

ЦИКЛОАСТРАГЕНОЛ ОКАЗЫВАЕТ АНТИАПОПТОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НА ЛИМФОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

© 2025 г. М.А. Наквасина*., В.Г. Артюхов*, М.Г. Холявка*, И.А. Колтаков*, Е.И. Корпусова*, Н.Г. Сараджи*

*Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

#E-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2025 г.

После доработки 02.03.2025 г.

Принята к публикации 05.03.2025 г.

Исследованы изменения уровня некоторых маркерных показателей апоптоза (липидной асимметрии плазматических мембран, продукции активных форм кислорода, оксида азота, концентрации ионизированного кальция) лимфоцитов крови человека, модифицированных воздействием пероксида водорода (10^{-5} моль/л) и УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м^2) в присутствии циклоастренола (10^{-8} – 10^{-4} моль/л). Обнаружено снижение интенсивности процессов апоптотической гибели лимфоцитов после воздействия УФ-света в присутствии циклоастренола (10^{-8} моль/л). Выявлено, что цитопротекторное действие циклоастренола на лимфоциты обусловлено снижением уровня внутриклеточных активных форм кислорода и ионов кальция, повышением активности каталазы и глутатионредуктазы и продукции оксида азота. Обсуждаются возможные механизмы действия циклоастренола как регулятора процессов апоптотической гибели лимфоцитов, индуцированной воздействием УФ-излучения и пероксида водорода.

Ключевые слова: лимфоциты, циклоастренол, пероксид водорода, УФ-свет, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0006302925030141, EDN: KTRPELB

Изучение процессов старения и гибели клеток, разработка способов их регулирования, поиск эффективных цито- и геропротекторов — ключевые проблемы современной физико-химической биологии и медицины.

Старение иммунных клеток повышает риск развития онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, метаболических заболеваний, инфекций. Чрезмерное старение иммунных клеток приводит к выраженному иммунодефициту. Иммуноциты, как и другие клетки, претерпевают репликативное, зависящее от укорочения теломер, старение и стресс-индуцированное преждевременное старение, не связанное с изменением теломер и запускающееся факторами, вызывающими повреждение ДНК (действием ионизирующего и УФ-излучений, активных форм кислорода, химиотерапевтических препаратов, инфекционных агентов, хроническим воспалением) [1, 2]. Инициация апоптоза рассматри-

вается как связующее звено между иммуностарением и окислительным стрессом [3].

В связи с вышесказанным разрабатываются стратегии, направленные на предотвращение старения и гибели, повышение функциональной активности лимфоцитов, увеличение экспрессии и активации теломеразы в них, в том числе генетические, а также связанные с использованием низкомолекулярных регуляторов, диет и физической нагрузки [2]. Активно исследуются потенциальные цито- и геропротекторы: различные биогенные соединения, проявляющие антиоксидантную, сенолитическую активность, выступающие в роли регуляторов сигнальных путей, адаптогенов [1, 4–7].

Циклоастренол (рис. 1) — тритерпеноидное сапониновое соединение, активная форма астрагалозида IV — одного из основных компонентов *Astragalus membranaceus*, применяющегося в китайской медицине в качестве кардио- и гепатопротекторного, иммуностимулирующего, мочегонного, антигипертензивного, противодиабетического, антивозрастного, противоопухолевого

Сокращения: УФ — ультрафиолетовый, АФК — активные формы кислорода, NO — монооксид азота.

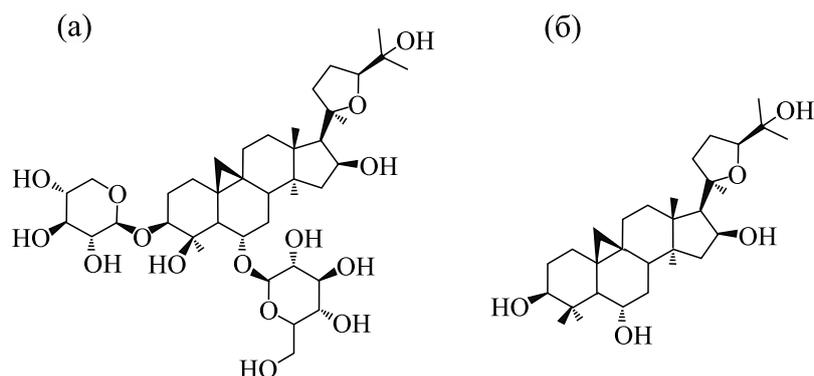


Рис. 1. Структура астрагалозида IV (а) и циклоастратегенола (б).

средства [8–10]. Циклоастратегенол образуется из астрагалозида IV в организме человека с участием ферментов кишечной флоры. Для этого соединения характерен более высокий уровень проницаемости, абсорбционной способности, биодоступности по сравнению с астрагалозидом [11]. Циклоастратегенол используется на рынке с 2013 г. как пищевая добавка с коммерческим названием ТА-65 (производитель – корпорация TA Sciences and Geron, США) [12, 13]. Циклоастратегенол обладает широким спектром фармакологической активности: противовоспалительной, антиоксидантной, антибактериальной, противовирусной, иммуномодулирующей, гепато- и нейропротекторной, антиканцерогенной [14–18]. Цитопротекторные свойства этого соединения связывают с повышением уровня сиртуина, деацетилирующего р53 и снижающего его способность связываться с ДНК, предотвращением апоптоза [15].

