

Оригинальное исследование
УДК 615.322: 615.375: 616.5-001.1: 616.5-002.1: 616.5-002.2

ЭКСТРАКТ *TRIPTERYGIIUM WILFORDII* КАК РЕГУЛЯТОР СПОНТАННОЙ И СТИМУЛИРОВАННОЙ *IN VITRO* ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

И.А. Волчек^{1,2}, А.С. Теряев², О.В. Гладько¹, О.М. Реброва³, А.П. Мичурина², А.Г. Макарова¹

¹ Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». Москва, Россия

² ООО «Научно-исследовательский центр иммунологии и аллергологии». Москва, Россия

³ ООО «Маруга», научно-образовательный центр. Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Введение. Анализ средств традиционной, в первую очередь китайской, медицины является предметом пристального внимания современных разработчиков лекарственных субстанций. Одним из важных, часто используемых, растительных субстратов, является *Tripterygium Wilfordii*, который применяют в качестве противовоспалительного средства, в том числе, для лечения заболеваний кожи. Однако механизмы действия этого средства, в частности, при таком широко распространенном заболевании, как atopический дерматит, еще требуют исследования.

Цель работы. Изучение влияния экстракта *Tripterygium Wilfordii* на продукцию цитокинов *in vitro* в норме и у больных atopическим дерматитом.

Материалы и методы. В культуре мононуклеарных клеток, полученных от здоровых доноров и больных atopическим дерматитом, оценивали действие экстракта *Tripterygium Wilfordii* на спонтанный и индуцированный фитогемагглютинином, синтез IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ с помощью иммуноферментных тест-систем Cloud-Clone Corp. (CCC, Wuhan).

Результаты. Установлено, что уровень спонтанного синтеза цитокинов у больных atopическим дерматитом достоверно повышен, а ответ на митогенный стимул резко снижен, отсутствует или инвертирован. Экстракт *Tripterygium Wilfordii* во всех пробах, за исключением интактных клеток здоровых доноров, показал выраженный ингибирующий эффект.

Выводы. В условиях *in vitro* культивируемые мононуклеарные клетки больных atopическим дерматитом продуцируют большее количество IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ , что указывает на активацию цитокиновой функции. Экстракт *Tripterygium Wilfordii* обладает выраженным ингибирующим эффектом, особенно проявляющимся в отношении активированных клеток. Использование препаратов *Tripterygium Wilfordii* представляется целесообразным для перспективных фармацевтических субстанций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: atopический дерматит, цитокины, экстракт *Tripterygium Wilfordii*.

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ: Волчек Игорь Анатольевич, e-mail: igor.volchek@gmail.com

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Волчек И.А., Теряев А.С., Гладько О.В., Реброва О.М., Мичурина А.П., Макарова А.Г. Экстракт *Tripterygium Wilfordii* как регулятор спонтанной и стимулированной *in vitro* продукции цитокинов при atopическом дерматите // Вестник Медицинского института непрерывного образования. — 2023. — Т. 3, № 3. — С. 8–13. — DOI 10.36107/2782-1714_2023-3-3-8-13.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ: Научно-исследовательский центр иммунологии и аллергологии, целевое финансирование.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

TRIPTERYGIIUM WILFORDII EXTRACT AS A REGULATOR OF SPONTANEOUS AND IN VITRO STIMULATED CYTOKINE PRODUCTION IN ATOPIC DERMATITIS

I.A. Volchek^{1,2}, A.S. Teryaev², O.V. Gladko¹, O.M. Rebrova³, A.P. Michurina², A.G. Makarova¹

¹ Medical Institute of Continuing Education of the Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia

² Research Center for Immunology and Allergology, Moscow, Russia

³ Scientific and Educational Center "Maruga", Moscow, Russia

ABSTRACT

Background. The analysis of traditional, primarily Chinese, medicine is the subject of close attention of modern medicinal substances developers. One of the important, frequently used plant substrates is Tripterygium Wilfordii, which is used as an anti-inflammatory agent, including for the treatment of skin diseases. However, the mechanisms of action of this agent, particularly in such a widespread disease as atopic dermatitis, still need to be investigated.

Purpose. To study of the effect of Tripterygium Wilfordii extract on in vitro cytokine production in normal and atopic dermatitis patients.

