культур клеток. Эксперимент на клеточной линии U-937 проводился в соответствии с ГОСТ ИСО 20391 «Биотехнология. Подсчёт клеток». Дизайн исследования соответствовал типовым экспериментальным работам с участием лабораторных животных. В ходе анализа литературы была выбрана оптимальная численность групп экспериментальных животных – по 5-6 особей в каждой группе. В ходе выполнения работы экспериментаторы придерживались Межгосударственного стандарта ГОСТ 32644-2014 («Метод определения острой пероральной токсичности»). Научные данные корректно обработаны с применением современных методов статистического анализа и использованием ПО Statistica 13.

Апробация работы

Результаты данной работы были доложены на конференциях: «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 22–23 октября 2024 года); V международной научной конференции «Наука будущего» и VIII всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Орел, 20–23 сентября 2023 года); II объединённом научном форуме, VI съезде физиологов СНГ. VI съезде биохимиков России. IX российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи – Дагомыс, 01–06 октября 2019 года).

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов исследования, заключения, выводов, списка использованных сокращений и списка использованного литературного материала. Диссертация содержит 43 рисунка и 25 таблиц. Список литературы включает в себя 161 библиографический источник, в том числе 17 работ на русском и 144 работы на английском языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое соединение

БК-ФК (Рисунок 1) синтезировано в лаборатории медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Для его получения была использована CuAAC-реакция азид-алкин циклоприсоединения в присутствии $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и аскорбата натрия в растворе $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$.

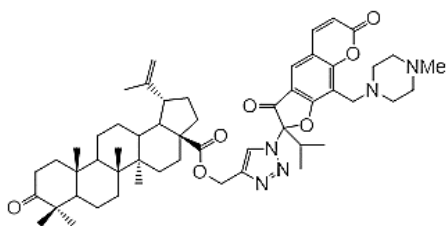


Рисунок 1. Структурная формула БК-ФК.

Клеточные культуры

Исследования проводили на клеточной линии U-937 (лимфома человека, моноцитарно-макрофагальный ряд, ATCC № CRL-1593.2). Суспензионную культуру U-937 выращивали в среде RPMI и вносили форбол-12-миристан-13 ацетат в концентрации 60 нг/мл для дифференцировки клеток. После этого прикрепленные клетки обрабатывали БК-ФК. Выделение РНК производили спустя 2, 6 и 24 часа после обработки. Предварительно

определяли диапазон нетоксичных концентраций для БК-ФК с использованием метода двойного окрашивания флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и пропидий йодидом. К клеткам добавляли БК-ФК, растворённое в DMSO в диапазоне концентраций 1–550 мкМ и инкубировали в течение 48 ч. Съёмку проводили по 4 поля на лунку на приборе INCellAnalyzer 2200 (GE Healthcare, UK). Эффект растворителя учитывали, сравнивая доли живых, некротических и апоптотических клеток в культурах, содержащих БК-ФК и DMSO в качестве растворителя, с культурами, к которым добавлен только DMSO в тех же концентрациях, что и для растворения БК-ФК.

Экспериментальные животные

В качестве объекта исследований использовались самцы лабораторных мышей *Mus musculus* возрастом 3 месяца линии C57BL/6. Животных содержали в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 33216-2014 и “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях”. Публикация материала одобрена комитетом по биомедицинской этике при Федеральном исследовательском центре фундаментальной и трансляционной медицины (протокол №2 на заседании от 10.01.2024).

Модель ЦФ - индуцированной иммуносупрессии

Экспериментальную модель создавали с помощью препарата ЦФ («Эндоксан», Baxter), растворённого в физрастворе. Схема эксперимента отображена в таблицах 1 и 2. Мышей умерщвляли посредством ингаляции двуокиси углерода и проводили перфузию организма раствором PBS для максимального обескровливания исследуемых органов. После этого из них были выделены перитонеальные клетки, фрагменты костного мозга, тимуса, печени и селезёнки.

Таблица 1. Схема проведения одноэтапного эксперимента *in vivo*

Группы	Кол-во особей в группе	1-ый день	2-ой день	6-ой день
Контроль	5	0,9% NaCl+DMSO	-	Выделение образцов печени, селезёнки и тимуса для гистологического исследования, образцов периферической крови для проточной цитометрии, перитонеальных клеток
ЦФ	5	0,9% NaCl+DMSO	ЦФ (200 мг/кг массы тела)	
ЦФ+БК-ФК	5	р-р БК-ФК (30 мг/кг массы тела) в DMSO + 0,9% NaCl внутрибрюшинно	ЦФ (200 мг/кг массы тела)	
БК-ФК	5	р-р БК-ФК (30 мг/кг массы тела) в DMSO + 0,9% NaCl внутрибрюшинно	-	

Таблица 2. Схема проведения двухэтапного эксперимента *in vivo*

Группы	Кол-во особей в группе	1-ый день	2-ой день	3-ий день	6-ой день
Контроль	12	1% крахмал +1% DMSO + H ₂ O (энтерально через зонд)	-	Выведение животных из эксперимента, выделение образцов костного мозга и печени, образцов венозной крови для определения активности АЛТ в сыворотке (6 животных из группы)	Выведение животных из эксперимента, выделение образцов костного мозга и печени (6 животных из группы)
ЦФ	12	1% крахмал +1% DMSO+H ₂ O (энтерально через зонд)	ЦФ (200 мг/кг массы тела) внутрибрюшинно		
ЦФ+БК-ФК	12	p-p БК-ФК (12 мг/кг массы) в 1% DMSO+1% крахмал +H ₂ O (энтерально через зонд)	ЦФ (200 мг/кг массы тела) внутрибрюшинно		
БК-ФК	12	p-p БК-ФК (12 мг/кг массы) в 1% DMSO+1% крахмал +H ₂ O (энтерально через зонд)	-		

ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов с детекцией в реальном времени

Выделение РНК из биологического материала было проведено с использованием «TRI-REAGENT» (MRC). Обратную транскрипцию и последующую ПЦР в реальном времени проводили с использованием наборов реактивов ОТ M-MuLV-RH и БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) («Биолабмикс»). В качестве референсных использовали гены, кодирующие GAPDH и β-актин (или *RPLP0* – для культуры клеток). Для сравнения уровней экспрессии генов в исследуемых образцах использовали метод E^{-ΔCT}. Эффективность ПЦР была рассчитана с помощью программы LinRegPCR.

В культуре иммунных клеток U-937 и суспензии перитонеальных клеток анализировали транскрипционную активность генов, кодирующих IL-12 и IL-10, в костном мозге мышей – генов цитокинов, *Rela* (кодирует p-65 субъединицу NF-κB) и *Nfkbia* (кодирует ингибитор NF-κB). Во фрагментах печени была исследована экспрессия генов цитохромов на 3-ий и 6-ой дни, а также экспрессия генов цитокинов на 6-ой день после энтерального введения БК-ФК. Образцы к-ДНК, полученные в ходе ОТ РНК печени животных, принадлежащие группам «Контроль» и «БК-ФК», были проанализированы с помощью набора RT² Profiler PCR Mouse Drug Metabolism Array (PAMM-002, Qiagen).

