

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИЗОПРОТЕРЕНОЛА, НИФЕДИПИНА, ИЗОБУТИЛ- МЕТИЛКСАНТИНА, КОЛХИЦИНА И ТАНС-РЕСВЕРАТРОЛА НА МОДЕЛИ ДЫХАТЕЛЬНОГО ВЗРЫВА МАКРОФАГОВ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

На модели FcγR-индуцированного респираторного взрыва макрофагов нифедипин и изопротеренол демонстрировали фармакодинамический антагонизм во всем эффективном диапазоне. В отношении Nox2-зависимой генерации активных форм кислорода взаимодействия изобутил-метил-ксантина и транс-ресвератрола с изопротеренолом и с нифедипином зависели от их концентраций в комбинации. В области низких концентраций доминировали аддитивные эффекты или слабый антагонизм, в области высоких – все композиции демонстрировали синергизм компонентов в наиболее рациональных молярных сочетаниях.

Ключевые слова: транс-ресвератрол, изопротеренол, нифедипин, изобутил-метил-ксантин, колхицин, комбинации лекарственных средств, синергизм, антагонизм, активные формы кислорода, макрофаги.

N. A. Bizunok

PHARMACODYNAMIC IMMUNOMODULATORY INTERACTIONS OF THE ISOPROTERENOL, NIFEDIPINE, ISOBUTYL-METHYL-XANTINE, COLCHICINE AND TRANS-RESVERATROL ON THE MODEL OF RESPIRATORY BURST OF MACROPHAGES

The nifedipine interacts with isoproterenol in antagonistic manner on the model of FcγR-induced respiratory burst of macrophages. In order to Nox2-dependent reactive oxygen species production by macrophages the interactions of isobutyl-methyl-xantine and trans-resveratrol with isoproterenol and nifedipine dependent upon concentrations. In range of low concentrations additive or light antagonism is dominate, however high concentrations demonstrate synergistic interaction in the most efficient molar ratios.

Key words: isoproterenol, nifedipine, isobutyl-methyl-xantine, colchicine, trans-resveratrol, drug combinations, synergism, antagonism, reactive oxygen species, macrophages.

Макрофаги играют главную роль в воспалительной реакции благодаря инициации и поддержанию специфического иммунного ответа. Первичная защита от агрессии патогенов достигается несколькими механизмами, главными из которых являются наработка и выброс цитокинов, ферментов, цитотоксических пептидов и активных форм кислорода (АФК). Последние не только обеспечивают макрофагам цитотоксическое действие, но и участвуют в преобразовке антигенов для презентации их Т-лимфоцитам [3, 11]. Генерация АФК обеспечивается активностью фермента Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы, который состоит из шести субъединиц, разобценных в состоянии покоя фагоцита. Для активации фермента необходима последовательная сборка всех субъединиц в единый комплекс, представляемый на мембране фагоцита. К субъединицам фермента относятся: p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, p22^{phox}, gp91^{phox} (Nox2) и ГТФ-аза Rac [13].

В исследовании, результаты которого представлены в настоящей работе, индуктором генерации АФК является опсонизированный зимозан. Современные представления об активации Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы при действии этого индуктора сводятся к следующему (рисунок 1).

FcγR-зависимая активация Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы происходит одновременно с формированием фагосомы и управляется несколькими сигнальными путями и эффекторами [8, 7, 13].

Прежде всего, стимуляция FcγR активирует фосфоинозитол-3-киназу лейкоцитов (PI3-K). PI3-K далее фосфорилирует мембранные липиды, что ведет к накоплению фосфатидил-инозитол-трифосфата (PIP₃), который и является критическим звеном в активации Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы – блокада PI3-K ингибирует продукцию супероксидного радикала (O₂^{•-}) – главного продукта фермента. PIP₃ взаимодействует с плекстрин-гомологичными (PH) доменами протеинов и активирует сериновую киназу – Akt/протеинкиназу В. Akt фосфорилирует субъединицу p47^{phox} по остаткам серина, что освобождает аутоингибиторную петлю

p47^{phox} и активирует эту субъединицу. Кроме того, PIP₃ инициирует замену ГДФ на ГТФ в Rac, в результате чего Rac активи-

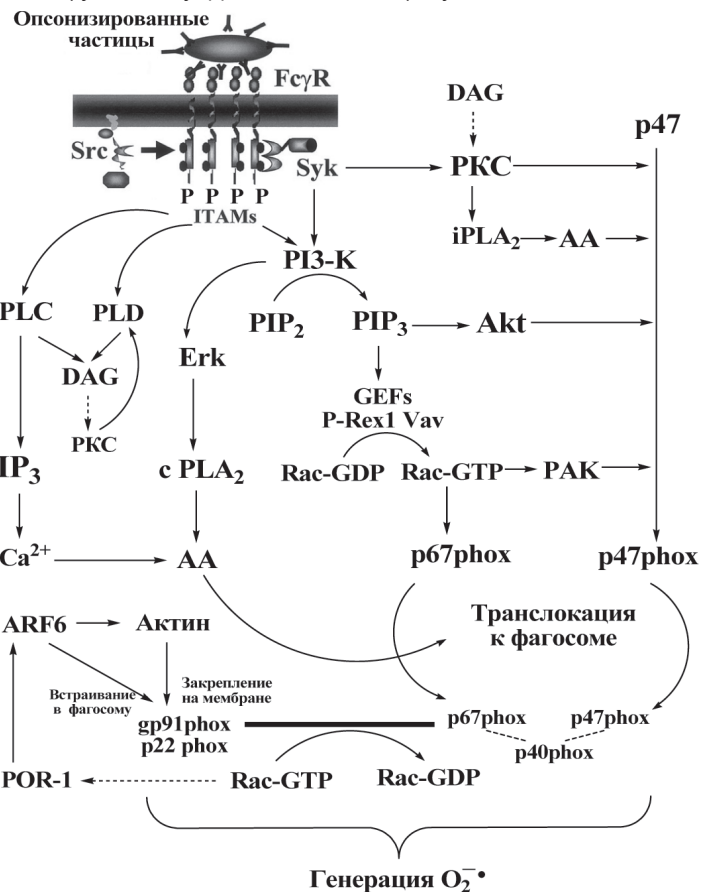


Рис. 1. FcγR-опосредованная активация НАД(Ф)Н-оксидазы (Nox2) в фагоцитах

руется. Активируемый Рас-ГТФ связывается с мембраной и взаимодействует с p67^{phox}, что является необходимой степенью активации оксидазы. Следующей степенью является фосфорилирование p47^{phox} за счет активности киназ, работающих ниже Рас, таких как p21-активируемая киназа (PAK). Фосфорилирование p47^{phox} является ключевым этапом активации Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы в котором принимают участие и другие эффекторные молекулы, включая протеинкиназу С (PKC) и арахидоновую кислоту (AA). Для макрофагов оба фактора исключительно важны. Так, PKC не только напрямую фосфорилирует p47, но и активирует индуцибельную фосфолипазу A₂ (iPLA₂), а также киназу Erk с последующей передачей сигнала на конститутивную фосфолипазу A₂ (cPLA₂). Это ведет к генерации AA, которая стимулирует транслока-

Таблица 1. Сравнительная эффективность изолированного и комбинированного действия нифедипина, колхицина, изопротеренола, ИБМК и ресвератрола на окислительный взрыв макрофагов (по критерию АУС ХЛ, n=4-6)

Состав комбинации	КОК ¹	IC ₅₀ ² (-Log, M)	Доверительный интервал (95%)	EC _{max} ³ (-Log, M)	E _{max} ⁴ , % (M±m)
Нифедипин	—	5,00	5,28;4,70	4,00	-71,8±3,4
Колхицин	—	4,89	5,40;4,40	4,00	-63,2±4,6
Изопротеренол	—	4,69	4,99;4,38	4,00	-66,0±6,1
ИБМК	—	5,12	5,31;4,94	4,00	-78,2±4,1
Ресвератрол	—	5,74	5,95;5,54	5,00	-70,0±4,5
Композиция 1 Нифедипин + Изопротеренол					
Нифедипин	1	4,42	5,09;8,76	5,00	-48,3±9,9 [#]
Изопротеренол	1	4,42	5,09;8,76	5,00	
Нифедипин	1	5,51	6,87;4,19	5,00	
Изопротеренол	10	4,51	5,87;8,19	4,00	-74,4±1,1
Композиция 2 ИБМК + Изопротеренол					
ИБМК	1	5,45	5,63;5,26	5,00	
Изопротеренол	1	5,45	5,63;5,26	5,00	-64,3±4,5
ИБМК	10	5,24	5,39;5,08	4,00	
Изопротеренол	1	6,24	6,39;6,08	5,00	-81,3±5,5 [†]
ИБМК	1	5,91	6,01;5,82	5,00	
Изопротеренол	10	4,91	5,01;4,82	4,00	-75,9±4,4 [†]
Композиция 3 ИБМК + Нифедипин					
ИБМК	1	5,58	5,71;5,45	5,00	
Нифедипин	1	5,58	5,71;5,45	5,00	-68,2±3,3
ИБМК	10	5,56	5,87;5,45	4,00	
Нифедипин	1	6,56	6,87;6,45	5,00	-81,3±3,5
ИБМК	1	6,24	6,39;6,09	5,00	
Нифедипин	10	5,24	5,39;5,09	4,00	-88,2±3,8 [#]
Композиция 4 Колхицин + Нифедипин					
Колхицин	1	4,53	5,41;8,66	4,00	
Нифедипин	1	4,53	5,41;8,66	4,00	-72,3±8,4
Колхицин	1	5,71	6,71;4,70	5,00	
Нифедипин	10	4,71	5,71;8,70	4,00	-78,1±10,0
Колхицин	1	6,86	7,87;5,84	6,00	
Нифедипин	100	4,86	5,87;8,84	4,00	-80,7±8,4
Композиция 5 Ресвератрол + Нифедипин					
Ресвератрол	1	5,65	6,26;5,03	5,00	
Нифедипин	1	5,65	6,26;5,03	5,00	-74,9±3,3
Ресвератрол	1	5,93	6,15;6,71	5,00	
Нифедипин	10	4,93	5,15;4,71	4,00	-79,1±1,7 [#]
Ресвератрол	10	4,79	6,80;2,79	5,00	
Нифедипин	1	5,79	7,80;8,79	6,00	-74,3±0,5
Композиция 6 Ресвератрол + Изопротеренол					
Ресвератрол	1	5,65	6,32;4,91	5,00	
Изопротеренол	1	5,65	6,32;4,91	5,00	-83,4±1,4 [†]
Ресвератрол	1	5,73	6,61;4,86	5,00	
Изопротеренол	10	4,73	5,61;8,86	4,00	-85,3±2,1 [†]

