

## ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМБИНАЦИЙ ИНОЗИНА И АТФ С L- АРГИНИНОМ И САЛИЦИЛАТАМИ

Агонист Р-II пуриновых рецепторов АТФ и агонист аденозиновых рецепторов инозин в сочетании с ацетилсалициловой кислотой и L-аргинином обладают преимущественно стимулирующим влиянием на макрофагальную генерацию АФК в широком диапазоне концентраций и комбинаторных соотношений.

Комбинация инозина с L-аргинином в комбинаторном соотношении 1/1 обладает выраженным стимулирующим действием на Nox2-зависимую генерацию АФК в биологически приемлемом диапазоне концентраций и является основой для разработки лекарственных средств иммуностимулирующего типа действия.

Комбинация на основе инозина, салициловой кислоты и L-аргинина демонстрирует сильный синергизм компонентов и обладает сильным ингибирующим действием на Nox2-зависимую макрофагальную продукцию АФК в широком диапазоне концентраций и комбинаторных соотношений (10/1/10...1/1/10). Подобные комбинации перспективны для разработки на их основе кардиозащитных средств.

**Ключевые слова:** кислота ацетилсалициловая, кислота салициловая, L-аргинин, инозин, АТФ, комбинации лекарственных средств, синергизм, активные формы кислорода, макрофаги.

**N.A. Bizunok, B.V. Dubovik**

### PHARMACODYNAMIC PATTERNS OF THE COMBINATIONS CONSISTING OF THE INOSINE OR ATP WITH THE L-ARGININE AND SALICYLIC AGENTS

The purinergic agonist ATP and the inosine in combination with the acetylsalicylic acid and L-arginine in the wide range of the concentrations and ratios stimulate of the reactive oxygen species (ROS) generation by macrophages and do not show pharmacodynamic interactions. The combination of the inosine with the L-arginine in the combine ratio lake 1/1 in the biological relevant concentrations stimulates of the Nox2-dependent ROS generation and it is the basis of a new immunostimulant drugs. The combinations on the basis inosine, salicylic acid and L-arginine show almighty pharmacodynamic synergism and forceful inhibition of the Nox2-dependent ROS generation by macrophages in a wide range of concentrations and combine ratios (10/1/10/...1/1/10). These combinations useful lake the basis of a new cardioprotective and antiischemic drugs and a new therapeutic strategies of the heart diseases.

**Key words:** acetylsalicylic acid, salicylic acid, L-arginine, ATP, inosine, drug combinations, synergism, reactive oxygen species, macrophages.

Предпосылкой настоящего исследования послужили многочисленные данные о высоком иммуномодулирующем и цитопротекторном потенциале агонистов аденозиновых и пуриновых рецепторов [1, 2, 3, 4]. В совокупности с современными представлениями о механизмах действия салицилатов [5] и L-аргинина [6] они позволили предположить, что комбинации этих соединений обладают потенциалом фармакодинамического синергизма в отношении Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах. Изучению этого вопроса посвящена настоящая работа.

#### Материалы и методы

**Среды и реагенты.** В работе использовали инозин, аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ), ацетилсалициловую кислоту (АСК), салициловую кислоту (СК), L-аргинин (L-арг); 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.

**Комбинаторные сочетания.** На первом этапе исследования изучалось индивидуальное действие инозина, АТФ, АСК, СК, L-аргинина в диапазоне концентраций от  $10^{-7}$  до  $10^{-2}$  М. По результатам этих испытаний было обосновано изучение следующих молярных комбинаторных сочетаний: АТФ/L-арг – 1/10 ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  М – АТФ +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – L-арг); АТФ/АСК – 1/1 и 1/10 ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  М – АТФ +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – АСК); АТФ/АСК/L-арг – 1/1/1, 1/1/10, 1/10/100 ( $10^{-6}$ – $10^{-3}$  М – АТФ +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – АСК +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – L-арг); L-арг/АСК (СК) – 10/1 ( $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – L-арг +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – АСК (СК)); Инозин/АСК (СК) – 10/1 ( $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – Инозин +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – АСК (СК)); Инозин/L-арг – 1/1 ( $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – Инозин +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – L-арг); Инозин/АСК (СК)/L-арг – 10/1/10, 1/1/10 ( $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – Инозин +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – АСК (СК) +  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М – L-арг).