Вестерн-блоттинг

Образцы печени гомогенизировали и денатурировали в SDS-содержащем буфере, в лизаты добавляли β-меркаптоэтанол и бромфеноловый синий. Белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле по методике Laemmli и переносили их на нитроцеллюлозную мембрану. Центры неспецифической сорбции блокировали в растворе 5% бычьего сывороточного альбумина. После отмывки трис-буферным раствором, мембрану инкубировали с раствором антител (АТ) против исследуемых мышечных белков: anti-NF-κB p65 (Millipore), anti-GST-π (BD Transduction laboratories) и anti-NAT-1 (BD Transduction laboratories). Содержание исследуемых белков было нормировано на уровни гистона H2b, β-актина и β-

тубулина («Western blot loading control» (ImgenEx)). После отмывки мембрану выдерживали в растворе АТ против IgG мыши (или кролика), конъюгированных с ЩФ в течение 1 часа. Далее мембрану снова отмывали и окрашивали смесью субстратов щелочной фосфатазы. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Image Lab (Bio-Rad).

Гистологическое исследование

Для световой микроскопии препараты тимуса и селезёнки готовили по общепринятой гистологической методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Предварительно тимус взвешивали и определяли «органный индекс» ($(m \text{ тимуса, гр} / m \text{ животного, гр}) \times 100$).

Образцы печени фиксировали в параформальдегиде, затем в растворе тетраоксида осмия, обезвоживали этиловым спиртом и заключали в эпон. Срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиновым синим. Светооптическое исследование проводили на микроскопе «Axio Imager.M2» (CarlZeiss, Германия). Морфометрия была проведена с использованием программы обработки изображений ImageJ. Для электронной микроскопии изготавливали срезы толщиной 70–100 нм на ультратоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия). Цифровые фотографии получали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония).

Проточная цитофлуориметрия образцов периферической крови

Выделение лимфоидных клеток из цельной крови проводилось с помощью раствора фиколл-верографина с использованием ЭТДА натрия в качестве антикоагулянта. Лимфоциты отбирали и отмывали от остатков фиколла. Полученные клетки использовали для иммунофенотипирования Т-лимфоцитов, используя АТ к CD3FITC, CD4PE, CD8APC (BioLegend Inc, США). К образцам клеток крови добавляли моноклональные АТ в растворе 1% альбумина. Анализ окрашенных лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlex S-100 (Beckman Coulter, Inc, США).

Биохимический анализ крови

Активность АЛТ в сыворотках определяли спектрофотометрическим методом с использованием анализатора AU 680 (Beckman coulter USA). Получали средние значения активности АЛТ в сыворотках для каждой группы.

Докинг-исследование

Предикция возможных мишеней для указанного соединения осуществлялась на портале Way2Drug с помощью встроенного сервиса PASS Targets и SMP. Структурные формулы потенциальных мишеней анализируемого соединения были получены из банка данных белков PDB и путем моделирования. Выравнивание аминокислотных последовательностей производилось с помощью BLAST, моделирование структур осуществлялось в программе Alpha Fold. Выявленные потенциальные взаимодействия оценивались на предмет сродства

путем вычисления минимальной энергии связи и её вероятности методом молекулярного докинга.

Статистический анализ

Значения экспрессии генов выражены как среднее \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Данные по относительному содержанию белков и гистологическому исследованию представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей [Q_1-Q_3]. Для статистического анализа использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественное сравнение. Дополнительно проведены множественные сравнения с использованием критерия Краскелла-Уоллеса. Для выявления связи между сравниваемыми показателями вычисляли коэффициент корреляции Пирсона. Значимость различий между исследуемыми группами была определена с использованием пакета программ STATISTICA 13 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффекты БК-ФК на модели культуры иммунных клеток

Наибольшее влияние БК-ФК оказывает на содержание апоптотических клеток в культуре U-937. Оно достоверно снижает процент апоптозов в концентрациях: 550 мкМ, 288 мкМ, 36 мкМ, 18 мкМ ($p = 0,03$). Лишь в одном из 10 разведений (2 мкМ) в культурах клеток, обработанных БК-ФК процент апоптотических клеток несколько выше, чем в контрольной группе. В концентрациях 18 и 36 мкМ вещество способствует некоторому повышению выживаемости клеток (в среднем в 1,1 раза) ($p = 0,03$) (Рисунок 2).

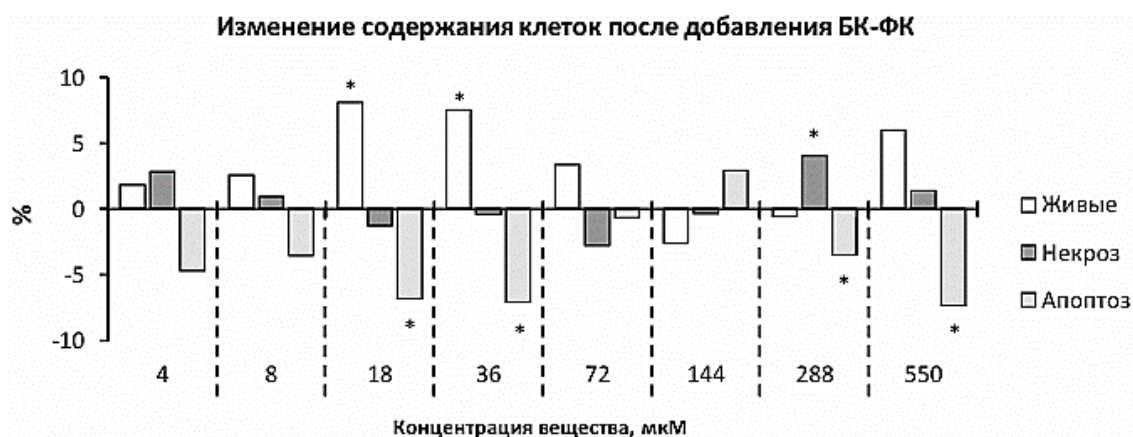


Рисунок 2. Влияние БК-ФК на выживаемость клеток U-937 (n=4).

Вещество вызывало дозо- и времязависимое снижение экспрессии гена противовоспалительного цитокина *IL10* (за 24 часа, «Контроль» / «24 часа» = $1,78 \cdot 10^{-5} / 2,75 \cdot 10^{-6}$) в концентрации 550 мкМ в клеточной среде (Рисунок 3). При этом профиль суточной экспрессии *IL12A* увеличивался в зависимости от концентрации БК-ФК и времени экспозиции, «Контроль» / «24 часа» = $0,106 / 0,223$) (p множ = $0,025$).

