

Н.А. Бизунок¹, Б.В. Дубовик¹, О.И. Шадыро²,
Г.И. Полозов², В.А. Сорокин², Г.А. Ксендзова²

НОВЫЕ ИНДУКТОРЫ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА ФАГОЦИТОВ ИЗ ХИМИЧЕСКИХ КЛАССОВ ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАЩИЩЕННЫХ БЕНЗОКСАТИОЛОВ И ФЕНИЛАНИЛИНОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СРЕДСТВА

¹ УО «Белорусский государственный медицинский университет»

² УО «Белорусский государственный университет»

Обнаружено новое, до сих пор не известное свойство экранированных производных бензоксатиола и фениланилина (4,6-ди-*tert*-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ола (S13) и 3,5-ди-*tert*-бутил-2-метокси-*N*-фениланилина (N21)) – индуцировать респираторный взрыв фагоцитов, который является важнейшей частью иммунной резистентности млекопитающих. Механизмы индукции респираторного взрыва макрофагов для соединений S13 и N21 различаются, что подтверждается их различным влиянием на кинетику процесса, а также различным потенциалом сенситизации макрофагов к эффектам цитокинов. Соединения S13 и N21 представляют интерес для разработки на их основе лекарственных средств иммуностимулирующего типа действия, могут использоваться в клинической лабораторной практике для диагностики нарушений фагоцитарной функции при иммунодефицитах, а также в экспериментально-исследовательской работе для изучения клеточных механизмов иммунитета.

Ключевые слова: макрофаги, респираторный взрыв, иммунитет, иммуностимулятор, 4,6-ди-*tert*-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ол, 3,5-ди-*tert*-бутил-2-метокси-*N*-фениланилин, пространственно защищенные производные бензоксатиола и фениланилина.

N.A. Bizunok, B.V. Dubovik, O.I. Shadyro, G.I. Polozov, V.A. Sorokin, G.A. Ksendzova THE NOVEL INDUCTORS OF THE RESPIRATORY BURST OF PHAGOCYTES IN THE CHEMICAL CLASSES OF THREE-DIMENSIONAL PROTECTED BENZOXYATIOL AND PHENYLANILINE DERIVATIVES – POTENTIAL IMMUNOSTIMULANT DRUGS

In this article, we described the novel until an known quality of three-dimensional protected benzoxatiol and phenylaniline derivatives – 4,6-di-tert-butyl-2,2-dimethyl-1,3-benzoxatiol-7-ol (S13) and 3,5-di-tert-butyl-2-methoxy-N-phenylaniline (N21) – to induct of the respiratory burst of phagocytes, the important part of the mammalian immune tolerance. The molecular mechanisms of this chemicals is not similar, because they are different modify not only kinetics of the respiratory burst but also sensitization of macrophages to cytokines action. Both of them are interested lake a drugs potent stimulant of immunity and lake diagnostic reagents for clinical investigation of immunodeficiency couple with injury of the phagocyte functions, also in the science for cell immunity mechanisms investigation.

Key words: macrophages, respiratory burst, immunity, 4,6-di-*tert*-butyl-2,2-dimethyl-1,3-benzoxatiol-7-ol, 3,5-di-*tert*-butyl-2-methoxy-*N*-phenylaniline, three-dimensional protected benzoxatiol and phenylaniline derivatives.

Уникальное явление, присущее фагоцитам и называемое оксидантным (окислительным) взрывом¹, имеет важное биологическое значение для нормального функционирования иммунитета, поскольку обеспечивает разрушение фагоцитированных чужеродных объектов. Кроме того, оксидантный взрыв макрофагов необходим для процессинга захваченного объекта и его презентации на клеточной поверхности, а также для наработки цитокинов, что в совокупности обеспечивает адекватную индукцию лимфоцитарных механизмов иммунного ответа. Генетически детерминированные нарушения оксидантного взрыва проявляются тяжелой патологией – хронической гранулематозной болезнью [1, 2]. Недостаточность оксидантного взрыва может развиваться и при различных приобретенных иммунодефицитах, следствием чего являются снижение резистентности к инфекции, хронизация течения инфекционных процессов, индукция опухолевого роста [3, 4]. Недостаточность функции фагоцитов требует применения лекарственных средств иммуностимулирующего типа действия.

Иммуностимуляторы – средства, усиливающие иммунный ответ (лекарственные препараты или пищевые добавки, стимулирующие иммунные процессы) [5]. По механизму действия можно выделить иммуностимулирующие препараты с преимущественным эффектом на моноциты/макрофаги, В- и Т- лимфоциты и НК-клетки [6].

