

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Борисов Александр Владимирович

**ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ N-ЗАМЕЩЕННЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА С АЗОТСОДЕРЖАЩИМИ  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ В УСЛОВИЯХ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук,

профессор

Иван Николаевич Тюренков

ВОЛГОГРАД, 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
1.1 Фармакологическая коррекция иммунопатологических процессов .....	19
1.2 Характеристика и спектр фармакологической активности производных хиназолина.....	24
1.3 Экспериментальные патологии для изучения иммуномодулирующего действия .....	34
1.4 Заключение .....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1 Экспериментальные животные.....	42
2.2 Исследуемые соединения и препараты сравнения .....	44
2.3 Оборудование и реактивы .....	48
2.4 Дизайн исследования и экспериментальные модели .....	50
2.5 Методы исследования.....	56
2.5.1 Получение и ведение первичных клеточных культур .....	56
2.5.2 Оценка цитотоксических свойств исследуемых субстанций.....	58
2.5.3 Определение продукции оксида азота перитонеальными макрофагами ..	59
2.5.4 Оценка лизосомального аппарата перитонеальных макрофагов.....	60
2.5.5 Определение фагоцитарной и киллинговой активности перитонеальных макрофагов.....	61
2.5.6 Определение генерации активных форм кислорода перитонеальными нейтрофилами .....	62

2.5.7	Определение количества лейкоцитов и их отдельных субпопуляции в крови и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) .....	63
2.5.8	Определение концентрации провоспалительных цитокинов .....	65
2.5.9	Определение индекса проницаемости легких (ИПЛ) .....	66
2.5.10	Определение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови .....	66
2.5.11	Определение индекса лимфоидных органов и содержания в них лимфоцитов.....	68
2.5.12	Определение экспрессии ядерного фактора NF-κB спленоцитами.....	69
2.5.13	Определение состояние иммунного статуса животных .....	70
2.5.14	Изучение функциональной активности нейтрофилов крови .....	72
2.5.15	Морфологические и иммуногистохимические методы исследования легочной ткани .....	76
2.6	Статистическая обработка результатов исследования.....	77
ГЛАВА 3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, СРЕДИ N-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА С АЗОТСОДЕРЖАЩИМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO .....		79
3.1	Поиск новых иммуностропных средств в тестовой системе in vitro.....	79
3.2	Оценка влияния исследуемых производных хиназолина на ЛПС-индуцированную продукцию NO макрофагами перитонеального экссудата .....	80
3.3	Оценка влияния исследуемых производных хиназолина на зимозан-индуцированную продукцию активных форм кислорода нейтрофилами.....	82
3.4	Взаимосвязь химической структуры соединений с их ингибирующим действием на продукцию оксида азота.....	85

3.5	Определение ИЛ-6-ингибирующей активности соединений .....	90
3.6	Оценка влияния исследуемых производных хиназолина на жизнеспособность перитонеальных макрофагов .....	91
3.7	Исследование влияния производных хиназолина на фагоцитарную активность макрофагов .....	92
3.8	Заключение .....	96
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ВМА-13-15 И ВМА-21-10 НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ.....		98
4.1	Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на массу и клеточный состав селезенки у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии .....	98
4.2	Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на экспрессию NF-κB в спленоцитах у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии .....	100
4.3	Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на общее количество лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии .....	101
4.4	Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии .....	104
4.5	Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии.....	107
4.6	Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии ....	109
4.7	Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови.....	111

4.8 Заключение .....	112
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ВМА-21-10 НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС ПРИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОМ ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ЛЕГКИХ .....	114
5.1 Исследование влияния соединения ВМА-21-10 на клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких .....	114
5.2 Исследование влияния соединения ВМА-21-10 на показатели белой крови при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких .....	116
5.3 Изучение влияния соединения ВМА-21-10 на показатель проницаемости легких и секрецию провоспалительных цитокинов при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких .....	118
5.4 Исследование влияния соединения ВМА-21-10 на морфологические изменения легочной ткани при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких .....	121
5.5 Заключение .....	126
ГЛАВА 6. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ ВМА-13-15 В УСЛОВИЯХ ИММУНОСУПРЕССИИ, ВЫЗВАННОЙ ЦИКЛОФОСФАМИДОМ .....	128
6.1 Влияние соединения ВМА-13-15 на лимфоидный индекс и количество ядросодержащих клеток селезенки и тимуса.....	128
6.2 Влияние исследуемого соединения на общее количество лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови.....	130
6.3 Влияние исследуемого соединения на гуморальный иммунный ответ .....	133
6.4 Влияние исследуемого соединения на клеточный иммунный ответ.....	135

6.5 Влияние исследуемого соединения на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови.....	136
6.6 Заключение .....	137
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	139
ВЫВОДЫ .....	159
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	161
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	162
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	164

## **ВВЕДЕНИЕ**

Проблема нарушений работы иммунной системы сегодня занимает одно из ведущих мест в патогенезе многих заболеваний [32]. Патология иммунной системы является ключевым этиопатогенетическим звеном в развитии инфекционных, аутоиммунных, аллергических, нейродегенеративных, онкологических и ряда соматических заболеваний [8], в связи с чем поиск новых эффективных иммунокорректирующих средств остается актуальной проблемой [27], определившей практическую значимость и целесообразность создания новых безопасных и эффективных лекарственных средств, обладающих иммуностимулирующими свойствами [17, 24, 31]. Удачным примером являются некоторые антибиотики группы макролидов, обладающие в дополнение к антибактериальным свойствам иммуномодулирующим и противовоспалительным действием [50]. Ряд иммуномодуляторов, отечественной разработки, уже внедренных и успешно используемых в лечебной практике, получили заслуженное признание, такие как миелопид, полиоксидоний, тимоген, имунофан, и ряд других [40, 42, 33]. Но в настоящее время все еще существует потребность в дальнейшем поиске и испытании новых иммуномодуляторов с избирательным действием на отдельные звенья иммунной системы и отличающиеся высоким профилем безопасности. Это вызвано ростом частоты встречаемости вторичных иммунодефицитных состояний, аллергических и аутоиммунных заболеваний. Несмотря на очевидные успехи, достигнутые в области создания иммуномодулирующих препаратов – лекарственных средств, корректирующих работу иммунной системы [33, 40] – не менее важной проблемой современной фармакологической науки является поиск и создание новых, более эффективных средств регуляции воспалительного процесса различного генеза.

Мероприятия направленные на поиск и создание новых иммуномодуляторов включают в себя получение химически чистых или химических аналогов

биологически активных природных веществ, рекомбинантных цитокинов и (или) индукторов их синтеза, разработку синтетических иммуномодуляторов, не имеющих природных аналогов (полиэлектролиты), поиск новых химических соединений, обладающих иммуотропными свойствами [40]. Такими соединениями могут быть хиназолины – структурные аналоги пиримидинов. Пиримидины входят в состав природных нуклеотидов, оказывающих полифункциональное влияние на процессы секреции иммуномедиаторов, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, их апоптоза и регенерации [34, 112, 180]. Среди пиримидиновых соединений перспективными в плане разработки новых высокоэффективных, селективных и безопасных лекарственных препаратов, влияющих на иммунную систему, являются производные хиназолин4(3H)-она. Они обладают доказанным широким спектром фармакологических свойств: антибактериальных [29, 148], противопрозоидных [171], противоопухолевых [47, 117], ноотропных [36], иммуотропных [25, 28, 44] и другими видами активности [54].

Ключевыми клетками иммунной системы млекопитающих, запускающими каскад иммунных реакций, являются макрофаги. Это разнородная группа клеток иммунной системы, обеспечивающих неспецифическую резистентность организма и выполняющих множество биологических функций, которые включают в себя защиту организма от патогенных агентов и участие в процессах регенерации [53, 68]. Кроме того, сюда относят и регуляторные функции, направленные на поддержание гомеостаза организма при различных воздействиях факторов внешней и внутренней среды [115, 116], выполняющие важную роль в патогенезе заболеваний различной этиологии [106, 163, 188]. Подводя итог вышесказанному, можно считать, что хиназолин, хиназолиноны и их производные представляют собой перспективный класс биологически активных азотсодержащих гетероциклических соединений с разнообразными терапевтическими и

фармакологическими свойствами [124] и поиск среди них соединений, обладающих иммуностропной активностью, представляет большой практический интерес.

Новизна настоящего исследования определяется тем, что впервые, с момента синтеза новых *N*-замещенных производных хиначолина с азотсодержащими функциональными группами, было проведено их комплексное иммунофармакологическое исследование в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* при экспериментальной патологии иммунной системы.

В настоящее время в Волгоградском государственном медицинском университете проводится целенаправленный синтез производных хиначолина с целью создания и разработки новых потенциальных, в том числе противовоспалительных и иммуностропных, лекарственных средств.

Вышеизложенное послужило основанием для изучения фармакологической активности 25 синтезированных *N*-замещенных производных хиначолина с азотсодержащими функциональными группами.

### **Степень разработанности проблемы**

В последние годы значительно увеличилось количество исследований и публикаций, посвященных изучению иммуностропных свойств различных соединений как природного, так и синтетического происхождения [40], в том числе и хиначолиновых производных пиримидина [1, 27, 28]. В данном случае речь, собственно, идет не о иммуностропном действии, а о способности соединений устранять дисфункцию иммунной системы, будь то иммунодефицит или гипериммунный ответ. При многих заболеваниях с неконтролируемым воспалением развиваются вторичные иммунодефициты, что уже само по себе представляет отдельную проблему. Производные хиначолина отличаются многогранностью их фармакологических эффектов [92, 95, 124, 196], но спектр иммуномодулирующего действия *N*-замещенных производных хиначолина с азотсодержащими функциональными группами малоизучен. С учетом изложенного актуальным

остаётся поиск эффективных и безопасных средств, обладающих иммуномодулирующим действием. Представленные литературные данные дают основание считать, что направленный поиск соединений с иммуномодулирующим действием в ряду новых *N*-замещённых производных хиназолина является целесообразным, что и послужило обоснованием для выполнения этой работы.

**Целью** настоящего исследования является изучение иммуномодулирующей активности и возможного механизма действия в ряду новых *N*-замещённых производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами, на основании фармакологического скрининга исследуемых производных *in vitro* и *in vivo* на моделях экспериментальной патологии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести фармакологический скрининг *in vitro* *N*-замещённых производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами на выявление иммуномодулирующей активности с использованием клеточной модели ЛПС-индуцированного воспаления и изучение фагоцитарной активности с определением цитотоксичности изучаемых соединений.
2. Выявить наиболее активные соединения, обладающие иммуномодулирующей активностью, установить для этих соединений элементы зависимости структура-активность с последующим фармакологическим изучением на моделях экспериментальной патологии, в зависимости от показанных эффектов (активация или супрессия иммунной системы).
3. Изучить влияние наиболее активных соединений на неспецифическую резистентность организма (продукцию активных форм кислорода, фагоцитарную активность нейтрофилов крови в условиях экспериментальной патологии).

4. Оценить влияние наиболее активных соединений на морфологические и цитологические показатели органов дыхания при воспалительном процессе на модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких.
5. Изучить влияние наиболее активных соединений на количество и популяционный состав лейкоцитов крови, центральных (тимус) и периферических (селезенка) органов системы иммунитета в условиях экспериментальной патологии.
6. Изучить влияние наиболее активных соединений на гуморальный и клеточный иммунный ответ в условиях циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии.
7. Оценить роль экспрессии ядерного фактора каппа В, активности iNOS, продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ ) в механизмах иммуномодулирующего действия наиболее активных соединений на экспериментальной модели ЛПС-индуцированного системного воспаления.

#### **Научная новизна исследования**

Впервые проведен скрининг *in vitro* фармакологической активности 25 *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими заместителями. Изучена зависимость фармакологической активности от химической структуры *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами. Выявлены соединения с наибольшей активностью, обладающие иммуномодулирующими свойствами. В результате фармакологического скрининга были отобраны 2 соединения, под лабораторными шифрами ВМА-13-15 и ВМА-21-10, проявляющие иммуномодулирующие свойства. Проведено изучение их специфической фармакологической активности.

В изучении влияния соединений под лабораторными шифрами ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на иммунную систему животных был использован комплексный подход, позволивший охарактеризовать ее структурные и функциональные особенности на клеточном, органном и организменном уровне.

Выявлено, что соединение ВМА-21-10 обладает выраженным иммуномодулирующим действием, блокируя ЛПС-индуцированное образование оксида азота и продукцию ИЛ-6 макрофагами в культуре, снижает их фагоцитарную активность через сутки экспозиции. Данный вид активности подтвержден на экспериментальных моделях системного и локального воспаления.

По результатам работы были установлены некоторые механизмы, способные объяснить стимулирующее влияние соединения ВМА-13-15 на функцию иммунной системы. В их числе увеличение суммарного пула лимфоцитов, стимуляция миелопоэза, восстановление клеточного состава тимуса и селезенки, снижение проявлений циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии и восстановлении уровня гуморального и клеточного иммунного ответа.

Впервые проведено изучение иммуномодулирующего действия изучаемых соединений в сравнении с официальным иммуностимулятором – полиоксидонием и иммуносупрессором дексаметазоном, на моделях иммунодефицита (ВМА-13-15) и системного воспалительного ответа (ВМА-13-15 и ВМА-21-10). Впервые описаны возможные механизмы иммуномодулирующего действия исследуемых соединений: влияние соединения ВМА-13-15 на гуморальное и клеточное звенья иммунного ответа, неспецифическую резистентность организма, влияние соединений ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на пролиферативную активность лимфоидных клеток и роль исследуемых соединений в регуляции экспрессии ядерного фактора каппа В, влияние на активацию iNOS и продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО  $\alpha$ ).

### **Научно-практическая ценность и реализация результатов работы**

В ходе фармакологического скрининга были отобраны перспективные вещества, обладающие выраженной иммуномодулирующей активностью, сопоставимой с лекарственными препаратами, применяемыми в лечебной практике. В дальнейшем, у соединений, отобранных по результатам скрининга, было

проведено экспериментальное изучение иммуномодулирующей активности в условиях экспериментальной патологии с измененной реактивностью иммунной системы. Полученные данные дают основание считать целесообразными дальнейшие исследования по разработке и созданию новых потенциальных иммуномодулирующих препаратов.

Наличие свободного или частично встроенного гуанидинового фрагмента у производных хиназолина сопряжено с их иммуномодулирующей активностью. Среди соединений, в своей структуре имеющих один линейный фрагмент гуанидина, ВМА-13-15, оказывало наиболее выраженное иммуномодулирующее действие, что выражалось в усилении продукции АФК и повышении показателей фагоцитарной активности на фоне незначительного ингибирования iNOS и продукции оксида азота. Следовательно, введение в базовый скаффолд одного линейного фрагмента гуанидина может быть связано с иммуностимулирующим действием исследуемого соединения. Среди соединений с двумя циклическими фрагментами гуанидина ВМА-21-10 также обладало иммуномодулирующим действием, однако оно заключалось в высокой ингибирующей активности продукции оксида азота в сочетании со способностью снижать продукцию АФК нейтрофилами при незначительном снижении их фагоцитарной активности. Данный факт может свидетельствовать о том, что наличие в базовом скаффолде двух циклических фрагментов гуанидина может придавать противовоспалительное свойство исследуемому соединению.