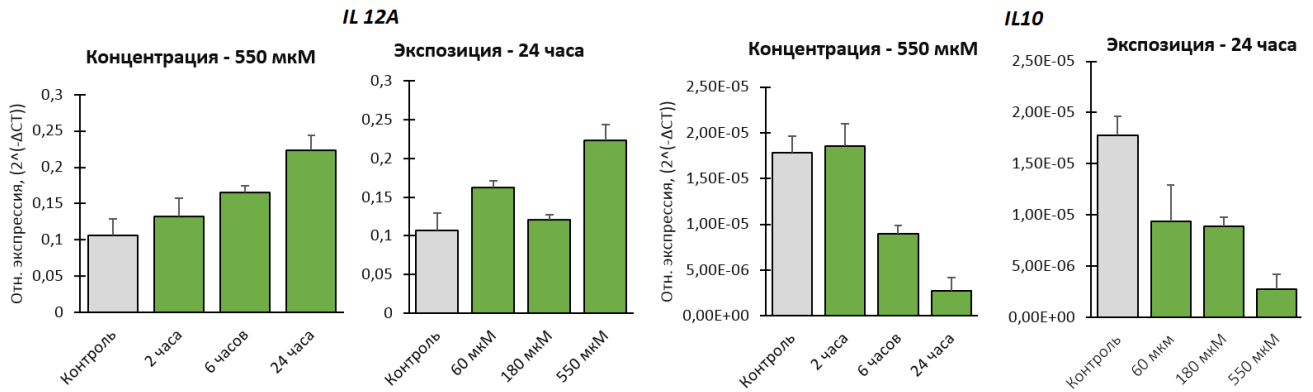


Рисунок 3. Уровни относительной экспрессии генов, кодирующих цитокины (IL-12, IL-10) после обработки культуры клеток U-937 исследуемым БК-ФК (n = 3).

Эффекты БК-ФК на модели ЦФ-индуцированной иммуносупрессии у мышей

После введения в брюшную полость БК-ФК наблюдалось увеличение относительной экспрессии *Il12a* клетками брюшной полости приблизительно в 4 раза по сравнению с контрольной группой (p множ = 0,034, Рисунок 4).

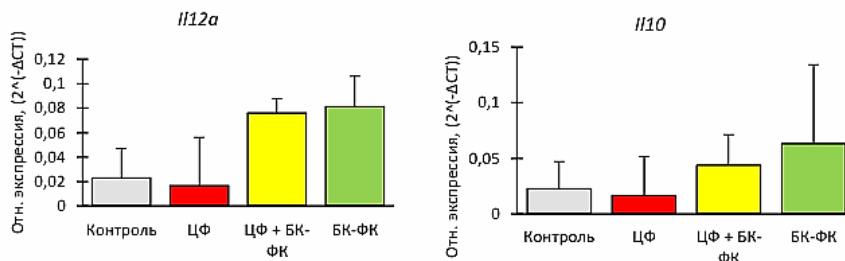


Рисунок 4. Относительная экспрессия генов цитокинов ($E^{-\Delta CT}$) во взвеси перитонеальных клеток мышей C57BL/6 после обработки ЦФ и БК-ФК (n = 5).

ЦФ снижает абсолютное число лейкоцитов крови, действуя главным образом на Т-лимфоцитарный росток кроветворения. БК-ФК способно восстанавливать их относительное содержание. У группы «ЦФ+БК-ФК» содержание Т-лимфоцитов в крови в среднем в 1,6 раз больше, чем у животных из группы «ЦФ». В группе «ЦФ+БК-ФК» содержание CD3+CD4+ клеток («Т-хэлперов») в среднем в 3,8 раз больше, чем в группе «ЦФ». Содержание CD3+CD8+ в той же группе после введения БК-ФК увеличилось в 2,9 раза (p = 0,005) (Рисунок 5).

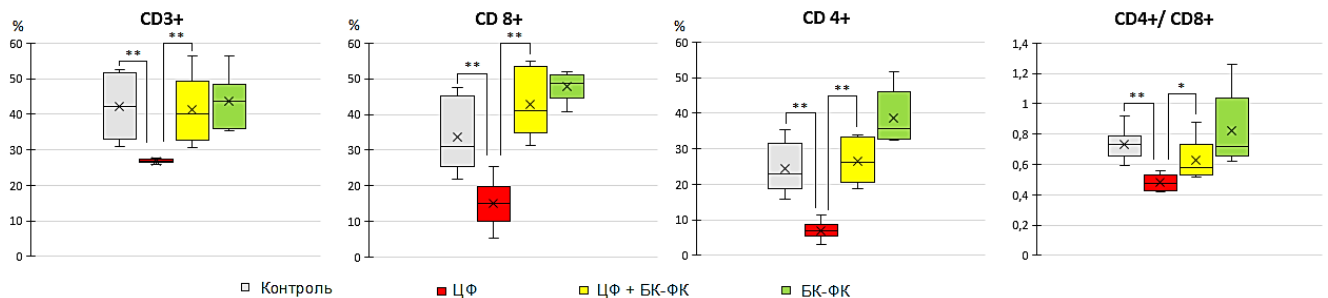


Рисунок 5. Результаты проточной цитометрии образцов крови мышей C57BL/6 (n=5). Представлены значения относительного содержания CD3+, CD3+CD4+ и CD3+CD8+ лимфоцитов в сыворотке (%), а также отношение содержания CD4+/ CD8+ лимфоцитов.

После воздействия ЦФ наблюдали атрофию коры тимуса, снижение плотности расположения клеток как в корковом, так и в мозговом веществе тимуса. ЦФ снижает объёмную плотность коркового вещества тимуса, однако БК-ФК не способствует её восстановлению. Освещённость коркового вещества у группы «ЦФ» была выше (соответственно плотность ткани ниже), чем у группы «Контроль» (1,854 против 1,745). Однако, у группы животных «ЦФ+БК-ФК» наблюдалось достоверное повышение средней интенсивности освещения (уменьшение плотности) коркового и мозгового веществ по сравнению с группой «ЦФ» ($p = 0,011$). В монорегиме БК-ФК практически не влияет на плотность коркового и мозгового вещества тимуса. После введения ЦФ масса тимуса уменьшилась приблизительно в 3 раза по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0006$). Влияния БК-ФК на вес тимуса после инъекции ЦФ не наблюдалось. Введение БК-ФК также не оказывало значимого влияния на массу тимуса у мышей, не обработанных ЦФ.

Введение высоких доз ЦФ приводило к снижению объёмной плотности лимфатических узлов селезёнки в 1,8 раз ($p = 0,012$), их полной или частичной деструкции. Введение БК-ФК вслед за ЦФ не приводило к восстановлению объёмной плотности лимфатических узлов, но границы фолликулов и их структурные элементы в данной группе выглядели значительно чётче (Рисунок 6).