Сущность иммуностимулирующего действия средств, влияющих на моноциты/макрофаги, сводится к следующему. При проникновении микроба в макроорганизм первой клеткой, которая вступает в борьбу с ним, является тканевая макрофаг. Он поглощает и переваривает микробы, презентуя их антигенные пептиды Т- и В-клеткам и иницируя, тем самым, развитие клеточного и гуморального ответа. При этом макрофаг выделяет цитокины, которые активируют механизмы неспецифической резистентности и клетки их реализующие: нейтрофилы, моноциты/макрофаги, НК-клетки. Кроме того, цитокины действуют на Т- и В-лимфоциты, способствуя реализации специфического иммунного ответа. Таким образом, макрофаги являются первыми клетками, иницирующими проявления иммунной резистентности и иммунного реагирования. Лекарственными средствами, стимулирующими функции макрофагов, а также нейтрофилов и других гранулоцитов являются, прежде всего, препараты микробного происхождения (продигиозан, пирогенал, рибомунил, ликопид и др.), а также полимерный иммуномодулятор полиоксидоний [7]. Недостатками этих средств являются низкая избирательность действия в отношении иммунных механизмов защиты, высокая индивидуальная вариабельность эффективности, технологически сложная и дорогая система промышленного производства, определяющая высокую стоимость конечного продукта, сложность стандартизации готовых лекарственных средств, широкий спектр противопоказаний и побочных эффектов при их применении. Эти недостатки свидетельствуют об актуальности изыскания новых лекарственных средств иммуностимулирующего типа действия с преимущественным влиянием на функции фагоцитов.

Что касается лабораторной и экспериментальной практики, то в качестве средств индукции респираторного взрыва фагоцитов здесь также используют продукты бак-

териального происхождения или хемотаксические пептиды, такие как N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (FMLP; N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine; N-formyl-MLF), форбол-12-миристан-13-ацетат (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, PMA) – продукт, выделенный из оболочки туберкулезных бактерий, а также опсонизированный зимозан (OZ), представляющий собой сухие пекарские дрожжи, убитые нагреванием и опсонизированные иммуноглобулинами и компонентами комплемента, содержащимися в сыворотке крови [8]. К недостаткам первых двух соединений относятся: сложность получения, высокая стоимость, низкая стабильность, требующая глубокого охлаждения, высокая токсичность, OZ отличается высокой вариабельностью клеточного ответа и относительно низкая эффективность в качестве индуктора фагоцитарной генерации оксидантов, поэтому изыскание новых индукторов окислительного взрыва фагоцитов является исключительно актуальным для лабораторной и экспериментальной практики.

Изучение пространственно защищенных бензоксатиолов и фениланилинов позволило впервые обнаружить иммуностимулирующее действие соединений из этих классов – 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилина (представлен под шифром N21) и 4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ола (представлен под шифром S13). Настоящая работа представляет результаты испытания этих соединений в качестве индукторов респираторного взрыва макрофагов и изучение отдельных механизмов этого действия.

Материалы и методы

Среды и реагенты. Соединения 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилин (N21), 4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ол (S13), 3,5-ди-трет-бутил-пирокатехин (O11) синтезированы на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий БГУ, Беларусь. Кроме того, в работе использовали интерлейкин-1альфа (ИЛ-1 α), аскорбиновую кислоту, мелатонин, нифедипин, хинидин, изопреналин, колхицин, люминесцентный зонд люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) – «Sigma-Aldrich», Германия; среду Хенкса без индикатора – ФГУП «ИПВЭ», Россия; диметилсульфоксид – ООО «Фармтехнология», Беларусь; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимозан (сухие пекарские дрожжи); сыворотку крови крупного рогатого скота – ОАО «Диалек», Беларусь.

Изучение действия соединений N21 и S13 на окислительный взрыв фагоцитов in vitro. Исследование проводили на перитонеальных макрофагах крыс. Генерируемые макрофагами при окислительном взрыве АФК регистрировали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) на люминометре LKB-Wallac-1251 (Финляндия). Исследование начинали сразу после внесения тестируемых соединений в кювету люминометра, содержащую 10^6 жизнеспособных макрофагов в среде Хенкса и люминол ($7 \cdot 10^{-5}$ М), контрольные пробы не содержали тестируемых соединений. Конечные концентрации соединения N21 составляли 10^{-9} - 10^{-5} М, соединения S13 – 10^{-7} - 10^{-4} М. Для сравнения опсонизированный зимозан (OZ) вносили в кюветы с макрофагами (10^6) и люминолом ($7 \cdot 10^{-5}$ М) в количестве $5 \cdot 10^7$ частиц (максимальная эффективная концентрация). Объем пробы составлял 1 мл, питательной средой являлся раствор

¹ Oxidative burst – англ.