Теоретическое значение работы определяется тем, что в ней впервые получены данные об иммуномодулирующей активности производных хиназолина в условиях экспериментальной патологии, выражающиеся в восстановлении морфофункциональных и количественных показателей периферической крови, центральных и периферических органах иммунной системы, фагоцитарной активности нейтрофилов, гуморального и клеточного иммунного ответа, цитокин-

продуцирующей активности лейкоцитов и пролиферацию ядродержащих клеток (ЯСК) в процессе формирования первичного гуморального иммунного ответа на фоне экспериментального иммунодефицита.

В процессе установления взаимосвязи структуры и активности соединений было выявлено, что наличие свободного или частично встроенного гуанидинового фрагмента у производных хиназолина сопряжено с их иммуномодулирующей активностью. Среди соединений, в своей структуре имеющих один линейный фрагмент гуанидина, ВМА-13-15, оказывало наиболее выраженное иммуномодулирующее действие, что выражалось в усилении продукции АФК и повышении показателей фагоцитарной активности на фоне незначительного ингибирования iNOS и продукции оксида азота. Следовательно, введение в базовый скаффолд одного линейного фрагмента гуанидина может быть связано с иммуностимулирующим действием исследуемого соединения. Среди соединений с двумя циклическими фрагментами гуанидина ВМА-21-10 также обладало иммуномодулирующим действием, однако оно заключалось в высокой ингибирующей активности продукции оксида азота в сочетании со способностью снижать продукцию АФК нейтрофилами при незначительном снижении их фагоцитарной активности. Данный факт может свидетельствовать о том, что наличие в базовом скаффолде двух циклических фрагментов гуанидина может придавать противовоспалительное свойство исследуемому соединению.

Выявленные механизмы иммуномодулирующего действия и коррекции иммунного ответа под влиянием исследуемых соединений в условиях экспериментальной патологии открывают новые возможности в изыскании иммуотропных лекарственных средств среди соединений хиназолиновой природы, синтеза их аналогов с избирательным действием на различные звенья иммунной системы.

## **Методология исследования**

Методологической основой для проведения исследования являлись работы отечественных и зарубежных ученых в области иммунофармакологии и токсикологии.

Исследования планировали и проводили в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [18] с использованием современных методов. Исследования осуществляли на половозрелых линейных мышах и крысах, а также на культурах первичных перитонеальных макрофагов и нейтрофилов.

Иммуотропные эффекты соединений оценивали в сравнении с официальными иммуномодуляторами – полиоксидонием и дексаметазоном.

Для изучения иммунокорректирующего действия исследуемых соединений были использованы следующие модели экспериментальной иммунофармакологии: иммунодефицита (циклофосфамид-индуцированный), системного воспалительного ответа (ЛПС-индуцированный) и его локальной модификации – острого повреждения легких (ОПЛ).

Для реализации поставленных задач, были выбраны современные методы исследования *in vitro* и *in vivo*, использующиеся в научно-исследовательских лабораториях Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ВолгГМУ. Эксперименты *in vivo* проводились на двух видах животных: крысах самцах линии Wistar и мышах самцах линий СВА и С57bl/6J. Методы исследования были сгруппированы следующим образом: иммунологические (определение фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов, продукции активных форм кислорода, титра специфических гемагглютининов в реакции прямой гемагглютинации (РПГА), пролиферативной активности лимфоидных клеток по оценке лимфоидного индекса (ЛИ) и подсчете ядросодержащих клеток (ЯСК), выраженности реакции гиперчувствительности

замедленного типа (ГЗТ)), биохимические (определение продукции оксида азота перитонеальными макрофагами, индекса проницаемости легочной ткани), методы клеточной биологии (культивирование перитонеальных макрофагов, нейтрофилов, МТТ-тест, тест высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ), оценка фагоцитарной и киллинговой активности перитонеальных макрофагов), цитологические (подсчет общего количества лейкоцитов периферической крови и бронхо-альвеолярном лаваже (БАЛ), определение их популяционного состава) и иммуноферментные (оценка уровня активации индуцибельной NO-синтазы, экспрессии ядерного фактора NF-κB, продукции провоспалительных цитокинов).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Наиболее перспективными для создания на их основе эффективных иммуномодуляторов являются производными хиназолина – соединения ВМА-21-10 и ВМА-13-15, обладающие выраженным иммуномодулирующим действием *in vitro* и *in vivo*.

2. Производные хиназолина ВМА-21-10 (1,3-бис-[(5-амино-1*H*-1,2,4-триазол-3-ил)метил]-хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион) и ВМА-13-15 (N-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин), не проявляют признаков цитотоксичности в тесте высвобождения ЛДГ и МТТ-тесте в культуре перитонеальных макрофагов, после 72 часов инкубации в концентрации 100 мкМ.

3. В основе иммуномодулирующего действия соединения ВМА-21-10 и ВМА-13-15 на модели ЛПС-индуцированного системного воспаления лежит способность снижать продукцию «ключевых» цитокинов воспаления ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНОα. и активацию iNOS за счет ингибирования экспрессии ядерного фактора транскрипции NF-κB.

4. В основе иммунокорректирующего действия соединения ВМА-13-15 на показатели неспецифической резистентности, гуморального и клеточного иммунного ответа при циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии лежит

активация лимфопрлиферативных процессов в лимфоидных органах, восстановление их функциональности за счет регенерации Т-системы клеточного и В-системы гуморального звена иммунитета, стимуляция лимфо- и миелопоэза с повышением общего числа лейкоцитов крови, с частичным восстановлением их субпопуляций и фагоцитарной активности нейтрофилов.

### **Внедрение результатов исследования**

Диссертационная работа выполнена на базе лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств и лаборатории метаболитных лекарственных средств Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России.

Исследования по данной работе выполнены в рамках соглашения по гранту (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации, г. Москва, «1» октября 2020 г. № 075-15-2020-777).

### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, полученного в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* с использованием современных методов и методических подходов в работе и адекватной статистической обработкой полученных данных.

Материалы диссертации были представлены и обсуждались на Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018), Медицинском профессорском форуме «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении» (Ярославль, 2018), 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» (Волгоград, 2022).

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Первичная экспертиза работы проведена на расширенном заседании кафедры фармакологии и фармации Института НМФО ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

#### **Личный вклад автора**

Вклад автора является определяющим как в теоретических изысканиях актуальности выбранной тематики, разработке идеи исследования и планировании работы, так и в проведении экспериментальных исследований, сборе первичных данных и их обработке, интерпретации и обсуждении полученных результатов, выполнении статистической обработки полученных результатов, подготовке публикаций по основным положениям диссертационной работы, сборе и анализе литературных данных отечественной и зарубежной литературы по тематике исследования, формулировке выводов и практических рекомендаций, оформлении рукописи диссертации.

#### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II–VI), обсуждения результатов (глава VII), выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 18 таблицами. Список литературы включает 252 источника, из них 45 отечественных, 207 иностранных.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Фармакологическая коррекция иммунопатологических процессов**

Дисфункция иммунной системы в существенной степени определяют патогенез подавляющего большинства инфекционных и многих неинфекционных заболеваний. Поскольку иммунные расстройства являются неотъемлемым атрибутом большинства патологических процессов в независимости от этиологии, коррекция иммунных нарушений представляется актуальным инновационным методом лечения, повышающим эффективность общей терапии [3, 10]. С этим связан большой интерес к проблеме иммунотерапии, а поиск новых современных иммунокорректирующих средств представляет важнейшую задачу для иммунологии, фармакологии и практической медицины. Необходимо различать «собственно» заболевания иммунной системы, при которых изменения ее реактивности являются устойчивыми, патогенетическими, требующими немедленной коррекции, и компенсированные временные нарушения в результате различных причин, не нуждающиеся в лечении [4, 11, 22]. Высокий адаптационный потенциал иммунной системы, ее многокомпонентность и многоуровневая организация затрудняют направленное медикаментозное изменение ее функций из-за высокого риска индукции нежелательных лекарственных реакций. Соответственно, реализация предполагаемых свойства иммуностропных препаратов никогда не бывает линейной, а всегда зависит от этиологии заболевания, характера и степени нарушения иммунной системы, стадии патологического процесса и многих других причин. Основные виды действия иммуностропных лекарственных средств (ЛС), имеющих в арсенале современной медицины:

1. иммуномодулирующее – возвращение звеньев иммунной системы из любого состояния реактивности к нормальному уровню функционирования;

2. иммунокорректирующее – исправляющее конкретные дефекты иммунной системы при ее определенных нарушениях;
3. иммуностимулирующее – повышающее активность как поврежденных, так и неповрежденных звеньев иммунной системы;
4. иммунодепрессивное – угнетающее активность различных звеньев иммунной системы [14, 39].

Под термином иммунотерапия в настоящее время понимается совокупность различных способов воздействия на иммунную систему с целью прекращения патологического процесса в организме и включает в себя иммунопрофилактику, иммунокоррекцию и иммунореабилитацию.

Иммунопрофилактика включает комплекс мероприятий, используемых для предупреждения возникновения заболеваний или их рецидивов. Обычно она используется для предупреждения заражения инфекционными или вирусными заболеваниями у здоровых людей в виде вакцинопрофилактики. В другом случае активно используется для профилактики рецидивов аллергических заболеваний (бронхиальной астмы, поллинозов и др.) путем алерговакцинации [21]. Ранее под иммунотерапией и иммунопрофилактикой подразумевались только такие методы воздействия на макроорганизм, при которых использовались специфические биологические средства: антигены, вакцины, анатоксины, аллергены, иммуноглобулины и др. В настоящее время несмотря на то, что новые химические препараты, активно действующие на различные звенья иммунитета, отличаются происхождением и механизмом действия, они также относятся к иммунотерапевтическим средствам и занимают достойное место в арсенале современной медицины.

Иммунокоррекция представляет собой совокупность методов лечения, направленных на исправление дефектов иммунной системы. Этот термин подчеркивает целенаправленность применяемых средств на коррекцию и

восстановление реактивности иммунной системы, хотя эти средства и методы могут не отличаться от используемых для иммунотерапии. Но основное отличие иммунокоррекции от иммунотерапии заключается в том, что иммунокоррекция включает в себя такие способы восстановления или угнетения реактивности иммунной системы как реконструктивные операции – трансплантацию органов и клеток иммунной системы и, наоборот, удаление органов, клеток, молекул иммунной системы у больных. Пересадки тимуса, костного мозга и особенно генная терапия иммунодефицитов (например, дефицита аденозиндезаминазы) являются наиболее яркими примерами иммунокоррекции [23]. По характеру действия методы иммунокоррекции можно классифицировать на: стимулирующую, подавляющую, специфическую, неспецифическую, вспомогательную, предварительную, метаболическую. По механизму действия – на активную (антигены, вакцины) и пассивную (антитела, иммуноглобулины). По видам – на специфическую (антигенную) активную стимулирующую или супрессорную; специфическую адаптивную (фактор переноса); специфическую пассивную заместительную (антитела, иммуноглобулины); специфическую пассивную подавляющую (антитела); неспецифическую активную стимулирующую (адьюванты, митогены, модуляторы); супрессорную (медиаторы, иммуноглобулины); неспецифическую адаптивную стимулирующую (тимомелопептиды); неспецифическую пассивную заместительную (антитела, иммунокомпетентные клетки); супрессорную (глюкокортикостероиды, иммунодепрессоры, цитостатики, антимедиаторы); предварительную (коррекцию иммунопатологии до основного лечения, вспомогательную (антибиотиками, витаминами) [9].

Под термином иммуномодуляция обычно подразумевают временное повышение или снижение тех или иных показателей иммунологической реактивности. Спектр веществ, обладающих иммуномодулирующими свойствами, постоянно расширяется. Часто такие свойства находят у препаратов, ранее

применявшиеся в медицине по другим показаниям. Это указывает на то, что иммунная система обладает высокой тропностью к веществам различной природы, особенно ксенобиотикам, попадающим в макроорганизм. Они или продукты их биотрансформации взаимодействуют с рецепторами клеток и внеклеточными факторами иммунной системы, вызывают сдвиг показателей иммунологической реактивности, полезность или вредность которых можно оценить лишь в конкретной ситуации или по отдаленным последствиям [9, 23].

Под иммунореабилитацией понимают комплекс иммунологических, иммунокорректирующих, иммунопрофилактических, социальных, экологических, биомедицинских мероприятий, направленных на восстановление измененной иммунологической реактивности больного или определенного контингента населения [23].

Иммуномодуляторы в целом – это различные биологически активные вещества (субстанции), влияющие на иммунную систему. Это влияние заключается либо в усилении (повышении) функции иммунной системы (иммуностимуляторы) или подавлении (понижении) иммунной реакции (иммунодепрессанты). Существует также точка зрения, согласно которой иммуномодуляторы – это средства, которые приводят патологически измененный иммунный ответ в физиологическую норму [40].

Существуют различные классификации лекарственных препаратов обладающих иммуностропными свойствами. Так, в зависимости от происхождения их делят [30] на природные (биологические) и синтетические, и (или) химически чистые. Все вещества природного происхождения авторы делят на экзогенные и эндогенные. К первым из них в подавляющем большинстве случаев относятся вещества бактериального (мурамил-дипептид, продигозан), грибкового (зимозан) или растительного (сапонины) происхождения. Среди эндогенных иммуностропных средств выделяют иммунорегуляторные пептиды тимического и костномозгового

происхождения, а также цитокины. К последним относят всю совокупность биологически-активных белков, продуцируемых лимфоцитами и макрофагами, включая интерлейкины, монокины и интерфероны [20].

В соответствии с другим принципом классификации иммуотропных лекарственных средств основанных на представлениях о механизмах их действия, в соответствии с которыми предлагается разделить эти средства на две группы [37]. Первую из них, включающую цитокины, миелопептиды и тимические гормоны, характеризует заместительное действие на иммунную систему, тогда как вторую группу, объединяющую активные компоненты поверхностных структур патогенов (липополисахарид), полиэлектролиты и индукторы цитокинов (интерферонов) отличает индуцибельное действие на иммунную систему [57].

Еще одним принципом классификации иммуотропных средств является их разделение на основе механизма действия, которое они оказывают на конкретные клеточные системы, обеспечивающие иммунные реакции [144]. Современная интерпретация, подразумевающая участие в иммунной защите четырех главных механизмов: фагоцитоза, системы комплемента, гуморального и клеточного звеньев иммунитета, позволяет разделить иммуотропные лекарственные средства на препараты с центростремительным и центробежным действием [41]. Первый из них, центростремительный, предусматривает воздействие на моноцитарно-макрофагальную систему, служащей главной мишенью практически для всех препаратов микробного происхождения или их синтетических аналогов. В последующем взаимодействии моноцитов-макрофагов с Т- и В-лимфоцитами, определяющий уровень функционирования иммунной системы, реализуется через их способность синтезировать ряд цитокинов (ИЛ-1, ФНО $\alpha$ , ИЛ-3) и колониестимулирующих факторов, непосредственно активирующих иммунокомпетентные клетки.

Второй направленностью действия иммуотропных препаратов, согласно этой же классификации, являются препараты с центробежным действием, для которых мишенью их действия служат лимфоциты. Такой способностью обладают пептиды тимического происхождения.

Ряд иммуномодуляторов проявляет стимулирующее влияние на иммунную систему в обоих направлениях. К ним, например, относится миелопид, один из компонентов которого (МП-1) действует преимущественно на Т-лимфоциты, в то время как другой компонент (МП-3) - на макрофаги, усиливая фагоцитарную активность и стимулируя их цитотоксические свойства [19].