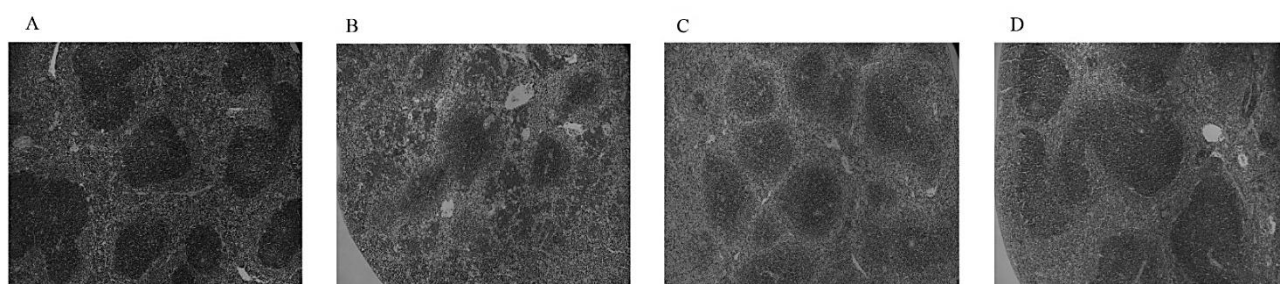


Рисунок 6. Структура селезёнки мышей линии C57BL/6, подверженных воздействию исследуемых препаратов. А – группа «Контроль», В – «ЦФ», С – «ЦФ+БК-ФК», D – препарат животного из группы «БК-ФК». Увеличение $\times 50$. Микроскопия в проходящем свете.

В результате проведения морфометрии печени было установлено, что обработка животных ЦФ способствует снижению яркости светового поля гепатоцитов (повышению их относительной плотности). Это можно объяснить увеличением зон некроза после введения ЦФ ввиду его гепатотоксичности. В то же время, введение БК-ФК способствует повышению яркости светового поля (снижению относительной плотности) гепатоцитов (Таблица 3). В препаратах группы «БК-ФК» наблюдали светлые участки в цитоплазме гепатоцитов, связанные со скоплениями гликогена (Рисунок 7), что могло найти отражение в увеличении яркости светового поля у животных, которым была введена исследуемая субстанция.

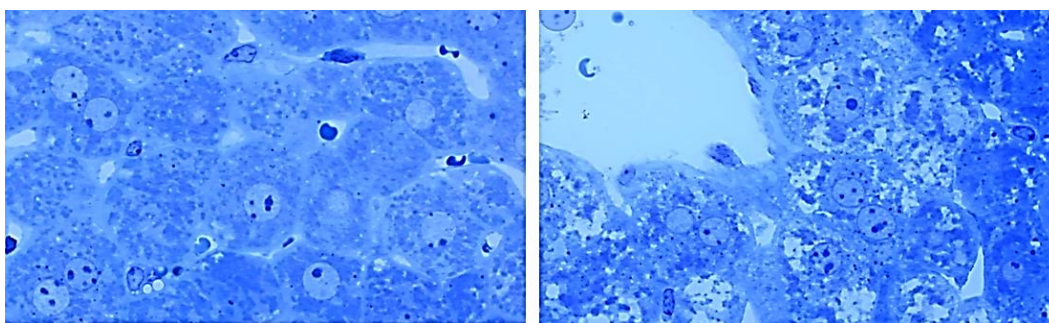


Рисунок 7. Клетки печени исследуемых групп животных. Слева – препарат контрольной группы, справа – препарат печени мышей группы «БК-ФК». Видны более светлые участки в цитоплазме гепатоцитов, связанные с накоплением гликогена в печени животного из группы БК-ФК. Окраска толуидиновым синим. Увеличение $\times 1000$.

В ходе подсчёта относительной объёмной плотности синусоидных клеток печени были зафиксированы различия (на уровне тенденции) между группами животных, обработанных ЦФ и комбинацией ЦФ+БК-ФК. Среднее значение у последней группы было в 1,2 раза меньше, чем у первой. БК-ФК снижает и количество погибших клеток печени у животных, обработанных ЦФ. При этом оно не вызывает значимого увеличения зон некроза по сравнению с контролем (Таблица 3). Это свидетельствует в пользу того, что БК-ФК не обладает выраженной гепатотоксичностью.

Таблица 3. Значения параметров, полученные в ходе световой микроскопии печени экспериментальных животных

	Контроль	ЦФ	ЦФ+БК-ФК	БК-ФК	Р
Средняя интенсивность освещения светового поля гепатоцитов, у.е.	0,26	0,21	0,36	0,29	Контроль/ЦФ: $p=0,00$; Контроль/ЦФ+БК-ФК: $p=0,00$; ЦФ/ ЦФ+БК-ФК: $p=0,00$; Контроль/БК-ФК: $p=0,003$; Множ срав: $p=0,00$;
Средняя относительная объёмная плотность синусоидных клеток, %	1,72	1,57	1,27	1,58	Контроль/ЦФ: $p=0,22$; Контроль/ЦФ+БК-ФК: $p=0,002$; ЦФ/ ЦФ+БК-ФК: $p=0,043$; Контроль/БК-ФК: $p=0,37$; Множ срав: $p=0,013$;
Объёмная плотность некротизированных клеток, сред. (min; max)	0 (0; 0)	0,98 (0; 23,1)	0,13 (0; 2,88)	0,09 (0; 2,78)	Контроль/ЦФ: $p=0,0002$; Контроль/ЦФ+БК-ФК: $p=0,043$; ЦФ/ЦФ+БК-ФК: $p=0,0246$; Контроль/БК-ФК: $p=0,08$; Множ срав: $p=0,0003$.

В цитоплазме гепатоцитов контрольной группы были хорошо представлены все цитоплазматические органеллы и включения гликогена. У животных, обработанных ЦФ, были видны признаки повреждения ультраструктуры печени. При анализе электронных микрофотографий было отмечено увеличение в 2 раза объёмной плотности гликогеновых гранул в цитоплазме клеток у группы животных, обработанных ЦФ и БК-ФК ($p=0,003$). Также значение этого параметра в группе «ЦФ+БК-ФК» достоверно в 1,7 раз больше, чем в группе «ЦФ» (Рисунок 8). Объёмная плотность митохондрий в печени животных группы «ЦФ» была в 1,4 раза выше по сравнению с контрольной группой ($p=0,012$). Введение комбинации ЦФ+БК-ФК оказало значительное влияние на количество лизосом: их объёмная плотность у данной группы оказалась в 18 раз ниже контрольной ($p=0,006$).

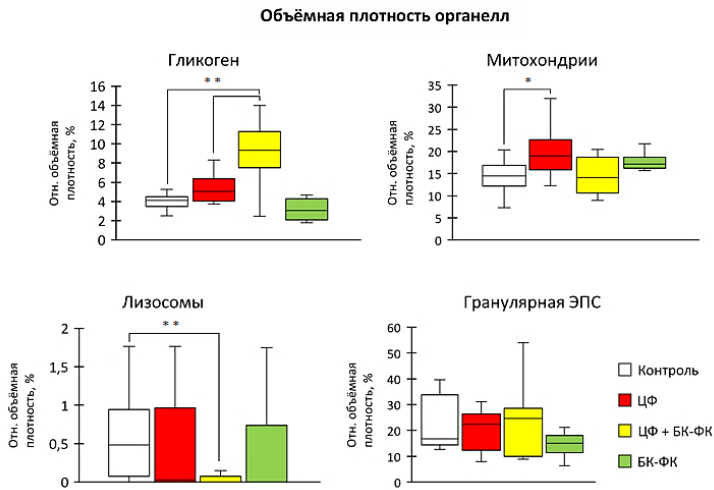


Рисунок 8. Результаты морфометрии гепатоцитов экспериментальных животных.