Materials and methods. In a culture of the effect of Tripterygium Wilfordii extract on spontaneous and phytohemagglutinin-induced synthesis of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ was evaluated in mononuclear cells culture obtained from healthy donors and patients with atopic dermatitis using enzyme immunoassay test systems Cloud-Clone Corp. (CCC, Wuhan)

Results. It was found that the level of spontaneous cytokine synthesis in patients with atopic dermatitis was significantly increased, while the response to the mitogenic stimulus was sharply reduced, absent or inverted. Tripterygium Wilfordii extract in all samples, except for intact cells of healthy donors, showed a pronounced inhibitory effect.

Conclusions. Under in vitro conditions, cultured mononuclear cells of patients with atopic dermatitis produce a greater amount of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ , which indicates the activation of the cytokine function. Tripterygium Wilfordii extract has a pronounced inhibitory effect, especially on activated cells. The use of Tripterygium Wilfordii extracts seems reasonable for promising pharmaceutical substances.

KEYWORDS: atopic dermatitis, cytokines, Tripterygium Wilfordii extract.

CORRESPONDENCE: Igor Anatolievich Volchek, e-mail: igor.volchek@gmail.com

FOR CITATIONS: Volchek I. A., Teryaev A. S., Gladko O. V., Rebrova O. M., Michurina A. P., Makarova A. G. Tripterygium Wilfordii extract as a regulator of spontaneous and in vitro stimulated cytokine production with atopic dermatitis. Bulletin of the Medical Institute of Continuing Education. — 2023. — V. 3, № 3. — P. 8–13. — DOI 10.36107/2782-1714_2023-3-3-8-13.

FUNDING SOURCE: Research Center for Immunology and Allergology, targeted funding.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST: The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

ВВЕДЕНИЕ

Не секрет, что atopический дерматит является иммунопатологическим заболеванием. Издревле для лечения atopического дерматита используются средства традиционной медицины, в частности, Трёхкрыльник Вильфорда (*Tripterygium Wilfordii*; léi gōng téng; 雷公藤; Лоза Бога Грома), однако иммунологический механизм его действия до сих пор требует изучения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы явилось изучение влияния экстракта *Tripterygium Wilfordii* на продукцию цитокинов in vitro в норме и у больных atopическим дерматитом.



Рис. 1. Трёхкрыльник Вильфорда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в культуре клеток здоровых доноров ($n=10$, группа «контроль») и больных atopическим дерматитом ($n=12$, группа АД). Группу АД составили 12 пациентов, мужчин, в возрасте 26–38 лет, средней степени тяжести заболевания и ограниченно-локализованной формой патологического процесса. Исследования производили в начале фазы обострения заболевания. Оценка тяжести течения atopического дерматита происходила полуколичественным методом по индексу SCORAD [1].

Из периферической крови обследованных при помощи градиентного центрифугирования [2] выделяли мононуклеарные клетки, которые в концентрации 2×10^6 /мл культивировали в течение 36 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . В часть проб дополнительно вносили неспецифический митоген — ФГА (фитогемагглютинин П, РНА Р, Sigma).

В часть других проб, с или без ФГА добавляли экстракт *Tripterigium Wilfordii* (10 мкг/мл) производства компании «Научно-исследовательский центр аллергологии и иммунологии» (Москва).

По окончании культивирования в супернатантах определяли уровень IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ с помощью иммуоферментных тест-систем Cloud-Clone Corp. (CCC, Wuhan). Исследования осуществляли по протоколам производителя. Чувствительность исследований (The limits of detection — LOD) для отдельных тестов были следующими: IL-2 — 0,51 пг/мл, диапазон определения: 1,56–100 пг/мл; IL-4 — 3 пг/мл, диапазон определения: 7,8–500 пг/мл; IL-6 — 0,31 пг/мл, диапазон определения: 0,78–50 пг/мл; IL-10 — 2,3 пг/мл, диапазон определения: 7,8–500 пг/мл; IL-17 — 5,5 пг/мл, диапазон определения: 15,6–1000 пг/мл; TNF α — 0,52 пг/мл, диа-