Хенкса без индикатора. Регистрацию ЛХЛ проводили при 37°C на протяжении 30 минут. Количественную оценку образования АФК осуществляли по площади под кривой ЛХЛ (AUC ХЛ, мВ ($\times 10^3$)) и максимальному значению люминесценции I_{\max} ХЛ, мВ. Показатели ЛХЛ проб, содержащих тестируемые соединения, выражали в % к контрольным значениям (без индуктора). Статистическую обработку результатов проводили с использованием парного t-критерия, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5%.

Изучение действия соединения N21 на окислительный взрыв фагоцитов ex vivo на фоне цитокиновой стимуляции. Известно, что отдельные цитокины, например, ИЛ-1 оказывают стимулирующее действие на окислительный взрыв фагоцитов [9]. Это свойство рассматривается как полезное при воспалительных заболеваниях инфекционной природы. Модифицирующее действие соединения N21 на опосредованную ИЛ-1 α стимуляцию окислительного взрыва фагоцитов изучали следующим образом. Соединение N21 вводили подкожно мышам-самкам линии СВА, массой 20-25 г в дозах 10, 30, 100 мг/кг в течение 5-и суток, контрольным животным назначают плацебо (n животных/группе = 10). На 6-е сутки у животных выделяли перитонеальные макрофаги. Макрофаги преинкубировали с ИЛ-1 α (Sigma, Германия) в концентрации 100 мкг/л в течение 40 мин при 38°C. В дальнейшем макрофаги переносили в кюветы люминометра (10^6 клеток/мл), добавляли люминол ($7 \cdot 10^{-5}$ М) и индуктор окислительного взрыва – опсонизированный зимозан в количестве $5 \cdot 10^7$ частиц. Объем пробы составляет 1 мл. Исследование выполняли методом хемилюминесценции, как описано выше (Этап 1). Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического варианта критерия Ньюмена-Кейлса, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Изучение механизма стимулирующего действия соединения S13 на окислительный взрыв фагоцитов in vitro. Действие соединения S13 оценивали в присутствии ранее испытанных ингибиторов макрофагальной генерации АФК различного механизма действия: антиоксидантов – аскорбиновой кислоты, мелатонина, 3,5-ди-трет-бутил-пирокатехина (соединение O11); блокатора Ca^{2+} -каналов нифедипина, блокатора Na^+ -каналов хинидина, агониста бета-адренорецепторов изопrenalина и ингибитора клеточной кинетики колхицина. Макрофаги преинкубировали с перечисленными соединениями в широком диапазоне концентраций (10^{-9} - 10^{-3} М) в течение 10 мин. при комнатной температуре, затем кюветы перенесли в люминометр и регистрировали фоновое свечение, после этого респираторный взрыв индуцировали внесением 10 мкМ соединения S13. Исследование хемилюминесценции выполняли, как описано выше (Этап 1).

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% ($p < 0,05$). Антиоксидант-

Таблица 1. Сравнительное действие соединения N21 и прототипа (OZ) на окислительный взрыв макрофагов

Индуктор, шифр	[С], мкмоль/л	n	AUC ХЛ, мВ ($\times 10^3$)		I_{\max} ХЛ, мВ	
			$M \pm m^1$	E^2	$M \pm m$	E
Контроль	Без индуктора	6	29,3 \pm 4,9	0,2	18,4 \pm 3,4	0,2
OZ	$5 \cdot 10^7$ частиц/мл ³	6	130,6 \pm 22,8	1,0	120,2 \pm 17,9	1,0
N21	0,1	6	59,4 \pm 11,1	0,5	33,4 \pm 4,1	0,3
	1,0	6	144,0 \pm 23,7	1,1	133,6 \pm 33,7	1,1
	10,0	6	670,8 \pm 126,8**	5,1	1455,1 \pm 506,1**	12,1

Примечание к таблице 1 – ¹Среднее значение и ошибка среднего значения. ²E – относительная эффективность. Рассчитывается как отношение люминесценции проб, содержащих N21 (контрольных), к пробам, содержащим OZ. Отличие N21 от OZ достоверно с ** $p < 0,01$ по парному t-критерию (двусторонний вариант). ³Максимальная эффективная концентрация OZ.

