

Л. В. Аникина, И. А. Толмачева, Ю. Б. Вихарев, В. В. Гришко

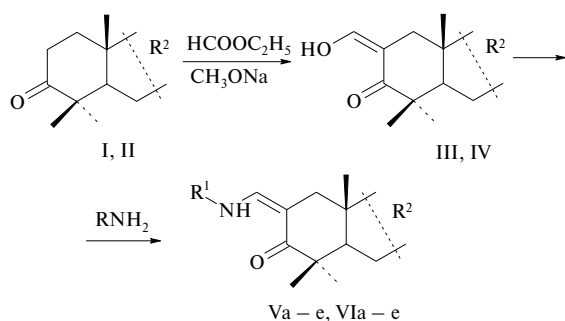
ВЛИЯНИЕ ЛУПАНОВЫХ И ОЛЕАНАНОВЫХ β -ЕНАМИНОКЕТОНОВ НА КОЛИЧЕСТВО И МОРФОЛОГИЮ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БЕЛОЙ КРОВИ

Институт технической химии УрО РАН, Пермь, Россия, cheminst@mpm.ru

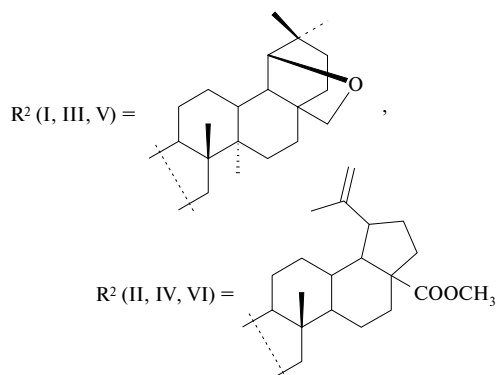
Изучена биологическая активность некоторых лупановых и олеанановых β -енаминокетон-ов. По данным сравнительного анализа лейкоцитарных реакций обе группы исследованных тритерпеновых производных обладают высокой биологической активностью при хроническом введении, а их иммуносупрессорная активность обусловливается токсическим действием на лимфоциты.

Ключевые слова: тритерпеноиды, бетулин, β -енаминокетоны, лейкоциты

Производные тритерпеноидов лупанового ряда обладают широким спектром биологических эффектов, среди которых преобладают цитостатический, противовирусный, иммуномодулирующий [1, 2]. Ранее нами установлено наличие иммунодепрессантной активности у ряда тритерпеновых β -енаминокетон-ов — 2-алкиламинометил-19 β ,28-эпоксиолеанан-3-онов Va – e [3] и метиловых эфиров 2-алкиламинометил-луп-20(29)-ен-28-овых кислот VIa – e [4], полученных на основе бетулина. В связи с выраженным иммуномодулирующим действием и малой острой токсичностью соединений Va – e, VIa – e представляло интерес изучить их влияние на систему крови, в частности на лейкоцитарные реакции, свидетельствующие о неспецифической резистентности организма. Настоящая работа посвящена исследованию влияния тритерпено-вых β -енаминокетон-ов на количество и морфологию лейкоцитов.



R¹ = (CH₃)₂CH– (а); C₆H₁₃– (б); C₈H₁₇– (в); C₆H₁₁– (г); C₁₈H₃₇– (д); C₆H₅CH₂– (е)

*Экспериментальная химическая часть*

Синтез олеанановых и лупановых аминопроизводных описан в работах [3, 4].

Экспериментальная биологическая часть

Исследование влияния соединений Va – e, VIa – e на количество и морфологию форменных элементов белой крови на фоне системного иммунного ответа проводили на беспородных белых мышах-самцах массой 22 – 24 г. Соединения вводили в дозе 100 мкг на мышь внутрибрюшинно 1 раз в сут в течение 14 сут [5] в виде тонкой суспензии в физиологическом растворе (0,9 % раствор натрия хлорида). При этом на 8 сут эксперимента мышей иммунизировали внутрибрюшинно эритроцитами барана в дозе $5 \cdot 10^6$ клеток в 0,2 мл физиологического раствора на мышь. Контрольной группе мышей вводили физиологический раствор. В эксперименте использовали также группу чистых животных, которые не подвергались никакому воздействию. Через 14 сут в периферической крови животных определяли общее число лейкоцитов, относительное и абсолютное количество всех лейкоцитарных форм и изменение морфологии клеток. Общее число лейкоцитов подсчитывали в камере Горяева, идентификацию лейкоцитарных форм проводили в мазках, окрашенных по Романовскому — Гимзе [6].