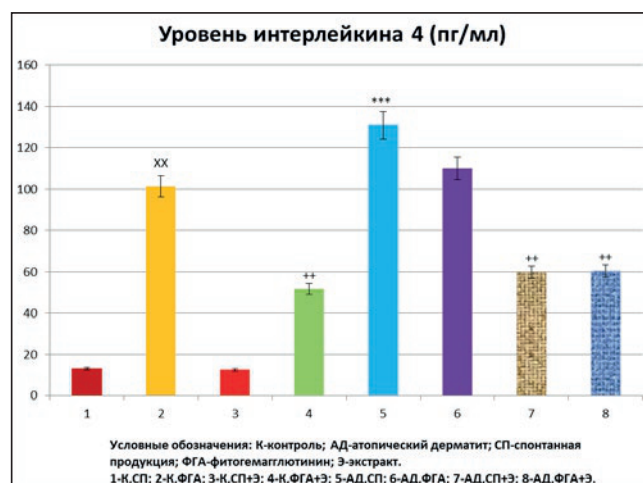
пазон определения: 1,56–100 пг/мл; IFN- γ — 6,1 пг/мл, диапазон определения: 15,6–1000 пг/мл.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы «Statistica-7».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные данные представлены на рисунках 1–7.

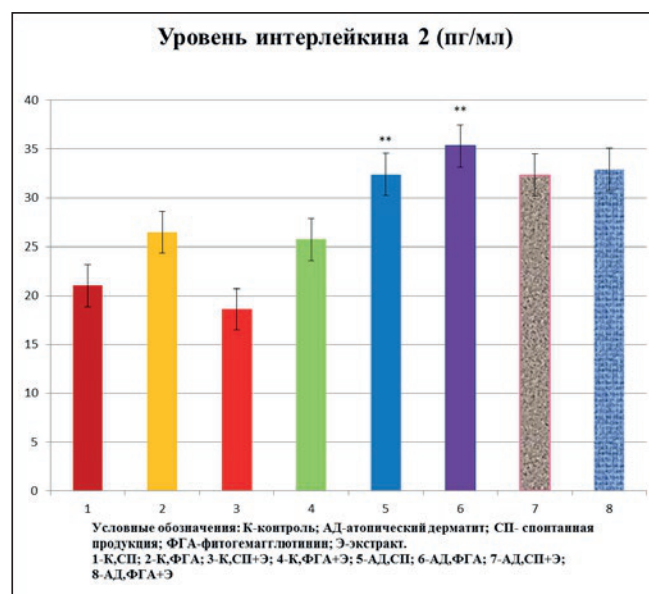
Как видно из рис. 1, как спонтанная, так и стимулированная концентрация IL-2 у больных АД была повышена ($P \leq 0,05$). При этом явных изменений в ответ на ФГА не обнаружено. У здоровых доноров при видимых отчетливых изменениях уровня этого цитокина, достоверно-



Примечание:

*** ($P \leq 0,01$) — достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (контроль).
++ ($P \leq 0,05$) — достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем без добавления экстракта *Tripterigium Wilfordii* (экстракт).
XX ($P \leq 0,01$) — достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем до стимуляции ФГА

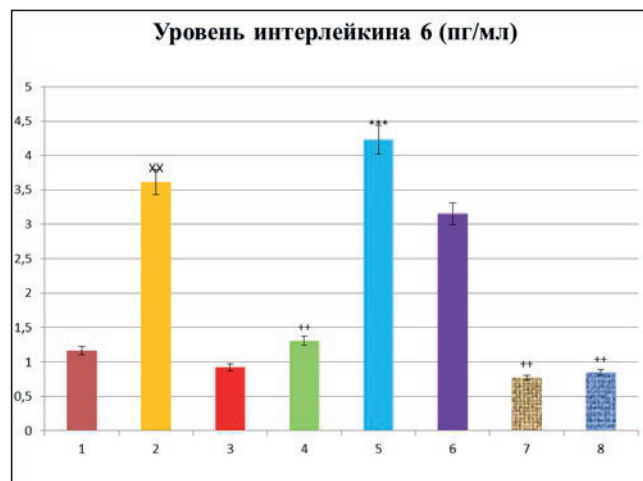
Рис. 2.