Необходимость создания новых иммуномодуляторов, обладающих как селективностью в отношении различных субпопуляций лимфоцитов, так и системным действием на иммунную систему, продиктовано тем, что в настоящее время существует большое количество неселективных иммуотропных средств со специфическим иммунокорректирующим действием,

В последние годы все большую актуальность приобретают исследования по разработке и апробации синтетических иммуномодуляторов (как одних из самых безопасных и эффективных), а также в рамках решения проблемы создания новых иммунокорректирующих препаратов, интенсивно ведется скрининг веществ природного происхождения [42]. В последние годы среди этих веществ большое внимание уделяется производным хиназолина в виду обнаруженных у них противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств, опосредуемых влиянием на продукцию различных цитокинов.

## **1.2 Характеристика и спектр фармакологической активности производных хиназолина**

Хиназолины (1,3-бензодиазины) представляют собой один из наиболее активных классов азотсодержащих гетероциклических ароматических соединений,

обладающих широким спектром биологической активности. Данная группа соединений относится к бензодиазинам – диазофталинам, содержащим два атома азота в одном кольце [169]. Бензодиазины различаются по строению диазинового ядра: пиразиновое кольцо содержится в структуре хиноксалина, пиридазиновое – в структуре фталазина, а пиримидиновое – в составе хиназолина [43]:

Хиназолин был впервые синтезирован А. Бишлером и Лангом в 1895 г. путем декарбоксилирования 2-карбоксиипроизводного (хиназолин-2-карбоновая кислота). Однако обширные исследования структуры хиназолина были проведены в 1903 г. З. Габриэлем [124].

Структура основного представителя этой группы – хиназолина – содержит два конденсированных шестичленных кольца: бензольное в сочетании с пиримидиновым. Хиназолины, производные хиназолина, представляют собой окисленную форму хиназолина – кетохиназолина. Расположение кетогруппы является основой классификации: 2(1*H*)хиназолины, 4(3*H*)хиназолинон и 2,4(1*H*,3*H*)хиназолиндион. Среди четырех хиназолиновых структур наиболее распространены 4(3*H*)-хиназолиноны либо в качестве промежуточных, либо в качестве природных продуктов во многих предполагаемых путях биосинтеза. Эти гетероциклические мотивы часто составляют основу структурного скелета многих лекарственных средств, обладающих разнообразными свойствами и биологической активностью. Характер действия хиназолинов в основном зависит от свойств заместителей, их присутствия и положения в одном из циклических соединений [154, 177].

Известны различные способы синтеза хиназолинов. Они могут быть химически синтезированы, а также получены естественным путем из различных видов растений, животных и микроорганизмов. В зависимости от различного положения атомов азота хиназолиновое кольцо имеет четыре изомерные формы: хиназолин, хиноксалин, циннолин и фталазин. Вместе с другими изомерами

хиназолины находят распространенное применение в медицине, фармации и сельском хозяйстве [124, 169]. Эти вещества часто применяются во многих видах терапии: противовоспалительной [129], антипролиферативной [92], обезболивающей [123], антидепрессантной [124], антибактериальной [117], противопротозойной [171] и противовирусной [229]. Хиназолины также используются при лечении туберкулеза, малярии, гипертонии, судорог, аритмии и злокачественных новообразований [231]. Существует множество препаратов, содержащих в своей структуре хиназолин и хиназолиновое кольцо [210].

### ***Противоопухолевая активность***

В последние годы FDA одобрило несколько производных хиназолина в качестве нового класса химиотерапевтических средств против рака со значительной терапевтической эффективностью против солидных опухолей. Противоопухолевые препараты, такие как гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, афатиниб и вандетаниб, были одобрены для клинического применения [58].

Было показано, что производные хиназолина могут оказывать противоопухолевое действие несколькими способами. Например, хиназолиновый каркас напоминает как пуриновое, так и птеридиновое ядро. Как следствие, были обнаружены некоторые соединения на основе хиназолина, которые способны ингибировать пути метаболизма пуриновой [90] или фолиевой кислоты [207].

Также производные хиназолина могут обладать противоопухолевой активностью, действуя в качестве ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и ингибитора рецепторных тирозинкиназ [194]. Тирозинкиназы (ТК) играют ключевую роль в распознавании, передаче и амплификации клеточных сигналов, например, к пролиферации, дифференцировке и миграции клеток. Однако потеря контроля над этими процессами может привести к серьезным нарушениям, которые лежат в основе возникновения злокачественных новообразований, их прогрессирования и метастазирования [252]. Некоторые из новых ингибиторов ТК

(пиррол, морфолин и др.) были разработаны на основе гевитиниба или других хиназолиновых противоопухолевых препаратов, являющихся ингибиторами ТК [239].

Некоторые хиназолины могут действовать как ингибиторы сборки тубулина и, как следствие, приводить к апоптозу [75, 219]. Тубулин – основной структурный белок микротрубочек – важен для деления и подвижности клеток, вследствие чего является мишенью для противоопухолевых препаратов (винкристин, доцетаксел, паклитаксел и др.), которые предотвращают образование митотического веретена путем связывания с тубулином. Другим эффектом соединений, ингибирующих полимеризацию тубулина, является способность подавлять миграцию и инвазию опухолевых клеток, таким образом предотвращая их метастазирование [236]. Производное хиназолина, ингибирующее сборку тубулина, верубулин, достигло фазы II клинических исследований для оценки эффективности терапии глиобластомы. Однако вскоре исследование было остановлено из-за токсичности лекарственного средства в отношении сердечно-сосудистой системы [222]. Li et al. (2019) синтезировали ряд производных хиназолина на основе верубулина, тропных к трем сайтам связывания колхицина, и исследовали *in vitro* их противоопухолевую активность. Соединение-лидер под шифром 19с обладало наиболее выраженным антипролиферативным действием в отношении нескольких клеточных линий HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека), KB (клетки носоглоточной эпидермальной карциномы человека), HCT-8 (клетки аденокарциномы прямой кишки человека) и MDA-MB-231 (клетки аденокарциномы молочной железы человека). Селективность соединения 19с в отношении клеточных линий была низкая: полумаксимальная ингибирующая концентрация ( $IC_{50}$ ) находилась в диапазоне 0,11–0,13 мкМ. Исследование влияния на сборку тубулина показало, что соединение 19с дозозависимым образом нарушало полимеризацию белка, что приводило к разрушению сети микротрубочек [160].

Производные хиназолина могут действовать как многофункциональные лиганды. Гибриды фторированных аминокислот хиназолина были описаны как двойные ингибиторы полимеризации тубулина 650 и киназы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [242]. Wang et al. (2017) провели исследование противоопухолевой активности синтезированных хиназолиновых производных, ингибирующих EGFR. Биологическую активность этих соединений исследовали *in vitro* на нескольких клеточных линиях, включая клеточную линию эпидермоидной карциномы человека (A431), немелкоклеточного рака легкого человека (A549) и HepG2. Большинство производных показали лучшую биологическую активность и эффективность ( $IC_{50} < 2,0$  мкМ) по отношению к препарату сравнения гефитинибу. Антипролиферативное действие этих соединений может быть обусловлено тем, что они могут более тесно связываться с белком в районе сайта связывания АТФ в EGFR [228].

Высокая экспрессия потенциалзависимых натриевых каналов (VDSC) экспрессируются не только в возбудимых клеточных системах, но и в метастатически активных клетках. Поэтому VDSC рассматриваются как перспективная мишень для противоопухолевой и антиметастатической терапии [184]. Пирролидинилкарбаматные производные хиназолина были описаны и запатентованы как ингибиторы VDSC [233].

Другое свойство хиназолинов заключается в преодолении множественной лекарственной устойчивости в опухолевых клетках посредством ингибирования АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ATP-binding cassette transporters, ABC). ABC транспортеры, такие как ABCB1 или ABCG2, вызывает эффлюкс токсичных веществ из клеток за счет гидролиза АТФ. Избыточная экспрессия ABC-транспортеров часто связана с возникновением множественной лекарственной устойчивости при химиотерапии. Ингибирование ABC-транспортеров может повысить эффективность противоопухолевой терапии [151].

### ***Нейропротективная активность***

Замещенные производные хиназолинона также проявляют ингибирующую активность в отношении моноаминоксидазы (МАО) и ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [56]. Было показано, что производные хиназолинона, содержащие фрагменты гидразина и пиразолина, являются хорошими ингибиторами МАО [113]. Другие соединения 4(3H)-хиназолинона были исследованы как потенциальные ингибиторы МАО.

Amer et al. (2020) синтезировали ряд производных хиназолина и исследовали их способность ингибировать А и В изоформы МАО (МАО-А и МАО-В). В качестве моделей авторы исследования использовали структуры минимальной энергии МАО-А и МАО-В человека после удаления ковалентных лигандов [51]. Две изоформы характеризуются разным сродством к ингибиторам и разной специфичностью к субстратам. МАО-А в основном участвует в метаболизме серотонина, адреналина и норадреналина, тогда как 2-фенилэтиламин и бензиламин преимущественно метаболизируются МАО-В. Тирамин и дофамин являются общими субстратами для обоих изоферментов. Терапевтический интерес к ингибиторам МАО охватывает две основные категории: ингибиторы МАО-А в основном используются для лечения психических расстройств, в частности депрессии и тревоги, тогда как ингибиторы МАО-В используются при лечении болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера [66]. По результатам проведенного исследования серия N'-замещенных бензилиден-2-(6-хлор-4-оксо-2-арил-1,4-дигидрохиназолин-3(2H)ил) ацетогидразидов обеспечивает наиболее сильное ингибирование МАО. Соединение под шифром 5d селективно ингибировало МАО-А ( $IC_{50} = 0,25$  мкМ), а 5h ингибировало две изоформы МАО ( $IC_{50}$  составила 0,31 и 0,44 мкМ для МАО-А и для МАО-В, соответственно) [51].

Как уже было упомянуто, ингибиторы МАО-В часто используются в качестве адъювантов к леводопе при терапии болезни Паркинсона, поскольку ингибиторы

они не только блокируют метаболизм дофамина, но и снижают выработку нейротоксичных побочных продуктов каталитического цикла МАО, таких как перекись водорода и альдегиды [99, 240]. Основываясь на терапевтическом применении ингибиторов МАО-В, исследование, проведенное Qhobosheane et al. (2019), посвящено оценке ряда моно- и дизамещенных производных 4(3H)-хиназолинона в качестве потенциальных ингибиторов рекомбинантных МАО-А и МАО-В человека. Авторами были синтезированы 12 С6-монозамещенных и 9 N3/С6-двузамещенных производных 4(3H)-хиназолинона. Наиболее активные моно- и дизамещенные производные имели значения  $IC_{50}$  0,685 и 6,35 мкМ. Из-за их обратимого и избирательного действия на МАО-В соединения с меньшей вероятностью будут вызывать побочные эффекты, опосредованные ингибированием МАО-А [198]. Противопаркинсоническое действие производных хиназолина может быть опосредовано другими механизмами. Sabnis (2021) продемонстрировал, что производные N-гетероарилхиназолин-2-амина могут действовать как ингибиторы богатой лейциновыми повторами киназы 2 (leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2), мутации гена, кодирующего данный белок, приводят к развитию наследственной болезни Паркинсона с поздним началом [204].

Некоторые хиназолиновые производные рассматриваются в качестве терапии болезни Альцгеймера, причем терапевтическое действие этих соединений реализуется в совокупности влияния на несколько звеньев патогенеза. Производные хиназолина могут ингибировать ферменты ацетил- и бутирилхолинэстеразы ( $IC_{50}$  в диапазоне 1,6–30,5 мкМ), предотвращать агрегацию  $\beta$ -амилоида (диапазон  $IC_{50}$  270 нМ–16,7 мкМ) и проявлять антиоксидантные свойства. Соединение N2-(1-бензилпиперидин-4-ил)-N4-(3,4-диметоксибензил)хиназолин-2,4-диамин) идентифицировано как двойной ингибитор холинэстераз ( $IC_{50}$  составила 2,1 и 8,3 мкМ для ацетила- и бутирилхолинэстеразы, соответственно) и как ингибитор агрегации  $\beta$ -амилоида ( $IC_{50} = 2,3$  мкМ). Соединение 4-(бензиламино)хиназолин-2-

ол) было наиболее сильным ингибитором агрегации  $\beta$ -амилоида ( $IC_{50} = 270$  нМ). Комплексные исследования взаимосвязи «структура-активность» демонстрировали применение 2,4-дизамещенного хиразолинового кольца в качестве подходящей матрицы для разработки мультитаргетных агентов для лечения болезни Альцгеймера [176].

### ***Иммунотодулирующая активность***

Производные хиразолина с гуанидиновым компонентом обладают противовоспалительным действием за счет способности ингибировать натрий-протонные обменники ( $Na^+/H^+$  exchanger, NHE). NHE принадлежат к семейству переносчиков растворенных веществ 9 (solute carrier 9, SLC9) и являются древними высококонсервативными белками. Данные переносчики играют ключевую роль в регулировании внутриклеточного pH посредством электронейтрального обмена ионов  $Na^+$  и  $H^+$  через клеточные мембраны. Изоформа NHE-1 была обнаружена первой и является наиболее изученной [193]. Она почти повсеместно экспрессируется и опосредует множество клеточных процессов, таким образом представляя собой ценную фармакологическую мишень [142].

Активация NHE-1 в иммунных клетках опосредует провоспалительный эффект [212]. Фагоцитоз, высвобождение цитокинов и хемокинов, образование активных форм кислорода зависит от внутриклеточного pH [87]. Ингибирование NHE-1 снижало индуцированную ЛПС продукцию супероксид-аниона, интерлейкина (interleukin, IL) 6, IL-1 $\beta$  и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) в микроглии [166]. Было показано, что ингибитор NHE-1 амилорид снижает выраженность воспаления тканей при остром повреждении легких, вызванном ЛПС у крыс [246].

Hu et al. (2015) разработали и синтезировали серию производных 4-аминохиразолина и исследовали их противовоспалительную активность *in vitro* с использованием макрофагов, активированных ЛПС. Несколько соединений

проявляли значительную противовоспалительную активность, а 4 соединения-лидера ингибировали высвобождение как ФНО $\alpha$ , так и ИЛ-6 дозозависимым образом. Кроме того, эксперименты *in vivo* показали, что исследуемые соединения могут снижать ОПЛ, вызванное введением ЛПС, у крыс за счет снижения продукции провоспалительных цитокинов, концентрации белка в БАЛ и инфильтрации легочной ткани макрофагами [129].

ФНО $\alpha$  является одним из наиболее распространенных медиаторов воспаления при различных воспалительных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит. Соединение 2-хлор-N-(4-(2-морфолиноэтокси)фенил)хиназолин-4-амин было открыто Pu et al. (2015). Соединение ингибирует продукцию ФНО $\alpha$  ( $IC_{50} = 8,86$  мкМ в клеточной линии RAW264.7). Причем ингибирующее действие оказывалось за счет фермента, который является наиболее важной протеазой, ответственной за высвобождение ФНО $\alpha$  из его про-ФНО $\alpha$  и перевода в активный (растворимый ФНО $\alpha$ ). Исследование *in vivo* на мышах с экспериментальным артритом, индуцированным коллагеном, показало, что соединение-лидер снижало выраженность артрита у животных посредством уменьшения инфильтрации воспалительными клетками и продукции провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ ) [197].