В ходе 3-ёх дневного эксперимента ЦФ снижал экспрессию *Rela* в 1,6 раз в монорегиме и в 2 раза в комбинации с БК-ФК в костном мозге животных. Последнее также снижало её в среднем в 2 раза ($p = 0,005$) на 3-ий день, однако на 6-ой день БК-ФК повышало её в 1,8 раз по сравнению с контрольной группой. Обработка мышей ЦФ приводила к повышению экспрессии *Nfkbia* в 4,5 раза на 3-ий день и практически в 2 раза на 6-ой день эксперимента ($p = 0,008$). В то же время, БК-ФК не влияло на его экспрессию (Рисунок 9).

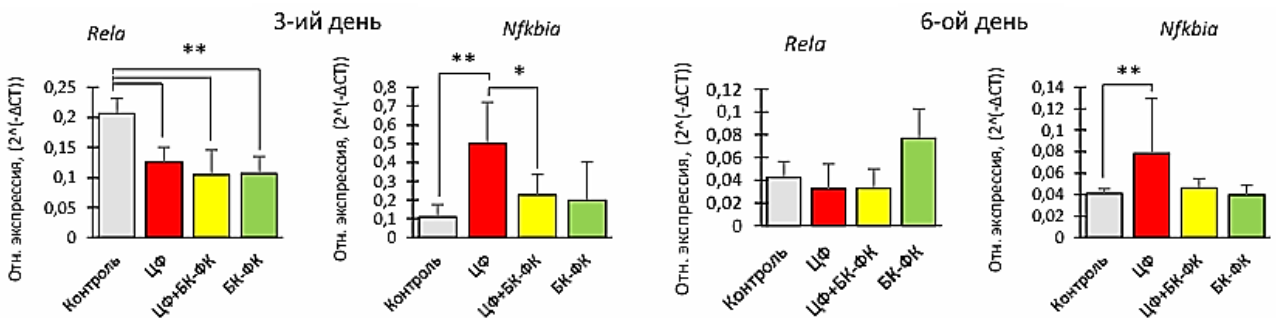


Рисунок 9. Уровни экспрессии генов, кодирующих NF-κB p65 (*Rela*) и его ингибитор (*Nfkbia*) в костном мозге мышей после обработки ЦФ и БК-ФК ($n=6$). Знаком «*» отмечены различия между группами («*» – $p < 0,05$; «**» – $p < 0,01$).

Значимых различий в экспрессии генов цитокинов в костном мозге животных на 3-ий день эксперимента между группами зафиксировано не было. Через 6 дней после введения животным одного ЦФ в костном мозге наблюдалось увеличение экспрессии гена *Tgfb1*. В костном мозге БК-ФК повышало экспрессию *Csf2* (кодирует GM-CSF) в среднем в 3,5 раза, *Il10* в среднем в 2,2 раза, *Il4* в среднем в 2,3 раза ($p=0,008$) и *Tnf* в 1,7 раз по сравнению с контролем (Рисунок 10).

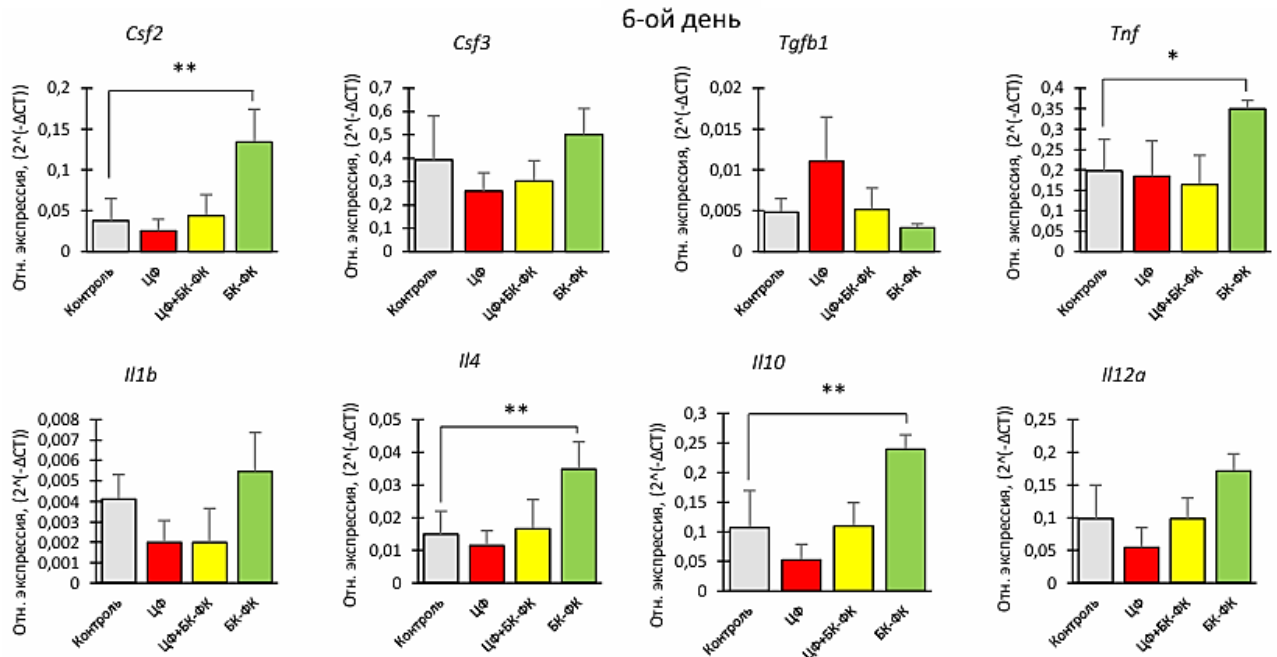


Рисунок 10. Относительная экспрессия генов цитокинов в костном мозге животных после обработки ЦФ и БК-ФК на 6-ой день эксперимента ($n = 6$) («*» – $p < 0,05$; «**» – $p < 0,01$).

Изменения в экспрессии изучаемых генов в печени на 3-ий день опыта после введения ЦФ не были достоверными. Однако некоторые из них носили характер тенденции. В результате использования набора RT² Profiler PCR Mouse Drug Metabolism Array было зарегистрировано повышение экспрессии нескольких генов в пробах к-ДНК у животных группы «БК-ФК». Наиболее близкими к диапазону достоверности оказались значения «Р» у сравниваемых групп по экспрессии двух генов цитохромов: *Cyp2b10* и *Cyp17a1* ($0,0125 < p < 0,05$), а также у *Gstp1* и *Nqo1* ($0,05 < p < 0,1$). Через 6 дней после введения БК-ФК в монорезиме достоверных изменений в экспрессии *Cyp* обнаружено не было. По сравнению с контролем, введение ЦФ вместе с БК-ФК повышало экспрессию гена *Cyp2b10* в среднем в 2,7 раза на 6-ой день ($p = 0,005$). У животных той же группы повышалась экспрессия *Cyp3a11* в 3 раза по сравнению с группой ЦФ ($p = 0,008$) (Рисунок 11).