Циклоастратегенол является природным активатором теломеразы: удлиняет теломеры *in vitro* и *in vivo*, в основном путем регулирования сигнальных путей митоген-активируемых протеинкиназ и серин-треониновых протеинкиназ [11]. Защита теломер может быть связана с антиоксидантными свойствами циклоастратегенола: повышением общей антиоксидантной активности и активности супероксиддисмутазы, снижением уровня малонового диальдегида [14]. Применение ТА-65 индуцировало улучшение некоторых показателей продолжительности жизни (толерантности к глюкозе, состояния кожи, устойчивости к остеопорозу) без значительного увеличения заболеваемости раком у самок мышей [19]. Отмечено значительное снижение процента стареющих цитотоксических Т-клеток и естественных клеток-киллеров человека при использовании этой пищевой добавки в течение 6–12 месяцев [19].

Астрагалозид IV и циклоастратегенол могут повышать активность теломеразы в Т-лимфоцитах, усиливать пролиферацию и иммунную функцию CD8⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных

пациентов посредством активации пути Src/MEK/ERK (сигнального пути, регулируемого митоген-активируемыми протеинкиназами) [12, 14, 19]. Удлинение теломер не сопровождалось ростом заболеваемости раком, однако, экспериментальные данные в этом отношении не многочисленны [12].

Обнаружены антиканцерогенные эффекты астрагалозида IV по отношению к различным опухолевым клеткам, которые связывают с инициацией митохондриального и рецепторного механизмов апоптоза [8].

Циклоастратегенол представляется перспективным соединением для лечения патологий, связанных с воспалением, окислительным стрессом, старением клеток или аутофагией [13, 15].

Фактором, препятствующим клиническому применению циклоастратегенола, является его возможный канцерогенный потенциал [14]. Детальные механизмы действия этого сапонина, демонстрирующего плейотропные эффекты (в том числе, с одной стороны, цитопротекторный, с другой – иницирующий гибель опухолевых клеток), изучены недостаточно полно. Необходимо исследовать его возможные биологические эффекты в широком концентрационном диапазоне по отношению к иммуноцитам человека в условиях инициации процессов клеточного старения и гибели.

Ионизирующее излучение, ультрафиолетовый (УФ) свет, активные формы кислорода (АФК) – факторы, вызывающие стресс-индуцированное старение и гибель клеток, в том числе иммуноцитов [1, 20–23]. Нами обнаружено [24, 25], что апоптоз лимфоцитов периферической крови человека после УФ-облучения (240–390 нм) в дозе 1510 Дж/м² осуществляется с участием р53-зависимого пути ядерного механизма, а также рецепторопосредованного каспазного, митохондриального и связанного с нарушением кальциевого гомеостаза механизмов. Экзогенный пероксид водорода в концентрации 1 и 10 мкмоль индуцирует в лимфоцитах процессы апоптотической ги-

бели, которые реализуются с участием рецепто-
ропосредованного каспазного, митохондриаль-
ного (с активацией каспазы-9) и p53-зависимого
пути ядерного механизмов апоптоза. Внутриклеточные активные формы кислорода и ионы кальция – медиаторы апоптоза лимфоцитов, инициируемого УФ-излучением и пероксидом водорода.

С целью разработки новых способов регулирования процессов программированной клеточной смерти нами исследованы изменения уровня некоторых маркерных показателей апоптоза (липидной асимметрии плазматических мембран, продукции активных форм кислорода, оксида азота, концентрации ионизированного кальция) лимфоцитов крови человека, модифицированных воздействием пероксида водорода (10^{-5} моль/л) и УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м^2) в присутствии циклоастренола (10^{-8} – 10^{-4} моль/л).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – лимфоциты, полученные не позднее двух часов после забора крови доноров. Забор крови производили в стеклянные центрифужные пробирки с добавлением раствора гепарина (25 ЕД/мл). Донорами были здоровые мужчины 18–45 лет, у которых брали кровь в филиале Воронежской городской клинической больницы скорой медицинской помощи № 1 БУЗ ВО Воронежской областной станции переливания крови.

Лимфоциты получали путем центрифугирования донорской крови с антикоагулянтом в градиенте плотности фикола–урографина (фиколл 400 (Diam, Швейцария) – 7.64 г, урографин 76% (Bayer Schering Pharma AG, Германия) – 20 мл, вода – 92.56 мл; $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$) [26]. В центрифужную пробирку на 1 мл градиентной смеси наслаивали 3 мл крови с антикоагулянтом, разбавленной раствором Хенкса (0.1 моль/л, pH 7.4 при 20°C) в соотношении 1 : 1. Центрифугирование проводили в течение 15 мин при 1500 об/мин. Полученные лимфоциты отбирали пипеткой, а затем центрифугировали в избытке раствора Хенкса в течение 10 мин при 1000 об/мин. Отмытые лимфоциты суспендировали в растворе Хенкса до рабочей концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл при помощи камеры Горяева.

Для проверки чистоты полученной суспензии лимфоцитов делали мазки, которые затем окрашивали по методу Романовского – Гимзы [26]. В полученной суспензии лимфоциты составляли 95–97% всех клеток, 3–5% приходилось на долю нейтрофилов и моноцитов.

Число жизнеспособных клеток во взвесах определяли методом эксклюзии трипанового синего [26].

К суспензии клеток ($2 \cdot 10^6$ кл/мл) объемом 0.9 мл добавляли 0.1 мл раствора циклоастренола (Hunan Insen Biotech Co, Китай), приготовленного на растворе Хенкса, в концентрациях 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} моль/л, инкубировали в течение 1 ч при 37°C .

УФ-облучение лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл), суспендированных в растворе Хенкса, проводили в чашке Петри, помещаемой в облучатель BIO-link-BLX 254 нм (Vilber Lourmaet, Франция). Доза облучения лимфоцитов составляла 1510 Дж/м^2 .

Лимфоциты обрабатывали пероксидом водорода в конечной концентрации 10^{-5} моль/л. Растворы пероксида водорода готовили с использованием коэффициента молярного поглощения H_2O_2 – $43.6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при длине волны 240 нм.