**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 по результатам теста с трипановым синим (0,1%) содержала более 98% жизнеспособных клеток, при дифференцированном подсчете клеток 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 среды Хенкса:  $10^6$  жизнеспособных макрофагов, люминол ( $7 \cdot 10^{-5}$  М), опсонизированный зимозан ( $5 \cdot 10^7$  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°С), 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 соответствовало 5.

**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 [7] при помощи разработанного интерактивного алгоритма.

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

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

(D)<sub>j</sub> – доза (концентрация) агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; (D<sub>x</sub>)<sub>j</sub> – доза (концентрация) агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.

Значения CI трактовали в соответствии со следующей шкалой [7]: 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 сильный 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.

### Результаты и обсуждение

**Взаимодействие инозина с L-аргинином и салицилатами.** Результаты индивидуального и комбинированного действия инозина, L-аргинина и салицилатов представлены в таблицах 1–5 и на рисунке.

Индивидуальные эффекты испытанных соединений подробно обсуждались в наших предыдущих работах [8, 9]. Салицилаты оказывают слабое (до 30%), а инозин и L-аргинин умеренное (45–65%) ингибирующее действие на Nox2-зависимую генерацию АФК в максимальных испытанных концентрациях. Ацетилсалициловая кислота (АСК) обладает двойственным действием, усиливая генерацию АФК на 40% в концентрациях, сопоставимых с терапевтическими *in vivo* (таблицы 1 и 2).

Изучение комбинаций инозина с L-аргинином и салицилатами позволило установить следующие эффекты. Комбинации на основе салициловой кислоты (СК) обладали ингибирующим действием на совокупную и Nox2-зависимую генерацию АФК. При этом действие в отношении Nox2 было более выраженным. Сочетание СК с L-аргинином в соотношении 1/10 оказывало 35% ингибирующее действие уже при концентрациях  $10^{-5}$  М /  $10^{-4}$  М, на порядок ниже терапевтических. При более низких концентрациях ингибирующего действия не выявлено. Сочетание инозина с СК в соотношении 10/1 уменьшало площадь под кривой хемилюминесценции (DAUC ХЛ) на 46% в максимальных испытанных концентрациях (таблица 2).

Расчет фармакодинамического взаимодействия по методу Chou обнаружил для этого комбинаторного сочетания выраженный синергизм (3+) (таблица 3) и возможности широкого изменения дозы СК (таблица 4) с сохра-

## Оригинальные научные публикации

нением ингибирующего эффекта комбинации.

Альтернативные эффекты демонстрировала комбинация инозина с L-аргинином в сочетании 1/1. В максимальной испытанной концентрации ( $10^{-3}$  М /  $10^{-3}$  М) она обладала сильным стимулирующим действием на Nox2-зависимую генерацию АФК в фагоцитах, обеспечивая почти 2-х кратный прирост показателя DAUC ХЛ (таблица 5).

При этом увеличивалась не только интенсивность клеточного ответа, но и скорость достижения максимальных значений люминесценции; при этом кинетика процесса соответствовала Fcγ-индуцированному фагоцитозу. Концентрации, при которых проявилось стимулирующее действие, соответствуют терапевтическим концентрациям инозина и L-аргинина.

Трехкомпонентная комбинация инозина, СК и L-аргинина в обоих испытанных сочетаниях обнаружила ингибирующее действие в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, превосходящее индивидуальное действие компонентов, как по максимальной эффективности, так и по активности (по критерию  $IC_{50}$ ) (таблица 2). Расчет комбинаторного индекса показал, что комбинация, содержащая инозин/СК/L-аргинин в соотношении 10/1/10 демонстрирует очень сильный синергизм (5+) компонентов и возможности снижения концентраций СК и L-аргинина на 3 и 2 порядка, соответственно. Аналогичным образом комбинация с содержанием инозина/СК/L-аргинина в соотношении 1/1/10 демонстрировала сильный синергизм (4+) и широкие возможности управления концентрациями компонентов (таблица 4).

