

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности
«8D05101–Биология»

Даулет Гульданы Даулетовны

«Исследование миело- и лимфоцитопоздстимулирующей активности синтетических азотистых соединений при вторичных миелодепрессивных состояниях»

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертация посвящена исследованию изменений уровня клеток при вторичных циклофосфамид-индуцированных миелопоэз- и лимфоцитопозддепрессивных состояниях и поиску активных соединений среди новосинтезированных азотистых соединений, эффективных для восстановления уровня клеток в периферической крови и в лимфо-миелоидных органах при вторичных циклофосфамид-индуцированных миелопоэз- и лимфоцитопозддепрессивных состояниях.

Актуальность диссертационной работы. Президент Республики Казахстан Касым-Жомарт Кемелевич Токаев актуализировал и обозначил острую проблему развития фармакологических разработок собственных препаратов и внедрения их в производство с развитием фармацевтического рынка в стране. Одной из актуальных проблем является разработка препаратов с миелопоэз- и лимфоцитопоздстимулирующей активностью. Данное направление новое, не разработанное и актуально в силу увеличения процента больных людей со вторичными формами миелопоэз- и лимфоцитопозддепрессивных состояний. Также интерес возрос к данным препаратам в связи с применением в технологии получения онковакцин *in vitro*. Также представленный в терапевтической практике спектр препаратов очень ограничен и каждая группа препаратов обладает спектром тяжелых побочных эффектов.

Цель исследования. Целью работы являлось исследование изменений уровня клеток при вторичных циклофосфамид-индуцированных миелопоэз- и лимфоцитопозддепрессивных состояниях и поиск активных соединений среди новосинтезированных азотистых соединений, эффективных в восстановлении уровня клеток в периферической крови и в лимфо-миелоидных органах при вторичных циклофосфамид-индуцированных миелопоэз- и лимфоцитопозддепрессивных состояниях.

Задачи исследования:

1. Исследование вторичных циклофосфамид-индуцированных Т-лимфоцитодепрессивных состояний.
2. Исследование вторичных циклофосфамид-индуцированных В-лимфоцитодепрессивных состояний.
3. Выделение путем проведения первичного скрининга из новосинтезированных азотистых соединений с биспидиновыми, диеноновыми, пиразолопиридиновыми, пиперазиновыми, пиперидиновыми структурными ядрами и из жидких тримекаиновых ионных субстанций соединений с высокой гемостимулирующей активностью.
4. Анализ активности новосинтезированных соединений ВIV и TIC в восстановлении уровня Т-лимфоцитов в органах лимфо-миелоидного комплекса на фоне циклофосфамид-индуцированной Т-лимфоцитодепрессии.
5. Анализ активности новосинтезированных соединений ВIV и TIC в восстановлении уровня В-лимфоцитов в органах лимфо-миелоидного комплекса на фоне циклофосфамид-индуцированной В-лимфоцитодепрессии.
6. Исследование влияния соединений ВIV и TIC на костномозговой, спленоцитарный регенеративный миелоцитопозд при циклофосфамид-индуцированной миелодепрессии.

Объекты исследования. На исследование поступило 40 соединений под шифром БИВ: 32 соединений с биспидиновым, диеноновым, пиразолопиридиновым, пиперазиновым, пиперидиновым ядром в структуре (НИИ Химических наук им. А.Б. Бектурова) и 8 жидких тримекаиновых ионных соединений (КБТУ).

Объектами являлись белые беспородные крысы альбиносы из биологической клиники КазНУ имени аль-Фараби, мыши линии *C57BL6/J* закуплены в Charles River Laboratory (США) и размножены в Казахском научном центре карантинных и зоонозных инфекций им. Айкимбаева.