Примечание:

** ($P \leq 0,05$) — достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (контроль).

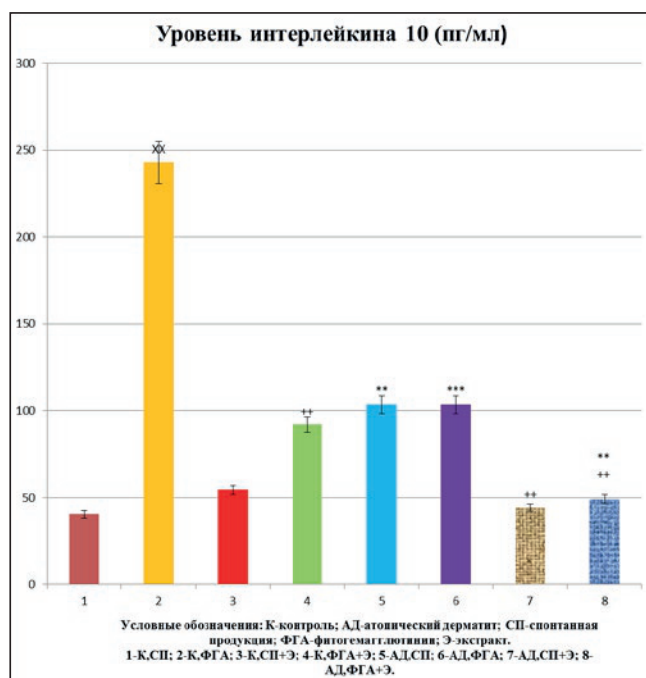
Рис. 1.



Примечание:

*** ($P \leq 0,01$) — достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (контроль).
++ ($P \leq 0,05$) — достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем без добавления экстракта *Tripterigium Wilfordii* (экстракт).
XX ($P \leq 0,01$) — достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем до стимуляции ФГА

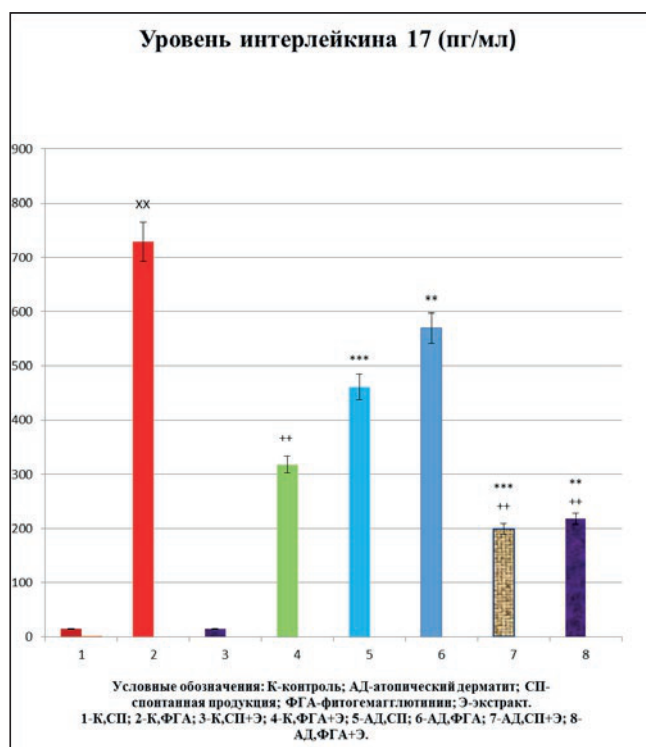
Рис. 3.



Примечание:

** ($P \leq 0,05$), *** ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (контроль).
 ++ ($P \leq 0,05$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем без добавления экстракта *Tripterigium Wilfordii* (экстракт).
 XX ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем до стимуляции ФГА