Действие комбинаций инозина и L-аргинина с АСК отличалось от действия, присущего комбинациям с СК. Сочетание инозина с АСК полностью подавляло стимулирующий эффект АСК на Nox2-зависимую генерацию АФК и усиливало ингибирующее влияние L-аргинина (таблица 2). Расчет CI дает возможность оценить это взаимодействие как выраженный синергизм компонентов (3+). Таким образом, направленность и характер действия комбинации инозина с АСК соответствовали комбинации инозина с СК.

Внесение дополнительной компоненты – L-аргинина изменяло действие комбинации инозина с АСК. В отличие от усиления ингибирования, обнаруженного для комбинаций инозин/СК/L-аргинин, замена СК на АСК приводила к появлению стойкого стимулирующего эффекта у комбинации инозин/АСК/L-аргинин в концентрациях  $10^{-3}/10^{-4}/10^{-3}$  М, достигавшего 60% по отношению к контролю (таблица 5).

**Взаимодействие АТФ с L-аргинином и салицилатами.** Изучение комбинаций АТФ с L-аргинином и салицилатами позволило установить следующие эффекты.

В отличие от комбинаций инозина с аргинином, стимулирующей респираторный взрыв фагоцитов, комбинация аргинина с АТФ обладала дозозависимым ингибирующим действием, особенно выраженным в отношении Nox2-зассоциированной компоненты (таблица 6). Несмотря на некоторое увеличение максимальной эффективности, активность компонентов при комбинированном применении существенно не изменилась, фармакодинамические взаимодействия не выявлены.

Изучение комбинации АТФ и АСК обнаружило сохра-

Таблица 1. Индивидуальное и комбинированное действие инозина, салицилатов и L-аргинина на совокупную продукцию АФК в макрофагах при Fcγ-индуцированном фагоцитозе (AUC ХЛ, n=5)

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	$IC_{50}^2$ (-Log, М)	Доверительный интервал (95%)	$EC_{max}^3$ (-Log, М)	$E_{max}^4, \%$ (M±m)	
Инозин	—	3,96	4,17±3,55	3,00	-42,4±7,3*	
СК	—	—	—	3,00	-23,9±8,4*	
АСК	—	—	—	2,00 3,00	-22,0±2,7** +35,2±8,1*	
L-арг	—	3,02	3,43±2,60	2,00	-53,9±7,6**	
1	L-арг СК	10 1	NI	4,00 5,00	-24,8±8,8*	
2	Инозин СК	10 1	3,79 4,79	3,76 4,76	3,00 4,00	-40,0±8,0*
3	Инозин СК L-арг	10 1 10	3,81 4,81 3,81	3,98±3,64 4,98±4,64 3,98±3,64	4,00 5,00 4,00	-36,5±7,0*
	Инозин СК L-арг	1 1 10	4,29 4,29 3,29	3,98±3,64 4,98±4,64 3,98±3,64	5,00 5,00 4,00	-23,0±6,4*
	Инозин АСК	10 1	3,76 4,76	3,98±3,64 4,98±4,64 3,98±3,64	3,00 4,00	-50,4±9,3*
6	Инозин L-арг	10 1	NI	3,00 3,00	+104,1±7,1**	
7	Инозин АСК L-арг	10 1 10	NI	3,00 4,00 3,00	61,1±1,4**	

Примечание к таблицам 1, 2 и 6. <sup>1</sup>КОК – комбинаторное отношение компонентов, <sup>2</sup> $IC_{50}$  – концентрация (моль/л) испытуемого соединения, ингибирующая респираторный взрыв макрофагов на 30% по отношению к контролю при индивидуальном или комбинированном применении <sup>3</sup> $EC_{max}$  – максимальная эффективная концентрация, <sup>4</sup> $E_{max}$  – максимальный эффект, в % подавления (-) или стимуляции (+) ХЛ по отношению к контролю, указано среднее значение и ошибка среднего. \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  в сравнении с контрольными значениями.

