

Оригинальное исследование

УДК 615.275.3: 615.276: 615.322: 615.324: 615.357: 615.375: 571.27.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА *TRIPTERYGIUM WILFORDII* НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЯНУС КИНАЗЫ 1 В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

И.А. Волчек^{1,3}, А.С. Теряев³, О.В. Гладко¹, В.Г. Новоженков²¹ Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Москва, Россия² Филиал Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Москва, Россия.³ ООО «Научно-исследовательский центр иммунологии и аллергологии», Москва, Россия.

АННОТАЦИЯ

Введение. Растение *Tripterygium Wilfordii* является одним из важных компонентов традиционной китайской медицины. Современные исследования позволили выявить противовоспалительные, противовопухолевые, регулирующие метаболизм свойства данного растения. Получены и химически охарактеризованы некоторые компоненты *Tripterygium Wilfordii*. Исследуются молекулярные механизмы их действия, однако изучение суммарных экстрактов *Tripterygium Wilfordii* пока проводится редко.

Цель работы. Исследование влияния экстракта *Tripterygium wilfordii* на экспрессию JAK1-киназы и продукцию интерлейкина 6 в мононуклеарных клетках человека.

Материалы и методы. В культуре клеток здоровых доноров определяли влияние различных концентраций экстракта *Tripterygium wilfordii* на уровень спонтанной и стимулированной фитогемагглютинином экспрессии JAK-1 и синтез интерлейкина 6.

Результаты. Под действием ФГА наблюдалась индукция экспрессии JAK1-киназы, уровень которой достоверно повышался по сравнению с отрицательным контролем. Использование экстракта в концентрации 1 мкг достоверно снижало уровень фермента, при использовании меньших концентраций наблюдалась тенденция к снижению, но при статистической обработке эти изменения оказались недостоверны. Полученные результаты положительно коррелировали с изменениями синтеза JAK1/JAK2-зависимого интерлейкина 6.

Выводы. Экстракт *Tripterygium wilfordii* оказывает дозозависимый ингибирующий эффект в отношении синтеза мононуклеарными клетками человека янус киназы 1 in vitro, что коррелирует с торможением продукции JAK1/JAK2-зависимого интерлейкина 6.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ингибиторы янус киназ, экстракт *Tripterygium Wilfordii*, цитокины

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

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Волчек И. А., Теряев А. С., Гладко О. В., Новоженков В. Г. Исследование влияния экстракта *Tripterygium wilfordii* на уровень экспрессии янус киназы 1 в культуре мононуклеарных клеток человека // Вестник Медицинского института непрерывного образования. — 2024. — Т. 4. — № 3. — С. 122–125. — DOI 10.36107/2782–1714_2024–4–3–122–125.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ: Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

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

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ: Данные текущего исследования можно получить по обоснованному запросу у корреспондирующего автора.

STUDY OF THE EFFECT OF *TRIPTERYGIUM WILFORDII* EXTRACT ON THE LEVEL OF JANUS KINASE 1 EXPRESSION IN HUMAN MONONUCLEAR CELL CULTURE

I.A. Volchek^{1,3}, A.S. Teryaev³, O.V. Gladko¹, V.G. Novozhenov²¹ Medical Institute of Continuing Education, Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia² Branch of Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Moscow, Russia³ Research Center for Immunology and Allergology, Moscow, Russia

ABSTRACT

Background. Tripterygium wilfordii is one of the important components of traditional Chinese medicine. Modern research has revealed the anti-inflammatory, antitumor, and metabolism-regulating properties of this plant. Some components of Tripterygium wilfordii were obtained and chemically characterized. The molecular mechanisms of their action are under study. However, studies of Tripterygium wilfordii total extracts are still rare.

Purpose. To examine the effect of Tripterygium wilfordii extract on JAK1-kinase expression and interleukin 6 production in human mononuclear cells.

Materials and methods. The effect of different concentrations of Tripterygium wilfordii extract on the level of spontaneous and phytohemagglutinin-stimulated JAK-1 expression and interleukin 6 synthesis was determined in cell cultures from healthy donors.