В каждой группе использовали по 8 – 10 мышей, результаты эксперимента обрабатывались статистически по критерию Стьюдента, разницу считали достоверной при $p \leq 0,05$ [7].

Результаты и их обсуждение

Установлено, что применение гидроксиметиленовых интермедиатов III и IV приводит к уменьшению относительного и абсолютного числа лимфоцитов и увеличению количества сегментоядерных нейтрофилов (табл. 1, 2). При этом наблюдается гиперсегментация ядер и вакуолизация цитоплазмы нейтрофилов, что в сочетании с установленным прежде [3] снижением числа ядросодержащих клеток в тимусе и селезенке свидетельствует о лимфотоксичности производных III и IV. Применение олеананового β -енаминокетона

Таблица 1

Влияние олеанановых производных (III, Va – e) на общее число лейкоцитов и количество лейкоцитарных форм в периферической крови мышей

Соединение *	Общее число лейкоцитов	Лейкоцитарные формы					
		лимфоциты	моноциты	эозинофилы	палочкоядерные нейтрофилы	сегментоядерные нейтрофилы	
III	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	4,56 ± 1,36	1,86 ± 0,28**	0,30 ± 0,14	0,00 ± 0,00**	0,21 ± 0,11	2,19 ± 0,93
	% ± m	100	48,40 ± 5,27**	5,00 ± 1,03	0,10 ± 0,10**	3,60 ± 0,82	42,90 ± 4,70**
Va	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	4,46 ± 0,80	2,04 ± 0,40	0,24 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0,24 ± 0,09	2,03 ± 0,51
	% ± m	100	46,60 ± 5,92**	4,70 ± 1,04	0,40 ± 0,22	3,40 ± 0,52	43,90 ± 5,34**
Vb	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	3,24 ± 0,58	1,68 ± 0,40	0,09 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,11 ± 0,02	1,44 ± 0,39
	% ± m	100	51,60 ± 5,18	3,60 ± 1,36	0,20 ± 0,20	3,40 ± 0,51	43,40 ± 7,14**
Vг	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	4,13 ± 0,53	2,94 ± 0,41	0,16 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,01	1,09 ± 0,03
	% ± m	100	71,00 ± 2,08	3,67 ± 0,88	0,33 ± 0,33	1,33 ± 0,33	2,70 ± 2,52
Vд	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	4,52 ± 0,44	2,22 ± 0,25	0,27 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,03	1,94 ± 0,36**
	% ± m	100	51,50 ± 5,64	6,00 ± 1,48	0,50 ± 0,31	1,70 ± 0,65	40,30 ± 5,35**
Чистые животные	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	5,44 ± 0,76	3,46 ± 0,60	0,25 ± 0,06	0,06 ± 0,02	0,11 ± 0,02	1,57 ± 0,22
	% ± m	100	60,40 ± 4,80	4,80 ± 0,96	1,20 ± 0,36	2,00 ± 0,42	31,70 ± 3,98
Контроль	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	4,20 ± 0,37	2,81 ± 0,37	0,24 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,02	1,06 ± 0,16
	% ± m	100	65,90 ± 5,27	5,80 ± 1,52	0,70 ± 0,26	2,40 ± 0,48	26,20 ± 3,94

* Относительное (% ± m) и абсолютное ($M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$) количество лейкоцитов,

** $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Va с изопропильным радикалом оказывает влияние только на процентное соотношение лимфоцитов и нейтрофилов, вызывая незначительные изменения в лейкоформуле, при этом в цитоплазме нейтрофилов регистрируется обильная и крупная зернистость. В то время как введение лупанового аналога VIa приводит к заметному снижению общего количества лейкоцитов за счет уменьшения числа лимфоцитов, что в комбинации с обнаруженным ранее [4] иммунодепрессивным

действием VIa позволяет говорить о лимфотоксичности данного соединения.

При введении соединения VIг с циклогексильным радикалом отмечается увеличение общего числа лейкоцитов за счет повышения количества лимфоцитов и моноцитов, хотя ранее [4] данное соединение не проявляло иммуностропной активности. При двухнедельном применении олеананового аналога Vг наблюдается массовая гибель подопытных мышей, несмотря на

Таблица 2

Влияние лупановых производных (IV, VIa – e) на общее число лейкоцитов и количество лейкоцитарных форм в периферической крови мышей