Использовали следующий биологический материал: периферическая кровь крыс альбиносов; костный мозг, тимус, селезенка мышей линии *C57BL6/J*; иммуноцитофлуорометрические метки: APC-CD117, APC-CD11b, PE-Ly-6C, PE-Ly6G, PerCP-Ter119⁺/CD71, APC-B220/CD45R, PE-CD43, PerCP-CD19, PE-MHCII, PE-CD40, PE-CD3e, FITC-CD4, PerCP-CD8a, PerCP-CD25, PE-FoxP3, PerCP-CD28, FITC-CD44. Исследовались субпопуляции клеток в костном мозге, тимусе и селезенке: CD117⁺ –гемопоэтические стволовые клетки; CD11b⁺Ly-6C⁺Ly6G⁺ – моноцитарно-гранулоцитарные лейкоциты; Ter119⁺/CD71⁺ – эритроидные клетки; B220/CD45R⁺CD43⁺CD19⁺ – Pro-B-I- и Pro-B-II-лимфоциты; B220/CD45R⁺CD43⁺CD19⁺ – Pre-B-I- и Pre-B-II- и транзиторные В-лимфоциты; B220/CD45R⁺CD19⁺ – незрелые В-лимфоциты; B220/CD45R⁺CD19^{+/mid} – MZB- и FO-B-лимфоциты; B220/CD45R⁺CD19⁺MHCII⁺ – В_{акт}-лимфоциты; B220/CD45R⁺CD19⁺CD40⁺ – В_{mem}-лимфоциты; CD43⁺ CD3e⁺CD19⁻ – Pre- T – лимфоциты; CD3e⁺CD4⁺ – Th-лимфоциты; CD3e⁺CD8a⁺ – CTL – лимфоциты; CD4⁺CD25⁺ – Th_{акт}-лимфоциты; CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ – T_{рег}-лимфоциты; CD28⁺ CD8a⁺ CD44⁺ – T_{mem}-лимфоциты.

Методы исследования. Для проведения первичного скрининга: метод исследования гемостимулирующей активности на модели циклофосфамид-индуцированной гемодепрессии (гематологический анализатор «MicroCC-20 Plus» (Китай)), цитологический контроль мазка периферической крови методом Гимза (микроскоп Micromed MP-3). Для проведения вторичного скрининга: метод оценки клеточности органов лимфо-миелоидного комплекса, иммуноцитофлуорометрический метод (цитофлуорометрический проточник FACSCalibur (BD Biosciences, США)).

Научная новизна исследования. На основании проведенных исследований впервые установлено, что циклофосфан вызывал значительное снижение уровня реактивных первичных и рециркулирующих T_{mem} – лимфоцитов в костном мозге (36,91 %) и селезенке (28 %), что может негативно отразиться в реактивности и полноценности вторичного T-клеточного иммунного ответа. Циклофосфан вызывал в 2 раза более значительное снижение уровня FoxP3⁺T_{рег}-лимфоцитов (48,08%) в селезенке, чем в тимусе (19,13%). Значительное снижение уровня FoxP3⁺T_{рег}-клеток вызывало значительное повышение уровня CTL-лимфоцитов (на 32,87%) в селезенке, что может вызвать тяжелые аутоиммунные заболевания и неконтролируемые иммунные реакции, вплоть до сепсиса. Также наблюдалось компенсаторное заселение тимуса рециркулирующими Th_{акт}-лимфоцитами (на 132,05%), что может привести к гиперреактивности иммунной системы. В отношении В-лимфоцитопозза циклофосфан также вызывал негативные последствия. Он вызывал практически полное опустошение герминативных центров от реактивных клеток: MHC class II – В_{акт}-лимфоцитов (на 74,83%) и В_{mem}-лимфоцитов (на 68,05%) в селезенке, что может вызывать опасное нивелирование активности гуморального иммунитета.

Впервые был проведен первичный скрининг 32 новосинтезированных азагетероциклических соединений и 8 тримекаиновых ионных жидких субстанции с выделением четырех соединений со средним уровнем и двух соединений с высоким уровнем гемостимулирующей активности.