ную 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 [10] при помощи разработанного интерактивного алгоритма.

Результаты и обсуждение

Иммуностимулирующий потенциал соединения N21. Результаты исследования свидетельствуют о выраженном стимулирующем действии соединения N21 на окислительный взрыв фагоцитов. При внесении соединения N21 в клеточную систему макрофаги-люминол на 15-20-й минуте развивается интенсивное свечение, которое достигает максимума к 30-й минуте, а затем медленно затухает (рисунок 1.). Действие соединения N21 носит дозозависимый характер и достигает максимума при 10,0 мкМ (таблица 1). Интенсивность свечения, вызванного соединением N21, превосходит люминесценцию, индуцированную опсонизированным зимозаном примерно в 5 раз по критерию AUC ХЛ и в 12 раз по критерию I_{\max} ХЛ. Внесение соединения N21 в среду с люминолом, не содержащую макрофаги (люминол-Хенкс), или содержащую убитые клетки, не приводило к вспышке свечения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эффект соединения N21 обусловлен индукцией естественных АФК-генерирующих механизмов, присущих только жизнеспособным клеткам.

Дальнейшее изучение свойств соединения N21 показало, что при 5-и дневном введении соединение N21 не изменяет ответ фагоцитов на OZ, однако дозозависимо усиливает стимулирующее действие ИЛ-1 α на окислительный взрыв фагоцитов. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. Действие соединения N21 в отношении респираторного взрыва макрофагов, индуцированного OZ, на фоне ИЛ-1 α и в его отсутствие (AUC ХЛ, % к контролю, $M \pm m$, n=10)

Доза, мг/кг	OZ	ИЛ-1 α +OZ
Контроль (плацебо)	100,0 \pm 8,8	176,5 \pm 3,6
N21	10	125,9 \pm 10,3
	30	94,4 \pm 19,3
	100	111,7 \pm 7,6
		407,2 \pm 25,6*

Примечание к таблице 2 – * $p < 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса в сравнении с контролем (ИЛ-1 α +OZ).

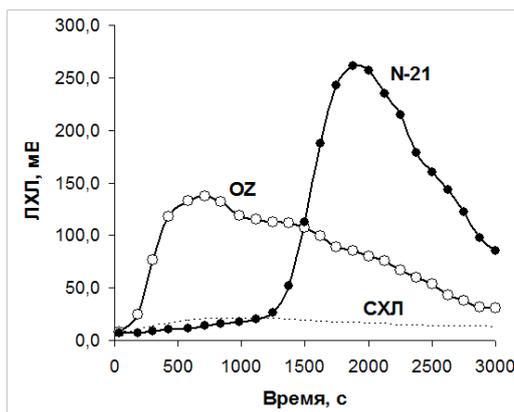
Эффект, заключающийся в усилении ответа эффекторной системы на одни стимулы после действия других, называется в фармакологии сенситизацией. Сенсити-

зация фагоцитов к эффектам цитокинов, в данном случае к ИЛ-1 α , имеет важное биологическое значение, поскольку ведет к усилению оксидантного взрыва и более эффективному разрушению поглощенных фагоцитами объектов, что является полезным свойством для антиинфекционной и противоопухолевой защиты.

Таким образом, в ряду пространственно защищенных фениланилинов обнаружен новый высоко эффективный индуктор генерации активных форм кислорода в макрофагах (соединение N21), который сенситизирует макрофаги к действию цитокинов при предварительном курсовом назначении млекопитающим. Дальнейшее изучение этого соединения представляется перспективным с позиций изыскания новых средств управления редкоассоциированным иммунным ответом.

Иммуностимулирующий потенциал соединения S13. При внесении соединения S13 в клеточную систему макрофаги-люминол на 5-10 минуте развивается интенсивное свечение, которое носит нелинейный дозозависимый характер с экстремумом при 10-30 мкМ (таблица 3). Интенсивность свечения, вызванного соединением S13, превосходит люминесценцию, индуцированную опсонизированным зимозаном в 4 раза по AUC ХЛ, и в 8 раз по I_{max} ХЛ. Внесение соединения S13 в среду с люминолом, не содержащую макрофаги (люминол-Хенкс) или содержащую убитые клетки, не приводило к вспышке свечения.

Если соединение S13 вносится одновременно с OZ или за 5 мин до его внесения, относительно слабое стимулирующее действие (в 2,5 раза) проявляется только при максимальной из исследованных концентра-



Индукторы вносились в нулевой момент времени. Видно, что действие соединения N21 имеет больший латентный период и по эффективности соединение N21 превосходит прототип.