Некоторые производные хиназолина способны усиливать неспецифическую резистентность организма. Высокопроизводительный скрининг *in vitro* с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека показал, что замещенные 4-аминохиназолины являются низкомолекулярными активаторами ядерного фактора «каппа-би» (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, NF- $\kappa$ B), запускающими каскад сигнального пути через Толл-подобные рецепторы (toll-like receptor, TLR) - критическими компонентами врожденной иммунной системы, частично регулирующими распознавание чужеродных антигенов посредством активации NF- $\kappa$ B. Синтетические модификации

хиназолинового каркаса во втором и четвертом положениях привели к созданию соединения, которое активировало сигнальный путь интерферона I типа (ИФН I), усиливая его продукцию. Присоединение различных радикалов, таких как бром, хлор и метил, в ортоположении фенильного кольца усиливало иммуномодулирующую активность [185].

### ***Другие виды активности***

У ряда производных тиазолохиназолина, полученных путем конденсации различных ароматических альдегидов с 4-нитроанилином, выявили антиоксидантную активность по реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом а также способности утилизировать NO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [54].

Новая серия замещенных производных хиназолина была разработана, синтезирована и оценена на предмет их гиполипидемической активности у крыс с холестерин-индуцированной гиперлипидемией. Скрининг *in vivo* показал, что три соединения продемонстрировали сильную антигиперлипидемическую активность за счет снижения уровня триглицеридов (ТГ), липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) с последующим повышением уровня липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в плазме животных [178].

С помощью последовательности реакций была синтезирована серия производных тиазолохиназолиндиамина из 6-метилантраниловой кислоты. Скрининг соединений на ингибирующую активность в отношении дипептидилпептидазы IV (DPP-4) и на антиоксидантную активность проводили *in vitro*. По результатам, ряд соединений обладал выраженной противодиабетической активностью, сопоставимой с линаглиптином, и оказывали антиоксидантное действие [49].

Производные хиназолин-2,4,6-триамина обладали антипаразитарной активностью в отношении возбудителей малярии, трипаносомоза и лейшманиоза [171].

Тестирование *in silico* 71 производного хиназолина на наличие противовирусной активности в отношении SARS-CoV-2, провели Ismail et al. (2021). В результате 3 хиназолиновых производных (норхинадолин А, дезокситриптоквивалин и дезоксинортриптоквивалин) продемонстрировали сильное связывание с тремя мишенями: основной протеазой вируса, спайковым белком и ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ 2) человека [131].

### **1.3 Экспериментальные патологии для изучения иммуномодулирующего действия**

#### **1.3.1 Системный воспалительный ответ, ассоциированный с бактериальным липополисахаридом**

Клеточная оболочка грамотрицательных бактерий состоит из тонкого слоя пептидогликана (ПГ), наружной мембраны, липополисахарида ЛПС и фосфолипидов. ЛПС является основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Эта макромолекула локализуется во внешнем слое мембраны и состоит из О-специфической цепи, основного олигосахарида и липидного компонента, называемого липидом А. У некапсулированных штаммов ЛПС находится на поверхности клеточной стенки [202]. Молекула ЛПС встроена во внешнюю клеточную мембрану грамотрицательных бактерий, а липид А – хвост молекулы – служит для ее закрепления в стенке бактериальной клетки. При делении клеток, гибели или антибиотикотерапии ЛПС высвобождается, попадает в системный кровоток, что может вызвать иммунный ответ. Хотя воспалительная реакция необходима для элиминации возбудителя, высокие дозы ЛПС, гипериммунный ответ может вызвать полиорганную дисфункцию, часто приводящую к смерти [63]. Поэтому ЛПС также известен как эндотоксин [81].

ЛПС, наряду с ПГ, белками теплового шока и др., представляет собой высоко консервативную структуру и входит в число патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) [223]. PAMP

распознаются через паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors, PRR), которые представлены TLR, NOD-подобными рецепторами (NLR) и маннозосвязывающим лектинами (MBL) – они являются основными PRR, участвующими в реализации воспалительного ответа [93, 105, 223]. После активации PRR запускается внутриклеточная передача сигналов, например через сигнальные пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAP), к ядрам иммунокомпетентных клеток, где присутствуют различные транскрипционные факторы, в частности NF-κB. Последующая активация транскрипционных факторов вызывает клеточный ответ, который включает индукцию синтеза молекул адгезии, ускоряющих развитие воспаления и диапаез эффекторных клеток врожденного иммунитета [157], а также активацию экспрессии и высвобождения провоспалительных медиаторов таких как ФНОα, ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-10 или I тип интерферона (ИФН) [102].

Кроме того, указанные медиаторы воспаления сами могут индуцировать высвобождение молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением DAMP (danger-associated molecular patterns). DAMP представляют собой внутриклеточные белки или нуклеиновые кислоты, которые в норме практически не могут быть обнаружены во внеклеточном пространстве. Наиболее значимыми DAMP являются такие молекулы, как HMGB1 (high-mobility group protein B1), аденозинтрифосфат (АТФ), мочевая кислота, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и фрагменты расщепленного внеклеточного матрикса – гепарансульфат и гиалуроновая кислота [91]. DAMP также распознаются PRR (pattern recognition receptors), что приводит к потенцированию воспалительного процесса [140].

Из-за связи с септициемией ЛПС используется в экспериментальных моделях для выявления возможных механизмов и путей устранения системного воспалительного ответа, индуцированного введением ЛПС. Экспериментальная модель системного воспаления, вызванного ЛПС, имеет существенные преимущества, включая техническую простоту и высокую воспроизводимость,

особенно в отношении острой воспалительной реакции. Вскоре после введения ЛПС происходит массивное высвобождение провоспалительных цитокинов, циркулирующих в кровотоке – их уровни можно измерить в сыворотке или плазме [201]. Действие цитокинов приводит к развитию синдрома системного воспалительного ответа и последующей смертности, которая зависит от дозы введенного ЛПС [200, 201, 221]. Стоит отметить, что воспалительный ответ, индуцированный ЛПС, не является экспериментальной моделью сепсиса, поскольку не точно воспроизводит его характерные черты. В отличие от сепсиса, введение препаратов ЛПС характеризуется более ранним и сильным цитокиновым ответом, продолжительность которого короче [88]. В целом, имеющиеся данные позволяют предположить, что введение препаратов ЛПС может быть использовано для изучения патофизиологических процессов эндотоксемии или системного воспалительного ответа, а также как модель эндотоксического шока, но не сепсиса в целом [208].

### **1.3.2 Острое повреждение легких, вызванное бактериальным липополисахаридом**

Острое повреждение легких (ОПЛ) характеризуется острым воспалением дыхательных путей и паренхимы легких. Многие факторы, такие как тяжелый сепсис, травма, шок и вдыхание токсичных газов, могут способствовать развитию данного патологического процесса. ОПЛ – типичный клинический синдром, связанный со значительной заболеваемостью и смертностью [72]. Несмотря на значительно выросший уровень технического оснащения и современное поддерживающее лечение в отделениях интенсивной терапии, смертность в результате ОПЛ составляет от 30 до 40% [170, 203]. К сожалению, существует мало эффективных препаратов для лечения ОПЛ.

Липополисахарид (ЛПС) был признан основным компонентом, вызывающим развитие ОПЛ. Как уже было сказано выше, при стимуляции ЛПС активируется экспрессия воспалительных цитокинов, включая ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$ , которые участвуют в прогрессировании ОПЛ. Воздействие ЛПС также приводит к окислительному стрессу, а дисбаланс между оксидантной и антиоксидантной системами является одним из ведущих звеньев в патогенезе ОПЛ.

Недавно несколько исследований показали, что толл-подобные рецепторы играют существенную роль в системе врожденного иммунитета, ответственной за воспалительный процесс при ОПЛ [244]. Активация NF- $\kappa$ B, вызванная бактериальными эндотоксинами, необходима для транскрипции и образования провоспалительных медиаторов, включая ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$  в ранней фазе ОПЛ. Сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt/mTOR регулирует выживаемость клеток и окислительный стресс при воспалении легких. Akt регулирует активацию NF- $\kappa$ B и контролирует противовоспалительную активность mTOR у млекопитающих [159].

Являясь основным компонентом наружной мембраны бактерий, ЛПС вызывает ОПЛ, характеризующееся избыточной экспрессией многочисленных провоспалительных цитокинов. Интратрахеальное введение ЛПС широко используется для изучения патогенеза и воздействия ОПЛ у крыс.

Последние данные свидетельствуют о том, что дисбаланс между антиоксидантной системой и чрезмерной продукцией свободных радикалов при ЛПС-индуцированном повреждении легких является причиной последующего перекисного окисления липидов клеточных мембран, приводящего к разрушению паренхиматозных клеток легких, повреждению базальной мембраны капилляров и других компонентов стромы. В связи с этим происходит значительное повышение концентрации малонового диальдегида (МДА), конечного продукта свободно-радикального окисления полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав

фосфолипидов клеточных мембран и снижению уровня основных компонентов антиоксидантной защиты легких: супероксиддисмутазы (СОД) ключевого фермента, отражающего способность нейтрализовать свободные радикалы кислорода и глутатиона, небелкового антиоксиданта [73, 136].

Существенным признаком повреждения паренхимы легких является высвобождение медиаторов воспаления, таких как ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$ . Эти ключевые цитокины инициирующие воспалительный каскад, вызывают инфильтрацию клеток и ускоряют развитие патологических изменений [138]. Оксид азота (NO) также считается внутриклеточным мессенджером, гиперпродукция которого усиливает развитие воспаления [71].

После распознавания ЛПС с помощью TLR4 и последующей активации киназы, связанной с рецептором ИЛ-1 (interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK) запускается ряд каскадов, включая миелоидный дифференцирующий фактор 88 (MyD88). Впоследствии активация ИКК- $\alpha$ /ИКК- $\beta$  приводит к фосфорилированию и деградации I $\kappa$ B- $\alpha$ , что способствует экспрессии NF- $\kappa$ B [134]. Фосфорилирование NF- $\kappa$ B приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, включая ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$  [250].

### **1.3.3 Циклофосфамид-индуцированная иммуносупрессия**

Циклофосфамид (ЦФ) является одним из наиболее эффективных и широко используемых противоопухолевых препаратов [96]. Цитостатическое действие ЦФ обусловлено его активными метаболитами, алкилирующими молекулы ДНК по трем различным механизмам. Во-первых, присоединение алкильных групп к азотистым основаниям ДНК, что приводит к фрагментации ДНК ферментами репарации, предотвращая синтез ДНК и транскрипцию РНК из поврежденной ДНК. Во-вторых, повреждение ДНК за счет образования поперечных сшивок, которые предотвращают разделение цепей ДНК для репликации или транскрипции. В-

третьих, индукция неправильного образования пар нуклеотидов, приводящая к мутациям [84]. Эти свойства нашли применение в терапии злокачественных новообразований [247] и аутоиммунных заболеваний [82, 158]. Кроме того, препарат применяется в качестве иммуносупрессанта после трансплантации [96].

Цитотоксичность ЦФ носит неспецифический характер, вследствие чего применение препарата сопровождается рядом побочных эффектов, среди которых снижение антиоксидантной способности органов и тканей, гепато- и нефротоксичность [122, 137, 214], подавление процессов роста и развития организма [128]. Одним из главных токсических эффектов ЦФ является выраженная иммуносупрессия [247], опосредованная действием препарата преимущественно в отношении быстро пролиферирующих клеток, классическим примером которых являются клетки системы гемопоэза [139].

ЦФ угнетает миело- и лимфопоэз, что проявляется в снижении числа иммунокомпетентных клеток вследствие угнетения процессов их пролиферации и дифференцировки, что приводит к существенному подавлению гуморального и клеточного звена иммунного ответа [33,34]. Нейтрофилы – короткоживущие клетки неспецифической иммунной защиты – наиболее подвержены действию химиотерапевтических агентов, но восстанавливаются одними из первых. Напротив, Т-клеткам, ответственным за генерацию клеточных ответов, требуется больше времени, чтобы восстановиться [251]. Предполагается, что влияние ЦФ на Т-клетки опосредуется через регуляторные Т-лимфоциты (regulatory T cells, Treg) [234]. В свою очередь Treg действуют на работу Т-хелперов (CD4+) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), которые являются наиболее важными регуляторными клетками иммунной системы, осуществляя высвобождение цитокинов или оказывая прямое цитотоксическое действие [109]. Также восстановление субпопуляции В-лимфоцитов, которые дифференцируются в антителообразующие (плазматические)

клетки, занимает значительный период времени [234]. Эти изменения часто могут также сопровождаться атрофией таких лимфоидных органов, как селезенка [175].

Таким образом, восстановление нарушенного ЦФ адаптивного иммунного ответа чаще всего происходит в течение длительного времени, что затрудняет осуществление корректной реакции на чужеродные антигены различного происхождения.

Описанные свойства ЦФ делают возможным его применение не только в клинических целях, но и для экспериментальных исследований. Индукция иммунодефицита на животных моделях широко используется для изучения многочисленных иммунных процессов, связанных с развитием рака, реакцией отторжения трансплантата и инфекционными заболеваниями [130, 234]. Иммуносупрессия, вызванная введением ЦФ, также сама по себе является полноценной экспериментальной моделью, поскольку данное состояние представляет собой дисфункцию иммунной системы и может привести к повышенной уязвимости организма к различным патогенам [237]. Следовательно поиск и изучение соединений, обладающих иммуномодулирующей активностью, в условиях экспериментальной иммуносупрессии представляется целесообразным и обоснованным.

## **1.4 Заключение**

Фармакологическая коррекция нарушений работы иммунной системы и разработка методов избирательного изменения функций иммунитета для лечения заболеваний является областью повышенного интереса для поиска и изучения иммуномодулирующих агентов. Одновременно с этим заслуживают внимания противовоспалительные свойства производных хиназолина. Механизмы развития иммунопатологических состояний многообразны, что диктует необходимость их изучения, и поиска новых эффективных средств коррекции воспалительных

нарушений и дисфункций иммунного статуса. При этом в первую очередь должна рассматриваться не только активность иммуностимулирующих средств, но и способность устранять непосредственно иммунную дисфункцию, будь то иммунодефицитное состояние или чрезмерно усиленный иммунный ответ.

Необходимость разработки, изучения и применение новых безопасных и эффективных иммунокорректирующих лекарственных средств в широкую лечебную практику возможно только после тщательного экспериментального изучения безопасности и специфической иммуностимулирующей активности химических соединений - кандидатов на экспериментальных моделях иммунологического процесса в норме и патологии с последующим выявлением их воздействия на различные звенья иммуногенеза.

Особый интерес представляют производные хиназолина, в частности производные хиназолин-4(3H)-она. С течением времени открываются новые и более сложные варианты структур хиназолинов. Появляется все большее количество публикаций, сообщающих о легкой доступности структурных хиназолиновых каркасов к синтезу в соответствии с разнообразным характером возможного применения, что свидетельствует о все возрастающем интересе к расширению биологических эффектов, оказываемых этими соединениями. Вследствие стабильности хиназолинового ядра представляется возможным введение в это ядро множества биологически активных фрагментов для создания новых лекарственных средств. С другой стороны, хиназолин сам по себе представляет собой структурный каркас, обладающий широким спектром биологической активности с различным механизмом действия, включающим как противомикробную: противомикробную, противопротозойную и противовирусную активность, так и противовоспалительную, что свидетельствует о перспективности поиска соединений с иммуностимулирующим действием в ряду *N*-замещенных производных хиназолина.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Экспериментальные животные

Фармакологические исследования были выполнены на лабораторных животных следующих видов: 50 нелинейных самцах мышей (возраст 3–4 мес., масса тела 25–30 г); 50 самцах мышей линии C57bl/6J (возраст 3–4 мес., масса тела 20–23 г), 50 самцах крыс линии Wistar (возраст 12–13 мес., масса тела 300–350 г), поставленных ООО «НИЦ БМТ» (г. Москва); 150 самцах мышей линии СВА (возраст 6–8 нед., масса тела 18–24 г), поставленных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (г. Санкт-Петербург). В исследование были взяты самцы животных с целью исключения возможного влияния ежемесячных флюктуаций гормонального статуса во время эстрального цикла у самок.