Таблица 2. Индивидуальное и комбинированное действие инозина, салицилатов и L-аргинина на Nox2-зависимую продукцию АФК в макрофагах при Fcγ-индуцированном фагоцитозе (DAUC ХЛ, n=5)

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	$IC_{50}^2$ (-Log, М)	Доверительный интервал (95%)	$EC_{max}^3$ (-Log, М)	$E_{max}^4, \%$ (M±m)	
Инозин	—	3,71	3,99±3,43	3,00	-44,9±8,1*	
СК	—	2,76	3,41±2,11	3,00	-28,0±10,8*	
АСК	—	1,67	2,26±1,08	2,00 3,00	-25,7±2,3** +41,3±11,5*	
L-арг	—	2,18	2,66±1,70	2,00	-65,2±7,2*	
1	L-арг СК	1 10	NI	5,00 4,00	-33,7±15,2*	
2	Инозин СК	10 1	5,08 6,08	5,28±4,88 6,28±5,88	3,00 4,00	-45,8±9,0*
3	Инозин СК L-арг	10 1 10	4,84 5,84 4,84	5,17±4,52 6,17±5,52 5,17±4,52	3,00 4,00 3,00	-53,5±12,2*
	Инозин СК L-арг	1 1 10	4,85 4,85 3,85	5,07±4,63 5,07±4,63 4,07±3,63	4,00 4,00 3,00	-46,1±12,1*
	Инозин АСК	10 1	4,05 5,05	4,56±3,54 5,56±4,54	3,00 4,00	-56,1±13,4*
6	Инозин L-арг	1 1	NI	3,00 3,00	+97,0±14,2**	
7	Инозин АСК L-арг	10 1 10	NI	3,00 4,00 3,00	+62,3±7,5**	

**Таблица 3. Значения комбинаторного индекса (CI) для различных комбинаторных сочетаний инозина, салицилатов и L-аргинина (по критерию DAUC ХЛ)**

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	CI для [IC <sub>16%, 50%</sub> ] <sup>2</sup>			M [CI] <sub>16-50</sub> <sup>3</sup>	Степень синергизма
		16	30	50		
Инозин СК	10/1	0,002	0,043	0,860	0.302	3+
Инозин АСК	10/1	0,972	0,459	0,210	0.547	3+
Инозин СК L-арг	10/1/10	0,068	0,076	0,087	0.077	5+
Инозин СК L-арг	1/1/10	0,090	0,102	0,123	0.105	4+

Примечание к таблице 3. <sup>1</sup>Комбинаторное отношение компонентов. <sup>2</sup>IC [16%, 50%] – концентрации модулятора, ингибирующие оксидантный взрыв на 16...50% по сравнению с контролем (в отсутствие модулятора). <sup>3</sup>Средневзвешенное значение, рассчитанное, как  $M[CI]_{16-50} = [CI_{16} + CI_{30} + CI_{50}] / 3$ .

**Таблица 4. Значения индекса снижения дозы (DRI) для различных комбинаторных сочетаний инозина, салицилатов и L-аргинина (по критерию DAUC ХЛ)**

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	CI для [IC <sub>16%, 50%</sub> ] <sup>2</sup>			M [CI] <sub>16-50</sub> <sup>3</sup>
		16	30	50	
Инозин СК	10/1	1,0 708,2	2,2 2390,0	4,8 8521,0	2,7 3873,0
Инозин СК L-арг	10/1/10	15,0 2713,0 774,0	13,6 1206,0 462,0	12,3 517,0 269,0	13,6 1478,7 501,7
Инозин СК L-арг	1/1/10	13,8 250,0 71,3	13,8 122,3 46,8	13,8 58,0 30,2	13,8 143,4 49,4

Примечание к таблице 4. <sup>1</sup>Комбинаторное отношение компонентов. <sup>2</sup>IC [16%, 50%] – концентрации модулятора, ингибирующие оксидантный взрыв на 16...50% по сравнению с контролем (в отсутствие модулятора). <sup>3</sup>Средневзвешенное значение индекса снижения дозы, рассчитанное как  $M[DRI]_{16-50} = [DRI_{16} + DRI_{30} + DRI_{50}] / 3$ .