Впервые установлено, что соединение ВIV (комплекс 5-бензил-7-(*o*-фторбензилиден)-2,3-бис(*o*-фторфенил)-3,3а,4,5,6,7-гексагидро-2*H*-пиразоло[4,3-*c*]пиридина с β-циклодекстрином) обладало выраженной миело- и лимфоцитопозэстимулирующей активностью, превышая

активность препарата Метилурацил. Соединение ВIV показало уникальную иммуномодулирующую активность в восстановлении уровня субпопуляций Т-лимфоцитов: повышая уровень Th_{act}^- , $FoxP3^+T_{reg}^-$, T_{mem} -лимфоцитов до физиологической нормы; снижая повышенный уровень СТЛ – лимфоцитов до показателя физиологической нормы. Соединение ВIV эффективно восстанавливало уровень В-лимфоцитарных клеток: Pre-B-I-, Pre-B-II-, незрелых В-, транзиторных В-, FO-B-, MZB-, MHC class II⁺ В-act, V_{mem} – лимфоцитов и умеренно восстанавливало уровень эритроцитарных, гранулоцитарных и моноцитарных клеток.

Впервые установлено, что соединение ТИС (ионная жидкость бромид N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-пропаргил-оксоэтанамониума) обладало высокой миело- и Т- и В-лимфоцитопозстимулирующей активностью, значительно превышая активность препарата Метилурацил.

Научно-практическая значимость. Диссертационная работа вносит вклад в фундаментальную иммунологию в раздел иммунодепрессивных состояний. Изучение миело- и лимфоцитопозстимулирующей активности у азотосодержащих соединений ТИС и ВIV вносит вклад в фундаментальную фармакологию в раздел лейкоцитостимулирующие препараты.

Результаты диссертационной работы имеют практический потенциал. Получено из МЮ РК Национального института интеллектуальной собственности 6 патентов на изобретения.

Соединение ВIV имеет перспективу в качестве препарата для терапии вторичных циклофосфамид-индуцированных миело- и лимфоцитодепрессивных состояний, так как обладало уникальной Т-лимфоцитомодулирующей активностью.

Соединение ТИС имеет перспективу в качестве препарата для терапии вторичных циклофосфамид-индуцированных миело- и В-лимфоцитодепрессивных состояний. Соединение ТИС имеет перспективу в разработке в качестве соединения, способного эффективно стимулировать повышение уровня T_{mem} -клеток памяти и СТЛ-цитотоксических лимфоцитов, что играет огромное значение в разработке онковакцин *in vitro*, применяемых для терапии раковых заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что циклофосфан вызывает значительное снижение $FoxP3^+T_{reg}^-$ регуляторных лимфоцитов в лимфо-миелоидных органах, в результате чего возрастает уровень СТЛ-цитотоксических лимфоцитов. Также циклофосфан вызывал снижение реактивных первичных и рециркулирующих Т-костимулированных клеток памяти и компенсаторное заселение тимуса рециркулирующими Th_{act} – активированными хелперами.

2. Циклофосфан вызывает критическое снижение MHC II⁺ - активированных В-лимфоцитов и рециркулирующих V_{mem} -лимфоцитов памяти в герментативных центрах селезенки.

3. Путем первичного фармакологического скрининга на гемоцитостимулирующую активность из 40 новосинтезированных азотистых азагетероциклических соединений выделены два активных соединения ВIV и ТИС.

4. Установлено, что комплекс 5-бензил-7-(*o*-фторбензилиден)-2,3-бис(*o*-фторфенил)-3,3а,4,5,6,7-гексагидро-2*H*-пиразоло[4,3-*c*]пиридина с β-циклодекстрином (ВIV) обладает уникальной иммуномодулирующей активностью в отношении Т-лимфоцитов. Он способен повышать уровень Th_{act} -активных хелперов, T_{mem} -клеток памяти и $FoxP3^+T_{reg}^-$ регуляторных лимфоцитов до физиологической нормы, что вызывало снижение уровня СТЛ-цитотоксических лимфоцитов до показателя физиологической нормы. Также соединение ВIV эффективно восстанавливало уровень В-лимфоцитов, эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов.