Суспензии нативных и модифицированных воздействием УФ-света и пероксида водорода лимфоцитов в отсутствие и в присутствии циклоастренола инкубировали в течение 1 и 4 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 .

Уровень активных форм кислорода в интактных и модифицированных лимфоцитах определяли флуоресцентным методом при помощи 2',7'-дихлорфлуоресцеиндиацетата на спектрофлуориметре RF-1501 (Shimadzu, Япония) [27].

Интенсивность образования монооксида азота (NO) в лимфоцитах оценивали по накоплению нитрит-аниона, устойчивого метаболита оксида азота, спектрофотометрическим методом, основанным на реакции Грисса [28, 29].

Уровень функциональной активности каталазы определяли при $\lambda = 410 \text{ нм}$ спектрофотометрическим методом, основанным на оценке светопоглощения цветного комплекса пероксида водорода и водного раствора аммония молибденовокислого.

Ферментативную активность глутатионредуктазы оценивали по скорости окисления НАДФН, регистрируемой спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Концентрацию свободного цитоплазматического кальция в лимфоцитах измеряли с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM на спектрофлуориметре RF-1501 [30].

При исследовании количественных параметров клеточной гибели лимфоцитов кровь доноров с ЭДТА разбавляли фосфатно-солевым буфером (pH 7.4 при 20°C) в соотношении 1 : 1. Суспензию объемом 5 мл наслаивали на 1.5 мл градиента плотности фикола–урографина и центрифугировали в течение 15 мин при 1500 об/мин. Полученную фракцию лимфоцитов аккуратно отбирали в отдельную пробирку и разбавляли фосфат-

но-солевым буфером в равных пропорциях. Отмывку от градиента проводили путем центрифугирования в течение 10 мин при 1000 об/мин. Далее доводили рабочую концентрацию в камере Горяева – $2 \cdot 10^6$ кл/мл. Для подсчета количества апоптотических клеток в суспензии лимфоцитов использовали тест-систему Annexin V-PE/7-AAD Cell Apoptosis Detection Kit (Servicebio, Китай) и краситель пропидиум йодид (Servicebio, Китай). Образцы клеток анализировали на проточном цитофлуориметре Guavaeasy Cyte 8HT (Merck Millipore, США), обработку этих данных проводили при помощи программы Floreada.

Уровень повреждений ДНК лимфоцитов исследовали методом ДНК-комет, основанным на оценке электрофоретической подвижности ДНК единичных клеток, иммобилизованных в агарозном геле, как описано в работе [31].

Статистический анализ проводили с использованием программы Excel (Microsoft, США). Количественные показатели описывали с помощью средних арифметических величин и стандартных отклонений. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали

при помощи *t*-критерия Стьюдента. Различия тестируемых показателей считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружено (табл. 1), что предварительная инкубация в течение 1 ч суспензии лимфоцитов в присутствии циклоастренола в конечной концентрации 10^{-8} моль/л индуцирует статистически значимое по сравнению с контролем снижение уровня внутриклеточных активных форм кислорода в интактном состоянии и через 1 ч после воздействия на клетки УФ-света и пероксида водорода. После обработки иммуноцитов циклоастренолом в концентрациях 10^{-7} – 10^{-4} моль/л отмечается тенденция к снижению величины исследуемого параметра по отношению к таковой для немодифицированных тритерпеноидом образцов (табл. 1).

Уровень функциональной активности каталазы интактных лимфоцитов через 1 ч после воздействия циклоастренола в концентрациях 10^{-8} ,

Таблица 1. Изменение уровня внутриклеточных активных форм кислорода, функциональной активности каталазы и глутатионредуктазы лимфоцитов человека, модифицированных воздействием УФ-излучения и пероксида водорода в отсутствие и в присутствии циклоастренола

Показатель	Конечная концентрация циклоастренола, моль/л					
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Уровень продукции АФК в интактных клетках, отн. ед.	22.7 ± 7.2	$5.1 \pm 2.3^*$	9.5 ± 6.0	9.6 ± 6.2	10.4 ± 5.9	10.7 ± 6.0
Уровень продукции АФК в H ₂ O ₂ -модифицированных клетках, отн. ед.	20.6 ± 6.2	$5.0 \pm 2.5^*$	10.0 ± 4.5	10.2 ± 4.6	13.6 ± 2.9	13.0 ± 3.9
Уровень продукции АФК в УФ-облученных клетках, отн. ед.	104.9 ± 21.2	$35.0 \pm 9.3^*$	84.1 ± 7.5	82.8 ± 22.2	91.9 ± 14.6	87.8 ± 15.4
Уровень активности каталазы в интактных клетках, мкмоль/мин	7.2 ± 3.1	$29.0 \pm 9.5^*$	$19.0 \pm 6.7^*$	$20.4 \pm 8.5^*$	15.9 ± 5.9	10.8 ± 2.9
Уровень активности каталазы в H ₂ O ₂ -модифицированных клетках, мкмоль/мин	7.7 ± 5.4	$27.2 \pm 5.3^*$	16.0 ± 5.1	10.6 ± 6.1	9.7 ± 4.2	9.9 ± 5.7
Уровень активности каталазы в УФ-облученных клетках, мкмоль/мин	12.7 ± 5.2	$23.5 \pm 5.3^*$	15.4 ± 6.2	18.4 ± 7.1	19.1 ± 6.5	15.3 ± 5.7
Уровень активности глутатионредуктазы в интактных клетках, мкмоль/мин	2.5 ± 1.5	$15.6 \pm 3.7^*$	4.9 ± 3.0	5.7 ± 2.4	4.9 ± 2.2	4.9 ± 1.0
Уровень активности глутатионредуктазы в H ₂ O ₂ -модифицированных клетках, мкмоль/мин	3.6 ± 2.4	$13.6 \pm 2.5^*$	3.7 ± 1.1	4.7 ± 2.7	4.3 ± 1.5	3.6 ± 2.4
Уровень активности глутатионредуктазы в УФ-облученных клетках, мкмоль/мин	3.3 ± 1.7	$8.4 \pm 1.0^*$	3.0 ± 1.4	2.3 ± 1.3	3.6 ± 1.8	4.1 ± 1.0

Примечание. * – Отличия от контроля (без циклоастренола) статистически значимы, $p < 0.05$.