**Таблица 5. Стимулирующее действие комбинаций инозина с L-аргинином и АСК на генерацию АФК в макрофагах при Fcγ-индуцированном фагоцитозе (n=5)**

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	C (-Log, M)	E, % (M±m)	
			АУС ХЛ	ДАУС ХЛ
Инозин/ L-арг	1/1	5,0/5,0	-0,1±4,6	-12,2±14,4
		4,0/4,0	-25,3±13,1	-20,4±11,0
		<b>3,0/3,0</b>	<b>+46,5±8,1*</b>	<b>+97,0±14,2**</b>
Инозин/АСК/ L-арг	10/1/10	5,0/6,0/5,0	-12,2±6,5	-21,9±3,5**
		4,0/5,0/4,0	-0,1±7,8	+6,0±1,7
		<b>3,0/4,0/3,0</b>	<b>+61,1±1,4**</b>	<b>+62,3±7,5**</b>

Примечание к таблицам 5 и 7. <sup>1</sup>Комбинаторное отношение компонентов; \* – p<0,05, \*\* – p<0,01 в сравнении с контрольными значениями

нение стимулирующего действия АСК при эквимольном соотношении компонентов и 10 кратном превалировании АСК в комбинации, а также некоторое усиление ингибирования респираторного взрыва при максимальных испытанных концентрациях. При этом действие в отношении совокупной (АУС ХЛ) и Nox2-зависимой (ДАУС ХЛ) генерации АФК качественно не различалось (таблица 7).

Испытание трехкомпонентной комбинации АТФ/АСК/L-аргинин в широком диапазоне концентраций и молярных сочетаний обнаружило устойчивое стимулирующее действие на макрофагальную генерацию АФК, которое составило 40-65% при концентрации АСК равной 10<sup>-4</sup> М и не изменялось при 10-кратных колебаний концентраций АТФ и L-аргинина (таблица 7). Эти результаты свидетельствуют о том, что АТФ и L-аргинин не пре-

пятствуют реализации прямого стимулирующего действия АСК на респираторный взрыв макрофагов.

Результаты изучения комбинаций АТФ с АСК и L-аргинином не позволили обнаружить значимых фармакодинамических взаимодействий компонентов. Это может быть связано с тем, что сигнальные механизмы, ассоциированные с активацией пуриновых рецепторов II типа, не перекрываются с механизмами, инициируемыми при воздействии АСК и L-аргинина на макрофагальную генерацию АФК.

С позиций разработки новых лекарственных средств нас, прежде всего, заинтересовали 2-е комбинации инозина. Первая из них содержала инозин и L-аргинин в сочетании 1/1 и демонстрировала выраженное стимулирующее действие в отношении респираторного взрыва фагоцитов, вторая – трехкомпонентная комбинация инозина, СК и L-аргинина в соотношении 10/1/10, напротив оказывала выраженный ингибирующий эффект с сильным синергизмом компонентов. Эффекты обеих комбинаций в отношении макрофагальной генерации АФК обнаружены впервые.

**Комбинация инозин/L-аргинин.** Инозин считается эндогенным противовоспалительным иммуномодулирующим и цитопротекторным нуклеозидом. К числу наиболее изученных иммуномодулирующих эффектов инозина можно отнести подавление продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, усиление продукции IL-10, модифицирующее действие на функции фагоцитов [10, 11, 12, 13].

Являясь метаболитом аденозина, инозин реализует своё действие как за счет оккупации аденозиновых рецепторов клеточных мембран, так и за счет прямого модифицирующего действия в отношении клеточного метаболизма. Макрофаги экспрессируют аденозиновые рецепторы всех известных подтипов (A1, A2<sub>A</sub>, A2<sub>B</sub>, A3), однако уровень экспрессии конкретного подтипа зависит от степени дифференцировки макрофагов и микроокружения [13]. В настоящее время доказано взаимодействие инозина, по крайней мере, с рецепторами подтипов A2<sub>A</sub> и A3 [10]. Преобладающие эффекты при этом определяются типом индуктора, дополнительно воздействующего на макрофаги.

