

## ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛФЕНОЛА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА<sup>1</sup>

Д. Б. НИЖЕГОРОВОДА<sup>1</sup>), Г. А. КСЕНДЗОВА<sup>2</sup>), А. Г. СЫСА<sup>1</sup>),  
М. Ю. ЮРКЕВИЧ<sup>1</sup>), М. В. ЛОБАЙ<sup>1</sup>), О. И. ШАДЫРО<sup>2</sup>), М. М. ЗАФРАНСКАЯ<sup>1</sup>)

<sup>1</sup>)Международный государственный институт им. А. Д. Сахарова БГУ,  
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

<sup>2</sup>)Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ,  
ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Беларусь

Производные 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола проявляют противовирусные свойства и радикалрегуляторную активность в отношении различных типов органических радикалов, что обуславливает актуальность их дальнейшего изучения. До сих пор остается открытым вопрос об иммуномодулирующей активности производных аминифенольных соединений. В настоящей работе осуществляется оценка влияния производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на жизнеспособность и функциональный потенциал лимфоцитов периферической крови человека. Проведенный анализ показал, что исследуемые соединения в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  моль не оказывали цитотоксического действия, в то время как эти соединения в концентрации  $10^{-4}$  моль проявляли цитотоксический эффект за счет индукции вторичного некроза. Соединения N-(2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид и 2,4-ди-*трет*-бутил-6-морфолинофенол в концентрации  $10^{-6}$  моль стимулировали

<sup>1</sup>Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

### Образец цитирования:

Нижегородова ДБ, Ксэндзова ГА, Сыса АГ, Юркевич МЮ, Лобай МВ, Шадыро ОИ, Зафранская ММ. Эффекты производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на жизнеспособность и функциональное состояние лимфоцитов периферической крови человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:19–28.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-19-28>

### For citation:

Nizheharodava DB, Ksendzova GA, Syasa AG, Yurkevich MYu, Labai MV, Shadyro OI, Zafranskaya MM. Effects of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives on the viability and functional state of human peripheral blood lymphocytes. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:19–28. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-19-28>

### Авторы:

**Дарья Борисовна Нижегородова** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

**Галина Анатольевна Ксэндзова** – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории химии свободнорадикальных процессов.

**Алексей Григорьевич Сыса** – кандидат химических наук, доцент; декан факультета экологической медицины.

**Мария Юрьевна Юркевич** – кандидат биологических наук; доцент кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

**Марина Валерьевна Лобай** – преподаватель кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

**Олег Иосифович Шадыро** – доктор химических наук, профессор; заведующий лабораторией химии свободнорадикальных процессов.

**Марина Михайловна Зафранская** – доктор медицинских наук, доцент; заведующий кафедрой иммунологии факультета экологической медицины.

### Authors:

**Darya B. Nizheharodava**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

[nzh@tut.by](mailto:nzh@tut.by)

**Galina A. Ksendzova**, PhD (chemistry); leading researcher at the free radical processes chemistry laboratory.

[ksja-bn@tut.by](mailto:ksja-bn@tut.by)

**Aliaksei G. Syasa**, PhD (chemistry), docent; dean of the faculty of environmental medicine.

[aliaksei.syasa@iseu.by](mailto:aliaksei.syasa@iseu.by)

**Mariya Yu. Yurkevich**, PhD (biology); associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

[marija4567@gmail.com](mailto:marija4567@gmail.com)

**Maryna V. Labai**, lecturer at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

[marina.lobai@mail.ru](mailto:marina.lobai@mail.ru)

**Oleg I. Shadyro**, doctor of science (chemistry), full professor; head of the free radical processes chemistry laboratory.

[shadyro@tut.by](mailto:shadyro@tut.by)

**Marina M. Zafranskaya**, doctor of science (medicine), docent; head of the department of immunology, faculty of environmental medicine.

[zafranskaya@gmail.com](mailto:zafranskaya@gmail.com)

внутриклеточную продукцию  $\alpha$ -интерферона мононуклеарами периферической крови и внутриклеточную продукцию  $\gamma$ -интерферона CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитами. Выявлен иммуносупрессивный эффект (более 50 %) соединений N-(2-гидрокси-3,5-ди-*т*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида и 2,4-ди-*т*-бутил-6-морфолинофенола в концентрации  $10^{-5}$  моль на митогениндуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** производные 2-амино-4,6-ди-*т*-бутилфенола; иммунная система; лимфоидные клетки; интерфероны; пролиферация; цитотоксичность.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность Министерству образования Республики Беларусь за финансовую поддержку исследования в рамках научно-исследовательской работы «Разработка инновационных мишень-адресованных антиВИЧ-агентов» (номер государственной регистрации 20191188).