Таблица 2. Изменение уровня NO в лимфоцитах, модифицированных УФ-излучением и пероксидом водорода в присутствии циклоастратегенола

Показатель	Конечная концентрация циклоастратегенола, моль/л		
	0	10^{-8}	10^{-5}
Уровень продукции NO в интактных клетках, нмоль/л	2.6 ± 0.2	$32.1 \pm 6.0^*$	$20.7 \pm 5.0^*$
Уровень продукции NO в H ₂ O ₂ -модифицированных клетках, нмоль/л	2.9 ± 0.1	$50.0 \pm 3.0^*$	$34.3 \pm 5.0^*$
Уровень продукции NO в УФ-облученных клетках, нмоль/л	3.4 ± 0.6	$50.0 \pm 3.0^*$	$39.0 \pm 2.0^*$

Примечание. * – Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0.05$.

10^{-7} и 10^{-6} моль/л увеличивается по сравнению с таковым для клеток в отсутствие этого агента (табл. 1). Зарегистрировано повышение по отношению к контролю уровня активности глутатионредуктазы нативных иммуноцитов, модифицированных тритерпеноидом (10^{-8} моль/л). Статистически значимое повышение величин активности каталазы и глутатионредуктазы выявлено после инкубации лимфоцитов с циклоастратегенолом (10^{-8} моль/л) и через 1 ч после воздействия пероксида водорода и УФ-света по сравнению с таковыми для немодифицированных клеток (табл. 1).

Общий уровень белка в исследуемых модифицированных клетках через 1 ч не изменялся по отношению к таковому для интактных лимфоцитов.

Установлено (табл. 2), что воздействие циклоастратегенола в конечных концентрациях 10^{-8} и 10^{-5} моль/л в течение 1 ч на суспензию интактных лимфоцитов с последующей инкубацией при 37°C (4 ч) вызывает повышение уровня продукции монооксида азота по сравнению с таковым для нативных иммуноцитов (контроль).

Уровень NO в лимфоцитах, подвергнутых воздействию УФ-света и пероксида водорода в присутствии циклоастратегенола в тех же концентрациях, существенно возрастает по отношению к

величинам исследуемого параметра для клеток, модифицированных в отсутствие указанного соединения. При этом обнаруженный эффект повышения уровня оксида азота более выражен при концентрации циклоастратегенола 10^{-8} моль/л.

Полученные нами результаты могут быть обусловлены активацией циклоастратегенолом АМФ-активируемой протеинкиназы и сиртуина-1 [18, 32, 33], с участием которых возможны стимуляция и повышение экспрессии индуцибельной NO-синтазы.

Обнаружено (табл. 3) снижение уровня внутриклеточного кальция в цитозоле модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света лимфоцитах в присутствии циклоастратегенола в конечных концентрациях 10^{-8} и 10^{-5} моль/л через 1 ч после их сочетанного действия.

Снижение уровня внутриклеточного кальция в иммуноцитах в присутствии циклоастратегенола может быть связано с ингибированием процессов поступления ионов кальция из внешней среды и его депонированием в эндоплазматическом ретикуле [14].

Нами исследовано влияние циклоастратегенола в концентрациях 10^{-8} и 10^{-5} моль/л на количество апоптотических и некротических клеток (табл. 4–6, рис. 2) до и после воздействия на лим-

Таблица 3. Изменение уровня цитозольного кальция (нмоль/л) в лимфоцитах, модифицированных воздействием пероксида водорода и УФ-света в присутствии циклоастратегенола

Образец	Конечная концентрация циклоастратегенола, моль/л		
	0	10^{-8}	10^{-5}
Интактные лимфоциты	115 ± 32	$42 \pm 7^*$	76 ± 17
Лимфоциты, модифицированные пероксидом водорода	147 ± 19	$57 \pm 10^*$	$103 \pm 6^*$
УФ-облученные лимфоциты	149 ± 16	$22 \pm 3^*$	$77 \pm 7^*$

Примечание. * – Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0.05$.

Таблица 4. Данные цитометрического анализа количества апоптотических и некротических лимфоцитов (%) в присутствии циклоастратегенола

Образец	Живые клетки	Ранняя стадия апоптоза	Поздняя стадия апоптоза, некроз
Свободные клетки	19.10 ± 6.00	76.90 ± 5.00	3.95 ± 2.00
Клетки + циклоастратегенол 10 ⁻⁸ моль/л	14.90 ± 7.00	80.30 ± 5.00	4.75 ± 4.00
Клетки + циклоастратегенол 10 ⁻⁵ моль/л	16.55 ± 6.00	79.35 ± 4.00	4.10 ± 4.00

Таблица 5. Результаты цитометрического анализа количества апоптотических и некротических лимфоцитов (%) в присутствии циклоастратегенола после воздействия пероксида водорода (10⁻⁵ моль/л)

Образец	Живые клетки	Ранняя стадия апоптоза	Поздняя стадия апоптоза, некроз
H ₂ O ₂ -модифицированные клетки	10.75 ± 6.00	78.15 ± 7.00	10.45 ± 5.00
H ₂ O ₂ -модифицированные клетки + циклоастратегенол 10 ⁻⁸ моль/л	19.60 ± 5.00	73.65 ± 4.00	6.70 ± 5.00
H ₂ O ₂ -модифицированные клетки + циклоастратегенол 10 ⁻⁵ моль/л	9.90 ± 7.00	78.25 ± 7.00	11.20 ± 3.00

фоциты пероксида водорода и УФ-света. Преимущественным типом гибели лимфоцитов в течение 4 ч в условиях УФ-облучения и воздействия пероксида водорода является апоптоз.