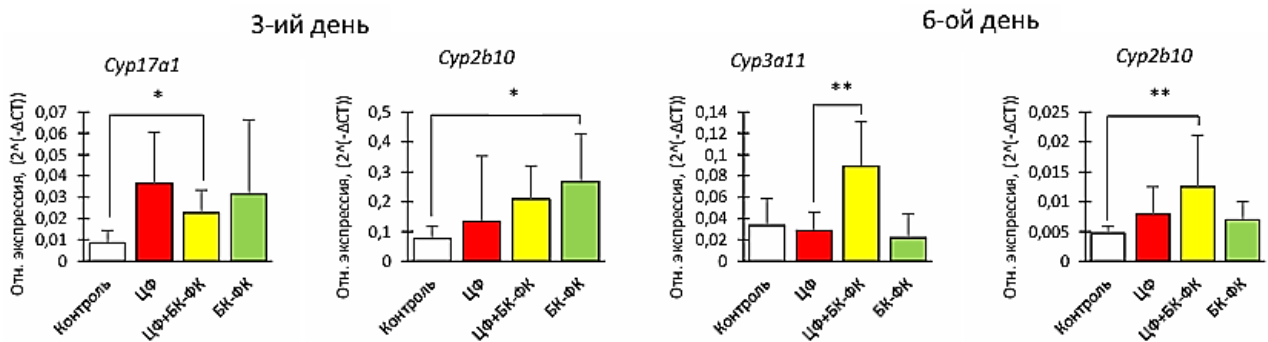


Рисунок 11. Относительная экспрессия ($E^{-\Delta\Delta CT}$) генов ферментов суперсемейства СYP в печени животных после обработки ЦФ и БК-ФК на 3-ий и 6-ой дни после введения БК-ФК ($n=6$). Показаны статистически наиболее значимые различия («*» – $p < 0,05$; «**» – $p < 0,01$).

Оценка влияния изучаемых субстанций на экспрессию генов цитокинов в печени показала, что у животных из группы «ЦФ» наблюдалось незначительное повышение экспрессии гена *Il1b*, а также тенденция к снижению экспрессии генов *Tnf*, *Il12a* и *Il10*. Предположительно, изменения в транскрипционной активности данных генов иммунной системы в печени обусловлены влиянием DMSO, введённого накануне особям из данной группы.

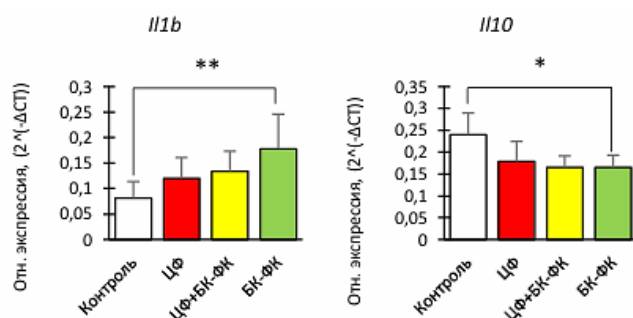


Рисунок 12. Относительная экспрессия генов цитокинов ($E^{-\Delta CT}$) в печени животных после обработки ЦФ и БК-ФК ($n = 6$) («*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$).

После введения ЦФ вслед за БК-ФК в печени животных наблюдалось некоторое повышение уровня м-РНК *Tnf* по сравнению с группой ЦФ. Введение БК-ФК повышало экспрессию *Il1b* в 2,2 раза ($p=0,0082$) и снижало экспрессию *Il 10* в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой (Рисунок 12).

Установлено, что на 3-ий день после начала эксперимента, комбинация вводимых веществ ЦФ и БК-ФК способствовала снижению относительного содержания NAT-1 в печени животных в среднем в 2 раза. Введение БК-ФК способствует повышению содержания NF-κB p65 («Контроль» / «БК-ФК» = 4,93 / 7,96), а также увеличивает количество белка NAT-1 («Контроль» / «БК-ФК» = 0,25 / 0,67) на 6-ой день эксперимента (Рисунок 13).

В ходе определения активности АЛТ в сыворотке у групп экспериментальных животных получены следующие значения: «Контроль» – 87, «ЦФ» – 208, «ЦФ+БК-ФК» – 88, «БК-ФК» – 93 ЕД/л соответственно. Полученные значения для контрольных животных находятся в пределах интервала референсных значений для самцов мышей (26–89 ЕД/л) [Мирошников М.В., 2021]. Введение животным ЦФ вызывало повышение активности АЛТ в их крови в среднем в 2,4 раза. Средние значения активности АЛТ в сыворотке животных, обработанных БК-ФК, превышали референсный интервал только на 4 ЕД. Значения у группы ЦФ+БК-ФК лежали в пределах референсного интервала.

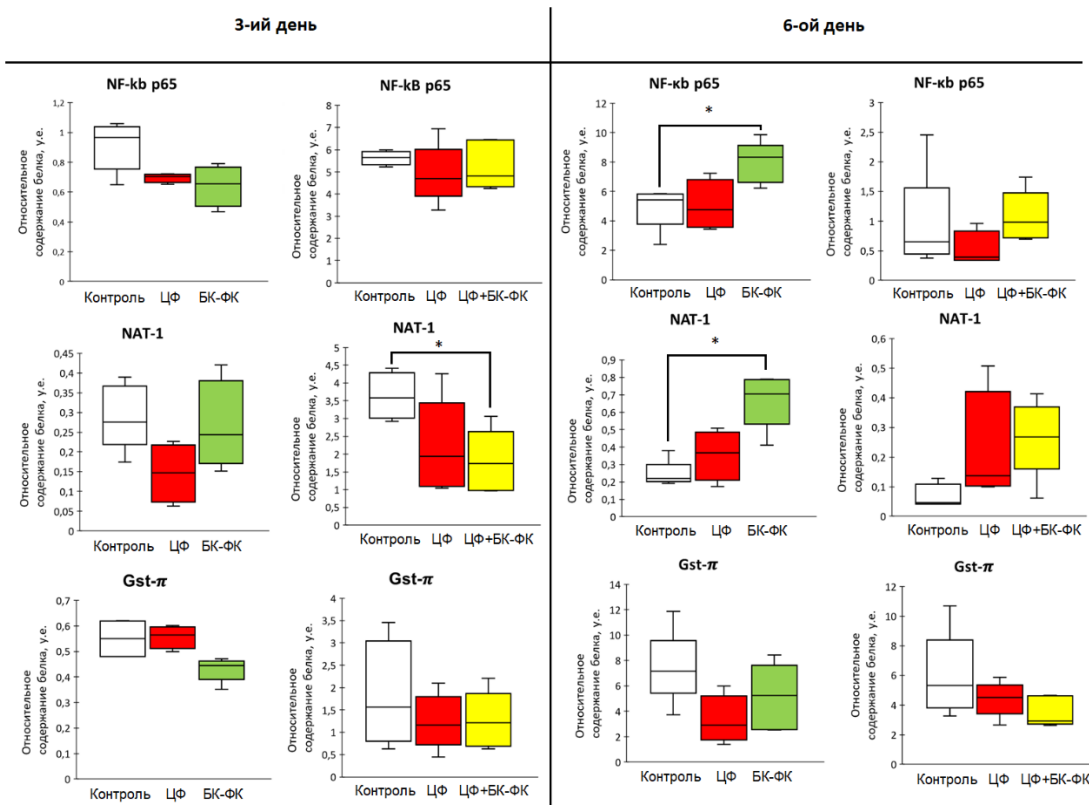


Рисунок 13. Относительное содержание белков (у.е.) в печени животных после обработки ЦФ и БК-ФК ($n = 6$) на 3-ий и 6-ой день после начала эксперимента («*» – $p < 0,05$).