Рис. 1. Действие соединения N21 и прототипа OZ на хемилюминесценцию макрофагов

ций – 100 мкМ. С одной стороны это может быть следствием уменьшения свободной фракции соединения S13 из-за его адсорбции на частицах зимозана, в избытке находящегося в тест-системе (50 частиц/клетку), с другой – показателем конкурентного истощения механизмов клеточной генерации АФК при совместном действии индукторов. Последнее предположение подтверждают результаты экспериментов с перекрестной индукцией – воздействие OZ на клетки, испытавшие «удар» S13, столь же безрезультатно, как и воздействие S13 после OZ (рисунок 2); не изменяло динамики люминесценции и повторное добавление обоих индукторов.

Другим подтверждением активного стимулирующего действия соединения S13 на клеточный механизм образования АФК является тот факт, что в среде ФСБ-А, лишенной ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, которые необходимы для реализации клеточного ответа, как OZ, так и соединение S13, утрачивают эффективность (рисунок 3).

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что эффект соединения S13 обусловлен действием на АФК-генерирующие механизмы жизнеспособных клеток.

На следующем этапе исследования действие S13 изучалось в присутствии ингибиторов зимозан-индуцированной генерации АФК различного фармакодинамического профиля. Эффект исследованных соединений представлен в таблице 4 и рисунках 4 и 5.

Исследованные антиоксиданты (аскорбат, мелатонин, соединение O11) эффективно подавляли генерацию АФК, индуцированную соединением S13. Интересно, что во всех случаях угол наклона зависимости «концентрация эффект» увеличивался, что приводило к сужению диа-

пазона эффективных концентраций. Мелатонин и соединение O11 при этом обладали несколько большими I_{С₁₆}, что касается аскорбата, то его активность и эффективность увеличились по сравнению с зимозан-индуцированным процессом. В совокупности эти результаты могут отражать различия качественного состава и количественного соотношения генерируемых свободных радикалов при действии обоих индукторов. Возможно, изменение дозовых зависимостей отражает превалирование генерации углерод-центрированных радикалов при действии соединения S13. Это предположение позволяет объяснить изменение активности аскорбата. Аскорбат может выступать в качестве ловушки и кислород-

Таблица 3. Сравнительное действие соединения S13 и прототипа (OZ) на окислительный взрыв макрофагов

Индуктор, шифр	[С], мкмоль/л	n	AUC ХЛ, мВ (×10 ³)		I _{max} ХЛ, мВ	
			M±m ¹	Относительная эффективность ²	M±m	Относительная эффективность
Контроль	Без индуктора	9	17,8±2,1	0,1	8,8±1,9	0,1
OZ	5·10 ⁷ /мл ³	9	149,4±23,3	1,0	145,4±34,3	1,0
S13	0,1	3	14,6±2,5	0,1	7,2±1,2	0,1
	1,0	9	19,4±3,8	0,1	10,5±3,5	0,1
	3,0	6	32,3±7,4	0,2	19,3±5,6	0,1
	6,0	4	150,8±37,9	1,0	267,8±87,0*	1,8
	10,0	8	417,3±89,2*	2,8	891,7±198,9**	6,1
	30,0	6	551,2±121,4*	3,7	1145,1±247,5**	7,9
	100,0	9	249,0±54,1*	1,7	326,2±59,1*	2,2

Примечание к таблице 3 – ¹Среднее значение и ошибка среднего значения. ²Рассчитывается как отношение люминесценции проб, содержащих S13 к пробам, содержащим OZ. Отличие от OZ достоверно с *p<0,05; **p<0,01 по парному t-критерию (двусторонний вариант). ³Максимальная эффективная концентрация OZ.

центрированных, и углерод-центрированных органических радикалов, при чем последние подавляются наиболее эффективно, поскольку реакции фрагментации протекают с участием водорастворимых соединений или реализуются в гидрофильных составляющих амфифильных веществ. При достаточно высоких концентрациях углерод-центрированных радикалов аскорбат может работать и как окислитель, и как восстановитель, при этом создаются условия для регенерации молекул и самого антиоксиданта [11].

Действие модуляторов клеточных функций отличается некоторыми особенностями. Нифедипин и изопреналин одинаково эффективно подавляли стимулирующее действие обоих индукторов, хинидин проявлял большую активность и эффективность в отношении S13-индуцированного процесса, тогда как колхицин, напротив, был менее эффективен (рисунки 4 и 5).