## EFFECTS OF 2-AMINO-4,6-DI-*TERT*-BUTYLPHENOL DERIVATIVES ON THE VIABILITY AND FUNCTIONAL STATE OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

D. B. NIZHEHARODAVA<sup>a</sup>, G. A. KSENDZOVA<sup>b</sup>, A. G. SYSA<sup>a</sup>,  
M. Yu. YURKEVICH<sup>a</sup>, M. V. LABAI<sup>a</sup>, O. I. SHADYRO<sup>b</sup>, M. M. ZAFRANSKAYA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,  
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

<sup>b</sup>Research Institute of Physical and Chemical Problems, Belarusian State University,  
14 Lieninhradskaja Street, Minsk 220006, Belarus

Corresponding author: D. B. Nizheharodava (nzh@tut.by)

Derivatives of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol exhibit antiviral properties and radical regulatory activity against various types of organic radicals which determines the actuality of their further investigation. But the question of amino-phenol derivatives immunomodulatory activity remains open. In this regard, the aim of the study was to assess the effects of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives on the viability and functional potential of human peripheral blood lymphocytes. As a result of the studies, it was shown that aminophenol compounds at concentrations of  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  mol did not exert a toxic effect while at a concentration of  $10^{-4}$  mol showed a cytotoxic effect due to the induction of secondary necrosis. Compounds N-(2-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylphenyl)-4-methylbenzenesulfonamide and 2,4-di-*tert*-butyl-6-morpholinophenol at a concentration of  $10^{-6}$  mol stimulated the extracellular production of  $\alpha$ -interferon by peripheral blood mononuclear cells and intracellular production of  $\gamma$ -interferon by CD3<sup>+</sup>T-lymphocytes. An immunosuppressive effect (more than 50 %) of N-(2-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylphenyl)-4-methylbenzenesulfonamide and 2,4-di-*tert*-butyl-6-morpholinophenol compounds at a concentration of  $10^{-5}$  mol was revealed to the mitogen-induced proliferation of T-lymphocytes.

**Keywords:** 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives; immune system; lymphoid cells; interferons; proliferation; cytotoxicity.

**Acknowledgements.** The authors are grateful to the Ministry of Education of the Republic of Belarus for financial supporting of research as part of the scientific work «Development of innovative targeted antiHIV-agents» (state registration No. 20191188).

### Введение

Производные 2-амино-4,6-ди-*т*-бутилфенола проявляют противовирусные свойства и радикалрегуляторную активность в отношении различных типов органических радикалов [1; 2], что обуславливает актуальность их дальнейшего изучения. До сих пор остается открытым вопрос об иммуномодулирующей активности производных аминифенольных соединений, в том числе их способности инициировать продукцию интерферонов типов I и II и регулировать неспецифический и специфический Т-клеточный иммунный ответ.

Ключевыми событиями в противовирусном иммунном ответе являются индукция генов системы интерферонов, активация неспецифических клеточных факторов защиты с последующей инициацией развития специфического противовирусного иммунитета [3]. Несмотря на то что интерфероны не обладают прямым противовирусным действием, при воздействии на различные типы клеток и их метаболизм они проявляют множественные биологические эффекты и, таким образом, выступают главным неспецифическим гуморальным фактором противовирусной защиты. Интерфероны типа I, включая  $\alpha$ -интерферон ( $\alpha$ IFN), синтезируются лейкоцитами на самых ранних этапах иммунного ответа и поэтому относятся к первой линии защиты организма, модулируя созревание дендритных клеток и инициацию

распознавания антигенных детерминант. В свою очередь,  $\gamma$ -интерферон ( $\gamma$ IFN) – интерферон типа II – синтезируется ограниченным спектром клеток и является участником как неспецифического, так и антигенспецифического иммунного ответа, активируя натуральные киллеры (НК-клетки), цитотоксические Т-лимфоциты и В-клетки [4; 5]. На более поздних стадиях решающим фактором выступает пролиферация Т-лимфоцитов и их дифференцировка в эффекторные клетки, которые с помощью различных механизмов (перфоринзависимый цитолиз и активационно-индуцированный апоптоз) приводят к элиминации патогена из организма [6].

В связи с этим цель исследования – оценить влияние производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина на жизнеспособность, цитокинсинтезирующую функцию и функциональный (пролиферативный и цитотоксический) потенциал лимфоцитов периферической крови человека.

## Материалы и методы исследования

Материалом исследования явилась цельная периферическая венозная кровь здоровых доноров ( $n = 15$ ).

Структурная характеристика объектов исследования – производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (1–3) и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина (4), синтезированных по описанным ранее методикам [2; 7; 8], – представлена в табл. 1.

Таблица 1

Структурная характеристика соединений

Table 1

Structural characteristics of compounds

Номер соединения	Структурная формула	Название
1		N-(2-гидрокси-3,5-ди- <i>трет</i> -бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид
2		N-(2-метокси-3,5-ди- <i>трет</i> -бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид
3		2,4-Ди- <i>трет</i> -бутил-6-морфолинофенол
4		2-(4,6-Ди- <i>трет</i> -бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусная кислота

**Культуральный метод.** Выделенные на градиенте плотности (Histopaque-1077, *Sigma*, Германия) мононуклеары периферической крови (МПК) в концентрации  $2 \cdot 10^5$  клеток на лунку 96-луночного планшета культивировали в питательной среде RPMI-1640 (*Bio-Whittaker*, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (*Gibco*, Германия), 2 ммоль L-глутамин (*Bio-Whittaker*, США), 1 % антибиотика-антимикотика (*Gibco*, Германия), в присутствии или отсутствии соединений 1–4 в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  моль в течение 48 ч, 72 ч и 6 дней соответственно, для оценки жизнеспособности, внутриклеточной продукции  $\gamma$ IFN и цитотоксичности, а также характеристики митогениндуцированной пролиферации лимфоцитов. Для стимуляции цитотоксичности в кокультуры добавляли интерлейкин-2 (IL-2, *Fluka*, Германия) в конечной концентрации 100 МЕ/мл. Митоген фитогемагглютинин (РНА, *Sigma*, Германия) добавляли в конечной концентрации 2,5 мкг/мл.