Примечание к таблицам 1 и 2. ИБМК – изобутил-метил-ксантин, ¹КОК – комбинаторное отношение компонентов, ²IC₅₀ – концентрация испытуемого соединения, ингибирующая респираторный взрыв макрофагов на 50% по отношению к контролю при индивидуальном или комбинированном применении (в виде отрицательного десятичного логарифма молярных концентраций); ³EC_{max} – максимальная эффективная концентрация, ⁴E_{max} – максимальный эффект, в % подавления ХЛ, указано среднее значение и ошибка среднего. P<0,05 в сравнении с изолированным действием () – ресвератрола, (#) – нифедипина, (?) – изопротеренола по t-критерию Стьюдента.*

цию p67^{phox} и p47^{phox} к мембране и их ассоциацию с Nox2 (gp91^{phox}) и p22^{phox} в полноценный ферментный комплекс.

После связывания FcγR с частицами, опсонизированными IgG, происходит активация киназ семейства Src, что ведет к фосфорилированию при их участии тирозиновых остатков в рецепторных доменах ITAM. Фосфорилированные ITAMs служат «стыковочными» сайтами для киназ Syc, которые инициируют несколько нисходящих сигнальных путей. Ключевым звеном для сборки и активации Nox2 является активация фосфотидилинозитол-3-киназы (PI3-K). PI3-K стимулирует накопление фосфотидил-инозитол-трифосфата (PIP₃), который активирует Akt и PIP₃-зависимые GEFs. Akt фосфорилирует p47^{phox}, а GEF стимулирует GDM-GTP обмен в Рас. Рас затем может активировать p67^{phox}, а также p21-активируемые киназы (PAK). PAK подобно Akt и PKC завершают фосфорилирование p47^{phox} по остаткам серина, тем самым обеспечивая сборку оксидазы. Важную роль играют и другие пути внутриклеточной сигнализации. Подробности в тексте.

Важные модулирующие влияния в сборку Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы привносят кальций, фосфолипазы C и D. Кальций облегчает высвобождение AA и реализацию её активности, обеспечивает деполимеризацию актина вокруг фагосомы и, возможно, «заякорение» на мембране Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы. Накопление кальция происходит при участии PLC и её продукта IP₃. PKC может управлять сборкой Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы через прямую активацию Erk и некоторых изоформ

Таблица 2. Сравнительная эффективность изолированного и комбинированного действия нифедипина, колхицина, изопротеренола, ИБМК и ресвератрола на окислительный взрыв макрофагов (по критерию DAUC ХЛ, n=6)

Состав комбинации	КОК ¹	IC ₅₀ ² (-Log, M)	Доверительный интервал (95%)	EC _{max} ³ (-Log, M)	E _{max} ⁴ , % (M±m)
Нифедипин	—	5,85	6,36;5,34	4,00	-99,9±2,9
Колхицин	—	4,89	5,29;4,50	4,00	-66,8±4,9
Изопротеренол	—	4,90	5,33;4,47	4,00	-81,6±2,1
ИБМК	—	5,59	5,76;5,41	4,00	-94,4±2,8
Ресвератрол	—	5,75	6,23;5,28	5,00	-76,5±5,0
Композиция 1 Нифедипин + Изопротеренол					
Нифедипин	1	4,59	5,69;8,48	5,00	
Изопротеренол	1	4,59	5,69;8,48	5,00	-59,8±15,5 [#]
Нифедипин	1	5,81	6,48;5,14	5,00	
Изопротеренол	10	4,81	5,48;4,14	4,00	-94,2±1,7 [†]
Композиция 2 ИБМК + Изопротеренол					
ИБМК	1	5,74	6,03;5,46	5,00	
Изопротеренол	1	5,74	6,03;5,46	5,00	-77,5±7,0
ИБМК	10	5,67	6,23;5,12	4,00	
Изопротеренол	1	6,67	7,23;6,12	5,00	-93,8±3,4 [†]
ИБМК	1	6,42	7,04;5,79	5,00	
Изопротеренол	10	5,42	6,04;4,79	4,00	-89,8±5,1
Композиция 3 ИБМК + Нифедипин					
ИБМК	1	5,90	5,97;5,83	5,00	
Нифедипин	1	5,90	5,97;5,83	5,00	-83,2±7,9
ИБМК	10	5,84	6,38;5,29	4,00	
Нифедипин	1	6,84	7,38;6,29	5,00	-92,7±3,7
ИБМК	1	6,62	7,20;6,04	5,00	
Нифедипин	10	5,62	6,20;5,04	4,00	-99,8±0,2
Композиция 4 Колхицин + Нифедипин					
Колхицин	1	4,91	5,82;4,02	4,00	
Нифедипин	1	4,91	5,82;4,02	4,00	-89,9±1,3
Колхицин	1	6,46	7,63;5,29	5,00	
Нифедипин	10	5,46	6,63;4,29	4,00	-96,6±3,4
Колхицин	1	8,11	8,89;7,35	6,00	
Нифедипин	100	6,11	6,89;5,35	4,00	-99,5±1,1
Композиция 5 Ресвератрол + Нифедипин					
Ресвератрол	1	6,14	7,18;5,09	5,00	
Нифедипин	1	6,14	7,18;5,09	5,00	-90,9±5,4 [†]
Ресвератрол	1	6,47	6,97;5,96	5,00	
Нифедипин	10	5,47	5,97;4,96	4,00	-99,9±3,3 [†]
Ресвератрол	10	5,73	7,23;4,23	5,00	
Нифедипин	1	6,73	8,23;5,23	6,00	-91,6±3,6 [†]
Композиция 6 Ресвератрол + Изопротеренол					
Ресвератрол	1	5,90	6,20;5,60	5,00	
Изопротеренол	1	5,90	6,20;5,60	5,00	-91,0±0,5 [†]
Ресвератрол	1	6,05	6,70;5,40	5,00	
Изопротеренол	10	5,05	5,70;4,40	4,00	-96,2±0,9 [†]

PLA₂. Фосфолипазы D и C играют важную роль в активации РКС за счет эффектов ди-ацил-глицерола (DAG) (рисунок 1). Кроме того, ГТФ-аза ARF6 активирует полимеризацию актина, а также индуцирует локальный экзоцитоз везикул и встраивание в мембрану фагосомы Nox2. Полимеризация актина способствует корректной сборке и закреплению на мембране всего ферментного комплекса.

Конечный этап сборки и активации Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы выглядит следующим образом.

- Фосфорилирование p47^{phox} ведет к конформационным изменениям, позволяющим ей взаимодействовать с p22^{phox}.

- Предварительно образованный комплекс p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} перемещается к мембране с образованием связи p47^{phox}-p22^{phox}.

- Рас ГТФ-аза взаимодействует с p67^{phox}, обеспечивая его правильную ориентацию и контакт с цитохромом, что в конце концов замыкает цепь транспорта электронов.

- Взаимодействие p47^{phox} и p40^{phox} с фосфоинозидами мембраны способствует дополнительному закреплению комплекса.

- Сборка активирует продукцию O₂• путем переноса электрона от НАДФНН⁺ цитозоля на кислород люминальной поверхности клетки. Продукция O₂• происходит внутрь фагосомы или любого клеточного образования в мембрану которого встроена полноценная Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаза. Другие АФК генерируются на основе супероксида.