Все процедуры, выполняемые с лабораторными животными, порядок их содержания и обращения с ними соответствовал требованиям надлежащей лабораторной практики (ГОСТ 33215-2014 и 33216-2014), принципам, изложенным в Директиве 2010/63/EU [15], и были одобрены Локальным этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета (регистрационный № ИРБ 00005839 ИОРГ 0004900, ОГРП), свидетельство №2022/107 от 11.02.2022. Все разделы этого исследования соответствовали требованиям Руководства ARRIVE по отчетности об исследованиях, проводимых на животных [211].

Животные находились в карантине в течение 14 дней в условиях отдельных боксов вивария НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. В течение карантинного периода, дважды (на 1 и 14 день) проводилось измерение массы тела. Ежедневно контролировалось клиническое состояние животных путем визуального осмотра. В случае преждевременной гибели животных производился визуальной осмотр с установлением возможных причин гибели.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014

№51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» на специальном гигиеническом наполнителе древесном (ООО «Производственный комплекс «ГлавРезерв»). Крысы и мыши содержались в стандартных лабораторных клетках для мелких грызунов, размещенных на вертикальных стеллажах. Температурный режим помещения вивария поддерживался от +18 до +22°C. Освещение вивария обеспечивало стандартные (12 ч. свет /12 ч. темнота) условия размещения.

Животные имели круглосуточный свободный доступ к воде из централизованных систем водоснабжения (ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая» и СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества»), отстоянной в течение 1 суток. Замена воды в поилках производилась ежедневно. Для исключения возможного негативного влияния на результаты исследования циркадных биоритмов все экспериментальные исследования проводились в одинаковые временные интервалы и при одинаковых климатических условиях.

Лабораторные животные использовались нами, как для моделирования патологии *in vivo*, так в качестве доноров для получения первичных клеточных культур для экспериментов *in vitro* для выделения первичных перитонеальных макрофагов и нейтрофилов с последующим скринингом противовоспалительной активности.

Животные были рандомизировали по экспериментальным группам. Основным критерием рандомизации была масса тела животного. Отклонение индивидуальных значений массы животных от среднего значения не превышало 10%.

Каждому животному была присвоена идентификационная метка, которая наносилась на хвост животного перманентным маркером и фиксировалась в протоколе исследований. На клетках закреплялись этикетки со следующей

информацией: № протокола-заявки, вид, пол и количество животных, их индивидуальный номер, дата начала и конца эксперимента, ответственный сотрудник, название, способ введения и доза вещества.

В течение 24 часов до начала экспериментов все животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. На момент выполнения экспериментов животные были здоровыми (по результатам клинического осмотра), без изменений в поведении и аппетите.

Эвтаназию животных массой до 150 г проводили методом транслокации шейных позвонков [55]. Животных с массой тела более 150 г подвергали эвтаназии посредством тотального обескровливания. Процедуре предшествовала наркотизация с использованием хлоралгидрата (PanReac, Германия), согласно правилам «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [18]. Эвтаназию осуществляли своевременно, без причинения страданий, в помещении, где не содержатся другие животные.

## **2.2 Исследуемые соединения и препараты сравнения**

Объектами исследования иммуномодулирующей активности являлись 25 веществ, *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами, под лабораторными шифрами «ВМА». Из них 14 содержали незамещенную гуанидиновую группу, 11 – гуанидиновый фрагмент в составе дополнительного триазольного цикла. Исследуемые вещества впервые синтезированы на кафедре фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ под руководством заведующего кафедрой, д.х.н., профессора Озерова А.А.<sup>1</sup>

---

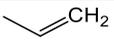
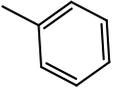
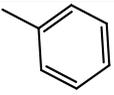
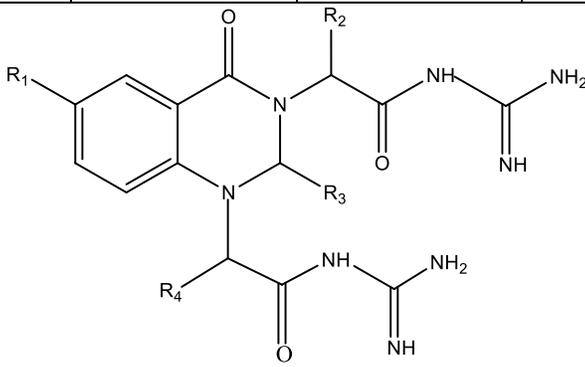
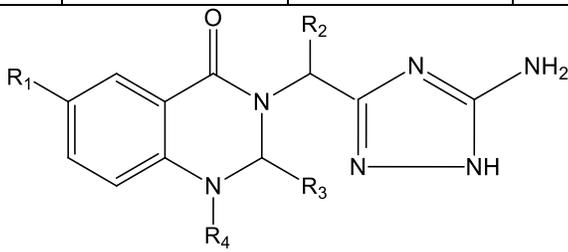
<sup>1</sup> Выражаем глубокую признательность сотрудникам Волгоградского государственного медицинского университета, кафедры фармацевтической и токсикологической химии – д.х.н., профессору Озерову А. А. за синтез и предоставление соединений для данной работы.

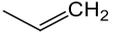
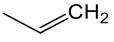
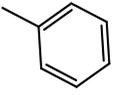
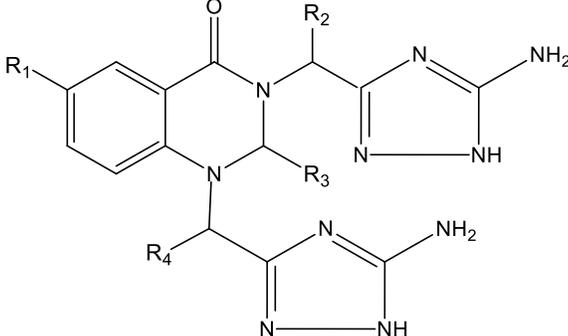
При осуществлении синтеза новых соединений были использованы эффективные методы очистки и разделения сложных смесей, основанные на аналитической и препаративной хроматографии. Строение синтезированных соединений подтверждено данными элементного анализа ЯМР-спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Структуры 25 впервые синтезированных *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами представлены в Таблице 1.

Для проведения скрининга в условиях *in vitro* исследуемые соединения растворяли в 99% растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (Татхимфармпрепараты, Россия) в концентрации 40 мМ с помощью вортекса. В случае обнаружения осадка или опалесценции нагревали на водяной бане (80 °С), встряхивая до полного растворения. Серийные разведения проводили *ex tempore* в среде, соответствующей методике исследования. Для исключения неспецифических реакций и токсического действия на клетки концентрация ДМСО в опытных и контрольных образцах была идентична, и не превышала 0,5%. Конечная концентрация ДМСО в пробах составила 0,5%. Соответственно, 0,5% раствор ДМСО использовался в качестве контроля растворителя. После проведения исследований стоковые растворы соединений хранили при -20 °С.

Таблица 1 - Химическое строение исследованных *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами

№	Шифр соединения	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>

1.	BMa 13-10	-	-	-	-
2.	BMa 13-15	-	CH <sub>3</sub>	-	-
3.	BMa 13-16	-	-	CH <sub>3</sub>	-
4.	BMa 13-17	Br	-	-	-
5.	BMa 21-05	-	-	O	CH <sub>3</sub>
6.	BMa 21-06	-	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>
7.	BMa 21-20	-	CH <sub>3</sub>	O	
8.	BMa 21-03	-	-	O	
9.	BMa 21-04	-	CH <sub>3</sub>	O	
10.	BMa 21-22	Br	-	O	CH <sub>3</sub>
					
11.	BMa 21-02	-	-		-
12.	BMa 21-07	Br	-		-
13.	BMa 21-08	-	CH <sub>3</sub>		CH <sub>3</sub>
14.	BMa 21-09	Br	CH <sub>3</sub>		CH <sub>3</sub>
					
15.	BMa 21-14	-	-	O	CH <sub>3</sub>

16.	вма 21-18	-	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>
17.	вма 21-15	-	-	O	
18.	вма 21-21	-	CH <sub>3</sub>	O	
19.	вма 21-13	-	-	O	
20.	вма 21-23	Br	-	-	-
21.	вма 21-24	Br	CH <sub>3</sub>	-	-
					
22.	вма 21-10	-	-	O	-
23.	вма 21-11	-	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>
24.	вма 21-12	Br	-	O	-
25.	вма 21-16	Br	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>

Для фармакологической оценки иммуномодулирующей активности изучаемых соединений в качестве положительных контролей (препаратов сравнения) были использованы полиоксидоний («НПО Петровакс Фарм», Россия) и дексаметазон (KRKA, Словения). Отрицательным контролем (контролем растворителя) служил физиологический раствор (Мосфарм, Россия).

В рамках данного исследования дозы ЦФ и соединения ВМА-13-15 были выбраны по литературным данным: исходная доза ЦФ для крыс -100 мг/кг, в результате расчета межвидового переноса доз между лабораторными животными разных видов [45, 97], учитывающий массу и площадь поверхности тела животных [108] для мышей составила ~ 200 мг/кг, соединение ВМА-13-15 для крыс – 5 мг/кг,

после расчета для мышей ~ 10 мг/кг. Соединение ВМА-21-10 для крыс – 30 мг/кг, основываясь на ранее проведенных экспериментах.

### **2.3 Оборудование и реактивы**

(данные приведены в этом разделе, если не упоминались в тексте диссертации)

*Лабораторное оборудование общего назначения:* бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 (Ламинарные системы, Россия), автоклав ГК-10 (МИЗ-МА, Украина), стерилизатор воздушный ГП-40-3 (Витязь, Беларусь), центрифуга Allegra 25R (Beckman Coulter, США), система очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция), pH-метр pH-150МИ (Измерительная техника, Россия), аналитические весы OHAUS AV114C (Adventurer Pro, США), портативные весы Scout PRO, 6000g (OHAUS, Китай), термошейкер для планшетов PST-60HL (Biosan, Латвия), термостат водяной TW-2.02 (ELMI, Латвия), холодильник-морозильник XM-6021-000 (Атлант, Беларусь), УФ-рециркулятор UVR-M (Biosan, Латвия), дозаторы автоматические одноканальные переменного объема: 0–20; 20–200 и 200–1000 мкл (Eppendorf, Германия), дозаторы 8-канальные регулируемые на объемы: 5–50 мкл и 30-300 мкл (Thermo Fisher Scientific, Россия), мульти-вортекс V-32 (Biosan, Латвия), магнитная мешалка с нагревом MSH-300 (Biosan, Латвия), ультразвуковая мойка с подогревом Elmasonic S130 H (ELMA, Германия),

*Аналитическое оборудование и программное обеспечение (ПО):* микроскоп инвертированный PrimoVert с программой обработки и анализа изображения Zeiss Efficient Navigation (ZEN) (Carl Zeiss, Германия), анализатор микропланшетный SPECTROstar Nano с программным пакетом BMG LABTECH's Reader Control Software и ПО для анализа данных MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Германия), анализатор микропланшетный Infinite M200 PRO с ПО i-control™ для микропланшетных анализаторов Tecan (Tecan, Австрия).

*Лабораторная посуда и вспомогательные материалы:* цилиндры мерные на 25, 50, 100 мл (МиниМед, Россия), стаканы стеклянные на 500 и 1000 мл (МиниМед, Россия), наконечники пластиковые объемом 1–200 мкл и 200–1000 мкл (Eppendorf, Германия), пипетки серологические, объемом 1, 2, 5, 10 мл (Corning, США), перчатки нитриловые смотровые (SFM, Германия), маска медицинская одноразовая (Sense, Россия), салфетки марлевые стерильные и бинты (Ньюфарм, Россия), пробирки центрифужные, градуированные 15 и 50 мл (Eppendorf, Германия), пробирки микроцентрифужные 1,5 мл (Eppendorf, Германия), парафинизированная пленка Parafilm (Aptaca, Китай), груша резиновая с тремя клапанами, стекла покровные круглые (диам.14 мм), штатив-бокс для предметных стекол, штатив для пипеток-дозаторов и бумага фильтровальная (МиниМед, Россия), штатив универсальный для пробирок диам. 30/16/12/6 мм (Aptaca, Китай), фильтрационная насадка 0,2 мкм (Corning, США), ванночки для многоканальных дозаторов, 50 мл (Citotest, Китай), шприцы стерильные однократного применения объемом 1, 2, 20 мл (SFM, Германия), ножницы хирургические изогнутые (Sammar, Пакистан), скальпели хирургические одноразовые (Aprexmed, Нидерланды), пинцеты анатомические изогнутые (Asa Dental, Италия).

*Реактивы:* масло иммерсионное для микроскопии (Агат, Россия), таблетки фосфатно-солевого буфера, рН 7,4 (ПанЭко, Россия), гепарин, 5000 ЕД (Ферейн, Россия), диахим-буфер Г рН 6,8-7,2 (Абрис, Россия), уксусная кислота, конц. 99.7% (Реахим, Россия), борная кислота, хч (ЛенРеактив, Россия), бура 10-водная (Реахим, Россия), метиленовый синий, чда (Вектон, Россия), натрий гидроокись, хч (ЛенРеактив, Россия), соляная кислота, хч (ЛенРеактив, Россия), натрия цитрат, чда (Реахим, Россия), сульфаниламид  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, Германия), N-(1-нафтил) этилендиамина дигидрохлорид (Sigma-Aldrich, Германия), о-фосфорная кислота, ч (Вектон, Россия)

## 2.4 Дизайн исследования и экспериментальные модели

Для решения поставленных цели и задач диссертационной работы было проведено комплексное четырехэтапное фармакологическое исследование потенциальной иммуномодулирующей активности ряда синтезированных *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами при искусственном воспалительном процессе различной локализации (системная воспалительная реакция, острое повреждение легких) и искусственной иммуносупрессии, как моделях, характеризующих избыточность и недостаточность реакций иммунной системы, что позволило в полной мере оценить иммуномодулирующий потенциал изучаемых соединений (Таблица 2 и 3).

### **Скрининг иммуномодулирующих свойств *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами в тестовой системе *in vitro***

Целью первого этапа исследования являлось проведение высокопроизводительного скрининга на первичных клеточных культурах для выявления наиболее активных соединений, подавляющих воспалительную активацию макрофагов в терапевтических концентрациях и без выраженной цитотоксичности.

Суть эксперимента состояла в последовательном внесении тестируемых соединений в свежесыведенные клеточные популяции ПМ и ПН с последующим добавлением бактериального ЛПС для индукции воспалительного ответа с целью получения представления о протективном эффекте о воздействия хиназолинов на иммунокомпетентные клетки. Для этого суточную культуру ПМ инкубировали с различными концентрациями тестовых субстанций в течение 30 мин, затем добавляли бактериальный ЛПС (10 мкг/мл) до конечной концентрации 1 мкг/мл и инкубировали 24 часа при 37 °С в CO<sub>2</sub> инкубаторе (Binder, Германия). Срок инкубации ПН составлял не более 20 мин, затем проводили исследования в

соответствии с выбранными методами. Перечень методов для проведения скрининга приведен ниже по тексту, в Разделах 2.5.1 – 2.5.6 и 2.5.8.