**Проточная цитофлуориметрия.** Жизнеспособность клеточных культур МПК определяли с использованием набора Annexin A5 FITC/7-AAD Kit (*Beckman Coulter*, США). Регистрацию результатов измерения выполняли на 10 000 событий на проточном цитометре Cytotflex (*Beckman Coulter*, США).

Для количественного определения уровня внутриклеточной продукции  $\gamma$ IFN за 4 ч до окончания культивирования добавляли 10 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (*Sigma*, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (*Cayman Chemical*, США) и 10 мкг/мл брефелдина А (*Cayman Chemical*, США) с последующим окрашиванием МПК моноклональными антителами к поверхностному маркеру Т-лимфоцитов (CD3-PC7, *Beckman Coulter*, США) и дальнейшей фиксацией клеток в течение 10 мин 4 % раствором параформальдегида в физиологическом растворе. После отмывания клеток добавляли моноклональные антитела  $\gamma$ IFN-PE (*Beckman Coulter*, США). Учет результатов проводили на проточном цитометре Cytotflex на 10 000 CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов.

**CFSE-метод оценки клеточной пролиферации.** Для оценки клеточной пролиферации МПК предварительно окрашивали флуоресцентным красителем – 5,6-карбоксифлуоресцеинсукцинилмидиловым эфиром (CFSE, *Fluka*, Германия) – и культивировали в течение 6 дней в присутствии или отсутствии митогена. Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих Т-клеточных субпопуляций осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител CD3-PC7 (*Beckman Coulter*, США). Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции устанавливали границы популяции CD3<sup>+</sup>Т-клеток среди жизнеспособных лимфоцитов. Проллиферацию Т-лимфоцитов оценивали как процент непролиферирующих и пролиферирующих Т-клеток. Учет результатов проводили на проточном цитометре Cytotflex на 50 000 CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов.

**Оценка цитотоксичности.** Для оценки цитотоксичности к культуре МПК добавляли клетки-мишени – опухолевую клеточную линию K562, окрашенную CFSE, – в соотношении 5 : 1 и культивировали МПК в течение 4 ч. Процент гибели клеток-мишеней K562 в результате цитотоксичности МПК в кокультурах определяли путем добавления катионного красителя – пропидий йодида (PI, *Invitrogen*, Германия) – и идентификации нежизнеспособных клеток опухолевой линии (CFSE<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>K562) с использованием проточного цитометра Cytotflex (*Beckman Coulter*, США) на 20 000 событий. Коэффициент стимуляции цитотоксичности рассчитывали как отношение процента гибели клеток K562 в кокультуре с МПК, стимулированными IL-2, к таковому в нестимулированных МПК.

**Иммуноферментный анализ.** Концентрацию  $\gamma$ IFN и  $\alpha$ IFN определяли в супернатантах клеточных культур МПК исследуемых доноров методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя с использованием коммерческих наборов: гамма-интерферон-ИФА-БЕСТ (А-8752, *Вектор-Бест*, Россия) и альфа-интерферон-ИФА-БЕСТ (А-8758, *Вектор-Бест*, Россия). Результаты регистрировали на спектрофотометре (*Thermo Fischer*, Германия) при длине волны  $\lambda = 450$  нм.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных проводили с применением стандартного пакета *Statistica 8.0* (*StatSoft Inc.*, США). Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (25-й и 75-й процентиля). Определение достоверных различий между сравниваемыми группами осуществляли непараметрическими критериями: *U*-критерием Манна – Уитни и критерием Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

**Жизнеспособность лимфоидных клеток при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола и 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина.** Жизнеспособность лимфоидных клеток при культивировании с соединениями 1–4 исследована с использованием комбинированной окраски культуры МПК аннексином V (AnnexinV), конъюгированным с флуорохромом, и 7-аминоактиномицином D (7-AAD). Комбинированная окраска аннексином V и 7-аминоактиномицином D позволяет идентифицировать жизнеспособные клетки (AnnexinV<sup>−</sup>7AAD<sup>−</sup>); ранние проапоптотические изменения в клетках (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>−</sup>); позднюю стадию апоптоза, сопровождающуюся вторичным некрозом клеток (AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>); некротический вариант клеточной гибели (AnnexinV<sup>−</sup>7AAD<sup>+</sup>). Результаты статистической обработки данных жизнеспособных клеток и клеток, подвергшихся апоптозу или некрозу при культивировании с соединениями 1–4, представлены в табл. 2.

Показано, что через 48 ч культивирования интактные культуры МПК характеризовались высокой жизнеспособностью: количество клеток AnnexinV<sup>−</sup>7AAD<sup>−</sup> составило 96,80 (94,35–97,99) %, в то время как большинство нежизнеспособных клеток идентифицировались как AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>−</sup>, что соответствует стадии раннего апоптоза.