Докинг-анализ

В результате исследования потенциальных мишеней БК-ФК, а также его вероятных взаимодействий с микросомальными ферментами печени человека были выявлены несколько наиболее вероятных кандидатов (вероятность 0,1 и более), в частности: ETRA, NEK6, DNA TOP2A, Cdc25B, TNF- α , ACP1, CYP450 3A4, UGT1A4. По результатам ПЦР-анализа в число исследуемых взаимодействий включены изоформа 2B6 цитохрома P450 (CYP450 2B6), CAR, PXR, ретиноидный X рецептор (RXR), т.к. они являются транскрипционными факторами генов цитохромов. Так как самопроизвольная реакция возможна при отрицательных значениях энергии сродства, то для целей сравнения аффинности к мишеням высчитывалась вероятность конформации с отрицательной связью, представленная в виде доли кластеров с отрицательной связью в общем числе кластеров (Таблица 4). Анализируемое соединение продемонстрировало сильную связь со всеми представленными потенциальными мишенями, поэтому гомологичные белки мыши являются первыми кандидатами для определения потенциальных мишеней БК-ФК в организме *Mus musculus*. CYP3A11 и CYP2B10 анализировались аналогичным образом потому, что результаты экспрессии их генов показали индукцию в ответ на обработку животных БК-ФК. Белки CYP 2B10 и NEK6 продемонстрировали наибольшую энергию связи (следовательно – наименьшую степень сродства) к исследуемой субстанции. По отношению к ряду мишеней (TNF- α , ETRA, ACP1, DNA TOP2A, PXR, CAR) соединение-лиганд в активном

центре белка-мишени принимает аналогичные конформации, то есть «ведет себя» схожим образом в организме человека и мыши.

Таблица 4. Минимальные значения энергии сродства БК-ФК к потенциальным мишеням в организме человека и мыши

Человек			Мышь		
Мишени	Минимум энергии связи, ккал/моль	Доля кластеров с отрицательными значениями энергии связи	Мишени	Минимум энергии связи, ккал/моль	Доля кластеров с отрицательными значениями энергии связи
TNF- α	-9,2485	0,74	CYP3A11	-10,061	0,82
CYP450 2B6	-9,1341	0,82	DNA TOP2A	-9,8219	1,00
NEK6	-9,1145	0,54	CAR	-9,2453	1,00
UGT1A4	-9,0303	0,62	Cdc25B	-8,9769	1,00
ETRA	-8,981	0,72	ETRA	-8,902	0,82
RXR	-8,6274	0,52	ACP1	-8,7625	0,94
CAR	-8,4385	0,92	PXR	-8,1032	0,4
CYP450 3A4	-8,248	0,24	RXR	-5,3702	0,08
PXR	-7,9483	0,42	TNF- α	-5,186	0,02
ACP1	-7,7421	0,56	NEK6	3,855	0
Cdc25B	-7,3308	0,44	CYP2B10	15,6103	0
DNA TOP2A	-6,472	0,12			

Заключение

Эффект БК-ФК, направленный на супрессию апоптоза и повышение выживаемости лимфоцитарных клеток U-937, коррелирует со снижением экспрессии гена *IL10* и повышением экспрессии *IL12A* в той же культуре. Повышение выживаемости иммунных клеток может являться благоприятным фактором в процессе восстановления организма после курсов химиотерапии [Zitvogel L., 2008]. Продукция IL-12 угнетается под влиянием IL-10, следовательно, эти цитокины – антагонисты [Кетлинский С. А., 2008]. Повышенный уровень IL-10 в опухолевой ткани прямо коррелирует с тяжестью заболевания при различных злокачественных новообразованиях [Aslam A., 2025; Chen L., 2019]. IL-12 признан одним из основных эндогенных противораковых агентов за счёт активации им клеточного звена приобретённого иммунитета, реализуемой главным образом посредством усиления выработки IFN- γ и активации NK-клеток [Lasek W., 2014]. Эти доводы позволяют предположить, что данные, полученные в ходе работ с культурой иммунных клеток человека, свидетельствуют о явном иммуноактивирующем эффекте БК-ФК. Этот результат воспроизведен на лабораторных животных: в перитонеальных клетках мышей C57BL/6 после введения вещества возрастает экспрессия *Il12a*.

БК-ФК увеличивало содержание Т-лимфоцитов в крови, повышало отношение CD4+/CD8+ после воздействия БК-ФК на обработанные ЦФ особи. Следовательно, его эффект

направлен на поддержание числа CD3+CD4+ лимфоцитов в кровотоке. На это также указывает то, что данное вещество способствует снижению плотности тканей тимуса – «депо» Т-лимфоцитов. Увеличение содержания Т-лимфоцитов в крови может быть связано не только с влиянием БК-ФК на их миграцию из тимуса, но и со стимуляцией им экспрессии генов цитокинов в костном мозге. Так, IL-4 известен как стимулятор лейкоцитопоэза в костном мозге [Sonoda Y., 1994]. Он способен стимулировать пролиферацию и дифференцировку Th2 посредством активации транскрипционных факторов STAT6 и Gata3. Данный эффект мог внести вклад в повышение общего содержания Т-лимфоцитов в крови мышей под влиянием исследуемой субстанции [Zhu J., 2002]. Кроме этого, IL-4 и IL-10 препятствуют апоптозу В-лимфоцитов и усиливают пролиферацию их предшественников [Luzina I.G., 2012; Rutz S., 2016].

Повышение экспрессии *Rela* (кодирующего р65-субъединицу NF-κB), *Tnf* в костном мозге животных тоже свидетельствует в пользу иммуноактивирующего эффекта исследуемой субстанции. В противоположность ЦФ, оно не вызывает роста содержания м-РНК TGF-β, а наоборот, способствует некоторому его снижению. TGF-β известен как строго противовоспалительный цитокин, обладающий выраженным антипролиферативным действием [Кетлинский С. А., 2008]. Усиление экспрессии гена *Csf2* под действием исследуемого БК-ФК может говорить о его эффективности в качестве потенциального стимулятора костномозговой регенерации. Примечательно, что данный иммуностимулирующий эффект является несколько отсроченным, ведь вначале БК-ФК подавляет экспрессию *Rela*.

Значения экспрессии *Cyp2b10* в группе «ЦФ+БК-ФК» были выше, чем в контрольной на 5-ые сутки после введения, а БК-ФК в монорежиме повышало экспрессию гена *Cyp2b10* на 3-ий день после введения. *In silico* БК-ФК продемонстрировало низкое сродство к CYP2B10. CYP2B10 гидроксимирует ЦФ, активирует его, следовательно, индуцируя экспрессию соответствующего гена, БК-ФК может ускорять метаболизм ЦФ. Также, под влиянием препаратов возрасла экспрессия гена *Cyp3a11*. Наряду с усилением транскрипции предыдущего гена это может говорить об активации CAR и PXR под влиянием БК-ФК. Это подтверждается результатами докинг-анализа.