Обнаружено (табл. 4), что циклоастратегенол в использованных концентрациях не влияет на количество фосфатидилсерин-позитивных клеток и клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза/некроза через 4 ч после инкубации с суспензией иммуноцитов.

При исследовании процессов гибели лимфоцитов, модифицированных пероксидом водорода в присутствии циклоастратегенола, не выявлены статистически значимые отличия в количестве живых, апоптотических и некротических лимфоцитов через 4 ч после инкубации по сравнению с таковыми для нативных образцов (табл. 5). Однако отмечается тенденция к увеличению количества живых клеток, снижению уровня клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза и поздней

стадии апоптоза/некроза, после воздействия пероксида водорода в присутствии циклоастратегенола в концентрации 10⁻⁸ моль/л по отношению к таковому для модифицированных иммуноцитов в отсутствие данного соединения.

При исследовании процессов клеточной гибели лимфоцитов в условиях УФ-облучения (рис. 2, табл. 6) обнаружено, что циклоастратегенол в концентрации 10⁻⁸ моль/л оказывает цитопротекторное действие на иммуноциты, снижая на 20% количество фосфатидилсерин-позитивных лимфоцитов по сравнению с таковым для облученных свободных клеток. При этом соответственно количество живых клеток увеличивается на 20%.

Через 1 ч после УФ-облучения лимфоцитов в присутствии циклоастратегенола (10⁻⁸ моль/л) зарегистрировано статистически значимое снижение уровня повреждений ДНК до 44 ± 5% по сравнению с таковым для фотомодифицирован-

Таблица 6. Данные цитометрического анализа количества живых и апоптотических лимфоцитов (%) в присутствии циклоастратегенола после УФ-облучения (254 нм, 1510 Дж/м²)

Образец	Живые клетки	Ранняя стадия апоптоза
УФ-модифицированные клетки	18.05 ± 6.00	81.95 ± 8.00
УФ-модифицированные клетки + циклоастратегенол 10 ⁻⁸ моль/л	38.05 ± 5.00*	61.95 ± 6.00*
УФ-модифицированные клетки + циклоастратегенол 10 ⁻⁵ моль/л	22.30 ± 6.00	77.70 ± 5.00

Примечание. * — Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0.05$.

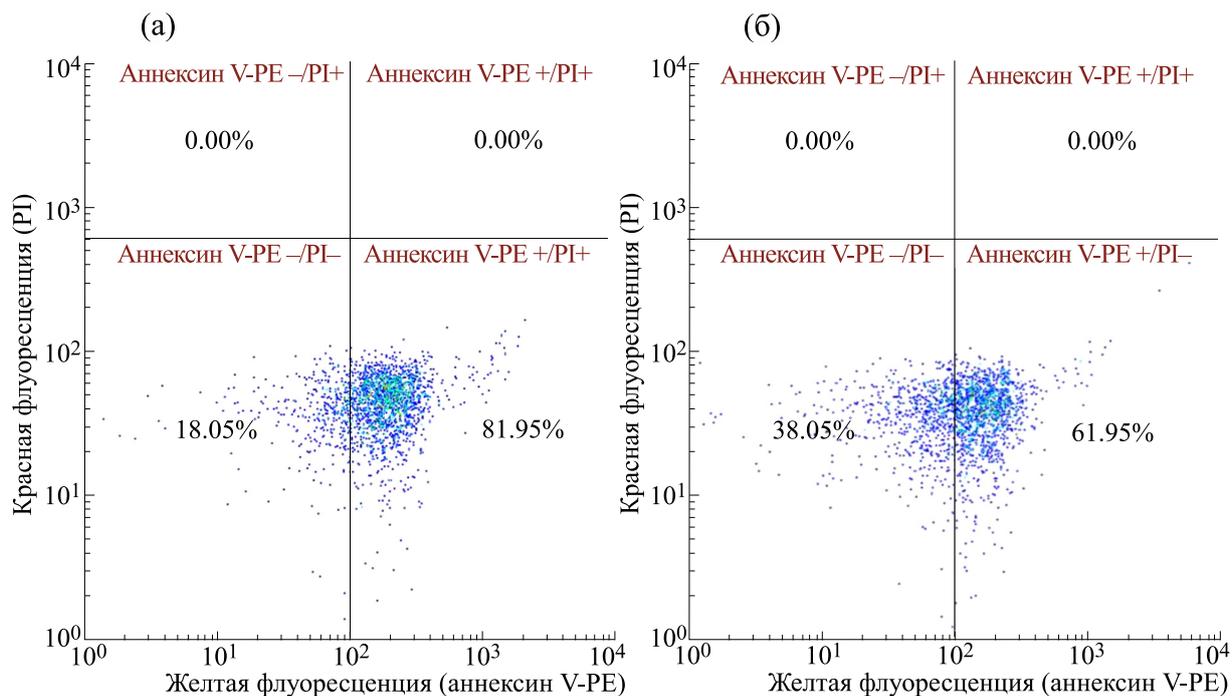


Рис. 2. Проточно-цитометрический анализ лимфоцитов после УФ-облучения в отсутствие (а) и в присутствии (б) циклоастратенола в концентрации 10^{-8} моль/л.