Таблица 2

Количество жизнеспособных, апоптотических и некротических клеток  
в культуре МПК через 48 ч культивирования с соединениями 1–4, %

Table 2

The number of alive, apoptotic and necrotic cells in 48 h culture  
of peripheral blood mononuclear cells with compounds 1–4, %

Условия культивирования		МПК			
		AnnexinV <sup>-</sup> 7AAD <sup>-</sup> (жизнеспособные)	AnnexinV <sup>+</sup> 7AAD <sup>-</sup> (ранний апоптоз)	AnnexinV <sup>+</sup> 7AAD <sup>+</sup> (поздний апоптоз)	AnnexinV <sup>-</sup> 7AAD <sup>+</sup> (некроз)
Культуральная среда		96,80 (94,35–97,99)	3,18 (1,99–5,57)	0,00 (0,00–0,02)	0,07 (0,01–0,13)
1	10 <sup>-7</sup> моль	96,31 (93,43–97,67)	3,69 (2,31–5,45)	0,00 (0,00–0,70)	0,05 (0,00–0,48)
	10 <sup>-6</sup> моль	97,49 (94,35–98,70)	2,51 (1,30–5,62)	0,00 (0,00–0,10)	0,03 (0,00–0,30)
	10 <sup>-5</sup> моль	98,02 (96,90–98,76)	1,56 (1,22–3,00)	0,02 (0,00–0,30)	0,10 (0,04–0,70)
	10 <sup>-4</sup> моль	63,75** (62,58–64,93)	0,10* (0,00–0,02)	0,10 (0,05–0,15)	36,05** (34,93–37,18)
2	10 <sup>-7</sup> моль	94,38 (91,69–96,58)	1,94 (1,18–6,24)	0,22 (0,19–0,32)	0,41 (0,36–1,93)
	10 <sup>-6</sup> моль	96,89 (94,55–97,27)	2,33 (2,32–4,75)	0,00 (0,00–0,03)	0,63 (0,32–0,71)
	10 <sup>-5</sup> моль	92,40 (89,92–93,18)	6,30 (4,32–7,82)	0,87 (0,44–0,94)	2,23 (1,33–2,98)
	10 <sup>-4</sup> моль	71,71** (71,10–82,63)	26,33* (13,40–27,92)	0,00 (0,00–0,00)	1,96 (0,98–3,98)
3	10 <sup>-7</sup> моль	96,47 (91,38–96,98)	3,42 (2,99–6,34)	0,00 (0,00–1,50)	0,10 (0,03–0,81)
	10 <sup>-6</sup> моль	96,20 (94,16–97,84)	2,40 (1,52–5,78)	0,02 (0,00–0,30)	0,10 (0,02–1,82)
	10 <sup>-5</sup> моль	98,07 (94,80–98,20)	1,70 (1,30–1,84)	0,02 (0,00–0,504)	0,10 (0,06–2,53)
	10 <sup>-4</sup> моль	63,25** (63,13–63,38)	0,15* (0,13–0,18)	0,10 (0,00–0,25)	36,30** (36,20–36,40)
4	10 <sup>-7</sup> моль	96,58 (89,25–97,17)	3,42 (2,76–7,82)	0,00 (0,00–1,21)	0,10 (0,01–1,30)
	10 <sup>-6</sup> моль	96,20 (94,80–98,30)	3,70 (1,63–5,00)	0,03 (0,00–0,10)	0,13 (0,10–1,20)
	10 <sup>-5</sup> моль	96,25 (93,44–97,90)	3,60 (2,00–6,51)	0,00 (0,00–0,08)	0,11 (0,06–1,20)
	10 <sup>-4</sup> моль	16,75** (14,83–18,68)	1,55* (1,43–1,68)	10,00* (8,90–11,10)	71,70** (70,75–72,65)

Примечание. \* – статистически значимые различия с уровнем достоверности  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  относительно показателей клеток в культуральной среде без соединений 1–4; 1 – культуральная среда с добавлением N-(2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида; 2 – культуральная среда с добавлением N-(2-метокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида; 3 – культуральная среда с добавлением 2,4-ди-*трет*-бутил-6-морфолинофенола; 4 – культуральная среда с добавлением 2-(4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоты.

**Внутриклеточная продукция  $\gamma$ IFN в лимфоидных клетках при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина.** В результате проведенных исследований изучено влияние производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина на спонтанную продукцию  $\gamma$ IFN CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитами в трехдневной культуре МПК. Установлено, что культивирование МПК с соединениями 1 и 3 сопровождалось повышением

спонтанной продукции  $\gamma$ IFN T-лимфоцитами: в присутствии соединения **1** в концентрации  $10^{-6}$  моль наблюдалось увеличение количества  $\gamma$ IFN<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T-клеток с 14,30 (12,5–16,1) до 25,90 (17,0–34,8) %, а при культивировании с соединением **3** в концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  моль процент  $\gamma$ IFN<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T-клеток повышался до 23,00 (13,3–32,7) и 22,80 (13,6–32,0) соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). В то же время показано, что соединения (**2**) и (**4**) не приводили к статистически значимым различиям в спонтанной продукции  $\gamma$ IFN T-лимфоцитами у здоровых доноров.