Таким образом, важнейшее значение в активации Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы при FcγR-зависимом фагоцитозе имеет PI3 и катионы Ca²⁺, а также ассоциированные с ними механизмы внутриклеточной сигнализации. Эти же пути активиру-

ются при стимуляции рецепторов, ассоциированных с Gi-протеинами. Примером таких рецепторов являются CD14-TLR-4 макрофагов, с которыми взаимодействуют бактериальные липополисахариды (ЛПС) [12]. Каскады, индуцируемые их связыванием на фагоците, подобны тем, что описаны выше для FcγR-зависимого фагоцитоза. Блокада этих механизмов за счет прямых ингибиторных влияний или включения альтернативных путей внутриклеточного сигналинга должно приводить к ингибированию Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы, что является целью фармакотерапевтического воздействия при избыточной активации фермента.

Одним из наиболее доказанных конкурентных путей для PI3 в фагоцитах является аденилатциклазный каскад внутриклеточных событий, включающий накопление цАМФ с последующей активацией протеинкиназы А (РКА), индуцирующей несколько ответов, важнейшим из которых является инактивация пути c-Raf-1/Erk через подавление фосфорелирования c-Raf протеина [6]. Доминантная роль Erk в сборке Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы обсуждалась выше. Аденилатциклазы ассоциированы с Gs-протеинами, которые в свою очередь связаны со множеством 7-TMS рецепторов, представленных на мембране макрофага, включая рецепторы вазоактивного интестинального пептида, вазопрессина, простаглицина, паратиреоидного гормона, гистамина и серотонина, а также β-адренергические рецепторы [12]. С позиции фармакологического управления активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы последние привлекают особое внимание, поскольку множество лекарственных средств, используемых в клинической практике при патологии, ассоциированной с оксидантным стрессом и гиперактивностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз (атеросклероз, эндотелиальная дисфункция, вазоспазм, воспаление и др. [9]) являются агонистами или антагонистами этих рецепторов. С другой стороны, в медицинской практике широко используются прямые модуляторы внутриклеточного уровня цАМФ, такие как ингибиторы фосфодиэстераз (ФДЭ) и модуляторы цитоархитектоники. Изучение фармакодинамических

Таблица 3. Значения комбинаторного индекса (CI) для различных комбинаторных сочетаний нифедипина, колхицина, изопротеренола, ИБМК, ресвератрола (AUC ХЛ)

Состав комбинации	КОК ¹	CI для [C _{16%...84%}] ²					M [CI] ₃₀₋₇₀ ³	Итог (степень синергизма)
		16	30	50	70	84		
Композиция 1 Нифедипин + Изопротеренол								
Нифедипин	1	0,529	1,633	5,585	20,463	76,138	6,089	4-
Изопротеренол	1							
Нифедипин	1	4,908	2,907	1,783	1,143	0,768	2,238	3-
Изопротеренол	10							
Композиция 2 ИБМК + Изопротеренол								
ИБМК	1	1,079	0,805	0,649	0,612	0,694	0,721	2+
Изопротеренол	1							
ИБМК	10	1,411	1,060	0,796	0,616	0,510	0,898	1+
Изопротеренол	1							
ИБМК	1	0,377	0,483	0,750	1,334	2,482	0,714	2+
Изопротеренол	10							
Композиция 3 ИБМК + Нифедипин								
ИБМК	1	0,991	0,772	0,610	0,496	0,418	0,672	3+
Нифедипин	1							
ИБМК	10	0,278	0,329	0,394	0,475	0,573	0,375	3+
Нифедипин	1							
ИБМК	1	1,207	0,867	0,653	0,487	0,370	0,732	2+
Нифедипин	10							
Композиция 4 Колхицин + Нифедипин								
Колхицин	1	10,074	7,241	5,254	3,915	3,030	6,024	4-
Нифедипин	1							
Колхицин	1	8,099	4,197	2,123	1,082	0,573	2,987	3-
Нифедипин	10							
Колхицин	1	4,401	2,513	1,400	0,781	0,447	1,853	3-
Нифедипин	100							
Композиция 5 Ресвератрол + Нифедипин								
Ресвератрол	1	4,231	2,519	1,478	0,875	0,536	1,898	3-
Нифедипин	1							
Ресвератрол	1	3,093	2,374	1,835	1,445	1,164	2,040	3-
Нифедипин	10							
Ресвератрол	10	23,940	14,901	9,089	5,551	3,469	11,405	5-
Нифедипин	1							
Композиция 6 Ресвератрол + Изопротеренол								
Ресвератрол	1	12,630	4,196	1,361	0,466	0,183	2,629	3-
Изопротеренол	1							
Ресвератрол	1	9,976	4,182	1,932	1,057	0,684	2,911	3-
Изопротеренол	10							

Примечание к таблицам 3-6. ¹Комбинаторное отношение компонентов. ²IC [16%...84%] – концентрации модулятора, ингибирующие оксидантный взрыв на 16...84% по сравнению с контролем (в отсутствие модулятора). ³Средневзвешенное значение, рассчитанное, как M[CI]₃₀₋₇₀ = [3CI₃₀ + 2CI₅₀ + CI₇₀]/6.

Таблица 4. Значения комбинаторного индекса (CI) для различных комбинаторных сочетаний нифедипина, колхицина, изопротеренола, ИБМК, ресвератрола (DAUC ХЛ)

Состав комбинации	КОК ¹	CI для [C _{16%...84%}] ²					M [CI] ₃₀₋₇₀ ³	Итог (степень синергизма)
		16	30	50	70	84		
Композиция 1 Нифедипин + Изопротеренол								
Нифедипин	1	6,277	10,852	20,479	40,245	78,532	18,960	5-
Изопротеренол	1							
Нифедипин	1	4,401	3,072	2,315	1,942	1,805	2,631	3-
Изопротеренол	10							
Композиция 2 ИБМК + Изопротеренол								
ИБМК	1	1,674	1,190	0,838	0,596	0,434	0,974	0
Изопротеренол	1							
ИБМК	10	2,450	1,447	0,836	0,483	0,286	0,974	0
Изопротеренол	1							
ИБМК	1	1,037	0,686	0,452	0,302	0,208	0,544	3+
Изопротеренол	10							
Композиция 3 ИБМК + Нифедипин								
ИБМК	1	0,436	0,693	1,367	3,247	8,349	1,478	3-
Нифедипин	1							
ИБМК	10	1,395	0,943	0,662	0,519	0,485	0,779	2+
Нифедипин	1							
ИБМК	1	2,356	1,974	1,790	1,695	1,636	1,866	3-
Нифедипин	10							
Композиция 4 Колхицин + Нифедипин								
Колхицин	1	7,146	7,683	9,527	12,772	17,494	9,146	4-
Нифедипин	1							
Колхицин	10	2,067	2,240	2,491	2,797	3,138	2,417	3-
Нифедипин	1							
Колхицин	1	0,396	0,460	0,538	0,631	0,735	0,515	3+
Нифедипин	100							
Композиция 5 Ресвератрол + Нифедипин								
Ресвератрол	1	1,460	1,154	0,933	0,780	0,678	1,018	0
Нифедипин	1							
Ресвератрол	1	3,401	2,964	2,600	2,302	2,063	2,732	3-
Нифедипин	10							
Ресвератрол	10	2,778	1,821	1,164	0,780	0,532	1,429	2-
Нифедипин	1							
Композиция 6 Ресвератрол + Изопротеренол								
Ресвератрол	1	1,188	0,981	0,811	0,677	0,574	0,874	1+
Изопротеренол	1							
Ресвератрол	1	3,117	1,949	1,216	0,775	0,513	1,509	3-
Изопротеренол	10							

взаимодействий модуляторов цАМФ-зависимого сигналинга между собой, а также с ингибиторами внутриклеточных Ca^{2+} -токов представляет фундаментальный и прикладной интерес, поскольку не только позволяет установить паттерны кросс-регуляции этих каскадов, но выявить синергичные комбинации, являющиеся основой для разработки новых фармако-терапевтических тактик или лекарственных средств комбинированного состава. Такой основой могут быть и комбинации модуляторов внутриклеточного сигналинга с прямыми ингибиторами активности Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, такими как транс-ресвератрол и его структурные аналоги, вызывающие большой интерес исследователей в связи с уникальным спектром фармакологической активности.

Настоящее исследование посвящено изучению фармакодинамических взаимодействий 16-и комбинаторных сочетаний ингибиторов респираторного взрыва, обладающих различными молекулярными мишенями и механизмами действия в клетке.

Материал и методы

Среды и реагенты. В работе использовали транс-ресвератрол (3,4',5-тригидроксистильбен), колхицин, изобутил-метил-ксантин (ИБМК) – «Sigma-Aldrich», Германия; изопротеренол – «Serva», Германия; нифедипин – «Kraemer & Martin, Pharma Handels-GmbH», Германия; люминесцентный зонд люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) – «Sigma-Aldrich», Германия; среду Хенкса без индикатора – ОАО «Диалек», Беларусь; диметилсульфоксид – ООО «Фармтехноло-

гия», Беларусь; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимозан (сухие пекарские дрожжи); сыворотку крови крупного рогатого скота – ОАО «Диалек», Беларусь.