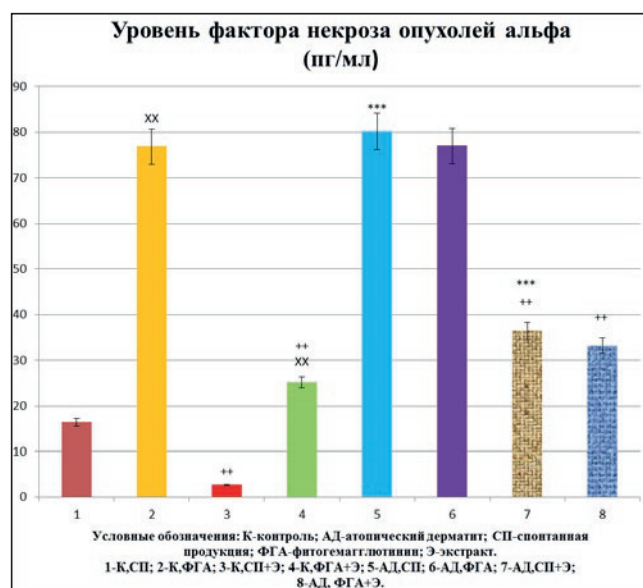
Рис. 4.



Примечание:

** ($P \leq 0,05$), *** ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (контроль).
 ++ ($P \leq 0,05$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем без добавления экстракта *Tripterigium Wilfordii* (экстракт).
 XX ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем до стимуляции ФГА

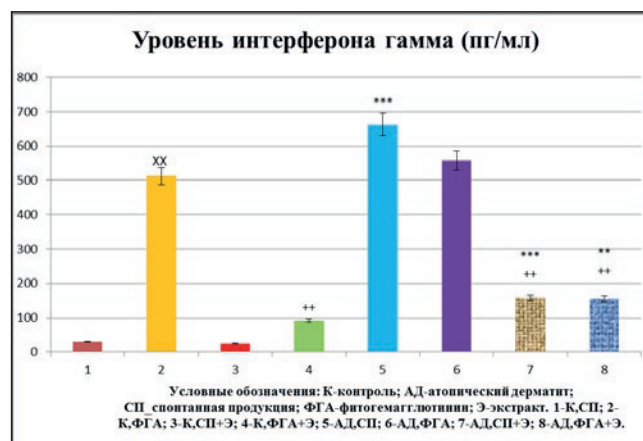
Рис. 5.



Примечание:

*** ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (контроль).
 ++ ($P \leq 0,05$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем без добавления экстракта *Tripterigium Wilfordii* (экстракт).
 XX ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем до стимуляции ФГА

Рис. 6.



Примечание:

*** ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (контроль).
 ++ ($P \leq 0,05$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем без добавления экстракта *Tripterigium Wilfordii* (экстракт).
 XX ($P \leq 0,01$) – достоверность различия по сравнению с аналогичным показателем до стимуляции ФГА

Рис. 7.

сти различий не определено. Также не были достоверны результаты действия экстракта, несмотря на очевидную ингибирующую тенденцию.

При исследовании продукции ИЛ-4 реакции были более выражены. У здоровых доноров — достоверный ответ на ФГА и достоверное снижение ответа стимулированных клеток при добавлении экстракта. У больных АД спонтанный синтез ИЛ-4 достоверно, по сравнению с контролем, повышен. Стимуляция ФГА парадоксально вызывала снижение уровня цитокина, однако при ста-

тистической обработке эти изменения оказались недостоверными. Тем не менее, реакции интактных и стимулированных клеток больных в ответ на экстракт были однозначно достоверны и выражались в резком снижении синтеза интерлейкина 4.

Картина изменений уровня интерлейкина 6 практически повторяет таковую у интерлейкина 4. Достоверная стимуляция синтеза в ответ на ФГА и ингибция в ответ на экстракт в контрольной группе, инверсия ответа на ФГА на фоне исходно высокого спонтанного синтеза и достоверное торможение продукции цитокина у больных АД.

Диаграмма синтеза интерлейкина 10 в группе контроля принципиально мало отличается от таковых для IL-4 и IL-6. У больных отмечен изначально высокий по сравнению с контролем синтез цитокина ($P \leq 0,05$), причем реакция на ФГА практически не проявлялась. Введение экстракта в культуру достоверно ингибировало синтез IL-10 в обеих группах.

Кривые изменений уровня интерлейкина 17, фактора некроза опухолей альфа и интерферона гамма у здоровых доноров и больных не отличалась от таковых для других цитокинов (рис. 5–7). У больных atopическим дерматитом отмечено недостоверное увеличение уровня IL-17 в ответ на ФГА (рис. 5). В отношении всех цитокинов отмечено достоверное выраженное ингибирующее действие экстракта *Tripterygium Wilfordii*.