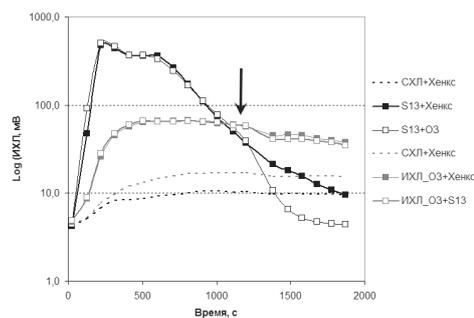
Эти данные свидетельствуют о том, что для индукции S13 внутриклеточные кинетические процессы и функция цитоскелета имеют меньшее значение, тогда как изменение ионных токов более значимо. Не следует, однако, забывать и о том, что хинидин обладает прямым антиоксидантным действием, эффективность которого может зависеть от качественного и количественного выхода свободно-радикальных интермедиатов. В то же время индукция S13, также как и OZ, подавляется стимуляцией аденилатциклазного каскада и блокадой кальциевых токов. В совокупности с влияниями колхицина и хинидина это заставляет предполагать, что S13 работает как индуктор механизмов активации Nox2 и, возможно, иных внутриклеточных генераторов АФК.

Известно, что соединения, обладающие способностью модифицировать редокс-состояние клеток и тканей оказывают в ряде случаев противовирусное действие [12, 13]. Исследование соединения S13 в клеточной культуре рабдомиосаркомы человека, инфицированной вирусом простого герпеса (ВПГ-1) показало его выраженное противовирусное действие в том же диапазоне концентраций, что и при индукции макрофагальной генерации АФК [14]. В действующем диапазоне концентраций цитотоксического действия на клеточную культуру не выявлено. Эффекта сенситизации макрофагов к действию

Таблица 4. Модулирующее действие некоторых фармакологически активных соединений на генерацию АФК, индуцированную OZ и S13

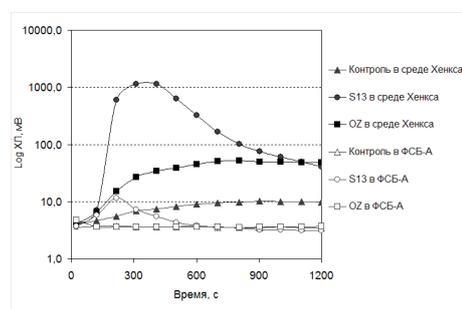
Механизм действия	Название	IC ₅₀ , мкМ			
		S13		OZ	
		М	ДИ ₉₅ ¹	М	ДИ ₉₅ ¹
Антиоксиданты	Аскорбиновая кислота	8,7	1,7/46,1	— ²	—
	Мелатонин	120,0	4,4/3200,0	298,0	61,6/1440,0
	O11	0,04	0,01/0,12	0,004	1,0·10 ⁻⁵ /1,2
Блокаторы Ca ²⁺ -каналов	Нифедипин	9,0	0,4/197,0	10,0	0,26/384,0
Блокаторы Na ⁺ -каналов	Хинидин	10,0	3,3/29,9	235,0	32,3/1710,0
Агонисты бета-АР	Изопреналин	8,1	3,9/16,9	20,0	0,1/316,0
Ингибиторы клеточной кинетики	Колхицин	100,0	24,9/402,0	13,0	0,4/433,0

Примечание к таблице 4 – ¹ 95% доверительный интервал для области значений линии регрессии; ² диапазон исследованных концентраций – 10⁻⁶–10⁻³ М.



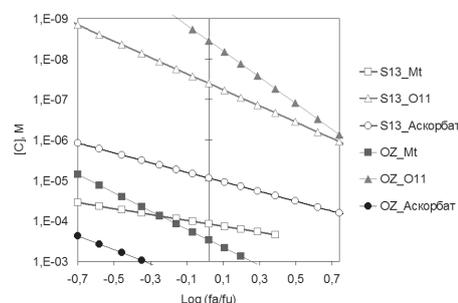
Момент повторной индукции указан стрелкой, первичная индукция осуществлялась в нулевой момент времени. Видно, что ни один из индукторов не вызывает повышения генерации АФК при повторном перекрестном внесении в тест-систему.