В отношении результатов настоящего исследования актуальны эффекты аденозиновых агонистов на такие функции макрофагов, как Fcγ-зависимый фагоцитоз, респираторный взрыв и активность NO-синтаз. Известно, что Fcγ-зависимый фагоцитоз усиливается при активации A1 и угнетается при активации A2 рецепторов. Аденозиновые агонисты угнетают респираторный взрыв фагоцитов, предполагается, что эффект обусловлен преимущественной активацией A2 рецепторов, сопряженных с цАМФ-ПКА путем внутриклеточного сигналинга. Модифицирующее действие аденозиновых агонистов в отношении активности NO-синтаз зависит от многих условий

## Оригинальные научные публикации

и варьирует от стимуляции до угнетения [13]. Испытания, выполненные на культивируемых линиях макрофагов и гладкомышечных клеток сосудов показали, что усиление генерации NO происходит при стимуляции A<sub>2b</sub> подтипа как под влиянием аденозина, так и инозина [14, 12].

В отношении полученных результатов интересно то, что стимулирующее действие комбинации инозина и L-аргинина может быть, по крайней мере, частично связано с усилением генерации NO в присутствии избыточных концентраций субстрата NO-синтаз – L-аргинина. Однако, кинетика процесса и преимущественный прирост показателя DAUC ХЛ свидетельствуют о прямом стимулирующем влиянии комбинации инозина и L-аргинина на продукцию АФК в системе Nox2. Дизайн исследования не позволяет раскрыть молекулярный механизм действия комбинации инозина и L-аргинина, однако свидетельствует о появлении качественно новых эффектов при достижении критических концентраций этих модуляторов в микроокружении фагоцитов. Эти результаты согласуются с исследованиями Tüting и соавт., свидетельствующими о том, что повышение макрофагальной продукции NO при избытке L-аргинина усиливает Fcγ-зависимый фагоцитоз и внутриклеточный киллинг бактерий [15]. Установленный эффект, обеспечивающий иммуностимулирующее действие комбинации, ассоциированное с усилением бактерицидной активности, предопределил разработку на основе комбинации инозина и L-аргинина нового иммуномодулирующего средства.

**Комбинации инозин/L-аргинин/СК.** Испытания комбинации инозин/СК/L-аргинин при молярном соотношении компонентов от 10/1/10 до 1/1/10 в широком диапазоне концентраций показало ингибирующее действие на макрофагальную продукцию АФК и сильный синергизм компонентов. Комбинация инозин/АСК/L-аргинин, напротив обнаружила стимулирующее действие на уровне АСК и отсутствие значимых взаимодействий компонентов. Эти эффекты позволяют, по крайней мере, частично объяснить антиишемические и кардиопротекторные эффекты комбинации инозина/АСК/L-аргинина, установленные *in vivo* (данные не опубликованы).

Пероральное назначение такой комбинации обеспечивает быстрый рост концентраций компонентов в портальном кровотоке. Именно в этом участке кровеносной системы реализуется угнетающее действие АСК на синтез ТхА<sub>2</sub> [16, 17]. Дальнейшая быстрая трансформация АСК в СК обеспечивает устойчивый рост последней в плазме крови с достижением к концу первого часа пиковых концентраций порядка 10<sup>-4</sup> М [18, 19] и реализацией паттерна комбинации инозин/СК/L-аргинин в отношении Nox2-зависимой продукции АФК, которая может осуществляться в клетках сосудистой стенки, фагоцитах и тромбоцитах. Этот эффект способен усилить антиагрегантное действие АСК за счет ингибирования продукции проагрегантного соединения 8-iso-PGF<sub>2</sub>-α, синтезируемого при активации Nox2 [18]. Вместе с тем, эффект комбинации в от-

Таблица 6. Индивидуальное и комбинированное действие АТФ, АСК и L-аргинина на окислительный взрыв макрофагов (n=5)