Комбинаторные сочетания. На первом этапе исследования изучалось индивидуальное действие транс-ресвератрола, колхицина, изобутил-метил-ксантина, изопротеренола, нифедипина в диапазоне концентраций от 10^{x9} до 10^{x4} М. По результатам этих испытаний было обосновано изучение следующих молярных комбинаторных сочетаний: ресвератрола и изопротеренола – 1/1 и 1/10 (10^{x8} – 10^{x5} М – ресвератрол + 10^{x7} – 10^{x4} М – изопротеренол); ресвератрола и нифедипина 1/1, 1/10, 10/1 (10^{x8} – 10^{x5} М – ресвератрол + 10^{x7} – 10^{x4} М – нифедипин); колхицина и нифедипина 1/1, 1/10, 1/100 (10^{x7} – 10^{x4} М – колхицин + 10^{x7} – 10^{x4} М – нифедипин); ИБМК и нифедипина 1/1, 10/1, 1/10 (10^{x8} – 10^{x4} М – ИБМК + 10^{x7} – 10^{x4} М – нифедипин), ИБМК и изопротеренола 1/1, 10/1, 1/10 (10^{x8} – 10^{x4} М – ИБМК + 10^{x7} – 10^{x4} М – изопротеренол), нифедипина и изопротеренола 1/1, 1/10 (10^{x7} – 10^{x4} М – нифедипин + 10^{x7} – 10^{x4} М – изопротеренол).

Получение клеток. Исследования выполнены на изолированных перитонеальных макрофагах-резидентах крыс линии Вистар массой 200 – 250 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия содержала более 98% жизнеспособных клеток по результатам теста с трипановым синим (0.1%), при дифференцированном подсчете которых в окрашенных мазках, макрофаги составляли около 90%.

Изучение респираторного взрыва. Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной (ИХЛ) генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251 – 002 (Финляндия).

Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемыми соединениями и их композициями при температуре 20 – 25 °С; контрольные пробы содержали эквивалентное количество среды. Каждый опыт проводился на клетках одного животного и включал весь изучаемый диапазон концентраций агента (комбинаторного сочетания). При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной сре-

Таблица 5. Значения индекса снижения дозы (DRI) для синергичных комбинаторных сочетаний нифедипина, колхицина, изопротеренола, ИБМК, ресвератрола (AUC ХЛ)

Состав комбинации	КОК ¹	DRI для [C ₁ ...C _n] ²					M [C] _{50/70} ³
		16	30	50	70	84	
Композиция 2 ИБМК + Изопротеренол							
ИБМК	1	1,0	1,4	2,1	3,1	4,5	1,9
Изопротеренол	1	15,5	9,5	5,7	3,5	2,1	7,2
ИБМК	10	0,7	1,0	1,3	1,8	2,4	1,2
Изопротеренол	1	112,2	63,9	35,4	19,7	11,2	47,0
ИБМК	1	4,3	5,2	6,2	7,5	9,0	5,9
Изопротеренол	10	6,8	3,5	1,7	0,8	0,4	2,5
Композиция 3 ИБМК + Нифедипин							
ИБМК	1	1,4	2,0	2,9	4,2	5,9	2,7
Нифедипин	1	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0	3,8
ИБМК	10	3,7	3,2	2,7	2,3	2,0	2,9
Нифедипин	1	95,9	59,6	36,2	22,0	13,7	45,5
ИБМК	1	4,1	7,2	13,1	23,8	42,2	11,9
Нифедипин	10	1,0	1,3	1,7	2,3	2,9	1,6

Таблица 6. Значения индекса снижения дозы (DRI) для синергичных комбинаторных сочетаний нифедипина, колхицина, изопротеренола, ИБМК, ресвератрола (DAUC ХЛ)

Состав комбинации	КОК ¹	DRI для [C ₁ ...C _n] ²					M [C] _{50/70} ³
		16	30	50	70	84	
Композиция 2 ИБМК + Изопротеренол							
ИБМК	1	0,7	1,0	1,4	2,1	3,1	1,3
Изопротеренол	1	5,3	6,1	7,0	8,0	9,2	6,7
ИБМК	10	0,4	0,7	1,2	2,1	3,6	1,1
Изопротеренол	1	32,8	43,8	59,3	80,3	107,4	55,1
ИБМК	1	2,2	3,8	6,8	12,1	21,0	6,2
Изопротеренол	10	1,7	2,4	3,3	4,6	6,2	3,1
Композиция 3 ИБМК + Нифедипин							
ИБМК	10	0,7	1,1	1,8	2,8	4,3	1,6
Нифедипин	1	32,8	43,8	59,3	80,3	107,4	55,1
Композиция 4 Колхицин + Нифедипин							
ИБМК	1	380,7	788,8	1688,4	3614,3	7488,2	1559,6
Нифедипин	100	2,5	2,2	1,9	1,6	1,4	2,0
Композиция 5 Ресвератрол + Нифедипин							
Ресвератрол	1	1,1	1,6	2,4	3,6	5,3	2,2
Нифедипин	1	1,8	1,9	1,9	2,0	2,0	1,9
Композиция 6 Ресвератрол + Изопротеренол							
Ресвератрол	1	1,1	1,2	1,4	1,6	1,9	1,3
Изопротеренол	1	4,2	6,5	10,0	15,6	23,7	9,2

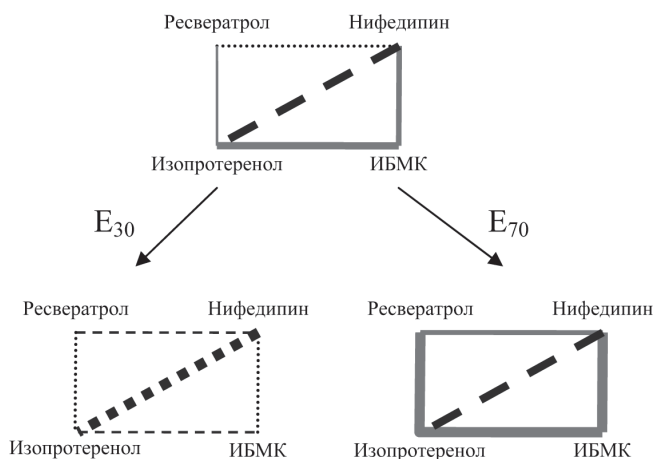


Рис. 2. Взаимодействие ресвератрола, нифедипина, изопротеренола, изобутил-метил-ксантина (ИБМК) на модели респираторного взрыва фагоцитов (DAUC ХЛ) по результатам испытания наиболее рациональных комбинаторных сочетаний: Н1/Изо10, ИБМК1/Изо10, ИБМК10/Н1, К1/Н100, Р1/Н1, Р1/Изо1

Условные обозначения: – синергизм (3+), – умеренный синергизм (2+), – слабый синергизм (1+), – аддитивный эффект (0), – слабый антагонизм (1-), – антагонизм (3-), – сильный антагонизм (4-).

ды Хенкса: 10^6 жизнеспособных макрофагов, люминол (7×10^{25} М), опсонизированный зимозан (5410^7 частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, изучаемый агент (комбинацию агентов); в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды.

Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах, содержащих изучаемые соединения (композиции) и контрольных, при постоянной температуре (37°C), в дискретном режиме с интервалом 2 – 3 мин, на протяжении 30 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и площади под кривой ХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC). Последний показатель отражает вклад Nox2 в продукцию общего пула АФК, генерируемых клеткой. Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые соединения (композиции), выражали в % к значениям контроля. Количество повторных опытов варьировало от 5 до 10.

Статистический анализ. Статистическую обработку первичных результатов внутри серии проводили с использованием парного t-критерия, межсерийные сравнения выполняли по t-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при вероятности ошибки $< 5\%$ ($p < 0,05$).

Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации ($IC_{16} - IC_{84}$) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6.1» и математических преобразований по Chou [5] при помощи специально разработанного алгоритма в программной оболочке MS «Excel».

Анализ взаимодействия. Результат взаимодействия тестируемых соединений оценивали по значению комбинаторного индекса (CI), который рассчитывался по формуле (1):

$$CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j}, \text{ где} \quad (1)$$

$(D)_j$ – доза (концентрация) агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; $(D_x)_j$ – доза (концентрация) агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.

Значения CI трактовали в соответствии со следующей шкалой [1]: $CI < 0,1$ – очень сильный синергизм (5+); $CI = 0,1-0,3$ – сильный синергизм (4+); $CI = 0,3-0,7$ – синергизм (3+); $CI = 0,7-0,85$ – умеренный синергизм (2+); $CI = 0,85-0,90$ – слабый синергизм (1+); $CI = 0,90-1,10$ – аддитивный эффект (0); $CI = 1,10-1,20$ – слабый антагонизм (1-); $CI = 1,20-1,45$ – умеренный антагонизм (2-); $CI = 1,45-3,3$ – антагонизм (3-); $CI = 3,3-10,0$ – сильный антагонизм (4-); > 10 – очень силь-

ный антагонизм (5-).