Results. The induction of JAK1-kinase expression was observed under the influence of PHA, the level of which significantly increased compared to the negative control. Using the extract at a concentration of 1 µg significantly reduced the level of the enzyme, a tendency to decrease when using lower concentrations was observed. However, these changes turned out to be statistically unreliable. The results obtained were positively correlated with changes in the synthesis of JAK1/JAK2-dependent interleukin 6.

Conclusions. Tripterygium wilfordii extract has a dose-dependent inhibitory effect on the synthesis of in vitro Janus kinase 1 by human mononuclear cells, which correlates with inhibition of JAK1/JAK2-dependent interleukin 6 production.

KEYWORDS: Janus kinase inhibitors, Tripterygium wilfordii extract, cytokines

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

FOR CITATIONS: Volchek I.A., Teryaev A.S., Gladko O.V., Novozhenov V.G. Study of the Effect of Tripterygium Wilfordii Extract on the Level Janus Kinase 1 Expression in Human Mononuclear Cell Culture // Bulletin of the Medical Institute of Continuing Education — 2024. — V. 4. — No. 3. — P. 122–125. — DOI 10.36107/2782-1714_2024-4-3-122-125.

FUNDING SOURCE: The authors declare no funding for research.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST: The authors declare that there are no explicit potential conflicts of interest related to the publication of this article.

DATA AVAILABILITY STATEMENT: Data from the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ВВЕДЕНИЕ

Tripterygium wilfordii, Лоза Бора грома, lei gōng teng (китайский: 雷公藤, японский: raikōtō), древнее средство традиционной китайской медицины, применяющееся для лечения болезней суставов, кожи, опухолей и пр. Исследованиями последних лет доказана высокая эффективность препаратов Tripterygium wilfordii при патологии аутоиммунного генеза [1, 2], в частности, модуляции синтеза цитокинов [3]. Из этого растения выделены и химически охарактеризованы по крайней мере три вещества — триптонид, триптолид и целастрол [4]. Показана их роль как ингибиторов сигнальных путей JAK/STAT [5]. В частности, целастрол ингибирует JAK1 и JAK2, а также STAT3 и STAT5 [5], однако влияние суммарного экстракта Tripterygium wilfordii на эти процессы, в частности, на процессы синтеза янус киназ, практически не изучено.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы явилось исследование влияния экстракта Tripterygium wilfordii на экспрессию JAK1-киназы в мононуклеарных клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение экстракта Tripterygium wilfordii.

В качестве исходного сырья использовали корни и траву Tripterygium wilfordii. Для экстрагирования материала использовали методы: водно-спиртовой экс-

тракции в циркуляционном экстракторе «Сокслет»; погружной ультразвуковой экстракции в водно-спиртовом растворе; ускоренной экстракции этанолом ASE (Accelerated solvent extraction).

Выделение мононуклеарных клеток.

Фракция мононуклеарных клеток из периферической крови (МНК) 3-х здоровых доноров получена путем выделения на градиенте плотности фиколла (Панэко, Россия) с $\rho=1,077$ по стандартной методике, с 2-кратной отмывкой от фиколла. После второй отмывки осадок клеток каждого донора был ресуспендирован в 1 мл среды RPMI-1640 (Панэко, Россия) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Biosera, Франция) и антибиотиками — пенициллином 50 Ед и стрептомицином 50 мкг (далее — полная среда), производили подсчет количества и жизнеспособности клеток в камере Горяева, с окраской 1% трипановым синим.

Индукция экспрессии JAK1-киназы под действием экстракта Tripterygium wilfordii.

Выделенные клетки каждого донора разводили полной средой до концентрации 2×10^6 в 1 мл и вносили по 200×10^5 в лунки 96-луночного планшета (Nunc, Дания). Из них: 8 лунок составили отрицательный контроль — спонтанная экспрессия JAK1; 8 лунок — положительный контроль — индуцированная экспрессия JAK1; 80 — лунки опыта. В качестве индуктора экспрессии JAK1-киназы использовали фитогемагглютинин (ФГА) в конечной концентрации 10 мкг/мл полной сре-

ды. Экстракт вносили в соответствующие лунки планшета в концентрациях 1 мкг, 100 нг и 10 нг в полной среде. Конечный объем среды во всех лунках — 250 мкл. Планшет помещали в условия влажной атмосферы с 5% CO₂ при 37 °C на 40 часов.