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>2</sup> (-Log, M)	Доверительный интервал (95%)	EC <sub>max</sub> <sup>3</sup> (-Log, M)	E <sub>max</sub> <sup>4</sup> , % (M±m)	
AUC ХЛ						
АТФ	—	3,93	4,18±3,68	3,00	-74,5±1,5**	
АСК	—	1,44	1,94±1,00	2,00	-22,0±2,7** +35,2±8,1*	
L-arg	—	3,02	3,43±2,60	2,00	-53,9±7,6*	
Комбинации АТФ и L-аргинина						
2	АТФ	1	3,27	3,54±2,96	3,00	-38,0±8,2*
	L-arg	10	2,27	2,54±2,00	2,00	
DAUC ХЛ						
АТФ	—	3,99	4,56±3,43	3,00	-85,7±3,0*	
АСК	—	1,67	2,26±1,08	2,00	-25,7±2,3** +41,3±11,5*	
L-arg	—	3,18	3,66±2,70	2,00	-65,2±7,2*	
Комбинации АТФ и L-аргинина						
2	АТФ	1	4,31	5,19±3,44	3,00	-95,1±0,2**
	L-arg	10	3,31	4,19±2,44	2,00	

Таблица 7. Стимулирующее действие комбинаций АТФ с L-аргинином и АСК на генерацию АФК в макрофагах при Fcγ-индуцированном фагоцитозе (n=5)

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	C (-Log, M)	E, % (M±m)	
			AUC ХЛ	DAUC ХЛ
АТФ/АСК	1/1	5,0/5,0	-9,3±3,8	-10,8±5,8
		<b>4,0/4,0</b>	<b>+26,0±7,2</b>	<b>+37,0±11,3</b>
		3,0/3,0	-81,6±0,8	-92,7±1,3
	1/10	6,0/5,0	-28,2±4,1	-34,2±1,9
		<b>5,0/4,0</b>	<b>+32,9±3,9</b>	<b>+43,3±5,9</b>
АТФ/АСК/ L-arg	1/1/10	5,0/5,0/4,0	-3,2±1,2	-7,2±2,6
		<b>4,0/4,0/3,0</b>	<b>+51,7±9,4</b>	<b>+61,4±6,1</b>
		3,0/3,0/2,0	-44,3±8,9	-82,2±10,6
	1/1/1	5,0/5,0/5,0	-30,9±2,1	-38,6±0,8
		<b>4,0/4,0/4,0</b>	<b>+42,3±8,4</b>	<b>+48,9±6,8</b>
		3,0/3,0/3,0	-74,9±1,2	-85,3±2,1
	1/10/100	6,0/5,0/4,0	-6,4±2,9	-9,2±4,0
		<b>5,0/4,0/3,0</b>	<b>+64,6±4,2</b>	<b>+63,9±9,9</b>
		4,0/3,0/2,0	-34,5±3,5	-99,9±5,6

ношении Nox2 может потенцировать уникальные цитопротекторные механизмы, присущие инозину [1, 2, 3] и L-аргинину [6] и, таким образом, делает обоснованным применение их комбинации с салицилатами в качестве кардиопротекторного и антиишемического средства.

### Выводы

1. Агонист пуриновых (P-II) рецепторов АТФ и агонист аденозиновых рецепторов инозин в сочетании с ацетилсалициловой кислотой и L-аргинином в широком диапазоне концентраций и комбинаторных соотношений обладают преимущественно стимулирующим влиянием на макрофагальную генерацию АФК.

2. Комбинация инозина с L-аргинином в комбинаторном соотношении 1/1 обладает выраженным стиму-



лирующим действием на Nox2-зависимую генерацию АФК в биологически приемлемом диапазоне концентраций и может быть основой для разработки лекарственных средств иммуностимулирующего типа действия.

3. Комбинации на основе инозина, салициловой кислоты и L-аргинина демонстрируют сильный синергизм компонентов и обладают сильным ингибирующим действием на Nox2-зависимую макрофагальную продукцию АФК в широком диапазоне концентраций и комбинаторных соотношений (10/1/10...1/1/10). Подобные комбинации перспективны для разработки на их основе кардио-защитных средств и фармакотерапевтических тактик.

#### Литература

1. Hsiao, G Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage / G. Hsiao, KH. Lin, Y. Chang [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. V.25. P. 1998–2004.