Индекс снижения дозы (DRI) компонентов комбинации рассчитывали по формуле (2):

$$DRI_j = \frac{(D_x)_j}{(D)_j} \quad (2)$$

Значение DRI показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента в комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием компонента.

Результаты представлены графически в виде распределений комбинаторного индекса (Fa-CI-plot) и индекса снижения дозы. (Fa-DRI-plot) как функция фракции Fa (фракции подавления ХЛ по отношению к контрольным значениям) в эффективном диапазоне $E_{10}-E_{95}$ (0,1-0,95). $CI < 1$, $= 1$ и > 1 показывает синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно. На диаграммах указан 95% доверительный интервал, рассчитанный с использованием методики T. Chou и H. Kim [5].

Результаты и обсуждение

В настоящей работе представлены результаты испытаний 6-и комбинаций, состоящих из соединений, ингибирующих респираторный взрыв фагоцитов при индивидуальном действии за счет различных механизмов управления клеточной активностью и внутриклеточной передачи сигнала.

Индивидуальное действие

Тестирование соединений показало, что они обладают сопоставимой ингибирующей эффективностью в отношении совокупной продукции АФК макрофагами, оцениваемой по E_{max} AUC ЛХЛ. Активность по критерию IC_{50} колебалась от $1,81 \cdot 10^{-6}$ М для ресвератрола, до $2,05 \cdot 10^{-5}$ М для изопротеренола (таблица 1).

В отношении Nox2-зависимого процесса максимальную эффективность демонстрировали нифедипин и ИБМК (94-99%), превосходя по этому показателю изопротеренол и ресвератрол (82-77%), наименьшую максимальную эффективность демонстрировал колхицин (67%). Наиболее активными по критерию IC_{50} были нифедипин и ресвератрол (таблица 2).

Ранее нами показано, что ингибирующее действие нифедипина на респираторный взрыв фагоцитов обусловлено блокадой медленных кальциевых токов [1], аналогичный эффект изопротеренола обесвечивается стимуляцией β -АР фагоцитов [2]. Что касается колхицина, то он вызывает деполимеризацию элементов цитоскелета и нарушает транспорт в фагоците, действие ИБМК обусловлено блокадой фосфодиэстераз [1, 2]. Активность ресвератрола обеспечивается по-

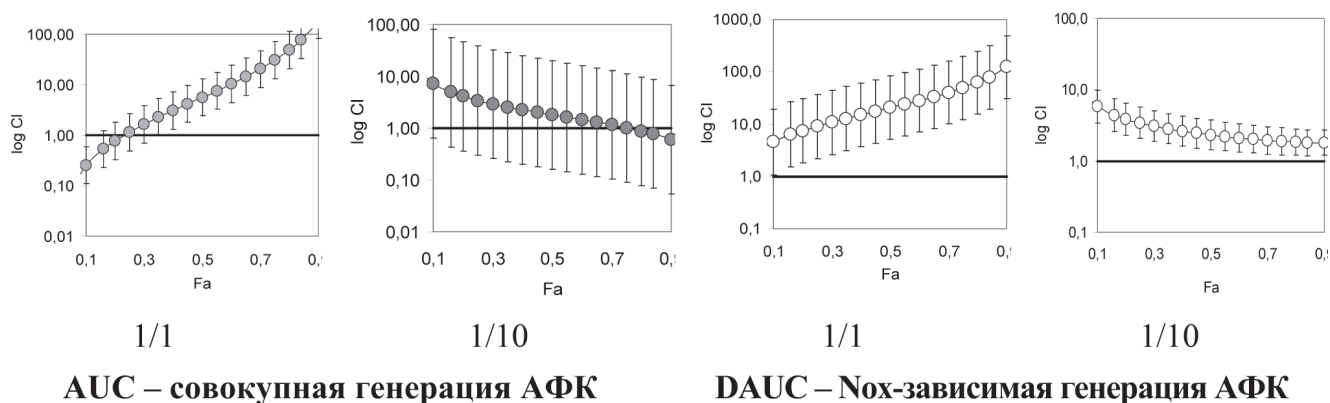


Рис. 3. Характер распределения CI (Fa-CI-plot) для различных комбинаторных сочетаний изопротеренола и нифедипина.

Здесь и на рис. 5-9 CI (Fa-CI-plot) представлен как функция фракции fa, полученная путем расчета по алгоритму Chou при fa 0,1-0,95. $CI < 1$, $= 1$ и > 1 показывает синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно. Указан 95% доверительный интервал, рассчитанный с использованием алгоритма T.C.Chou и H.Kim.

$\beta_{1,2}$ -АА – Изопроterenол

ЛПС, ОЗ

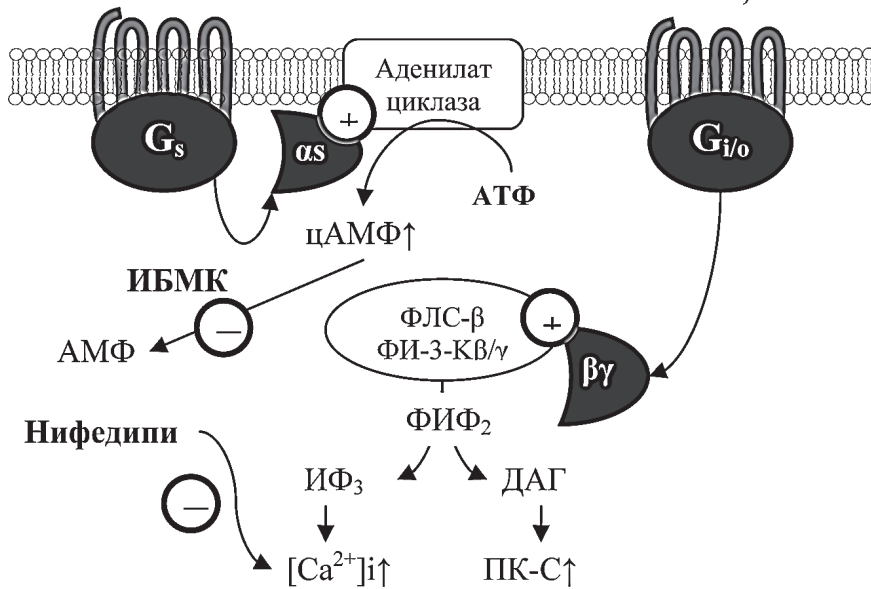


Рис. 4. Агонисты рецепторов, сопряженных с G_s - и G_i -протеинами, внутриклеточные сигнальные каскады и мишени испытанных соединений. ЛПС и опсонизированные частицы для упрощения представлены в виде лигандов G_i -ассоциированных рецепторов, хотя это справедливо только для CD14-TLR-4, Fc γ R работает подобно тирозинкиназам. Пояснения в тексте.

давлением сборки Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы [15].

Комбинированное действие

Результаты исследования можно представить в виде полигонограмм, наглядно показывающих результат фармакодинамических взаимодействий (рисунок 2). Взаимодействие нифедипина и колхицина в полигонограмму не включалось.

Комбинация 1. Изопроterenол + Нифедипин. Ингибирование внутриклеточных кальциевых токов нифедипином с одновременной стимуляцией β -AR изопроterenолом позволяют рассчитывать на фармакодинамический синергизм, проявляющийся в нашем тесте ингибированием респираторного взрыва. Вопреки ожиданиям, компоненты демонстрировали антагонизм на всех уровнях эффекта при любых комбинаторных сочетаниях (таблицы 3 и 4, рисунки 2 и 3).

Мишени изопроterenолола, нифедипина, использованного в тесте индуктора респираторного взрыва – опсонизированных дрожжевых частиц – и заинтересованные внутриклеточные мессенджеры представлены на рисунке 4.