Таким образом, изменения синтеза изучаемых цитокинов в целом имели похожие тенденции. Обращает на себя внимание высокий уровень спонтанного синтеза всех тестируемых цитокинов клетками больных atopическим дерматитом. При этом реакция в ответ на стимуляцию фитогемагглютинином была весьма неоднозначна: отсутствовала (IL-10), имела тенденцию к повышению (IL-2, IL-17), либо была инвертирована (снижена) (IL-4, IL-6, TNF α , IFN γ). Однако данные изменения оказались недостоверны, что указывает на необходимость продолжения исследований. Ответ на введение экстракта *Tripterygium Wilfordii* был однозначен во всех группах и проявлялся в выраженном торможении синтеза цитокинов при обработке клеток ФГА у здоровых доноров и, вне зависимости от стимуляции, у больных atopическим дерматитом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гиперактивация цитокиновой функции при АД отмечена многими авторами [3, 4]. Данное явление имеет сложный, до сих пор до конца не выясненный механизм, который, однако, несомненно связан с нарушением сети взаимодействий между клетками кожи и собственно эффекторами иммунитета, системы распознавания антигенов. В результате, как это известно при многих патологических состояниях инфекционной и неинфекционной природы [5], иммунная система находится в состоянии постоянного напряжения, когда вероятность срывов и ошибок иммунных реакций многократно возрастает. Здесь напрашивается прямая аналогия с психоневрологическими реакциями на фоне хронического стресса. Косвенно данное состояние системы иммунитета под-

тверждается полученными данными относительно сниженных, или инвертированных реакций мононуклеаров больных АД на митогенный стимул.

Что касается действия экстракта трехкрыльника Вильфорда, то препарат проявил стабильно ингибирующее действие в отношении синтеза всех исследованных цитокинов. Однако, и это представляется особенно важным, действие экстракта проявлялось лишь в отношении активированных клеток: у доноров — при стимуляции ФГА, у больных — во всех случаях и в отношении всех цитокинов. Это подтверждает предположение о поликлональной активации системы иммунитета при atopическом дерматите, а также предполагает универсальный механизм действия препаратов *Tripterygium Wilfordii* в отношении активированных клеток. Среди биологически активных веществ, полученных из данного растения, наиболее известны и изучены триптолид и целастрол [6]. Эти вещества в целом проявляют сходную фармакологическую активность (противовоспалительную, противораковую, нейропротекторную, антидиабетическую). Одним из известных механизмов противовоспалительной активности триптолида является ингибирование сигнальных путей NF- κ B, индуцированных TNF и TLR4. Целастрол значительно подавляет воспаление за счет снижения секреции IL-1 β и IL-18, ингибирует дифференцировку клеток Th17, усиливает выработку Treg-клеток, ограничивая активацию STAT3 [6, 7]. Однако данные вещества в чистом виде обладают значительной токсичностью, что затрудняет их применение [8]. Не подлежит сомнению тот факт, что само растение содержит значительно большее число биологически активных соединений, находящихся в эволюционно созданном равновесии, и модулирование этого состава может, в том числе, приводить к снижению и/или нивелированию токсических проявлений. Известно, например, что препараты другого средства традиционной медицины — дудника амурского, выделенные с помощью разных методических приемов, отличаются в направлении и выраженности биологического эффекта [9]. Отсюда напрашивается вывод о целесообразности дальнейшего изучения именно комплексного, тысячекратными испытанным природного препарата, а также действия экстрактов, полученных различными методами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях *in vitro* культивируемые мононуклеарные клетки больных atopическим дерматитом спонтанно продуцируют достоверно, по сравнению с контролем, большее количество IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ . В ответ на митогенную стимуляцию ФГА ответ МНК отсутствует, резко снижен или инвертирован, что предполагает исходную гиперактивацию иммунных функций.

Экстракт *Tripterygium Wilfordii* во всех опытах показал выраженный ингибирующий эффект, который, однако, проявлялся лишь в отношении активированных клеток.