2. Buckley, S. In vivo inosine protects alveolar epithelial type 2 cells against hyperoxia-induced DNA damage through MAP kinase signaling / S. Buckley, L. Barsky, K. Weinberg, D. Warburton // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005. V.288. P. L569–L575.

3. Modis, K. Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis / K. Modis, D. Gero<sup>o</sup>, N. Nagy [et al.] // *British Journal of Pharmacology* 2009. V.158. P.1565–1578.

4. Marteau, F. Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells / F. Marteau // *J. Leukocyte Biol.* 2004. V.76. P.796–803.

5. Czyz, M Aspirin – the prodigious panacea? [Molecular mechanisms of the action of acetylsalicylic acid in the organism] / M. Czyz, C. Watafa // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2005. V.23. N. 59. P. 105–115.

6. Morris, Jr. S.M. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge / Jr. S.M. Morris, // *J. Nutr.* 2007. V.137. P.1602S–1609S.

7. 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.

8. Бизунок, Н. А. Фармакодинамические иммуномодулирующие взаимодействия пуринов на модели дыхательного взрыва макрофагов / Н.А. Бизунок // *Медицинский журнал*. 2011. №3. С. 9–13.

9. Бизунок, Н. А. Фармакодинамические иммуносупрессивные

взаимодействия аминокислот и антиоксидантов на модели респираторного взрыва фагоцитов / Н. А. Бизунок // *Медицинский журнал*. 2011. №4. С. 25–33.

10. Gomez, G. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo/ G. Gomez, M. V. Sitkovsky // *Blood*. 2003. V.102. P. 4472–4478.

11. Hasko, G. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock / G. Hasko, D.G. Kuhel, Z.H. Ne<sup>o</sup>meth [et al.] // *J Immunol* 2000. V.164. P.1013–1019.

12. Hsiao, G Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage / G. Hsiao, KH. Lin, Y. Chang [et al.] // *J. Immunol.* 1996. V.157. N.10. P. 4634–4640.

13. Haskoa, G. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors / G. Haskoa, P. Pacherc, E.A. Deitcha, E.S. Vizib // *Pharmacol. Ther.* 2007. V.113. N.2. P. 264–275.

14. Min, HW. Adenosine and its receptor agonists regulate nitric oxide production and RAW 264.7 macrophages via both receptor binding and its downstream metabolites-inosine / HW. Min, S. Mochhala, KH. Eng // *Life Sci.* 2000. V.66. N.19. P. 1781–1793.

15. Tümer, C. Effect of nitric oxide on phagocytic activity of lipopolysaccharide-induced macrophages: possible role of exogenous L-arginine / C. Tümer, HM. Bilgin, BD. Obay [et al.] // *Cell Biol Int.* 2007. V.31. N.6. P. 565–569.

16. Bochner, F. Measurement of aspirin concentrations in portal and systemic blood in pigs: effect on platelet aggregation, thromboxane and prostacyclin production / F. Bochner, D.M. Siebert, S.E. Rodgers [et al.] // *Thromb. Haemost.* 1989. V.61. N.2. P. 211–216.

17. Bochner, F. Pharmacokinetics of low dose oral modified release, soluble and intravenous aspirin in man, and effects on platelet function / F. Bochner, D.B. Williams, P.M. Morris [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1988. V. 35. P. 287–294.

18. Rowland, M. Pharmacokinetics of acetylsalicylic acid and salicylic acid after intravenous administration in man / M. Rowland, S. Riegelman // *J. Pharm. Sci.* 1968. V. 57. P. 1313–1319.

19. Shen, J. Model representation of salicylate pharmacokinetics using unbound plasma salicylate concentrations and metabolite urinary excretion rates following a single oral dose / J. Shen, S. Wanwimolruk, R.D. Purves [et al.] // *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1991. V.19. P. 575.

20. Pignatelli, P. Inherited human gp91phoxdeficiency is associated with impaired isoprostane formation and platelet dysfunction / P. Pignatelli, R. Carnevale, S. Di Santo [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011. V. 31. P. 423–434.

Поступила 2.11.2012 г.