Полученные результаты, тем не менее, можно объяснить несколькими клеточны-

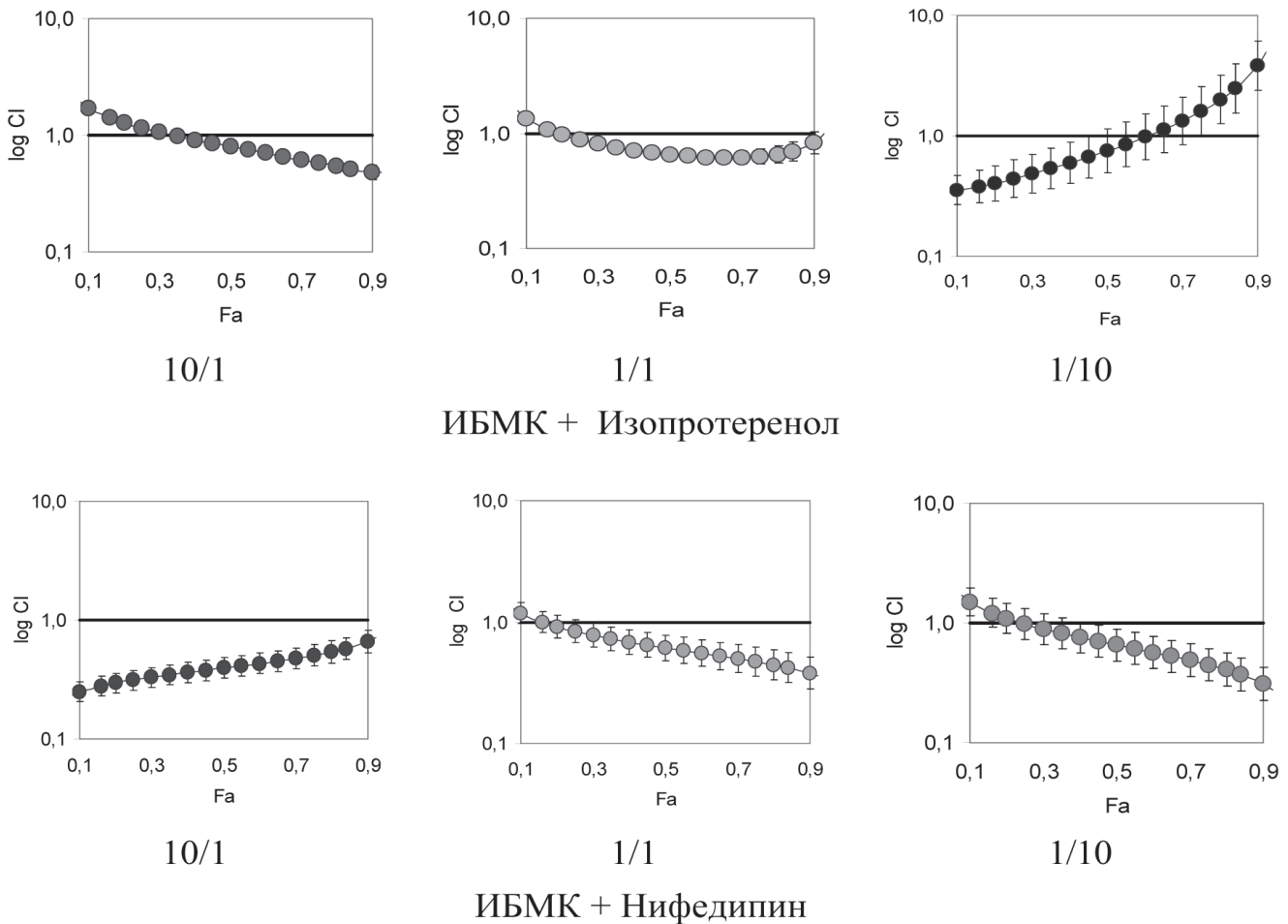


Рис. 5. Характер распределения CI (Fa-CI-plot) для различных комбинаторных сочетаний ИБМК, изопроterenолола, нифедипина (AUC – совокупная генерация АФК)

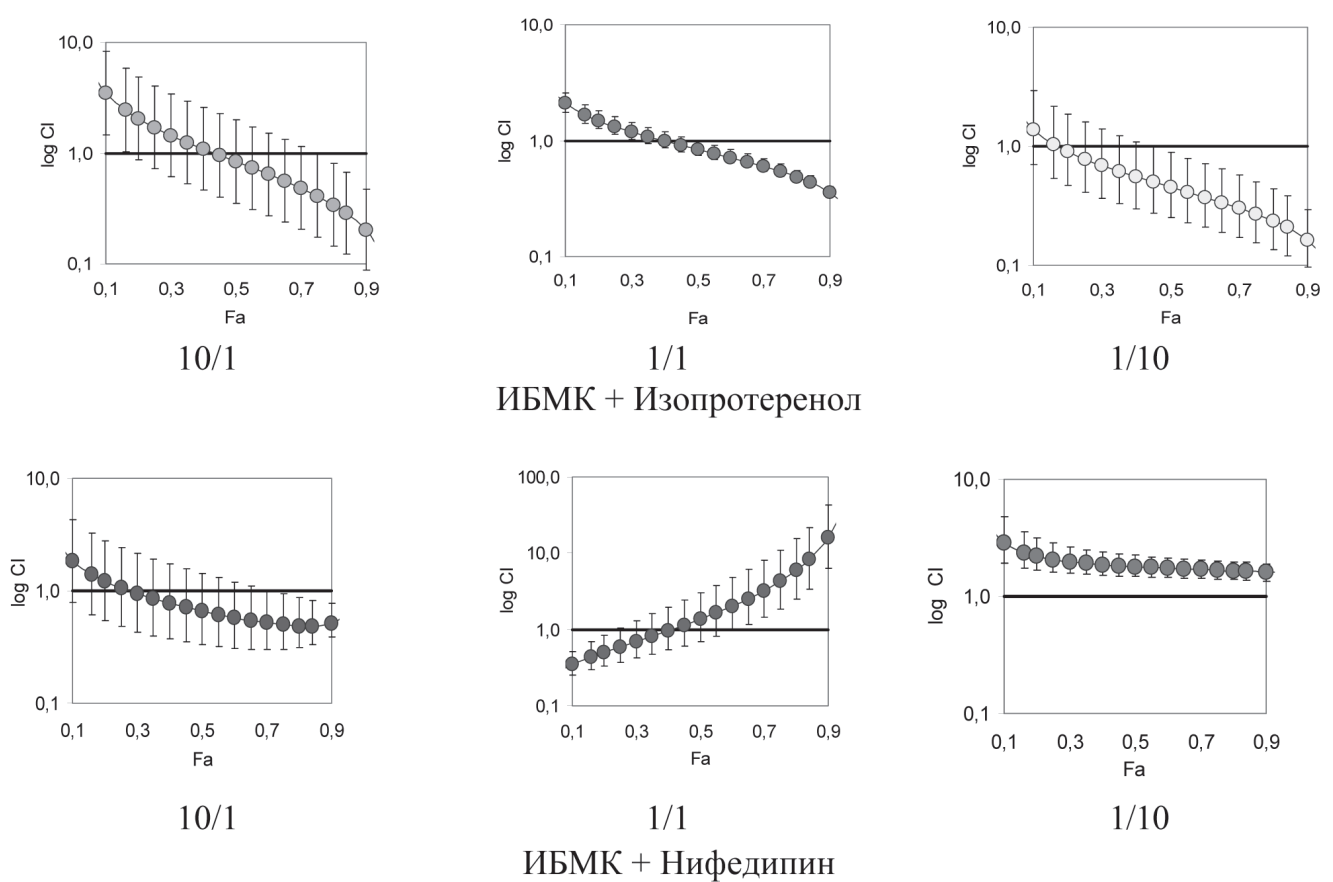


Рис. 6. Характер распределения CI (Fa-Cl-plot) для различных комбинаторных сочетаний ИБМК, изопротеренола, нифедипина (DAUC – Nox-зависимая генерация АФК)

ми феноменами, среди которых наиболее интересен эффект Gs/Gi-переключения (Gs/Gi-switch). Эффект установлен для многих GP-связанных рецепторов, включая и β -АР [11, 10] Сущность его состоит в том, что при определенных условиях β -АР способны стимулировать не Gs-протеины, сопряженные с РКА, а Gi-протеины с последующей активацией киназ MAP или других эффекторных молекул, оказывающих альтернативное РКА действие. То есть стимуляция β -АР способна индуцировать сигналы и через РКА, и через MAPK-ассоциированные пути, которые могут вступать в перекрестные взаимодействия друг с другом, регулируя клеточный ответ. Применительно к нашему исследованию важно то, что при связывании изопротеренола с β -АР перитонеальных макрофагов Gs/Gi-переключение ведет к одновременной и быстрой активации MAPK, Erk и p38, что в свою очередь не ингибирует, а, напротив, активирует Nox2 и запускает генерацию АФК (см. введение). В присутствии ингибиторов кальциевых токов, таких как нифедипин, подавляющих генерацию АФК,

реализация механизма Gs/Gi-переключения при действии изопротеренола будет вести к фармакодинамическому анта-

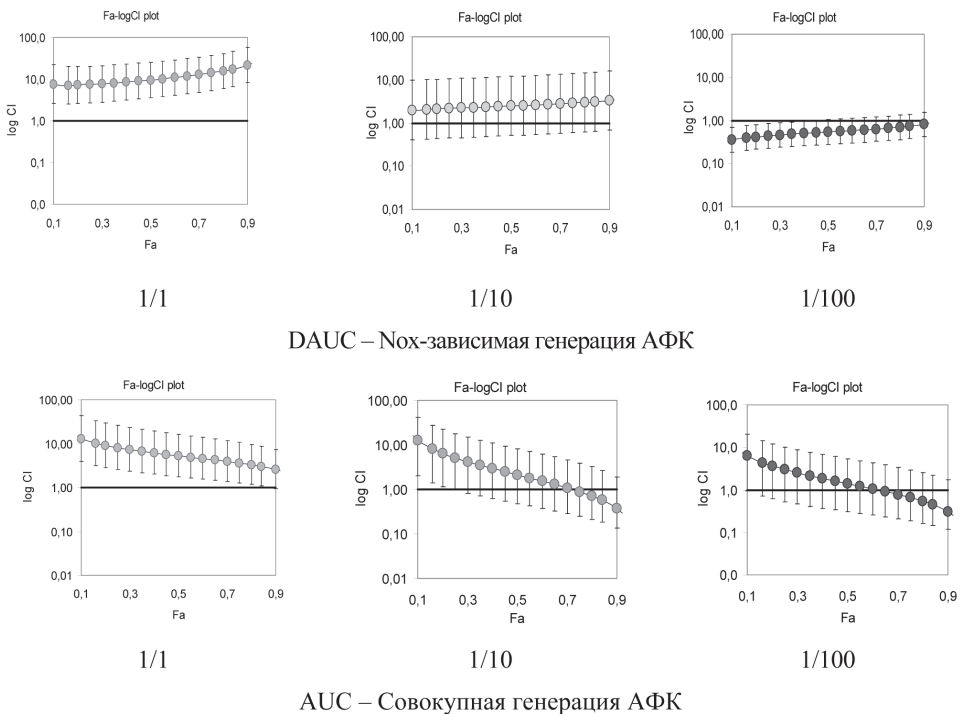


Рис. 7. Характер распределения CI (Fa-Cl-plot) для различных комбинаторных сочетаний Колхицин + Нифедипин