БК-ФК снижало объёмную плотность зон некроза на 5-ые сутки после введения ЦФ, демонстрируя некоторый гепатопротекторный эффект (по-видимому, за счёт фрагмента БК в своём составе). Оно снижало объёмную плотность синусоидных клеток печени после обработки ЦФ, что может указывать на снижение степени лейкоцитарной инфильтрации ткани печени. По результатам ПЦР-анализа экспрессия генов *III2a* и *III0* в печени несколько снижалась после введения ЦФ и БК-ФК. Это также может говорить об отсутствии гепатотоксичности наряду с тем, что средний уровень АЛТ в сыворотке животных из группы «ЦФ+БК-ФК» оставался в

пределах референсного интервала, а средний уровень АЛТ группы «БК-ФК» лишь незначительно превышал таковой у контрольной группы животных. В данной работе клетки печени после обработки исследуемым БК-ФК характеризуются возрастанием зон накопления гликогена, что сопоставимо с литературными данными.

Выводы

Из полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. БК-ФК имеет иммуностимулирующий эффект. Это проявляется в виде повышения выживаемости иммунных клеток и усиления экспрессии *IL12A in vitro* под влиянием данного соединения. На модели иммуносупрессии *in vivo* оно может непосредственно ускорять миграцию зрелых Т-лимфоцитов из тимуса или действовать опосредованно, повышая экспрессию генов цитокинов (*Csf2*, *Il4* и *Il10*) в костном мозге. В пользу иммуностимулирующих свойств исследуемого вещества свидетельствуют усиление экспрессии генов *Rela* и *Tnf* и угнетение экспрессии гена противовоспалительного медиатора TGF- β в костном мозге животных.

2. БК-ФК имеет биоинформатически предсказанное сродство к факторам транскрипции CAR и PXR, а применение его в эксперименте в комбинации с ЦФ приводит к повышению содержания м-РНК генов *Cyp2b10* и *Cyp3a11* в печени мышей. Это свидетельствует об усилении транскрипционной активности этих генов под действием БК-ФК и о возможном влиянии БК-ФК на метаболизм ЦФ.

3. Введение БК-ФК способствовало повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Tnf*) и усилению выработки р65-субъединицы NF- κ B в печени. Его применение может быть целесообразным при опухолевых и вирусных заболеваниях печени.

4. Исследуемое соединение повышает содержание белка N-ацетилтрансферазы 1 в печени спустя 5 дней после введения.

5. БК-ФК не обладает значимой гепатотоксичностью и, в то же время, оно проявляет некоторый гепатопротекторный эффект на модели ЦФ-индуцированного повреждения печени, снижая объёмную плотность зон некроза и активность АЛТ в сыворотке животных.

6. БК-ФК снижает количество синусоидных клеток печени после введения ЦФ, а также способствует накоплению гликогена и снижению числа лизосом в гепатоцитах.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных журналах:

1. Иванов, И. Д. Исследование механизмов противовоспалительной и иммуномодулирующей активности соединений бетулиновой кислоты с фурукумаринами / И. Д. Иванов, К. И. Мосалев, А. В. Липеева, Э. Э. Шульц, В. А. Вавилин – DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-6-28-34. – Текст: электронный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 6. – С. 28–34.
2. Мосалев, К. И. Иммуномодулирующая активность соединения бетулоновой кислоты / К. И. Мосалев, И. Д. Иванов, С. М. Мирошниченко, М. В. Тендитник, Н. П. Бгатова, Э. Э. Шульц, В. А. Вавилин – DOI: 10.18097/PBMC20236904219. – Текст: электронный // Биомедицинская химия. – 2023. – Т. 69, № 4. – С. 219–227.
3. Мосалев, К. И. Гепатотропная активность соединения бетулоновой кислоты / К. И. Мосалев, И. Д. Иванов, М. В. Тендитник, Э. Э. Шульц, В. А. Вавилин – DOI: 10.18097/PBMC20247001015. – Текст: электронный // Биомедицинская химия. – 2024. – Т. 70, № 1. – С. 15–24.

Тезисы:

1. Мосалев, К. И. Исследование биологической активности соединения бетулиновой кислоты с 2-азидо-9-замещённым ореозелоном / К. И. Мосалев // II объединенный научный форум. VI Съезд физиологов СНГ. VI Съезд биохимиков России. IX российский симпозиум "Белки и пептиды": научные труды, Сочи - Дагомыс, 01–06 октября 2019 года / Союз физиологических обществ стран СНГ; Российское общество биохимиков и молекулярных биологов. Том 2. – Москва: Издательство "Перо", 2019. – С. 183.
2. Мосалев, К. И. Исследование иммуномодулирующей активности соединений бетулоновой кислоты с фурукумаринами / К. И. Мосалев // Сборник тезисов докладов участников V Международной научной конференции "Наука будущего" и VIII Всероссийского молодежного научного форума "Наука будущего - наука молодых", Орел, 20–23 сентября 2023 года. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Инконсалт К", 2023. – С. 108.
3. Мосалев, К. И. Поиск механизмов активности и путей метаболизма соединения бетулоновой кислоты на модели циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии у мышей / К. И. Мосалев, И. Д. Иванов, В. А. Вавилин, Н. В. Гончарова // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов : Материалы Десятой Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 300-летию Российской академии наук и 100-летию со дня рождения академика РАМН Казначеева Влаиля Петровича, Новосибирск, 22–23 октября 2024 года. – Новосибирск: Сибирское отделение РАН, 2024. – С. 96-97.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность члену-корреспонденту РАН, д.м.н., руководителю лаборатории МЕЛФА, директору НИИМББ ФИЦ ФТМ, проф. Вавилину Валентину Андреевичу за неоценимую помощь в работе; с.н.с. лаборатории ЛБЧС НИИМББ ФИЦ ФТМ к.б.н. Ключовой Любови Сергеевне за оказанную помощь в работе с системой визуализации INCell Analyzer; с.н.с. лаборатории межклеточных взаимодействий НИИ биохимии ФИЦ ФТМ Мирошниченко Светлане Михайловне за помощь при анализе данных проточной цитометрии; сотрудникам лаборатории ультраструктурных исследований НИИКЭЛ – филиала ИЦиГ СО РАН за помощь в обработке материала для световой и электронной микроскопии и заведующей лабораторией профессору Бгатовой Наталии Петровне за консультативную помощь при анализе цифровых микрофотографий; к.б.н. Тендитнику Михаилу Владимировичу (НИИНМ СО РАН) за помощь в проведении эксперимента *in vivo*; к.м.н. Гончаровой Наталье Владимировне (НИИНМ СО РАН) за помощь в проведении биохимического анализа крови животных, а также м.н.с. лаборатории МЕЛФА НИИМББ ФИЦ ФТМ Мухиной Ирине Георгиевне за помощь в интерпретации результатов докинг-анализа.