5. Установлено, что ионная жидкость бромид N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-пропаргил-оксоэтанамониума (ТИС) превышает активность соединения ВIV и препарата Метилурацил и способно быстро восстановить уровень всех Т- и В-лимфоцитарных субпопуляций клеток, эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов.

Основные результаты и выводы исследования:

1. Циклофосфамид оказывал существенное влияние на Т-лимфоцитопоз, вызывая в костном мозге выраженное (более 40%) снижение уровня с-kit-лимфоцитов, Pre-T-лимфоцитов (на 42 %) и рециркулирующих T_{mem} -лимфоцитов (на 37%); в селезенке приводил к достоверному снижению (более 20 %) общего уровня Т-лимфоцитов, в том числе рециркулирующих T_{mem} -лимфоцитов (на 28%) и $FoxP3^+T_{reg}$ -лимфоцитов (на 48%), сочетающемуся со значительным повышением уровня СТЛ-лимфоцитов (на 33%); в тимусе вызывал глубокое угнетение Т-лимфоцитопоза, выражающееся в значительном снижении уровня незрелых Т- лимфоцитов (на 83%), при этом умеренно повышая уровень Th_{act} -активированных хелперных клеток (на 32%).

2. Циклофосфамид оказывал существенное влияние на В-лимфоцитопоз, вызывая значительное снижение (на 34 – 54 %) уровней различных субпопуляций активно пролиферирующих В-лимфоцитов в костном мозге и селезенке (Pro-B-I- и Pro-B-II-, Pre-B-I-, Pre-B-II- и незрелые В-, транзиторные В-, FO-B и MZB), в селезенке вызывая значительное снижение уровня (на 68 – 75 %) различных субпопуляций зрелых В-лимфоцитов ($MHC-II^+$ активированных В- и V_{mem} -лимфоцитов).

3. В результате проведенного первичного скрининга 32 новосинтезированных азотистых азагетероциклических соединений с биспидиновыми, диеноновыми, пиразолопиперидиновыми, пиперазиновыми, пиперидиновыми структурными ядрами и 8 жидких тримекаиновых ионных субстанций отобраны 2 соединения (BIV и TIC) с высокой гемостимулирующей активностью на фоне циклофосфамид-индуцированной гемодепрессии. Соединения BIV и TIC превышали по активности препарата сравнения Метилурацил.

4. На фоне циклофосфамид-индуцированной миелодепрессии препараты BIV и TIC оказывали стимулирующее действие на субпопуляции Т-лимфоцитов (Th_{act} -, $FoxP3^+T_{reg}$ -, T_{mem} -лимфоцитов), повышая их уровень до физиологической нормы, и снижая повышенный уровень СТЛ - цитотоксических Т-лимфоцитов до физиологической нормы.

На фоне циклофосфамид-индуцированной миелодепрессии препарат TIC оказывал стимулирующее действие на субпопуляции Т-лимфоцитов (Th_{act} -, $FoxP3^+T_{reg}$ -, T_{mem} -лимфоцитов), повышая их уровень до физиологической нормы и вызывал повышение уровня СТЛ-цитотоксических Т-лимфоцитов.

5. На фоне циклофосфамид-индуцированной миелодепрессии комплекс 5-бензил-7-(*o*-фторбензилиден)-2,3-бис(*o*-фторфенил)-3,3а,4,5,6,7-гексагидро-2*H*-пиразоло[4,3-*c*]пиридина с β -циклодекстрином (БИВ-190 (BIV)) проявил выраженную В-лимфоцитопоз- стимулирующую активность, значительно превышающая активность метилурацила, которая выражалась в эффективном восстановлении уровней различных субпопуляций В-лимфоцитов: Pre-B-I-, Pre-B-II-, незрелых В-, транзиторных В-, FO-B, MZB, $MHC-II^+$ активированных В- и V_{mem} -лимфоцитов.