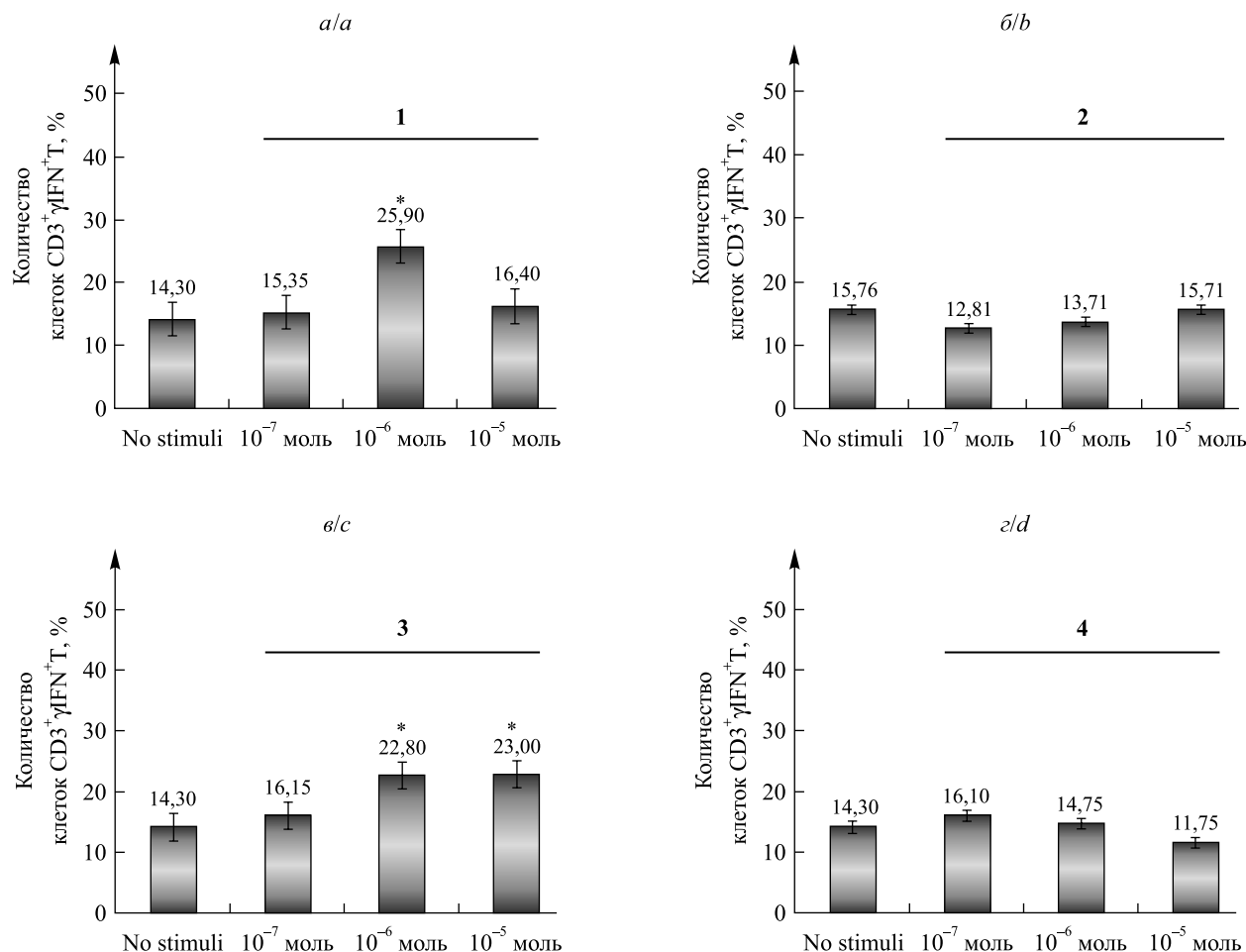


Рис. 1. Спонтанная продукция  $\gamma$ IFN CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитами при культивировании с исследуемыми соединениями:  
а – соединение **1**; б – соединение **2**; в – соединение **3**; г – соединение **4**  
(\* – статистически значимые различия с уровнем достоверности  $p < 0,05$  относительно культур без соединений **1–4**)

Fig. 1.  $\gamma$ IFN spontaneous production by CD3<sup>+</sup>T-lymphocytes cultivated with investigated compounds:  
a – compound **1**; b – compound **2**; c – compound **3**; d – compound **4**  
(\* – significant differences with  $p < 0.05$  as compared to cultures without compounds **1–4**)

Согласно литературным данным  $\gamma$ IFN относится к интерферонам типа II – гликопротеинам, синтезируемым Т-лимфоцитами и НК-клетками под действием антигенной стимуляции и оказывающим противовирусное и иммуномодулирующее действие. Если интерфероны типа I принимают непосредственное участие в защите организма от вируса, то интерфероны типа II занимают более высокое положение, оказывая влияние на процессы специфического и неспецифического клеточного иммунитета. Так, во время ранней неспецифической защиты организма продукция  $\gamma$ IFN НК-клетками играет важную роль в развитии острого воспаления.  $\gamma$ IFN активирует адгезивные свойства эндотелиальных клеток и продукцию медиаторов воспаления моноцитами. Во время антигенспецифической фазы иммунного ответа  $\gamma$ IFN регулирует антигенную презентацию, пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов, влияет на взаимодействие лейкоцитов с эндотелием, действует на апоптоз, стимулирует или подавляет экспрессию более 200 различных генов и является нелимитирующим механизмом эффекторных цитотоксических CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов [9].