Определение концентрации JAK1-киназы в МПК.

Для определения экспрессии JAK1-киназы в МПК производили лизис клеток путем 3-кратного замораживания при -80 °C и последующего размораживания при 37°C, с последующим вымыванием внутриклеточных белков из клеток с поврежденной мембраной, 10-кратным ресуспендированием в лунках планшета. После ресуспендирования планшет оставляли на ровной поверхности на 30 мин для осаждения корпускулярных структур (фрагменты клеток). Данный метод выбран как один из стандартных методов лизиса [6].

Для исследования использовали супернатанты из лунок в объеме 100 мкл. Исследование концентрации JAK1 в супернатантах проводили методом ИФА на наборе CloneCloud (США-Китай) в строгом соответствии с инструкцией к набору. Детекцию результатов и расчеты проводили на планшетном ридере Multiskan FC при λ=450 нм, под управлением ПО SkanIt 3.1.

Кроме того, для дополнительного контроля результатов исследования в супернатанте определяли концентрацию JAK1/JAK2-зависимого цитокина интерлейкина 6 (IL-6). Анализ проводили на оборудовании фирмы SIEMENS с использованием набора реагентов для определения интерлейкина 6 (IL-6) IMMULITE 2000 той же фирмы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведения исследований получены данные, представленные на рис.1 и в табл.1 и 2.

Как видно из таблицы 1, при обработке клеток ФГА наблюдалась индукция экспрессии JAK1-киназы, уровень которой достоверно повышался по сравнению с отрицательным контролем. Использование экстракта в концентрации 1 мкг достоверно снижало уровень фермента, при использовании меньших концентраций наблюдалась тенденция к снижению, однако при статистической обработке эти изменения оказались недостоверны.



Рис. 1. Полученные результаты позволяют говорить о качественной работе ИФА-набора CloneCloud для определения уровня JAK-1 (коэффициент детерминации 0,9872, форма калибровочной кривой).

Таблица 1. Концентрации JAK1-киназы в опыте и контроле (M±sd)

K-	K+	1 мкг	100 нг	10 нг
0,15±0,01	0,23±0,01**	0,12±0,05*	0,15±0,07	0,14±0,04

* - статистически достоверно (P≤0,05) по сравнению с положительным контролем

** - статистически достоверно (P≤0,05) по сравнению с отрицательным контролем

Таблица 2. Уровень IL-6 (пг/мл) в исследуемых образцах

K-	K+	1 мкг	100 нг	10 нг
978,6±12	1654,2±17**	453,9±14**	1134,9±12*	1354,2±17*

* - статистически достоверно (P≤0,05) по сравнению с положительным контролем

** - статистически достоверно (P≤0,05) по сравнению с отрицательным контролем

Полученные результаты положительно коррелировали с изменениями синтеза JAK1/JAK2-зависимого интерлейкина 6 (IL-6), уровень которого достоверно повышался под действием ФГА, и после обработки МНК экстрактом достоверно снижался по сравнению с положительным контролем для всех использованных концентраций. Для концентрации 1 мкг изменения были достоверны и по сравнению с отрицательным контролем. То есть введение экстракта *Tripterygium wilfordii* в концентрации 1 мкг ингибировало даже спонтанную продукцию IL-6.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно [4], наиболее важными активными ингредиентами *Tripterygium wilfordii* являются триптолид, целастрол и триптонид.

Исследования in vivo и in vitro продемонстрировали, что эти три соединения обладают противовоспалительным, противоопухолевым и другими сопутствующими эффектами [4]. Экстракт *Tripterygium wilfordii* способен регулировать синтез цитокинов [3].

Молекулярные механизмы этих эффектов изучаются. Для вышеупомянутых компонентов *Tripterygium wilfordii* они многообразны и во многом различны, но в основном направлены на ингибирование внутриклеточных сигнальных путей транскрипционного фактора NF-κB (nuclear factor κB) [1], в том числе, через путь JAK-STAT.