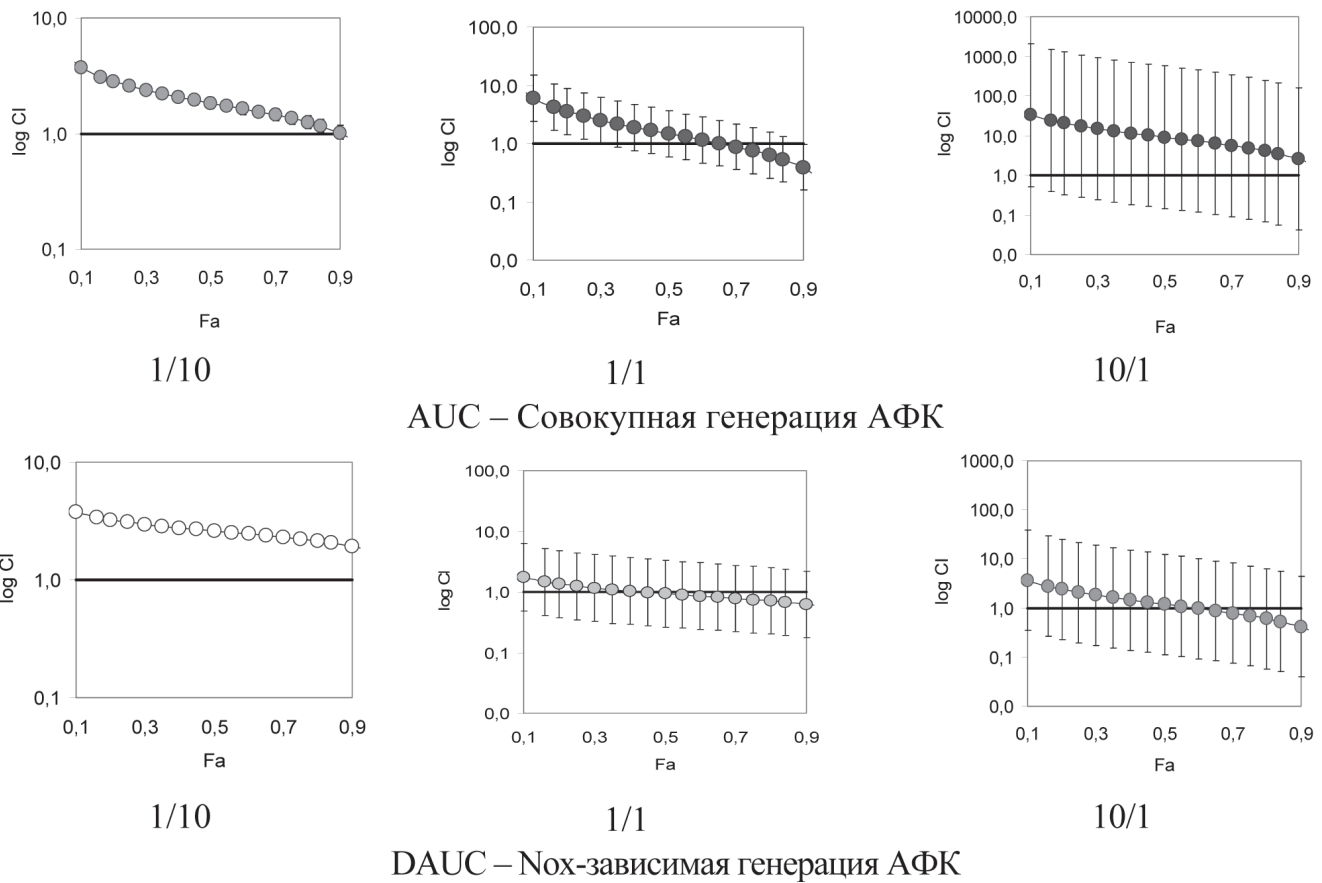


Рис. 8. Характер распределения CI (Fa-Cl-plot) для различных комбинаторных сочетаний ресвератрола и нифедипина

гонизму, что и зафиксировано в наших экспериментах. Симпатическая модуляция иммунного ответа через β -АР, экспрессированные на макрофагах считается одним из важных регуляторных механизмов, и при физиологических, и при патологических состояниях. Ранее критическое значение Gs/Gi-переключения в развитии воспалительного ответа макрофагов было показано при изучении действия изопротеренола на синтез воспалительных медиаторов (TNF- α , IL-12) и NO• [12]. Учитывая, что генерация АФК с участием Nox2 имеет важнейшее значение для синтеза и биологического действия указанных медиаторов воспаления, возможность Gs/Gi-переключения высоко вероятна. Такое переключение легко объясняет различия в действии избирательного агониста β_2 -АР салбутамола на спонтанную генерацию АФК и респираторный взрыв макрофагов, обнаруженный ранее в наших экспериментах [2].

Более того, принадлежность макрофагов к числу клеток, изменяющих свои ответы посредством переключения сигналинга между подтипами G-протеинов, может объяснить и варибельность ответов макрофагальной популяции на различные биологические стимулы, которая объяснялась прежде лишь гетерогенностью рецепторной экспрессии макрофагов, находящихся на разных стадиях дифференцировки.

Альтернативным механизму Gs/Gi-переключения является объяснение антагонизма нифедипина и изопротеренола особыми свойствами РКА, активности которой зависит от уровня внутриклеточного кальция. Значительное его падение инактивирует РКА и эффекты, реализуемые при её участии, нивелирует.

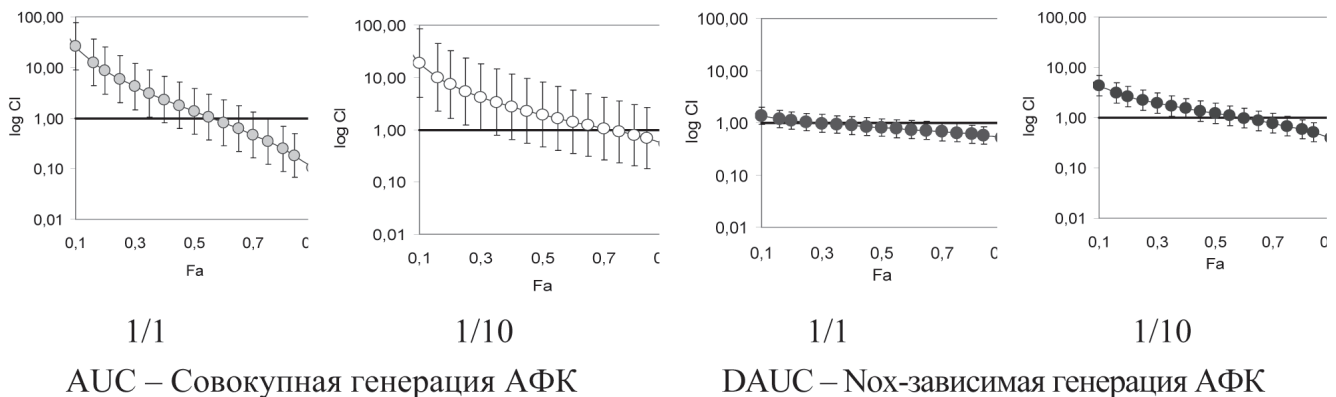


Рис. 9. Характер распределения CI (Fa-Cl-plot) для различных комбинаторных сочетаний ресвератрола и изопротеренола

ируется, а это в нашей тест-системе будет проявляться антагонизмом компонентов. Однако, учитывая, что антагонизм нифедипина и изопротеренола проявляется уже при низких концентрациях и характеризуется кинетикой насыщения, вклад этого механизма вряд ли можно считать значительным.

Комбинация 2. Изопротеренол + ИБМК. Наиболее рациональным молярным сочетанием оказалось десятикратное превалирование изопротеренола над ИБМК, при котором компоненты демонстрировали синергизм в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, если судить по средневзвешенным значениям комбинаторного индекса. Увеличение относительного содержания изопротеренола вело к уменьшению синергизма и появлению аддитивного действия при соотношениях ИБМК/изопротеренол 10/1...1/1. Избыточность изопротеренола подтверждается и расчетами индексов снижения дозы (DRI) (таблицы 5 и 6).