ных свободных клеток ($75 \pm 4\%$). Через 1 ч после обработки лимфоцитов пероксидом водорода в присутствии циклоастратенола (10^{-8} моль/л) также обнаружено снижение уровня повреждений ДНК до $45 \pm 3\%$ по сравнению с таковым для модифицированных свободных клеток ($68 \pm 3\%$).

Таким образом, нами выявлено апоптоз-ингибирующее действие циклоастратенола в концентрации 10^{-8} моль/л на лимфоциты в условиях воздействия УФ-света (1510 Дж/м^2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами установлено, что циклоастратенол (10^{-8} моль/л) снижает интенсивность процессов апоптотической клеточной гибели лимфоцитов человека, индуцированной воздействием УФ-света (254 нм , 1510 Дж/м^2). В условиях модификации иммуноцитов пероксидом водорода (10^{-5} моль/л) наблюдается тенденция к увеличению количества живых лимфоцитов и снижению уровня клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза в присутствии исследуемого соединения. Выявленные различия выраженности цитопротекторного эффекта циклоастратенола при действии двух факторов — индукторов клеточной гибели — могут быть связаны с неодинаковым вкладом механизмов и путей реализации апоптоза в процессы клеточной гибели при воздействии УФ-света и пе-

роксида водорода [24, 25]. Так, обработка лимфоцитов пероксидом водорода, в отличие от УФ-облучения, индуцирует активацию инициирующей каспазы-9, сопровождающуюся запуском митохондриального механизма апоптоза. В то же время уровень активности каспазы-12, связанной с инициацией апоптоза в условиях нарушения кальциевого гомеостаза, возрастает при действии УФ-света, но не изменяется после добавления к суспензии лимфоцитов пероксида водорода.

Обнаружено снижение уровня повреждений ДНК через 1 ч после УФ-облучения лимфоцитов и добавления пероксида водорода в присутствии циклоастратенола (10^{-8} моль/л) по отношению к таковому для модифицированных свободных клеток.

Цитопротекторное действие циклоастратенола в условиях воздействия на лимфоциты УФ-света и пероксида водорода связано со снижением уровня медиаторов апоптоза — активных форм кислорода и ионов кальция, а также с повышением уровня функциональной активности (возможно, и экспрессии) антиоксидантных ферментов — каталазы и глутатионредуктазы. Повышение активности каталазы в интактных и модифицированных лимфоцитах в присутствии циклоастратенола приводит, по всей вероятности, к снижению уровня пероксида водорода и других внутриклеточных активных форм кислорода. Активация глутатионредуктазы в иммуноцитах после воз-



Рис. 3. Схема процессов цитопротекторного эффекта циклоастренола по отношению к лимфоцитам: --- — через промежуточные стадии, □ — результаты собственных исследований.

действия пероксида водорода и УФ-облучения клеток в присутствии циклоастренола индуцирует процессы восстановления глутатиона — низкомолекулярного антиоксиданта, модулятора путей митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК), участвующей в запуске апоптоза. Снижение уровня клеточного восстановленного глутатиона ниже порогового уровня рассматривается как апоптотический сигнал, инициирующий активацию рецептора смерти или митохондриального апоптотического каскада [34].

Уменьшение уровня АФК в цитозоле, снижение интенсивности окислительной модификации белковых и липидных компонентов митохондриальных мембран и их стабилизация — один из путей ингибирования митохондриального механизма апоптоза.

Снижение уровня свободных ионов кальция в цитозоле иммунцитов в присутствии циклоастренола, обусловленное, вероятно, ингибированием входа Ca^{2+} в клетку из среды и его депонированием в эндоплазматическом ретикулуме, приводит к нивелированию («выключению») кальций-зависимых процессов реализации апоптотической гибели, протекающих в условиях УФ-облучения.

Цитопротекторное и апоптоз-ингибирующее действие циклоастренола связано и с повышением концентрации оксида азота в лимфоцитах до уровня 50 нмоль/л, при котором проявляются антиапоптотические эффекты NO. Торможение

процессов апоптоза с участием оксида азота может быть обусловлено активацией гуанилатциклазы, ингибированием каспаз за счет S-нитрозилирования или через цГМФ-зависимые механизмы, подавлением экспрессии проапоптотического гена *Bax* и повышением экспрессии антиапоптотических генов семейства *Bcl-2* [35, 36].

На основании анализа собственных экспериментальных и литературных данных [11, 14, 17–19] предложена схема реакций цитопротекторного эффекта циклоастренола по отношению к лимфоцитам (рис. 3).

Обращает на себя внимание тот факт, что цитопротекторное действие циклоастренола по отношению к лимфоцитам человека в условиях инициации клеточной гибели выявлено при его использовании в минимальной конечной концентрации — 10^{-8} моль/л, что обусловлено, вероятно, активацией сигнальных путей, регулирующих процессы программированной смерти иммунцитов и клеточного старения. Эти данные необходимо учитывать при применении циклоастренола в медицине в качестве биологически активной добавки для купирования патологических состояний организма, связанных с окислительным стрессом, воспалением, старением клеток. Снижение эффективности антиоксидантного и апоптоз-ингибирующего действия циклоастренола при повышении его концентрации может быть связано с модификацией им

структурного состояния липидных компонентов лимфоцитарных мембран, участвующих в образовании рафтов, ассоциированных с организующими центрами (платформами) сборки и активации апоптотических и сигнальных молекул, участвующих в клеточной гибели. В этой связи представляется необходимым проведение исследований, направленных на выявление возможных модифицирующих эффектов циклоастренола в более высоких концентрациях на структурно-функциональное состояние лимфоцитов.