Суммарное действие экстракта *Tripterygium wilfordii* на эти процессы изучено в меньшей степени, поэтому полученные предварительные данные о возможной ингибции синтеза янус киназы 1 веществами, содержащимися в данном растении, могут дать повод для более детального исследования экстрактов и поиска новых, ранее не обнаруженных продуктов.

Хочется, кроме того, указать, что, несмотря на очевидную коммерческую, производственную и фармацевтическую привлекательность работы с отдельными веществами, клиническое применение общего экстракта, содержащего сбалансированное миллионами лет эволюции соотношение действующих компонентов, может в

перспективе оказаться гораздо более эффективным и физиологичным, нежели отдельные химические вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования получены данные, свидетельствующие о

дозозависимом ингибирующем эффекте экстракта *Tripterygium wilfordii* в отношении синтеза мононуклеарными клетками человека янус киназы 1 *in vitro*, что коррелировало с торможением продукции JAK1/JAK2-зависимого интерлейкина 6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shan Y. et al. A comprehensive review of *Tripterygium wilfordii* hook. f. in the treatment of rheumatic and autoimmune diseases: bioactive compounds, mechanisms of action, and future directions // *Frontiers in Pharmacology*. — 2023. — Т. 14. — С. 1282610. doi: 10.3389/fphar.2023.1282610.
2. Chen Y. et al. Potential shared therapeutic and hepatotoxic mechanisms of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides treating three kinds of autoimmune skin diseases by regulating IL-17 signaling pathway and Th17 cell differentiation // *Journal of Ethnopharmacology*. — 2022. — Т. 296. — С. 115496. doi: 10.1016/j.jep.2022.115496. Epub 2022 Jun 21. PMID: 35750104.
3. 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.
4. 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 // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2023. — Т. 162. — С. 114705. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114705. Epub 2023 Apr 14. PMID: 37062220.
5. Fahmideh H. et al. The role of natural products as inhibitors of JAK/STAT signaling pathways in glioblastoma treatment // *Oxidative medicine and cellular longevity*. — 2022. — Т. 2022. — №. 1. — С. 7838583. doi: 10.1155/2022/7838583. PMID: 36193062; PMCID: PMC9526628.
6. <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/traditional-methods-cell-lysis.html#protein>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Волчек Игорь Анатольевич — д.м.н., профессор кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии МИНО ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»; главный научный сотрудник научно-исследовательского центра иммунологии и аллергологии. ORCID 0009-0000-1451-6145, SPIN-код: 6743-2105, AuthorID: 740245

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

Гладько Олег Викторович — к.м.н., доцент, доцент кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии МИНО ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)». ORCID 0009-0001-1798-7919.

Новоженков Владислав Григорьевич — д.м.н., профессор. Преподаватель кафедры терапии неотложных состояний Филиала федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова». ORCID 0009-0002-8037-3263, SPIN-код 5724-678, AuthorID 193286

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Волчек Игорь Анатольевич — теоретическое обоснование, практическое осуществление лабораторных исследований

Теряев Андрей Сергеевич — разработка и практическое осуществление получения тестируемых фармацевтических субстанций

Гладько Олег Викторович — обоснование исследования и подбор клинического материала

Новоженков Владислав Григорьевич — подбор клинического материала, непосредственное осуществление работы

ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ НА ПУБЛИКАЦИЮ: авторы получили письменное согласие пациентов на публикацию медицинских данных и фотографий.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ: проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации (Declaration Helsinki), соответствие протокола исследования этическим принципам было подтверждено Локальным этическим комитетом МИНО ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» (Москва, Волоколамское шоссе, дом 11, Москва, Россия), протокол № 3 от 05.09.2024 г.

ПОСТУПИЛА: 15.06.2024
ПРИНЯТА ПОСЛЕ РЕЦЕНЗИРОВАНИЯ: 17.08.2024
ОПУБЛИКОВАНА: 17.09.2024