**Пролиферация лимфоидных клеток при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина.** Пролиферативный потенциал митогенстимулированных Т-лимфоцитов в присутствии соединений **1–4** в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  моль оценивался по количеству делящихся Т-лимфоцитов в шестидневной культуре МПК. Оригинальные гистограммы CFSE<sup>low</sup> (пролиферирующих) Т-лимфоцитов представлены на рис. 2.

Установлено, что выраженный антипролиферативный эффект наблюдался при культивировании МПК с соединениями **1** и **4** в концентрации  $10^{-5}$  моль, где количество CFSE<sup>low</sup> (пролиферирующих) Т-лимфоцитов уменьшалось с 85,5 (75,2–87,0) до 37,0 (28,8–45,0) и 34,5 (23,2–66,9) % соответственно (см. рис. 2). В то же время показано, что культивирование МПК с соединениями **2** и **3** не приводило к статистически значимым различиям в РНА-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов у здоровых доноров.

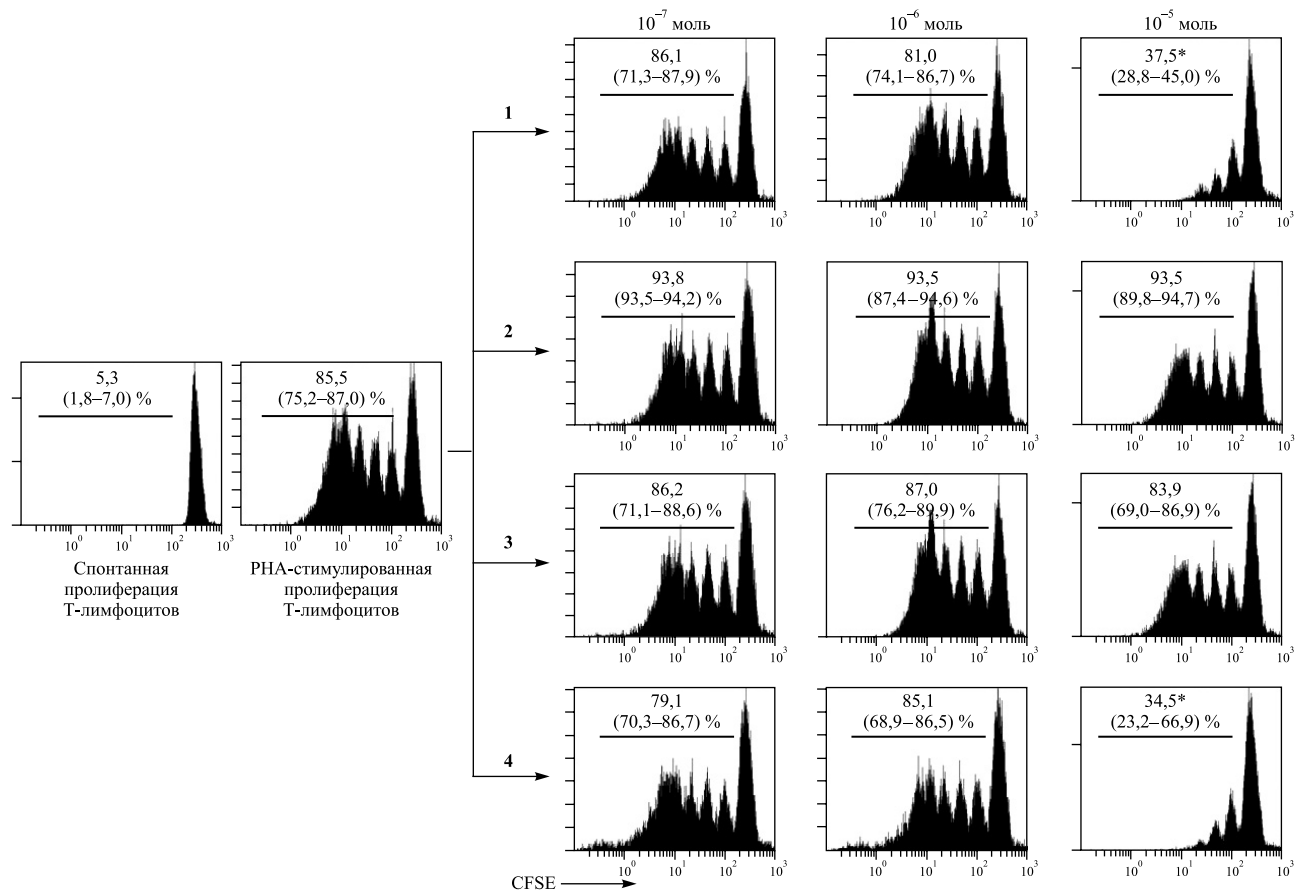


Рис. 2. Количество CFSE<sup>low</sup> (пролиферирующих) Т-лимфоцитов в культурах МПК с соединениями **1–4** в условиях митогенной стимуляции (\* – статистически значимые различия с уровнем достоверности  $p < 0,05$  относительно РНА-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов без соединений **1–4**)