На фоне циклофосфамид-индуцированной миелодепрессии ионная жидкость бромид N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-пропаргил-оксоэтанамониума (БИВ-119 (TIC)) обладала более значительной В-лимфоцитопоз-стимулирующей активностью, чем препарат BIV.

6. На фоне циклофосфамид-индуцированной миелодепрессии соединения BIV и TIC обладали выраженной миелопоз-стимулирующей активностью, восстанавливая до физиологической нормы уровень эритроцитов, гранулоцитов и моноцитов в костном мозге и селезенке. Соединения BIV и TIC превышали по активности Метилурацил.

Личный вклад автора. Все основные результаты, описанные в диссертации, выполнены и собраны автором. Докторант полностью реализовал все поставленные задачи, собрал данные, провел статистическую обработку данных, построил графики, рисунки, провел описание и обсуждение полученных результатов с выводами.

Связь исследования с научными проектами. Данная диссертационная работа проводилась в рамках научно-исследовательских грантов AP08856051 «Направленная модификация полифункциональных азагетероциклов – производных пиперидина и пиперазина в

новые биоактивные молекулярные системы для сельского хозяйства и/или медицины» и AP08857345 «Бифункциональные ионные соединения: синтез и применение в медицинской химии и сельском хозяйстве» в рамках грантового финансирования научных исследований МНВО РК, в Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург, Россия), а также в Казахском государственном университете им. аль-Фараби.

- **Апробация работы.** Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях:

- «Science and education in the modern world: challenges of the XXI century» VII международная научно-практическая конференция. (Нур-Султан, Казахстан, 20-22 октября 2020);

- «Science, Education, Innovation: Topical Issues and Modern Aspects» международная научно-практическая конференция. (Таллин, Эстония, 16-18 декабря 2020);

- «Тенденции и перспективы развития науки и образования в условиях глобализации» международная научно-практическая интернет-конференция. (Переяслав, Украина, 30 апрель 2020)

- Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы биологии и биотехнологии», посвященной 70-летию доктора биологических наук, профессора, члена-корреспондента Национальной Академии Наук Республики Казахстан Тулеуханова Султана Тулеухановича. (Алматы, Казахстан, 27 мая 2021);

- «Фараби әлемі» международная научная конференция студентов и молодых ученых. (Алматы, Казахстан, 6-9 апреля 2020);

- «Тенденции и перспективы развития науки и образования в условиях глобализации» международная научно-практическая интернет-конференция. (Переяслав, Украина, 29 января 2021);

- «Фараби әлемі» международная научная конференция студентов и молодых ученых. (Алматы, Казахстан, 6-8 апреля 2021);

- «2nd Advanced Chemistry World Congress» международная научная конференция (Берлин, Германия, 14-15 июня 2021);

- «Society and Science: Interconnection» III международная научно-практическая конференция. (Порто, Португалия, 16-18 ноября 2023);

- «RW Research World» международная конференция Research world. (Гумбург, Германия, 3-4 декабря 2023);

- «Asfen.Forum, новое поколение – 2023» 1-й Международный форум. (Алматы, Казахстан, 5-6 июня 2023).

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 24 научных работах, в том числе 1 статья в Международном научном журнале *Molecules*, имеющем по данным информационной базы компании *Clarivate Analytics* (ISI Web of Science) импакт-фактор = 7.143, процентиль по базе данных Scopus = 0,74 (Q1); 1 статья входящая в международную научную базу цитирования Scopus: Международный форум «Modern Trends in Sustainable Development of Biological Sciences»; 2 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science; 7 статей в журналах, представленном Комитетом по обеспечению качества в области науки и образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан; в материалах отечественных и зарубежных международных конференций опубликовано 13 научных публикаций. Получено из МЮ РК Национального института интеллектуальной собственности 6 патентов на изобретения.

Объем и структура диссертации. Диссертация написана на 148 страницах текста. Она включает в себя нормативные ссылки, определения, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение и 316 библиографических списков. Диссертация содержит 36 рисунков, 26 таблиц и 6 приложения.