После выявления наиболее активных соединений по результатам скрининга, наше дальнейшее исследование было направлено на изучение иммуномодулирующих свойств в условиях экспериментальной патологии: циклофосфамидной иммуносупрессии и ЛПС-индуцированной патологии различной локализации.

### **Системное ЛПС-индуцированное воспаление<sup>2</sup>**

На втором этапе исследования изучали иммуномодулирующие свойства соединений на модели системного ЛПС-индуцированного воспаления. Для этого были использованы половозрелые самцы крыс линии Wistar. Все животные были распределены на 5 групп по 6 особей в каждой. Крысам первой группы (интактным) вводили 0,9 % раствор хлорида натрия (Эском, Россия) в объеме 1 мл/кг. Животные второй группы (контрольной) получали однократно внутрибрюшинно бактериальный ЛПС в дозе 5 мг/кг. Остальные животные через 30 мин после однократного введения ЛПС в эквивалентной дозе получали внутрибрюшинно либо одно из исследуемых соединений под шифрами ВМА-13-15 и ВМА-21-10 в суточной дозе 5 и 30 мг/кг соответственно, либо препарат сравнения дексаметазон в суточной дозе 4 мг/кг. Курс лечения составлял 3 суток. По завершении эксперимента животных наркотизировали, осуществляли эвтаназию посредством тотального обескровливания и отбирали образцы крови и селезенки для оценки интенсивности воспалительного процесса (Таблица 2).

---

<sup>2</sup> Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования д.б.н, профессору Перфиловой В.Н.

## **ЛПС-индуцированное острое повреждение легких**

Иммуномодулирующие свойства соединения ВМА 21-10 (в дозе 30 мг/кг) изучали на 3-м этапе исследования, используя модель ЛПС-индуцированного острого повреждения легких (Таблица 2), как локального варианта системного воспалительного ответа [226]. Мышей C57BL/6J случайным образом распределяли в группы (N = 6). За 4 часа до эксперимента животных лишали пищи. Вводили препарат сравнения дексаметазон внутривентрально в дозе 5 мг/кг. Животным контрольной группы внутривентрально вводили стерильный 0,9% раствор натрия хлорида (Эском, Россия) в равном объеме. Через 1 час анестезировали мышей изофлураном (Kagizoo, Испания) ингаляционно до снижения частоты и глубины дыхания. Поочередно подвешивали мышей за передние резцы на наклонном хирургическом столе, оттягивали язык узким изогнутым пинцетом и с помощью дозатора вводили в заднюю часть ротоглотки раствор ЛПС в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида из расчета 6 мг/кг и 1 мл/кг [85]. Держали язык вытянутым до полной аспирации инстиллята. Животным контрольной группы орофарингеально вводили стерильный 0,9% раствор натрия хлорида в равном объеме. После выхода из наркоза животное возвращалось в клетку. Через сутки после введения ЛПС животные были выведены из эксперимента для оценки развития воспалительного процесса и повреждения легких (Таблица 2).

## **Иммуносупрессия, вызванная введением циклофосфамида**

На 4-ом этапе исследования моделировали циклофосфамид-индуцированную иммуносупрессию. С этой целью 120 мышей самцов линии СВА, 3-4 мес. возраста, распределяли на 4 группы по 10 особей в каждой. В первую группу входили интактные животные, получавшие физиологический раствор. Остальным животным моделировали экспериментальную иммуносупрессию посредством однократной внутривентральной инъекции ЦФ в дозе 200 мг/кг. На фоне экспериментальной патологии мыши контрольной группы получали эквивалентный объем

физиологического раствора, а мышцы опытных групп – исследуемое соединение ВМА-13-15 в дозе 10 мг/кг или препарат сравнения (полиоксидоний) в дозе 200 мкг/кг. Длительность курса составляла 3 суток. По завершении эксперимента наркотизированных животных подвергли эвтаназии посредством цервикальной дислокации с последующим оценкой патологических изменений по результатам тестов (Таблица 2).

Таблица 2 - Структура экспериментального исследования

Этап	Название этапа	Тесты	Модель
<i>in vitro</i>			
I	Скрининг 25 производных хиназолина с целью выявления наиболее активных соединений	<p><b>Для перитонеальных макрофагов (ПМ):</b>  МТТ-тест, тест высвобождения ЛДГ;  Продукция ИЛ-6;  Продукция NO;  Оценка степени адгезии и распластанности;  Оценка фагоцитарной и киллинговой активности;  Определение лизосомальной активности.</p> <p><b>Для перитонеальных нейтрофилов (ПН):</b>  Определение продукции АФК.</p>	<p>Воспалительный ответ в клеточных культурах:  ЛПС-стимулированные ПМ  Зимозан-стимулированные ПН</p>
<i>in vivo</i>			
II	Изучение иммуномодулирующего действия производных хиназолина на модели ЛПС-индуцированного системного воспалительного ответа	<p>Общее число лейкоцитов и лейкоцитарная формула;  Фагоцитарная активность нейтрофилов;  Уровень ИЛ-6, ИЛ-1<math>\beta</math>, ФНО<math>\alpha</math> в сыворотке;  Экспрессия iNOS;  Уровень ЦИК;  Лимфоидный индекс селезенки;  Количество ЯСК в селезенке;  Активация NF<math>\kappa</math>B в спленоцитах</p>	<p>ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ</p>
III	Изучение иммуномодулирующего действия производных хиназолина на модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких	<p>Общее число лейкоцитов и лейкоцитарная формула;  Клеточный состав БАЛ;  Индекс проницаемости легких;  Гистологическое исследование;  ИГХ.</p>	<p>ЛПС-индуцированное острое повреждение легких</p>
IV	Изучение иммуномодулирующего действия на модели циклофосфамидной иммуносупрессии	<p>Общее число лейкоцитов и лейкоцитарная формула;  Фагоцитарная активность нейтрофилов;  Лимфоидный индекс тимуса и селезенки;  Количество ЯСК в тимусе и селезенке;  Состояние гуморального звена иммунитета в РПГА;  Состояние клеточного звена иммунитета в РГЗТ.</p>	<p>Циклофосфамид-индуцированная иммуносупрессия</p>

Таблица 3 - Экспериментальные модели, используемые в исследовании

Экспериментальная модель	Индуктор	Верификация формирования патологии
Воспалительный ответ в клеточных культурах	Липополисахарид <i>E. coli</i> O111:B4 (Sigma, Израиль) Зимозан А	Усиление продукции NO; Усиление продукция ИЛ-6; Усиление продукции АФК.
Системный воспалительный ответ	Липополисахарид <i>S. typhimurium</i> (Sigma, Израиль) (5 мг/кг внутрибрюшинно)	Активация антителообразования в РПГА; Увеличение индекса РГЗТ; Усиление фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови; Лейкоцитоз, обусловленный нейтрофилезом.
Острое повреждение легких	Липополисахарид <i>S. typhimurium</i> (Sigma, Израиль) (6 мг/кг орофарингеально)	Активация антителообразования в РПГА; Увеличение индекса РГЗТ; Усиление фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови; Лейкоцитоз, обусловленный нейтрофилезом.
Иммуносупрессия	Циклофосфамид (ЭНДОКСАН®) (Вахтер, Германия) (200 мг/кг внутрибрюшинно)	Подавление антителообразования в РПГА; Снижение индекса РГЗТ; Лейкопения, обусловленная нейтропенией; Подавление фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови.

## 2.5 Методы исследования

### 2.5.1 Получение и ведение первичных клеточных культур

#### *Получение первичной культуры перитонеальных макрофагов и нейтрофилов*

ПМ и ПН были использованы в скрининговых тестах по изучению влияния исследуемых субстанций на их функциональную и метаболическую активность.

Перитонеальные макрофаги (ПМ) и нейтрофилы (ПН) выделяли из перитонеального экссудата белых беспородных мышей за сутки до начала эксперимента по стандартной методике [192] в модификации [114]: для получения индуцированных (активированных) перитонеальных макрофагов создавали асептическое воспаление путем внутрибрюшинного введения 1 мл стерильного 3 % раствора пептона (ДиаМ, Россия).

Через 2 ч (для нейтрофилов) и 3 сут. (для макрофагов) после введения раствора пептона получали перитонеальный лаваж и отбирали в стерильные центрифужные пробирки. Полученную суспензию клеток двукратно отмывали раствором Хенкса путем центрифугирования при 250 g в течение 5 мин. Отмытые клетки тщательно ресуспендировали в полной питательной среде на основе среды DMEM с 2 mM глутамином (ПанЭко, Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Для приготовления клеточных суспензий с известной концентрацией клеток в пробирку, содержащую ~100 мкл осадка клеток (после удаления супернатанта) добавляли 900 мкл питательной среды DMEM и перемешивали.

В наших исследованиях были использованы клеточные суспензии с концентрацией  $2 \times 10^6$  клеток в 1 мл.

Клеточную суспензию ПМ высевали по 100 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного культурального планшета. Оставляли на 2 часа при 37 °C в

увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>, после чего лунки промывали средой DMEM и добавляли в каждую лунку по 200 мкл полной питательной среды на основе DMEM и оставляли на 24 ч до формирования монослоя.

Клеточную суспензию ПН высевали по 200 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного культурального планшета. Оставляли при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Разброс по концентрации клеток в сравниваемых группах не превышал ± 10%.

### ***Определение количества и жизнеспособности клеток в клеточной суспензии***

Жизнеспособность выделенных клеток определяли методом исключения красителя (трипанового синего). Для подсчета количества живых клеток в суспензии, ее аликвоту (20 мкл) смешивали с равным количеством 0,4 % раствора трипанового синего (ПанЭко, Россия). Суспензию оставляли на 30 с при комнатной температуре, после чего под микроскопом в счетной камере Горяева (МиниМед, Россия) учитывали результат.

Количество «квадратов», в которых считали клетки зависело от плотности клеточной суспензии и от той точности, которая необходима (в среднем подсчитывали не менее 30–40 клеток). Исходную концентрацию клеток рассчитывали по следующей формуле:

$$C = 5 \times 10^5 \times K, \text{ где}$$

C – концентрация клеток, мл;

K – количество клеток в одном большом квадрате

Для создания рабочей концентрации клеток объем среды DMEM, необходимый для разбавления клеточной суспензии, рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{A}{B} - 1, \text{ где}$$

V – объем среды DMEM, мл;

A – фактическое число жизнеспособных клеток в суспензии, кл/мл;

B – требуемое число клеток в суспензии, кл/мл.

Жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим во всех экспериментах составляла 95–98 %.

## **2.5.2 Оценка цитотоксических свойств исследуемых субстанций**

### ***ЛДГ-тест***

Для определения содержания ЛДГ в супернатантах использовался метод, основанный на спектрофотометрической детекции, убыли NADH (Sigma, США) в смеси, содержащей пируват (Sigma, США). ПМ инкубировали с исследуемыми или контрольными соединениями в течение 72 ч, после чего смешивали с 250 мкл 0,194 нМ/л раствора NADH, растворенного в 54 мМ фосфатном буферном растворе (рН=7,5). К смеси добавляли 25 мкл 6,48 мМ раствора пирувата. Оценку результатов теста проводили путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках, в которых определяли оптическую плотность при длине волны 340 нм в течении 20 мин. Интерпретацию полученных результатов проводили с помощью стандартной кривой (интактные клетки – 100 %, Тритон X-100 – 0 %). Величина оптической плотности пропорциональна количеству погибших клеток.

### ***MTT-тест***

По 100 мкл клеточной суспензии ПМ в полной питательной среде (ППС) DMEM высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (SPL, Корея). Через 2 ч после инкубации (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) не прикрепившиеся клетки удаляли 2-кратной отмывкой каждой лунки раствором Хенкса без ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (Biosera, Франция). После чего в каждую лунку добавляли по 200 мкл ППС. Через 24 ч после посева клеток приступали к тестированию. В контрольные лунки вносили среду DMEM, содержащую 0,5 % ДМСО (отрицательный контроль) или 0,01 % Triton X-100 (Sigma, США) (положительный контроль). Каждое из исследуемых соединений вносили в конечной концентрации 0,1, 1, 10 или 100 мкМ в трех повторах. После 72-часовой инкубации клеток с тестируемыми соединениями в каждую лунку вносили

20 мкл раствора МТТ (Sigma, США), инкубировали в течение 4 часов (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>). По окончании инкубации культуральную среду удаляли и добавляли 150 мкл ДМСО для лизиса клеток и растворения кристаллов формазана. Планшеты встряхивали при комнатной температуре в течение 10 мин до полного растворения формазана. Учет результатов проводили, измеряя оптическую плотность в опытных и контрольных лунках в микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 565 нм.

### 2.5.3 Определение продукции оксида азота перитонеальными макрофагами

В качестве клеток-мишеней использовали первичные мышинные ПМ. Экспрессию iNOS клетками индуцировали внесением стерильного раствора ЛПС *E. coli* O111:B4 (в среде DMEM) в объеме 20 мкл, конечная концентрация составляла 1 мкг/мл. Инкубировали 24 часа в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, влажность 95 %).

Накопление нитрита (NO<sub>2</sub>), стабильного конечного продукта окисления оксида азота (NO) определяли при помощи реактива Грисса в супернатантах первичной культуры ПМ. Метод Грисса основан на диазотировании нитрит-иона в кислой среде сульфаниламидом и взаимодействии образовавшегося диазосоединения с N-(1-нафтил) этилендиамином с образованием окрашенного производного. и является количественным индикатором образования NO [120]. Вкратце, 50 мкл супернатантов (отобранных спустя 24 часа после совместной инкубации ПМ с тестовыми и контрольными субстанциями) инкубировали с равным объемом реагента Грисса (1 % сульфаниламид в 5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> и 0,1% N-(1-нафтил)этилендиамин) при комнатной температуре в течение 10 минут и определяли оптическую плотность при 550 нм. Преобразование оптической плотности в мкМ NO<sub>2</sub> определяли по стандартной кривой с использованием

известной концентрации (0–100 мкМ) нитрита натрия (Sigma-Aldrich, Германия), разведенного в среде DMEM (ПанЭко, Россия).

#### 2.5.4 Оценка лизосомального аппарата перитонеальных макрофагов

Адгезировавшиеся ПМ прижизненно окрашивали флуорохромным красителем акридиновым оранжевым (ПанЭко, Россия) в концентрации 2 мкг/мл (100 мкл на 1 образец) [2]. После 10-минутной инкубации в защищенном от света месте, при комнатной температуре окрашенные клетки промывали раствором Хенкса и готовили препараты типа «раздавленная капля». Приготовленные препараты изучали методом люминесцентной микроскопии (люминесцентный блок светофильтров «В» DM505, объектив 40×, окуляр 10×). Результаты исследования учитывали, исходя из процентного содержания клеток с разной лизосомальной активностью. Оценку проводили визуальным полуколичественным методом с вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК) [148] по формуле:

$$\text{СЦК} = \frac{(0 \times A + 1 \times B + 2 \times C + 3 \times D)}{N}, \text{ где}$$

0, 1, 2, 3 – коэффициент интенсивности люминесценции;

A – количество клеток с отсутствием люминесценции;

B – количество клеток со слабой люминесценцией;

C – количество клеток с умеренной люминесценцией;

D – количество клеток с резко выраженной люминесценцией;

N – общее число подсчитанных клеток.