Рис. 2. Эффект повторного перекрестного внесения индукторов макрофагальной генерации АФК – опсонизированного зимозана (OZ) и соединения S13

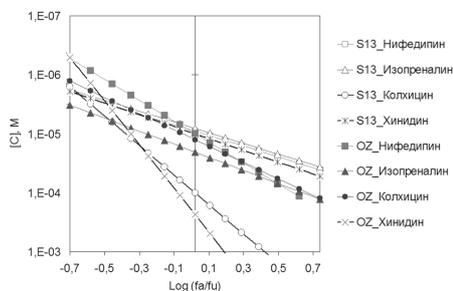


Видно, что в среде, лишенной ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (ФСБ-А), индукторы генерации АФК – соединения S13 и OZ – утрачивают активирующие свойства.

Рис. 3. Влияние состава среды на эффективность соединения S13 и прототипа – OZ



А – Действие антиоксидантов



В – Действие клеточных модуляторов

Log (fa/fu) – логарифм отношения эффективной к неэффективной фракции; [C], М – концентрация вещества в моль/л; Mt – мелатонин, O11 – 3,5-ди-трет-бутилпирокатехин.

Рис. 4. Распределение медианного эффекта при действии различных модуляторов клеточных процессов и антиоксидантов на модели ЛХЛ макрофагов при индукции респираторного взрыва OZ и соединением S13

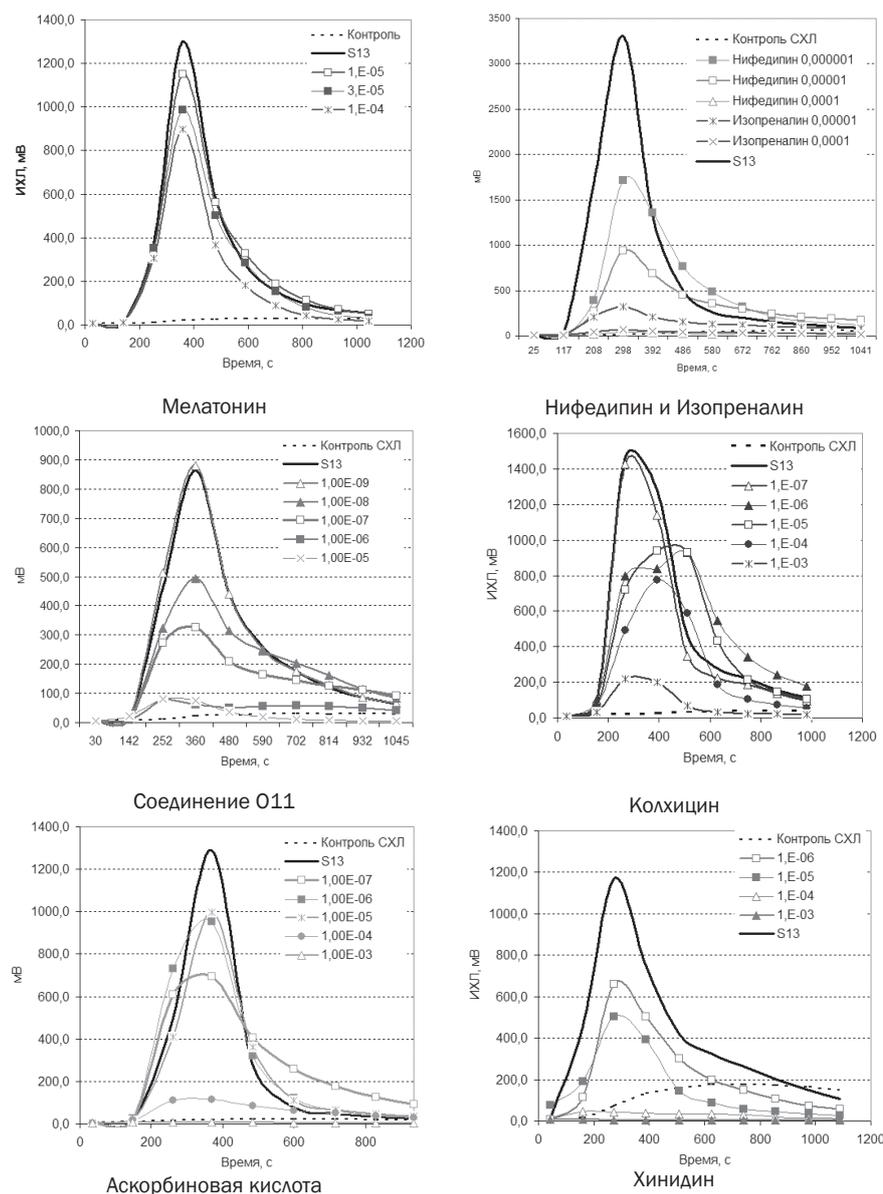


Рис. 5. Влияние различных модуляторов клеточного метаболизма и антиоксидантов на кинетику макрофагальной генерации АФК, индуцированную соединением S13.