Полученные нами данные расширяют современные представления о цитопротекторном и антиапоптотическом действии циклоастренола на лимфоциты крови человека в условиях воздействия факторов, индуцирующих процессы клеточной гибели и клеточного старения, особенно при УФ-облучении. Они могут использоваться при обсуждении вопросов, касающихся разработки новых способов регулирования процессов клеточной гибели иммуноцитов, а также выявления механизмов фото- и геропротекторного действия циклоастренола.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека» (Хельсинки, 1964 г., с поправками, внесенными в 1975–2000 гг.). Данное исследование одобрено Этическим комитетом по экспертизе биомедицинских исследований ВГУ, протокол № 42-02 от 17.06.2024 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Масютина А. М., Пашенков М. В. и Пинегин Б. В. Клеточное старение: механизмы и клиническое значение. *Иммунология*, **45** (2), 221–234 (2024). DOI: 10.33029/1816-2134-2024-45-2-221-234
2. Huang L., Zhang M., Bai D., and Qu Y. Deciphering the impact of TERT/telomerase on immunosenescence and T cell revitalization. *Front. Immunol.*, **15**, 1465006 (2024). DOI: 10.3389/fimmu.2024.1465006
3. Espino J., Pariente J. A., and Rodriguez A. B. Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **1**, 670294 (2012). DOI: 10.1155/2012/670294
4. Москалев А. А. Потенциальные геропротекторы – из лаборатории в клинику. *Биохимия*, **88** (11), 2101–2108 (2023). DOI: 10.31857/S0320972523110064
5. Proshkina E., Plyusnin S., Babak T., Lashmanova E., Maganova F., Koval L., Platonova E., Shaposnikov M., and Moskalev A. Terpenoids as potential geroprotectors. *Antioxidants (Basel)*, **9** (6), 529 (2020). DOI: 10.3390/antiox9060529
6. Proshkina E., Shaposnikov M., and Moskalev A. Genome-protecting compounds as potential geroprotectors. *Int. J. Mol. Sci.*, **21** (12), 4484 (2020). DOI: 10.3390/ijms21124484
7. Быков В. Н., Гребенюк А. Н. и Ушаков И. Б. Перспективы использования противолучевых средств для предотвращения эффектов, связанных со старением организма. *Радиаци. биол. Радиэкология*, **59** (5), 488–502 (2019). DOI: 10.1134/S0869803119050035
8. Chen T., Yang P., and Jia Y. Molecular mechanisms of astragaloside-IV in cancer therapy. *Int. J. Mol. Med.*, **47** (3), 13 (2021). DOI: 10.3892/ijms2024846
9. Dong M., Li J., Yang D., Li M., and Wei J. Biosynthesis and pharmacological activities of flavonoids, triterpene saponins and polysaccharides derived from *Astragalus membranaceus*. *Molecules*, **28** (13), 5018 (2023). DOI: 10.3390/molecules28135018
10. Ma P.-K., Wei B.-H., Cao Y.-L., Miao Q., Chen N., Guo C.-E., Chen H.-Y., and Zhang Y.-J. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of cycloastragenol, a potent telomerase activator in rats. *Xenobiotica*, **47** (6), 526–537 (2017). DOI: 10.1080/00498254.2016.1204568
11. He Y., Hu Z., Li A., Zhu Z., Yang N., Ying Z., He J., Wang C., Yin S., and Cheng S. Recent Advances in biotransformation of saponins. *Molecules*, **24** (13), 2365 (2019). DOI: 10.3390/molecules24132365
12. Yegorov Y. E., Poznyak A. V., Nikiforov N. G., Sobenin I. A., and Orekhov A. N. The Link between chronic stress and accelerated aging. *Biomedicines*, **8** (7), 198 (2020). DOI: 10.3390/biomedicines8070198
13. Березуцкий М. А., Якубова Л. Р., Дурнова Н. А., Романтеева Ю. В., Белоногова Ю. В., Комарова Е. Э. и Шереметьева А. С. Фармакологические свойства препаратов, созданных на основе экстракта астрагала (обзор). *Хим.-фармацевтич. журн.*, **54** (4), 20–25 (2020). DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-4-20-25
14. Yu Y., Zhou L., Yang Y., and Liu Y. Cycloastragenol: an exciting novel candidate for age-associated diseases. *Exp. Ther. Med.*, **16** (3), 2175–2182 (2018). DOI: 10.3892/etm.2018.6501
15. He M., Wang R., Che H., Wang H., Yang K., Zhang G., Jinchun Y., and Wang J. A comprehensive review of cycloastragenol: biological activity, mechanism of action and