Использование препаратов *Tripterygium Wilfordii* представляется целесообразным для перспективных фармацевтических субстанций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1993;186(1):23-31. doi: 10.1159/000247298. PMID: 8435513.
2. Практикум по иммунологии: учеб. пособие / Под ред. И. А. Кондратьевой, В. Д. Самуилова. — М. — Изд-во МГУ. — 2001. — 224 с.
3. Sugaya M. The Role of Th17-Related Cytokines in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 15;21(4):1314. doi: 10.3390/ijms21041314. PMID: 32075269; PMCID: PMC7072946.
4. Schuler C.F. 4th, Billi A.C., Maverakis E., Tsoi L.C., Gudjonsson J.E. Novel insights into atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2023 May;151(5):1145-1154. doi: 10.1016/j.jaci.2022.10.023. Epub 2022 Nov 22. PMID: 36428114; PMCID: PMC10164702.
5. Dutta K., Friscic J., Hoffmann M.H. Targeting the tissue-composome for curbing inflammatory disease. *Semin Immunol*. 2022 Mar;60:101644. doi: 10.1016/j.smim.2022.101644. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35902311.
6. Chen S.R., Dai Y., Zhao J., Lin L., Wang Y., Wang Y. A Mechanistic Overview of Triptolide and Celastrol, Natural Products from *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Front Pharmacol*. 2018 Feb 14;9:104. doi: 10.3389/fphar.2018.00104. PMID: 29491837; PMCID: PMC5817256.
7. Song J., He G.N., Dai L. A comprehensive review on celastrol, triptolide and triptonide: Insights on their pharmacological activity, toxicity, combination therapy, new dosage form and novel drug delivery routes. *Biomed Pharmacother*. 2023 Jun;162:114705. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114705. Epub 2023 Apr 14. PMID: 37062220.
8. Luo Y.M., Yang S.D., Wen M.Y., Wang B., Liu J.H., Li S.T., Li Y.Y., Cheng H., Zhao L.L., Li S.M., Jiang J.J. Insights into the mechanisms of triptolide nephrotoxicity through network pharmacology-based analysis and RNA-seq. *Front Plant Sci*. 2023 Mar 7;14:1144583. doi: 10.3389/fpls.2023.1144583. PMID: 36959927; PMCID: PMC10027700.
9. Волчек И.А., Теряев А.С. Влияние экстрактов дудника амурского (*Angelica amurensis*) на синтез цитокинов in vitro // Вестник медицинского института непрерывного образования. — 2023 — Т. 3. — № 2. — С. 8–3. — EDN AKJOTJ. DOI: 10.36107/2782-1714_2023-3-2-8-13

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Волчек Игорь Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии медицинского института непрерывного образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования. «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». Главный научный сотрудник научно-исследовательского центра иммунологии и аллергологии. Москва, Россия. ORCID 0009-0000-1451-6145, SPIN-код: 6743-2105, AuthorID: 740245

Теряев Андрей Сергеевич, генеральный директор научно-исследовательского центра иммунологии и аллергологии. Москва, Россия. ORCID 0009-0005-8393-2093, SPIN-код: 6743-2105, AuthorID: 740245

Гладько Олег Викторович, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ». Москва, Россия. ORCID 0009-0001-1798-7919

Реброва Ольга Михайловна, научный консультант ООО «Маруга», научно-образовательный центр «marugaEducation», Москва, Россия. ORCID 0009-0000-4593-7065, SPIN-код 8689-8485

Мичурина Анна Павловна, консультант НИЦ иммунологии и аллергологии. Москва, Россия. ORCID 0009-0008-4432-2569

Макарова Анастасия Геннадьевна, ассистент кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии Медицинского института непрерывного образования ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ». Москва, Россия. ORCID 0000-0001-7562-4422

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Волчек И.А. — теоретическое обоснование, практическое осуществление лабораторных исследований

Теряев А.С. — разработка и практическое осуществление получения тестируемых фармацевтических субстанций

Гладько О.В. — обоснование исследования и подбор клинического материала

Реброва О.М. — подбор клинического материала, непосредственное осуществление работы, обследование и наблюдение пациентов

Мичурина А.П. — анализ клинического материала, тестирование биологической активности препаратов, непосредственное исполнение лабораторных исследований

Макарова А.Г. — технические работы, подбор материала

ПОСТУПИЛА: 03.07.2023

ПРИНЯТА: 15.08.2023

ОПУБЛИКОВАНА: 25.09.2023