цитокинов, обнаруженного для соединения N21, установить не удалось.

Таким образом, в ряду пространственно защищенных бензоксатиолов обнаружен новый высокоэффективный индуктор генерации активных форм кислорода в макрофагах (соединение S13). Дальнейшее изучение этого соединения представляется перспективным с позиций изыскания новых средств управления редокс-ассоциированным иммунным ответом.

Выводы

1. Обнаружено новое, до сих пор не известное свойство экранированных производных бензоксатиола и фениланилина (4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ола (S13) и 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилина (N21)) – индуцировать респираторный взрыв фагоцитов, который является важнейшей частью иммунной резистентности млекопитающих.

2. Механизмы индукции респираторного взрыва макрофагов для соединений S13 и N21 различаются, что подтверждается их различным влиянием на кинетику процесса, а также различным влиянием потенциалом сенситизации макрофагов к эффектам цитокинов.

3. Соединения S13 и N21 представляют интерес для разработки на их основе лекарственных средств иммуностимулирующего типа действия, могут использоваться в клинической лабораторной практике для диагностики нарушений фагоцитарной функции при иммунодефицитах, а также в экспериментально-исследовательской работе для изучения клеточных механизмов иммунитета.

Литература

1. Гомес, Л.А. Хроническая гранулематозная болезнь: спектр клинико-лабораторных нарушений, тактика терапии / Л.А. Гомес, М.Н. Ярцев, А.А. Барсуков, В.Л. Присяжнюк // Педиатрия. 1991. №8. С. 65-70.
2. Curnette, J.T. Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level / J.T. Curnette // Clin. Immunol. Immunopathol. 1993. V.67. P. 2-15.
3. D Geraint, J. A clinicopathological classification of granulomatous disorders / J.D Geraint // Postgrad. Med. J. 2000. V.76. P. 457-465.
4. Клиническая иммунология и аллергология. Учебное пособие / под ред. А.В. Караулова. М.: Медицинское информационное агенство, 2002. 651 с.
5. Хаитов, Р.М. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты их клинического применения / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Клиническая медицина. 1996. Т.74, №8. С. 7-12.
6. Hadden, J.W. Immunostimulants / J.W. Hadden // Immunol.Today. 1993, V.14. P. 275-280.
7. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. Ежегодный сборник. Выпуск 9. ООО «РАС-2002», 2002. 1504 с.
8. Fülöp, T. Studies on opsonized zymozan, FMLP, carbachol, PMA and A23187 stimulated respiratory burst of human PMNLs / T. Fülöp, Jr, Varga Z, Nagy JT, Foris G. // Biochem. Int. 1988. V.17, N.3. P. 419-426.
9. Sample, A.K. Priming and stimulation of bovine neutrophils by recombinant human interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha / A.K. Sample, C.J. Czuprynski // J. Leuk. Biol. 1991. V.49. P. 107-115.
10. Chou, T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch Chou // Pharmacological reviews. 2006. V. 58. P. 621-681.
11. Бринкевич, С.Д. Влияние аскорбиновой кислоты и её производных на радиационно-химические превращения гидроксилсодержащих органических соединений / С.Д. Бринкевич, О.И. Шадыро // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42. №4. С. 297-302.
12. Бельков, М.В. Внутримолекулярные взаимодействия в противовирусно активных производных 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола / М.В. Бельков, Г.А. Ксендзова, Г.И. Полозов, И.В.

Оригинальные научные публикации

Скорняков, В.Л. Сорокин, Г.Б. Толсторожев, О.И. Шадыро // Журнал прикладной спектроскопии. 2009. Т. 76. №3. С. 435-439.

13. Бельков, М.В. Внутримолекулярные взаимодействия в противовирусно активных производных 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенола / М.В. Бельков, Г.А. Ксендзова, П.И. Кузовков, Г.И. Полозов, И.В. Скорняков, В.Л. Сорокин, Г.Б. Толсторожев, О.И. Шадыро // Журнал прикладной спектроскопии. 2007. Т. 74. №5. С. 577-582.

14. Патент ВУ 11659, МПК А 61К 31/39, А 61Р 31/00. Ингибитор размножения вирусов герпеса / Бореко Е.И., Дубовик Б.В., Бизунок Н.А., Павлова Н.И., Повалишев В.Н., Полозов Г.И., Савинова О.В., Шадыро О.И.

Поступила 2.11.2012 г.