### 2.5.5 Определение фагоцитарной и киллинговой активности перитонеальных макрофагов

Для оценки фагоцитарной активности первичных ПМ подсчитывали фагоцитарный показатель, фагоцитарный индекс методом световой микроскопии и киллинговую активность, методом люминесцентной микроскопии, соответственно.

Клеточную суспензию ПМ культивировали в 24-луночных планшетах (SPL, Корея). На круглые покровные стекла (предварительно помещенные в лунки планшета) наносили клеточную суспензию по 150 мкл/стекло. Для адгезии ПМ на поверхность стекол, клетки инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % влажности. По истечении времени инкубации, неадгезировавшие клетки удаляли путем 2-кратного отмывания раствором Хенкса (ПанЭко, Россия). После этого добавляли ППС на основе DMEM (ПанЭко, Россия) до конечного объема 500 мкл (поверхность стекол должна быть покрыта средой), и культивировали в прежних условиях для формирования клеточного монослоя в течение 24 часов перед разделением на группы: интактные клетки; контрольная группа; группы исследуемых соединений и препарат сравнения. Затем вносили изучаемые соединения в соответствии с группами, через 30 мин. в каждую группу, кроме отрицательного контроля вносили 50 мкл 1 % суспензии дрожжей (САФ-НЕВА, Россия). Через 24 ч инкубации с исследуемыми веществами среду удаляли. Клетки фиксировали красителем Май-Грюнвальда (МиниМед, Россия), содержащим метанол и окрашивали азур-эозином в модификации Романовского (МиниМед, Россия) в течение 45 мин при комнатной температуре, промывали, высушивали на воздухе и анализировали с использованием микроскопа Микмед-6 (ЛОМО, Россия), оснащенный цифровой камерой.

Влияние изучаемых веществ на «киллинг» микроорганизмов оценивали по способности ПМ, культивируемых в присутствии изучаемых соединений захватывать живые пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (САФ-НЕВА,

Россия) при совместном инкубировании в течение 60 мин при 37 °С в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (Binder, Германия) [6]. По завершении времени инкубации покровные стекла с адгезированными макрофагами промывали раствором Хенкса. Затем наносили на поверхность стекол 50 мкл раствора акридинового оранжевого (ПанЭко, Россия) в разведении 1:30000 (на физиологическом растворе с рН 7,2–7,4) и готовили препарат «раздавленная капля». Оценка фагоцитарной активности макрофагов проводили визуальным способом при люминесцентной микроскопии (люминесцентный блок светофильтров «В» DM505, объектив 40×, окуляр 10×). Подсчитывали в 100 макрофагах количество поглощенных дрожжей с оранжево-красной люминесценцией относительно таких же с зеленой люминесценцией. Учет результатов осуществляли путем подсчета количества ПМ, фагоцитировавших дрожжи, количества фагоцитированных дрожжей и количества погибших микроорганизмов из них. При этом живые микроорганизмы имели зеленое свечение, а мертвые – красное. Результаты исследования выражали в процентах (%).

### **2.5.6 Определение генерации активных форм кислорода перитонеальными нейтрофилами <sup>3</sup>**

Измерение люминол-зависимой хемилюминесценции проводили в белых 96-луночных полипропиленовых планшетах (Nunc, Дания) по модификации описанного метода [149]. В каждую лунку вносили по 100 мкл суспензии нейтрофилов ( $1,0 \times 10^6$  кл/лунку), 100 мкл раствора исследуемых соединений в среде RPMI – 1640 (ПанЭко, Россия) и 50 мкл 0,56 мМ раствора люминола (AppliChem, Германия) в деионизированной воде. Для измерения индуцированной и спонтанной хемилюминесценции интактных клеток вместо растворов соединений вносили 100 и 200 мкл среды, соответственно. Инкубировали в термошейкере при

---

<sup>3</sup> Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования к.х.н., с.н.с. Бабкову Д.А.

37 °С и 300 об/мин. в течение 15 мин. Затем в опытные пробы для измерения индуцированной хемилюминесценции вносили 100 мкл раствора опсонизированного зимозана (Sigma, США) и регистрировали люминесценцию (время интеграции 1000 мс) каждые 2 мин в течение 1 ч на микропланшетном ридере Infinite M200 Pro (Tecan, Австрия) при постоянной температуре 37 °С.

### **2.5.7 Определение количества лейкоцитов и их отдельных субпопуляции в крови и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ)**

#### ***Определение количества лейкоцитов в крови***

Принцип метода основан на подсчете лейкоцитов в 1 мкл крови при постоянном ее разведении в определенном объеме счетной камеры.

В пробирку с 0,38 мл 3 % раствора уксусной кислоты, подкрашенного метиленовым синим, вносили 0,02 мл стабилизированной гепарином крови и перемешивали. Каплей содержимого пробирки заполняли счетную камеру Горяева (МиниМед, Россия) и оставляли в горизонтальном положении на 1 мин для оседания лейкоцитов. Затем при малом увеличении (окуляр 15×, объектив 10×) подсчитывали лейкоциты в 100 больших квадратах сетки камеры.

Расчет лейкоцитов проводили по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 250 \cdot 20}{100} = a \cdot 50, \text{ где}$$

X – число лейкоцитов в 1 мкл крови;

a – число лейкоцитов в 100 больших квадратах;

20 – разведение крови;

100 – число больших квадратов;

250 – коэффициент пересчета на 1 мкл, т.к. объем одного большого квадрата равен 1/250 мкл (сторона квадрата – 1/5 мм, высота – 1/10 мм).

Клетки считали в 2 сетках камеры Горяева. За конечный результат принимали среднее значение.

Для расчета количества лейкоцитов в 1 мкл крови их число в 100 больших квадратах умножали на 50, а в 1 л – полученную величину умножали еще на  $10^6$ .

### ***Определение лейкоцитарной формулы***

Фиксацию мазков крови проводили фиксатором-красителем по Маю-Грюнвальду (3 мин), затем промывали забуференной водой (рН 6,8–7,2), высушивали на воздухе и окрашивали красителем по Романовскому-Гимзе. Зафиксированные мазки крови помещали в рабочий раствор красителя, по истечении 40 мин. (время окраски предварительно установлено опытным путем), препараты промывали проточной водой 1–2 с, высушивали на воздухе и микроскопировали (иммерсионная система, объектив 100×, окуляр 15×). На каждом стекле суммарно подсчитывали 100 клеток, учитывая отдельные субпопуляции лейкоцитов. Исходя из полученных результатов, вычисляли процентное содержание нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и других клеток белой крови.

### ***Определение клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа***

Через 24 ч после введения ЛПС мышей наркотизировали введением 500 мг/кг хлоралгидрата (PanReas, Германия) внутривентриально. После удаления кожно-мышечного покрова с грудной клетки забирали кровь интракардиальной пункцией в пробирки с гепарином. Выполняли торакотомию, накладывали лигатуру на левый бронх и канюлировали трахею зондом 20 G. Дважды промывали правое легкое 0,7 мл теплого стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. После объединения аликвот, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) центрифугировали при 800 g и 4 °C в течение 10 мин. Супернатант отбирали для дальнейшего исследования и хранили при -80 °C. Клеточный осадок ресуспендировали в 50 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) для определения общего количества клеточных элементов и их субпопуляций.

После центрифугирования бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) клеточный осадок ресуспендировали в 50 мкл раствора Хенкса и изготавливали мазки. Все последующие манипуляции: приготовление, фиксацию, окраску и микроскопию мазков проводили по аналогии с гематологическими мазками. В каждом мазке

подсчитывали 100 клеток, с учетом отдельных субпопуляций лейкоцитов. Исходя из полученных результатов, вычисляли процентное содержание нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов.

## **2.5.8 Определение концентрации провоспалительных цитокинов**

### ***Определение концентрации интерлейкина-6 в культуральной среде***

Продукцию ИЛ-6 оценивали в среде культивирования ПМ, стимулированных ЛПС, после совместного экспонирования клеток с исследуемыми соединениями (в конечной концентрации 100 мкМ) в течение 24 ч, затем отбирали супернатанты клеточных культур, центрифугировали в течение 10 мин при 1000g. Концентрацию ИЛ-6 определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя коммерчески доступный набор производства Cloud-Clone Corp., США в соответствии с прилагаемой инструкцией фирмы-производителя.

ОП окрашенных растворов в лунках измеряли при помощи анализатора микропланшетного автоматического Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм.

### ***Определение концентрации провоспалительных цитокинов в сыворотке крови***

Образцы крови экспериментальных животных оставляли при комнатной температуре на 60 мин. до завершения процесса свертывания крови и образования сгустка, затем центрифугировали при 1000 g и 4 °С в течение 20 мин, отбирали сыворотку и хранили при -20 °С до проведения исследования.

Уровень секретируемых провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$  измеряли методом ИФА, используя коммерчески доступные наборы (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с инструкциями производителя.

ОП окрашенных растворов в лунках измеряли при помощи анализатора микропланшетного автоматического SPECTROstar Nano (BMGLabtech, Германия) при длине волны 450 нм.

## ***Определение концентрации провоспалительных цитокинов в бронхоальвеолярном лаваже***

Получение БАЛ осуществляли методом, описанным в Разделе 2.5.7. После центрифугирования супернатант отбирали для исследования и хранили при -20 °С до проведения анализа. Концентрацию провоспалительных цитокинов, ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ , измеряли в БАЛ методом ИФА, используя коммерчески доступные наборы (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с инструкциями производителя.

ОП окрашенных растворов в лунках измеряли при помощи анализатора микропланшетного автоматического Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм.

### **2.5.9 Определение индекса проницаемости легких (ИПЛ)**

Индекс проницаемости легких определяли как отношение концентраций белка в БАЛ к белку плазмы. Получение БАЛ осуществляли методом, описанным в Разделе 2.5.7. Концентрацию общего белка в БАЛ определяли спектрофотометрически по методу с пирогаллоловым красным. Для получения плазмы в качестве антикоагулянта использовали гепарин 25 (ЕД/мл). Белок в плазме крови определяли биуретовым методом. Измерения концентрации белка в БАЛ и плазме проводили с использованием коммерческих наборов (Витал, Россия), стандартом служил бычий сывороточный альбумин (ПанЭко, Россия).

### **2.5.10 Определение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови**

Для определения циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови экспериментальных животных использовали микропланшетный вариант метода иммунного турбодиметрического анализа [195].

Принцип метода основан на преципитации иммунных комплексов, образовавшихся при реакции антигена с соответствующими антителами (циркулирующие иммунные комплексы – ЦИК), полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000) [126] в лунках 96-луночного планшета. Единицы ЦИК определяют сравнением оптических плотностей (ОП) сыворотки в среде с и без ПЭГ.

Перед проведением исследования образцы крови экспериментальных животных, забранных без использования антикоагулянтов, инкубировали в термостате в течение 2 часов для осаждения грубодисперсных белков, не имеющих отношения к ЦИК.

В нечетные лунки 96-луночного плоскодонного планшета (Apxlab, Китай) вносили по 200 мкл 0,1 М боратного буфера, рН 8,4. Соответственно, в четные лунки этого планшета по 200 мкл 4,5% раствора ПЭГ 6000 (PanReac, Германия). Затем добавляли исследуемые сыворотки по 20 мкл в 4 повторах.

После внесения опытных образцов, заклеивали планшет защитной пленкой и инкубировали в течение 120 мин при температуре 18-25 °С. После чего измеряли величину ОП содержимого лунок планшета на микропланшетном спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMGLabtech, Германия). при длине волны 450 нм. Бланком служили лунки с боратным буфером. Расчет единиц ЦИК проводили по формуле:

$$X = (A - B) \times 1000, \text{ где}$$

X – ЦИК, ед.;

A – ОП образца с боратным буфером;

B – ОП образца с 4,5% ПЭГ;

1000 – коэффициент пересчета

Диапазоном нормальных величин, при подсчете результатов, считали значения от 0 до 120 ед.

## **2.5.11 Определение индекса лимфоидных органов и содержания в них лимфоцитов**

### ***Определение лимфоидного индекса тимуса и селезенки***

После последнего введения исследуемых субстанций, животных взвешивали и эвтаназировали. После этого незамедлительно удаляли хирургическим путем тимус и селезенку, освобождали их от соединительной и жировой тканей на поверхности и взвешивали. Лимфоидный индекс (ЛИ) тимуса и селезенки рассчитывали гравиметрическим методом по следующей формуле [69, 241]:

$$\text{ЛИ} = \frac{\text{масса органа (мг)}}{\text{масса тела животного (г)}}$$

### ***Оценка содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета***

Извлеченные тимус и селезенку освобождали от жировой и соединительной тканей, взвешивали на электронных весах и переносили в стеклянный гомогенизатор Поттера (Kleinfeld, Германия). Добавляли раствор Хенкса (рН 7,4) из расчета для селезенки 50 мг/мл, для тимуса – 10 мг/мл. Извлеченные органы истирали до получения однородной клеточной взвеси. Полученную суспензию фильтровали через 2 слоя капрона (200 mesh). Фильтрат отмывали путем центрифугирования при 200g в течение 5 мин с последующим ресуспендированием осадка в растворе Хенкса до исходного объема. Процедуру повторяли дважды.

В пробирку с 180 мкл 3% раствора уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым синим, вносили 20 мкл клеточной суспензии и перемешивали. Каплю содержимого пробирки помещали в счетную камеру Горяева. Заполненную камеру оставляли в горизонтальном положении на 1 мин для оседания клеток. Затем помещали ее на предметный столик микроскопа и при малом увеличении (окуляр 15×, объектив 10×) подсчитывали ЯСК в 100 больших квадратах. Расчет ЯСК в 1 мкл суспензии производили по формуле:

$$X = \frac{a \times 250 \times 10}{100} = a \times 25, \text{ где}$$

X – число ЯСК в 1 мкл суспензии;

a – число ЯСК в 100 больших квадратах;

10 – разведение суспензии;

100 – число больших квадратов;

250 – коэффициент пересчета на 1 мкл, т.к. объем одного большого квадрата равен 1/250 мкл (сторона квадрата – 1/5 мм, высота – 1/10 мм).

Для определения общего числа ядросодержащих клеток в органе, количество клеток в 1 мкл умножали на количество среды, в которой были суспензированы селезенка или тимус.

### **2.5.12 Определение экспрессии ядерного фактора NF-κB спленоцитами**

Суспензию спленоцитов переносили в центрифужные пробирки и трижды отмывали охлажденным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) путем центрифугирования при 1000 g в течение 5 мин. Отмытые клетки тщательно ресуспендировали в охлажденном ФСБ (pH 7,2–7,4), доведя концентрацию до 10<sup>7</sup> клеток/мл. Затем образцы замораживали при -20°C. В течение двух циклов замораживания-оттаивания клетки параллельно обрабатывали в течение 5 мин ультразвуком (частота 37 кГц). После каждой обработки ультразвуком, пробы перемешивали с использованием встряхивателя типа «Vortex» (избегая образования пены). По завершении процедуры лизат центрифугировали в режиме 1500 g 10 мин при температуре 2–8 °C. После чего собирали супернатант.

Количественное определение ядерного фактора NF-κB проводили «сэндвич-методом» ИФА в клеточных лизатах спленоцитов, с использованием коммерчески доступного набора производства Cloud-Clone Corp., США в соответствии с прилагаемой инструкцией фирмы-производителя.

### **2.5.13 Определение состояние иммунного статуса животных**

#### ***Определение клеточного иммунного ответа к эритроцитам барана (ЭБ) в реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ)***

Влияние исследуемых веществ на состояние клеточного звена иммунной системы изучали по первичному иммунному ответу на введение корпускулярного антигена. Исследование проводили на методом постановки реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) согласно стандартной методике, используемой для изучения иммуотропной активности лекарственных средств [18]. В качестве антигена нами были использованы эритроциты барана (ЭБ).