Fig. 2. The number of CFSE<sup>low</sup> (proliferating) T-lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells cultures with derivatives **1–4** under mitogen-stimulated condition (\* – significant differences with  $p < 0.05$  as compared to RNA-stimulated T-lymphocytes proliferation without compounds **1–4**)

**Цитотоксичность лимфоидных клеток при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола.** Для оценки эффектов производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на спонтанную и IL-2-стимулированную цитотоксичность лимфоидных клеток по отношению к опухолевой клеточной линии K562 использовали показатели процента гибели клеток K562, детектируемых как клетки CFSE<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>K562, и уровень внеклеточной продукции  $\alpha$ IFN в кокультурах МПК и K562. Результаты количества нежизнеспособных клеток CFSE<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>K562 в кокультурах с МПК при культивировании с исследуемыми соединениями в концентрации  $10^{-6}$  моль представлены в табл. 3.

Показано, что при стимуляции IL-2 во всех исследуемых культурах наблюдалось выраженное увеличение цитотоксичности ( $p < 0,01$ ). Однако на данном этапе исследования не выявлено стимулирующего влияния соединений **1–3** на спонтанную и IL-2-стимулированную цитотоксичность лимфоидных клеток.

Таблица 3

Количество клеток CFSE<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>K562  
в кокультурах с МПК при культивировании  
с производными 2-амино-4,6-ди-*tert*-бутилфенола, %

Table 3

The number of cells CFSE<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>K562 co-cultured with peripheral blood mononuclear cells and 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives, %

Условия культивирования		CFSE <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> K562	ИС
Культуральная среда	Без IL-2	19,7 (15,6–22,0)	2,2 (1,8–3,2)
	IL-2	41,1 (40,0–43,2)	
1	Без IL-2	18,3 (14,9–22,0)	2,0 (1,8–3,3)
	IL-2	41,8 (37,2–46,6)	
2	Без IL-2	21,0 (17,1–23,3)	2,0 (1,8–2,5)
	IL-2	39,7 (35,8–44,6)	
3	Без IL-2	22,3 (16,9–24,1)	2,0 (1,9–2,7)
	IL-2	39,1 (38,9–45,3)	

Примечание. ИС – индекс стимуляции цитотоксичности МПК, рассчитываемый как отношение показателей IL-2-стимулированной цитотоксичности к спонтанной клеточной гибели; 1 – культуральная среда с добавлением N-(2-гидрокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10<sup>-6</sup> моль; 2 – культуральная среда с добавлением N-(2-метокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10<sup>-6</sup> моль; 3 – культуральная среда с добавлением 2,4-ди-*tert*-бутил-6-морфолинофенола в концентрации 10<sup>-6</sup> моль.

Результаты продукции αIFN МПК в кокультурах с опухолевой клеточной линией K562 в условиях культивирования с аминифенольными соединениями в концентрации 10<sup>-6</sup> моль представлены в табл. 4. Установлено, что в присутствии соединений 1 и 3 продукция αIFN МПК статистически значимо увеличивалась в 3,8 и 6,7 раза соответственно.

Таблица 4

Продукция αIFN МПК в кокультурах с K562  
при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*tert*-бутилфенола, пг/мл

Table 4

αIFN production by peripheral blood mononuclear cells in co-cultures  
with K562 in the present of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives, pg/ml

Условия культивирования	Культуральная среда	1	2	3
αIFN, пг/мл	6,9 (6,0–8,1)	26,0* (9,1–43,3)	8,5 (6,4–18,7)	46,3** (15,1–80,4)

Примечание. \* – статистически значимые различия с уровнем достоверности  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  относительно продукции αIFN в культурах без аминифенольных соединений; 1 – культуральная среда с добавлением N-(2-гидрокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10<sup>-6</sup> моль; 2 – культуральная среда с добавлением N-(2-метокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10<sup>-6</sup> моль; 3 – культуральная среда с добавлением 2,4-ди-*tert*-бутил-6-морфолинофенола в концентрации 10<sup>-6</sup> моль.

Согласно литературным данным индукция экспрессии генов интерферонов типа I, включая αIFN, является ключевым событием в иницировании противинфекционного иммунного ответа. Интерфероны типа I модулируют созревание дендритных клеток и их кооперацию с лимфоцитами путем инициации



распознавания Т-клеточным рецептором главного комплекса гистосовместимости с антигенной детерминантой, активацию экспрессии костимулирующих молекул Т-лимфоцитов и секрецию цитокинов, обеспечивающих пролиферацию Т-лимфоцитов и их дифференцировку в эффекторные клетки. Кроме того, передача сигнала от интерферонов типа I с участием активатора транскрипции STAT1 параллельно стимулирует экспрессию генов интерферона типа II ( $\gamma$ IFN), который участвует в регуляции механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, клеточного цикла, процессов апоптоза и воспалительной реакции посредством контроля транскрипции широкого спектра генов [10].