Соединение *	Общее число лейкоцитов	Лейкоцитарные формы					
		лимфоциты	моноциты	эозинофилы	палочкоядерные нейтрофилы	сегментоядерные нейтрофилы	
IV	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	7,08 ± 0,24	3,27 ± 0,27**	0,25 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,18 ± 0,06	3,34 ± 0,42**
	% ± m	100	46,60 ± 4,47**	3,60 ± 0,24	0,40 ± 0,24	2,60 ± 0,87	46,80 ± 4,85**
VIa	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	3,52 ± 0,24**	2,02 ± 0,13**	0,21 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,26 ± 0,12	1,17 ± 0,16
	% ± m	100	57,80 ± 3,25**	6,00 ± 0,32**	0,20 ± 0,20	3,60 ± 0,51**	32,60 ± 3,44
VIб	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	6,75 ± 0,27	4,18 ± 0,21	0,57 ± 0,06**	0,03 ± 0,01	0,13 ± 0,03	1,84 ± 0,31
	% ± m	100	62,63 ± 3,89	8,50 ± 0,78**	0,50 ± 0,19	2,00 ± 0,53	26,50 ± 3,63
VIв	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	5,29 ± 1,12	3,65 ± 0,93	0,26 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,03	1,24 ± 0,21
	% ± m	100	66,57 ± 2,72	5,71 ± 1,06	0,29 ± 0,18	2,57 ± 0,48	24,86 ± 2,36
VIг	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	10,58 ± 0,45**	7,42 ± 0,43**	0,61 ± 0,12**	0,03 ± 0,02	0,16 ± 0,03	2,78 ± 0,48
	% ± m	100	67,00 ± 3,45	5,75 ± 1,06	0,25 ± 0,16	1,50 ± 0,27	25,50 ± 3,42
Чистые животные	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	7,05 ± 0,46	4,81 ± 0,25	0,28 ± 0,05	0,10 ± 0,04**	0,14 ± 0,02	1,72 ± 0,34
	% ± m	100	69,63 ± 4,13	4,00 ± 0,63	1,38 ± 0,46**	2,25 ± 0,25	22,88 ± 4,02
Контроль	$M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$	7,68 ± 0,72	5,11 ± 0,43	0,28 ± 0,07	0,01 ± 0,01	0,15 ± 0,02	2,01 ± 0,37
	% ± m	100	67,38 ± 2,59	3,38 ± 0,60	0,13 ± 0,13	1,75 ± 0,16	27,38 ± 2,22

* Относительное (% ± m) и абсолютное ($M \cdot 10^9/\text{л} \pm m$) количество лейкоцитов;

** $p < 0,05$ по отношению к контролю.

то, что острая токсичность (LD_{50}) данного соединения свыше 1000 мг/кг [3].

Остальные аминопроизводные исследуемых рядов проявляют менее заметное влияние на лейкоцитарные реакции. Так, при введении соединения Vд наблюдается увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов, а при введении соединения VIб — повышение количества моноцитов, что сопровождается некоторым усилением их трофики — увеличением диаметра клеток.

Таким образом, на основании сравнительного анализа лейкоцитарных реакций можно сделать вывод, что обе группы исследованных тритерпеновых производных обладают высокой биологической активностью при хроническом введении, а их иммуносупрессорная активность обусловлена токсическим действием на лимфоциты.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Целевой программы междисциплинарных проек-

тов, выполняемых в содружестве учеными УрО и СО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, А. Г. Толстиков и др., *Биоорган. химия*, **32**(1), 42 – 55 (2006).
2. Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, А. Г. Толстиков и др., *Биоорган. химия*, **32**(3), 300 – 316 (2006).
3. И. А. Толмачева, Л. В. Аникина, Ю. Б. Вихарев и др., *Биоорган. химия*, **34**(1), 136 – 140 (2008).
4. И. А. Толмачева, Л. В. Аникина, Ю. Б. Вихарев и др., *Биоорган. химия*, **34**(4), 540 – 542 (2008).
5. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Фармкомитет МЗ РФ, Москва (2000).
6. *Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник*, В. В. Меньшиков (ред.), Медицина, Москва (1987).
7. М.-Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медицинская литература, Ленинград (1963).

Поступила 18.12.07

EFFECTS OF LUPANE AND OLEANANE β -ENAMINEKETONES ON THE AMOUNT AND MORPHOLOGY OF WHITE BLOOD CORPUSCLES

L. V. Anikina*, I. A. Tolmacheva, Yu. B. Vikharev, and V. V. Grishko

Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

*e-mail: cheminst@mpm.ru

Biological activity of some oleanane and lupane β -enamineketones has been studied. Comparative analysis of the data on leukocyte reactions showed that both groups of triterpene derivatives exhibit high biological activity upon chronic administration, while their activity in suppressing immune response depends on the lymphotoxicity.

Key words: triterpenoids, betulin, β -enamineketones, leukocytes.