- structural modifications. *Eur. J. Med. Chem. Rep.*, **5**, 100060 (2022). DOI: 10.1016/j.eimcr.2022.100060
16. Zheng X.-Y., Zhang Y.-H., Song W.-T., Chang D., and Liu J.-X. Research progress on the pharmacological mechanisms of chinese medicines that tonify qi and activate blood against cerebral ischemia/reperfusion injury. *World J. Tradit. Chinese Med.*, **8** (2), 225–235 (2022). DOI: 10.4103/wjtcn.wjtcn_21_21
17. Wang G., Ma C., Chen K., Wang Z., Qiu H., Chen D., He J., Zhang C., Guo D., Lai B., Zhang S., Huang L., Yang F., Yuan J., Chen L., He W., and Xu J. Cycloastragenol attenuates osteoclastogenesis and bone loss by targeting RANKL-induced nrf2/keap1/ARE, NF- κ B, calcium, and NFATc1 pathways. *Front. Pharmacol.*, **12**, 315–322 (2022). DOI: 10.3389/fphar.2021.810322
18. Zhao Y., Li Q., Zhao W., Li J., Sun Y., Liu K., Liu B., and Zhang N. Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium. *J. Ethnopharmacol.*, **169**, 210–218 (2015). DOI: 10.1016/j.jep.2015.04.030
19. Liu P., Zhao H., and Luo Y. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): a well-known chinese tonic. *Aging and disease*, **8** (6), 868–886 (2017). DOI: 10.14336/AD.2017.0816
20. Kulms D. and Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **16** (5), 195–201 (2000). DOI: 10.1034/j.1600-0781.2000.160501.x
21. Murahashi H., Azuma H., Zamzami N., Furuya K., Ikebuchi K., Yamaguchi M., Yamada Y., Sato N., Fujihara M., Kroemer G., and Ikeda H. Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J. Leukoc. Biol.*, **73** (3), 399–406 (2003). DOI: 10.1189/jlb.0702335
22. Шлапакова Т. И., Костин Р. К. и Тягунова Е. Е. Активные формы кислорода: участие в клеточных процессах и развитии патологии. *Биоорганич. химия*, **46** (5), 466–485 (2020). DOI: 10.31857/S013234232005022x
23. Алхаддад Л., Осипов А. Н. и Леонов С. В. Радиационно-индуцированное преждевременное старение опухолевых клеток. *Мед. радиология и радиац. безопасность*, **68** (2), 5–10 (2023). DOI: 10.33266/1024-6177-2023-68-2-5-10
24. Nakvasina M. A., Holyavka M. G., Artyukhov V. G., Radchenko M. S., and Lidokhova O. V. Mechanisms of UV-induced human lymphocytes apoptosis. *Biophys. Rev.*, **15** (5), 1257–1267 (2023). DOI: 10.1007/s12551-023-01142-w
25. Наквасина М. А., Артюхов В. Г. и Свекло Л. С. Механизмы гибели лимфоцитов человека, индуцированной УФ-излучением и активными формами кислорода. *Вестн. Воронежского гос. ун-та. Сер.: Химия. Биология. Фармация*, **1**, 61–74 (2023).
26. *Лимфоциты. Методы*. Под ред. Дж. Клауса (Мир, М., 1990).
27. Rastogi R. P., Singh S. P., Häder D. P., and Sinha R. P. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397** (3), 603–607 (2010). DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.006
28. Sun J., Zhang X., Broderick M., and Fen H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*, **3** (8), 276–284 (2003). DOI: 10.3390/s30800276
29. Bryan N. S. and Grisham M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.*, **43** (5), 645–657 (2007). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026
30. Hirst R. A., Harrison C., Hirota K., and Lambert D. G. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in whole cell suspensions using fura-2. *Methods Mol. Biol.* **312**, 37–45 (2005). DOI: 10.1385/1-59259-949-4:037
31. Наквасина М. А., Артюхов В. Г., Чурсанова Е. Н., Мячина О. В., Корпусова Е. И., Деенкова А. Ю. и Шестых В. А. Цитопротекторное и антиоксидантное действие ресвератрола на лимфоциты человека, модифицированные пероксидом водорода и УФ-светом. *Биофизика*, **69** (6), 1185–1194 (2024). DOI: 10.31857/S0006302924060056
32. Lin W., Yao H., Lai J., Zeng Y., Guo X., Lin S., Hu W., Chen J., and Chen X. Cycloastragenol confers cerebral protection after subarachnoid hemorrhage by suppressing oxidative insults and neuroinflammation via the SIRT1 signaling pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2022**, 3099409 (2022). DOI: 10.1155/2022/3099409
33. Куркин Д. В., Абросимова Е. Е., Бакулин Д. А., Ковалев Н. С., Дубровина М. А., Борисов А. В., Стрыгин А. В., Морковин Е. И. и Тюренков И. Н. Модуляция активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции. *Фармация и фармакология*, **10** (2), 130–153 (2022). DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-2-130-153
34. Circu M. L. and Aw T. Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823** (10), 1767–1777 (2012). DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.019
35. Рязанцева Н. В., Старикова Е. Г., Таширева Л. А., Степовая Е. А., Стариков Ю. В., Осихов И. А. и Новицкий В. В. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза. *Цитология*, **54** (2), 105–111 (2012).
36. Жигачева И. В. и Васильева С. В. Сигнальные функции оксида азота. *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии*, **3** (2), 64–68 (2018).

Cycloastragenol Exerts Antiapoptotic Effect on Human Lymphocytes under UV-Irradiation

**M.A. Nakvasina*, V.G. Artyukhov*, M.G. Holyavka*, I.A. Koltakov*,
E.I. Korpusova*, and N.G. Saraji***

**Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

Changes in the level of some markers of apoptosis (lipid asymmetry of plasma membranes, production of reactive oxygen species, nitric oxide, concentration of ionized calcium) of human blood lymphocytes modified by exposure to hydrogen peroxide (10^{-5} mol/l) and UV light (254 nm, 1510 J/m^2) in the presence of cycloastragenol (10^{-8} – 10^{-5} mol/l) were studied. The intensity of apoptotic lymphocyte death processes was found to decrease after UV-light exposure in the presence of cycloastragenol (10^{-8} mol/l). The cytoprotective effect of cycloastragenol on lymphocytes was found to be due to a decrease in the level of intracellular reactive oxygen species and calcium ions, an increase in the activity of catalase and glutathione reductase and nitric oxide production. Possible mechanisms of cycloastragenol action as a regulator of apoptotic death of lymphocytes induced by UV radiation and hydrogen peroxide exposure are discussed.

Keywords: lymphocytes, cycloastragenol, hydrogen peroxide, UV light, apoptosis