Таким образом, соединения **1** и **3** в концентрации  $10^{-6}$  моль стимулируют продукцию  $\alpha$ IFN МПК, тем самым усиливая противовирусное действие и потенциальную активацию киллерных клеток.

### Заключение

В результате выполненных исследований проведена оценка влияния производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на жизнеспособность, цитокинсинтезирующую, пролиферативную способность и цитотоксичность лимфоцитов периферической крови человека.

Выявлено, что соединения **1**, **3** и **4** в концентрации  $10^{-4}$  моль проявляют цитотоксический эффект на лимфоидные клетки преимущественно за счет индукции клеточной гибели путем вторичного некроза, а соединение **2** в концентрации  $10^{-4}$  моль – за счет индукции клеточной гибели путем раннего апоптоза. Наиболее выраженный токсический эффект на лимфоидные клетки зарегистрирован у соединения **4** в концентрации  $10^{-4}$  моль, при культивировании с которым выявлена клеточная гибель как путем вторичного некроза, так и позднего (вторичного) апоптоза.

Показано, что аминифенольные соединения **1** в концентрации  $10^{-6}$  моль и соединение **3** в концентрациях  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  моль стимулируют спонтанную внутриклеточную продукцию  $\gamma$ IFN CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитами, а соединения **1** и **4** в концентрации  $10^{-5}$  моль оказывают супрессивный эффект (более 50 %) на митогениндуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов, в то время как соединение **2** не влияет на синтез  $\gamma$ IFN и количество делящихся Т-лимфоцитов.

Установлено, что аминифенольные соединения не усиливают эффекторные киллерные свойства лимфоидных клеток, однако соединения **1** и **3** в концентрации  $10^{-6}$  моль стимулируют продукцию  $\alpha$ IFN МПК, тем самым усиливая противовирусное действие и потенциальную активацию киллерных клеток.

### Библиографические ссылки

1. Shadyro OI, Ksendzova GA, Polozov GI, Sorokin VL, Boreko EI, Savinova OV, et al. Synthesis and study of anti-radical and antiviral properties of aminophenol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(7):2420–2423. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.02.055.
2. Шадыро ОИ, Сорокин ВЛ, Ксэндзова ГА, Савинова ОВ, Павлова НИ, Бореко ЕИ. Синтез и противовирусная активность производных стерически затрудненных *орто*-аминофенолов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(7):27–30. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-7-27-30.
3. Braciale TJ, Hahn YS. Immunity to viruses. *Immunological Reviews*. 2013;255(1):5–12. DOI: 10.1111/imr.12109.
4. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*. 2018;11(9):2061. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02061.
5. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):778–809. DOI: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
6. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology*. 2012;13(3):214–222. DOI: 10.1038/ni.2229.
7. Ксэндзова ГА, Полозов ГИ, Скорняков ИВ, Сорокин ВЛ, Толсторожев ГБ, Шадыро ОИ и др. Проявление внутримолекулярных водородных связей в инфракрасных спектрах биоактивных аминифенолов. *Оптика и спектроскопия*. 2007;102(4):606–611.
8. Масловская ЛА, Петрикевич ДК, Тимошук ВА, Шадыро ОИ. Синтез и антиокислительная активность серосодержащих производных 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина. *Журнал общей химии*. 1996;66(11):1899–1902.
9. Kang S, Brown HM, Hwang S. Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma. *Immune Network*. 2018;18(5):e33. DOI: 10.4110/in.2018.18.e33.
10. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006;25(3):373–381. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.007.

### References

1. Shadyro OI, Ksendzova GA, Polozov GI, Sorokin VL, Boreko EI, Savinova OV, et al. Synthesis and study of anti-radical and antiviral properties of aminophenol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(7):2420–2423. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.02.055.
2. Shadyro OI, Sorokin VL, Ksendzova GA, Savinova OV, Pavlova NI, Boreko EI. Synthesis and antiviral activity of sterically hindered *ortho*-aminophenol derivatives. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2012;46(7):27–30. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-7-27-30. Russian.
3. Braciale TJ, Hahn YS. Immunity to viruses. *Immunological Reviews*. 2013;255(1):5–12. DOI: 10.1111/imr.12109.

4. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*. 2018;11(9):2061. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02061.
5. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):778–809. DOI: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
6. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology*. 2012;13(3):214–222. DOI: 10.1038/ni.2229.
7. Ksendzova GA, Polozov GI, Skornyakov IV, Sorokin VL, Tolstorozhev GB, Shadyro OI, et al. Manifestation of intramolecular hydrogen bonds in the IR-spectra of bioactive aminophenols. *Optika i spektroskopiya*. 2007;102(4):606–611. Russian.
8. Maslovskaya LA, Petrikevich DK, Timoshchuk VA, Shadyro OI. Synthesis and antioxidant activity of sulfur-containing derivatives of 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzenediol. *Zhurnal obshchei khimii*. 1996;66(11):1899–1902. Russian.
9. Kang S, Brown HM, Hwang S. Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma. *Immune Network*. 2018;18(5):e33. DOI: 10.4110/in.2018.18.e33.
10. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006;25(3):373–381. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.007.

Статья поступила в редколлегию 30.06.2020.  
Received by editorial board 30.06.2020.