Эти результаты хорошо согласуются с функциональной ролью вторичных посредников в амплификации клеточных сигналов. Эффект также сильно зависел от концентрации. С увеличением концентрации синергизм в отношении Nox2-зависимой генерации АФК нарастал, в отношении совокупной генерации – снижался, вплоть до появления антагонизма (соотношение 1/10, рисунки 2, 5 и 6).

Возможно, это связано с различной чувствительностью АФК-генерирующих ферментов к эффектам цАМФ и альтернативными влияниями цАМФ-зависимых каскадов на активность Nox2-оксидазы и NO-синтазы [4].

Известно, что индукция респираторного взрыва фагоцитов сопровождается повышением уровня цАМФ, которое нарастает со временем и считается одним из механизмов постепенного затухания генерации АФК, препятствующих разрушению клетки-генератора [6]. Стимуляция β -AR фагоцитов, ассоциированных с Gs-протеином ведет к активации аденилатциклазы и индукции цАМФ-зависимых каскадов, что подавляет генерацию АФК. Одновременное воздействие ингибиторов ФДЭ, пролонгирующих действие цАМФ должно усиливать этот эффект. Таким образом, синергизм комбинаций изопротеренола и ИБМК легко объясним, не исключено, что и в этом случае происходят Gs/Gi-переключения, вклад которых будет более заметен в области низких концентраций. Возможно, именно этим эффектом объясняются выраженные дозовые зависимости фармакодинамических взаимодействий изопротеренола и ИБМК.

Комбинация 3. ИБМК + Нифедипин. В отношении Nox2-зависимого пула синергизм выявлен только при 10-кратном превалировании ИБМК над нифедипином. Соотношение 1/1 демонстрировало выраженную дозовую зависимость и антагонизм компонентов в области высоких концентраций, превалирование нифедипина проявлялось антагонизмом во всем эффективном диапазоне. Несмотря на результирующий синергизм компонентов в отношении совокупной генерации АФК, при инверсии молярного соотношения в пользу нифедипина, синергизм в области низких концентраций уменьшался. Эти паттерны могут быть следствием истощения эффектов ИБМК при превалировании нифедипина, поскольку вследствие низкой активности аденилатциклазы отсутствует молекулярная основа для реализации действия ингибиторов ФДЭ. Это подтверждается расчетом DRI для Nox2-зависимой генерации АФК, который показывает, что для нифедипина существует возможность значительного снижения концентрации во всем эффективном диапазоне даже при 10-кратном превалировании ИБМК (таблицы 5 и 6).

Комбинация 4. Колхицин + Нифедипин. Взаимодействие колхицина и нифедипина мало зависело от концентрации, но сильно от молярного соотношения компонентов. Если соотношение 1/1 демонстрировало сильный антагонизм в отношении как совокупной, так и Nox2-зависимой генерации АФК, то дальнейшее снижение содержания колхицина вело к

уменьшению антагонизма и появлению синергизма при 100-кратном превалировании нифедипина (рисунок 7). Возможно, в такой комбинации избыток колхицина нарушает лиганд-рецепторные взаимодействия нифедипина, что проявляется их антагонизмом. Что касается синергизма, то он может обеспечиваться одновременным подавлением Ca^{2+} -зависимой активности Nox2 при действии нифедипина и нарушением транслокации субъединиц фермента к клеточной мембране, что обеспечивается колхицином. Кроме того, колхицин повышает содержание в клетке цАМФ [16], что также может вносить вклад в синергизм компонентов.

Комбинации 5 и 6. Сочетания ресвератрола с изопротеренолом и нифедипином. Ресвератрол – один из наиболее хорошо изученных и широко известных компонентов красного вина считается высоко эффективным антиоксидантом и этим свойством объясняется множество его биологических эффектов. Однако в отношении супероксидного аниона – первичной АФК респираторного взрыва – ресвератрол, как радикальная ловушка, не эффективен. Его ингибирующее действие на респираторный взрыв фагоцитов связано с подавлением сборки Nox2 за счет нарушения взаимодействия субъединицы $gp91^{phox}$ и ГТФ-азы Rac – важнейшего этапа активации фермента [14, 15]. Ресвератрол широко изучается на биомоделях патологии, ассоциированной с оксидантным стрессом, и является перспективным соединением для разработки на его основе и основе его структурных аналогов новых лекарственных средств.

В композиции с нифедипином ресвератрол демонстрирует преимущественно антагонизм в отношении совокупной генерации АФК и аддитивный эффект в отношении Nox2-зависимой генерации при равноценном молярном соотношении компонентов или превалировании ресвератрола над нифедипином. Вероятность синергизма выше в области больших концентраций (рисунок 8).

Композиция ресвератрола и изопротеренола при равном молярном отношении компонентов демонстрирует аддитивный эффект в области низких концентраций и синергизм в области высоких в отношении Nox2-зависимой генерации. В отношении совокупного пула АФК эффект значительно зависит от дозы, как и в комбинации с нифедипином, синергизм выявлен только в области высоких концентраций компонентов (рисунок 9).

Антагонизм в области низких концентраций в отношении Nox2-зависимой генерации АФК и во всем эффективном диапазоне в отношении совокупной продукции АФК объясняется относительным увеличением вклада NO-синтазы и ксантиноксидазы при действии ресвератрола на фагоциты [14, 15]. Что касается синергизма высоких концентраций, он легко объясним изменениями клеточной сигнализации при действии нифедипина, изопротеренола и ресвератрола, которые обеспечиваются прямым подавлением кальций и Erk-зависимого участия арахидоновой кислоты в сборке ферментного комплекса [8].

Выводы

1. На модели Fc γ R-индуцированного респираторного взрыва макрофагов блокатор медленных кальциевых токов нифедипин и агонист β -адренергических рецепторов изопротеренол демонстрировали фармакодинамический антагонизм во всем эффективном диапазоне.

2. В отношении Nox2-зависимой генерации активных форм кислорода взаимодействия ингибитора фосфодиэстеразы изобутил-метил-ксантина и ингибитора Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы транс-ресвератрола с изопротеренолом и с нифедипином зависели от их концентраций в комбинации. В области низких концентраций доминировали аддитивные эффекты или слабый антагонизм, в области высоких – все композиции демонстрировали синергизм компонентов в наиболее рациональных молярных сочетаниях.

Литература

1. Бизунок, Н.А. Влияние цитоактивных агентов на НАДФ-оксидазную генерацию активных форм кислорода в макрофагах / Н. А. Бизунок, Б. В. Дубовик // Рецепт. 2006. №1. С. 36 – 39.
2. Бизунок, Н. А. Влияние адренергических средств на НАДФ-оксидазную продукцию активных форм кислорода в макрофагах / Н. А. Бизунок, Б. В. Дубовик // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т.71, №.2. С. 43 – 46.
3. Beutler, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade / B. Beutler // J. Invest. Med. 1995. Vol. 43. P. 227 – 235.
4. Chio, C. C. PKA-dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 by dibutyryl cAMP / C. C. Chio [et al]. // Cell Signal. 2004. Vol. 16. P. 565 – 575.
5. Chou, T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch Chou // Pharmacological reviews. 2006. Vol. 58. P. 621 – 681.
6. Cook, S. J. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf / S. J. Cook, F. McCormick // Science. 1993. Vol. 262. P. 1069 – 1072.
7. Forman, H. J. Signaling by the Respiratory Burst in Macrophages / H. J. Forman, M. Torres // IUBMB Life. 2001. Vol.51. P. 365 – 371.
8. Garcia-Garcia, E. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis / E. Garcia-Garcia, C. Rosales // J. Leukocyte Biol. 2002. Vol. 72. P. 1092 – 1108.
9. Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2008. Vol. 295. P. 849 – 868.
10. Kilts, J. D. $\beta(2)$ -adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G (s) and G (i) / Kilts JD [et al]. // Circ Res. 2000. Vol. 87. P. 705-716.
11. Lefkowitz, R. J. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity / R. J. Lefkowitz, K. L. Pierce, L. M. Luttrell / Mol Pharmacol. 2002. Vol. 62. P. 971 – 974.
12. Magocsi, M. Multiple G-protein-coupling specificity of β -adrenoceptor in macrophages / M. Magocsi [et al]. // Immunology. 2007. Vol. 122. P.503 – 513.
13. Mizrahi, A. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships / Ariel Mizrahi [et al].// J. Leukocyte Biol. 2006. Vol. 79. P. 881 – 895.
14. Opie, L. H. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules / L. H. Opie, S. Lecour // European Heart Journal. 2007. Vol. 28. P. 1683 – 1693.
15. Orallo, F. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption / F. Orallo [et al] // Molecular pharmacology. 2002. Vol. 61. № 2. P. 294 – 302.
16. Osebold, J. W. Mechanisms of action by immunologic adjuvants / J. W. Osebold // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1982. Vol. 181. P. 983 – 987.

Поступила 22.08.2011 г.