Принцип метода заключается в том, что сенсibilизация ЭБ вызывает образование антигенспецифических Т-лимфоцитов. При введении разрешающей дозы антигена подкожно, на месте инъекции развивается воспалительная реакция, интенсивность которой измеряется гравиметрическим методом.

Исследуемые субстанции вводили животным внутривбрюшинно, ежедневно, где стартовой точкой являлось подкожное введение (в межлопаточную область) сенсibilизирующей дозы антигена – ЭБ ( $1 \times 10^7$  клеток в объеме 100 мкл), на фоне циклофосфамидной иммуносупрессии (индуцированной за 1 час до введения ЭБ), конечной – введение разрешающей дозы антигена. Разрешающую дозу ЭБ вводили на 5-е сутки после сенсibilизации под апоневротическую пластинку правой задней конечности — «исследуемая лапа» (20 мкл суспензии ЭБ, содержащей  $1 \times 10^8$  клеток). Под апоневротическую пластинку левой задней конечности («контрольная лапа») вводили 20 мкл стерильного физиологического раствора.

Интенсивность реакции оценивали через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена. Животных эвтаназировали методом цервикальной дислокации, ампутировали задние конечности по уровню тибиотарзального сустава. Ампутированные конечности взвешивали на электронных весах и рассчитывали

индекс воспалительной реакции ГЗТ индивидуально для каждого животного, по формуле:

$$I_p = \frac{M_{оп} - M_{к}}{M_{к}} \times 100\% , \text{ где}$$

$I_p$  – индекс реакции ГЗТ,

$M_{оп}$  – масса опытной лапы (задняя правая),

$M_{к}$  – масса контрольной лапы (задняя левая).

### ***Определение гуморального иммунного ответа на введение эритроцитов барана (ЭБ) в реакции прямой гемагглютинации (РПГА)***

Гуморальный иммунитет оценивали, определяя титры специфических антител к ЭБ в сыворотке крови животных методом постановки реакции прямой гемагглютинации (РПГА). Реакция основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, агглютинировать ЭБ, используемые в качестве антигена.

Изучаемые соединения вводили животным внутрибрюшинно один раз в сутки в течение 3 дней, начиная с момента введения ЭБ (через 1 час после введения циклофосфида). Иммунизацию мышей проводили однократным внутрибрюшинным введением ЭБ, в концентрации  $5 \times 10^8$  клеток на 100 мкл физиологического раствора. Животным контрольной группы однократно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор.

Одновременное введение изучаемых соединений с антигеном использовано для оценки действия соединений на индуктивную фазу гуморального иммунного ответа [18]. На 7-е сутки после иммунизации у животных под хлоралгидратным наркозом отбирали образцы крови для получения сыворотки. Полученную сыворотку, для инактивации комплемента прогревали при  $56^\circ\text{C}$  в течение 30 мин.

Затем определяли титр антиэритроцитарных антител (резистентных к 2-меркаптоэтанолу), в микропланшетном формате [104]. Для этого в 96-луночные

круглодонные планшеты для иммунологических реакций предварительно вносили по 50 мкл физиологического раствора. Вносили 50 мкл термоинактивированной сыворотки крови, после чего готовили серии двукратных разведений исследуемых сывороток в объеме 50 мкл (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048). Для определения титра антител, резистентных к 2-меркаптоэтанолу, в каждую лунку с сывороткой добавляли 50 мкл 0,1 М раствора 2-меркаптоэтанола. Затем в каждую лунку планшета вносили по 25 мкл 1% суспензии ЭБ, встряхивали и инкубировали содержимое при 37 °С в течение 2 ч. При положительном результате эритроциты оседали на дне лунки планшета в виде зонтика, при отрицательном – в виде пуговки. Расчет производили по формуле:

$$\text{Титр антител} = \log_2 N, \text{ где}$$

$N$  – номер последнего разведения сыворотки крови, при котором происходит гемагглютинация эритроцитов.

#### **2.5.14 Изучение функциональной активности нейтрофилов крови**

##### ***Оценка продукции активных форм кислорода нейтрофилами в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте***

Данный тест представляет собой простой метод оценки способности активированных нейтрофилов генерировать высокореактивные метаболиты кислорода. Мы использовали метод полуколичественной оценки НСТ–теста, основанного на методе Park et al. [191] в модификации [107, 77].

Проведение НСТ-теста в двух вариантах, спонтанном и индуцированном, дает возможность судить, с одной стороны, о степени активации кислородзависимых механизмов фагоцитоза у не стимулированных НГ (под влиянием внутренних причин), а с другой – дают представление о способности нейтрофилов к активации *in vitro* под воздействием внешних стимулов (, бактерий, зимозана, ЛПС и др.), что позволяет оценивать их функциональный резерв (завершенность фагоцитоза).

Принцип теста заключается в поглощении и восстановлении нейтрофилами из раствора бесцветного нитросинего тетразолия (НСТ) в темно-синий диформаза́н под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФН-оксидазной реакции. При этом размеры диформаза́новых отложений являются показателем суммарной активности НАДФН-оксидазы, инициирующей процесс стимуляции нейтрофилов.

В две соседние лунки 96-луночного круглодонного планшета (SPL, Корея) вносили по 50 мкл крови с добавлением гепарина (25 ЕД/мл) в качестве антикоагулянта. Затем в одну из них добавляли 25 мкл физиологического раствора, в другую – 25 мкл суспензии зимозана А (Sigma, США) в концентрации 3 мг/мл, предварительно опсонизированного сывороткой интактных мышей. Через минуту в лунки вносили по 25 мкл 0,15 % раствора НСТ (Sigma, США). Планшет заклеивали защитной пленкой, осторожно перемешивали и инкубировали в микропланшетном термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин, встряхивая каждые 10 мин. По окончании инкубации содержимое лунок аккуратно перемешивали. Затем на чистых и обезжиренных предметных стеклах (МиниМед, Россия) готовили 2 мазка – по одному мазку из каждой лунки. После высушивания на воздухе, фиксировали метанолом (Вектон, Россия) в течение 5 мин и докрашивали 0,5 % водным раствором нейтрального красного (Вектон, Россия) в течение 3 мин, затем промывали в проточной воде, высушивали и микроскопировали с иммерсионной системой (объектив 100×).

В каждом мазке подсчитывали 100 нейтрофилов, среди которых определяли процент клеток, содержащих включения диформаза́на (с различной интенсивностью локализации кристаллов диформаза́на в цитоплазме клеток) по методике Kaplow [141]. Затем рассчитывали индекс активации нейтрофилов (ИАН) в условных единицах, по формуле:

$$\text{ИАН} = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{100}, \text{ где}$$

А – количество клеток, не содержащих диформазановых отложений или содержащих их в виде пылевидных немногочисленных включений;

В, С, D – количество клеток, содержащих гранулы диформазана в тех или иных количествах, где цифры указывают на интенсивность окрашивания цитоплазмы:

0 – отсутствие окрашивания и отложений гранул диформазана;

1 – цитоплазма содержит одиночные гранулы, не более 1/3 площади ядра;

2 – сине-фиолетовые гранулы занимают от 1/3 до всей площади ядра;

3 – диформазановые отложения по площади превосходят площадь ядра.

### ***Определение параметров фагоцитарной активности нейтрофилов крови***

Для оценки влияния хиназолиновых производных на показатели неспецифической резистентности организма изучали параметры фагоцитарной активности нейтрофилов [6, 104].

Принцип метода заключается в определении методом световой микроскопии поглотительной способности нейтрофилов крови по отношению к тест-объектам, выраженной количественно, после их совместной инкубации.

В качестве объекта фагоцитоза использовали пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Для этого использовали заранее приготовленные аликвоты дрожжевой суспензии [6], хранившиеся при -20 °С. Непосредственно перед постановкой реакции размораживали 1 мл суспензии дрожжей и 3 раза отмывали и ресуспендировали физиологическим раствором методом центрифугирования при 1000 об/мин по 5 мин. После финального ресуспендирования количество дрожжевых клеток подсчитывали в камере Горяева и доводили физиологическим раствором до рабочей концентрации  $10^8$  клеток/мл.

Данное исследование проводилось параллельно с постановкой спонтанного и индуцированного НСТ-теста. Для определения поглотительной активности нейтрофилов в лунку 96-луночного круглодонного планшета для иммунологических

исследований вносили 50 мкл гепаринизированной (25 ед/мл) крови крыс и 50 мкл рабочей суспензии дрожжей. Планшет аккуратно перемешивали и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. По окончании инкубации на предметных стеклах готовили по одному мазку из каждой лунки. Высушенные на воздухе мазки фиксировали фиксатором-красителем по Май-Грюнвальду в течение 3 мин, промывали забуференной водой (рН 6,8–7,2), высушивали на воздухе, затем докрасивали рабочим раствором азур-эозина по Романовскому в течение 30 мин. Окрашенные мазки промывали забуференной водой (рН 6,8–7,2), высушивали на воздухе и микроскопировали с иммерсионной системой (объектив 100×).

Показатели фагоцитоза оценивали в мазках, приготовленных из смеси гепаринизированной крови с суспензией пекарских дрожжей. Всего оценивали 100 клеток в каждом препарате, учитывая как интактные (не фагоцитирующие), так и фагоцитирующие (поглотившие 1 и более дрожжевую клетку) нейтрофилы. При подсчете поглощенных дрожжей учитывали как непереваренные (интенсивно окрашенные в фиолетовый цвет грибы с обычными морфологическими признаками), так и убитые (окрашенные в различные оттенки розового цвета, уменьшенные в размерах). Результаты выражали следующими показателями:

Фагоцитарная активность (ФА, индекс Гамбургера) – процент нейтрофилов, имеющих поглощенные дрожжевые клетки, от общего числа подсчитанных фагоцитов. Рассчитывали по формуле:

$$ФА = \frac{В \times 100}{А}, \text{ где}$$

А – общее количество подсчитанных нейтрофилов;

В – количество нейтрофилов с поглощенными дрожжевыми клетками;

100 – коэффициент пересчета в проценты, %.

Фагоцитарное число (индекс Райта) — среднее число фагоцитированных дрожжей одним нейтрофилом. Рассчитывали по формуле:

$$\text{ФЧ} = \frac{A}{100}, \text{ где}$$

A – общее суммарное количество дрожжевых клеток, фагоцитированных нейтрофилами;

100 – количество подсчитанных нейтрофилов.

### **2.5.15 Морфологические и иммуногистохимические методы исследования легочной ткани <sup>4</sup>**

Для морфологического исследования образцы легких фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина (Элемент, Россия). Время пребывания в фиксаторе составляло 1–3 суток при 4 °С. Для обезвоживания образцов ткани использовали батарею спиртов восходящей концентрации, просветляли в хлороформе с использованием гистопроцессора Cytadel 2000 (Shendon, Великобритания) и заключали в парафиновую среду Histomix (Биовитрум, Россия). Парафиновые блоки резали на ротационном микротоме (MICROM HM340E, Германия), получали срезы толщиной 4–5 мкм и монтировали их на предметные стекла (Menzel, Германия). Для обзорного исследования срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Биовитрум, Россия) по общепринятой методике [65].

Препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioScore.A1 (ZEISS, Германия), оборудованного цифровой камерой AxioCam MRc5. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (ZEISS, Германия).

При выполнении иммуногистохимических исследований (ИГХ) парафиновые срезы образцов толщиной 5 мкм монтировали на предметные стекла, обработанные поли-L-лизинном (Menzel, Германия). После депарафинизации и регидратации срезы

---

<sup>4</sup> Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования д.м.н, профессору Смирнову А. В., н.с. Великородной Ю. И.

инкубировали 20 мин в 3% растворе перекиси водорода (Экотекс, Россия). Постановку ИГХ реакций проводили с помощью пероксидаза-полимерной системы визуализации MAX PRO (MULTI) согласно протоколу, изложенному в инструкции производителя (Histofine). Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100 °С в 0,01 М цитратном буфере с рН = 6,0 в течение 20 минут. Срезы легочной ткани инкубировали с первичными антителами к CD68 (клон 3F-103, Santa Cruse Biotechnology, США) при комнатной температуре в течение 1 ч. Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера (БиоВитрум, Россия). Негативным контролем служили препараты без инкубации с первичными антителами при полном соблюдении остальных этапов протокола.

### ***Оценка степени выраженности воспаления***

Оценку степени выраженности воспалительного процесса в легочной ткани производили полуколичественным способом [227] на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Препараты исследовали под световым микроскопом (ZEISS, Германия) двойным слепым методом. Степень воспаления оценивалась по всему образцу легкого следующим образом: 0 – присутствие единичных воспалительных клеток; 1 – слабое воспаление, воспалительные клетки инфильтрируют не более 10 % легочной ткани, включая межальвеолярные перегородки; 2 – умеренное воспаление, воспалительные клетки инфильтрируют не более 50% структур легкого, но межуточная ткань идентифицируется; 3 – сильное воспаление, воспалительные клетки плотно инфильтрируют более 50 % легочной ткани и воздухоносных путей. При этом локализованные вокруг крупных и средних бронхов лимфоидные фолликулы не учитывались в итоговой оценке.

## **2.6 Статистическая обработка результатов исследования**

Для обработки экспериментальных данных фармакологических исследований использовали статистические методы согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [18]. Результаты исследований выражали в значениях Международной системы единиц (СИ) и вносили в базы данных, для создания и частичной обработки которых использовали пакет программ Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного пакета GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). С целью выбора метода анализа взаимосвязи показателей исходные количественные характеристики были проверены на соответствие нормальному распределению с использованием теста Колмогорова-Смирнова [26]. Оценку достоверности различий между средними значениями в контрольных и опытных группах проводили, используя t-критерий Стьюдента [5] с поправкой Бонферрони, критерий Манна-Уитни и дисперсионный анализ (ANOVA) для параметрических данных и U-критерий Манна-Уитни для непараметрических [26]. Гистологическую оценку срезов легких проводили морфометрическим методом с использованием программы ZEN Pro 2012 (Carl Zeiss, Германия).

Статистически значимыми считали различия при выбранном уровне значимости  $p < 0,05$  [16].

## ГЛАВА 3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, СРЕДИ N-ЗАМЕЩЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА С АЗОТСОДЕРЖАЩИМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

### 3.1 Поиск новых иммунотропных средств в тестовой системе *in vitro*

Нами произведен скрининг иммунотропной активности среди N-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами с первоначальным использованием двух базовых тестов на перитонеальных макрофагах и нейтрофилах.

Скрининг как метод изучения исследуемых соединений в условиях *in vitro* является центральной функцией процесса поиска и открытия лекарственного препарата [167]. Поскольку отдельные фармакологические мишени зачастую связаны с этиологией или патогенезом заболевания, подход, основанный на мишень-ориентированном поиске, реализовывался посредством рационального дизайна, целенаправленного скрининга [230]. Преимуществом скринингового подхода является то, что данные, полученные в экспериментах *in vitro*, позволяют получить первоначальное представление о биологических свойствах исследуемых соединений, предопределяющих как их специфическую активность, так и потенциальную токсичность *in vivo*. Это сделало возможным проводить скрининговые исследования, то есть обеспечить строго стандартизированный и относительно недорогой способ оценки фармакологической активности большого количества образцов веществ за короткое время, позволяя выбрать соответствующие мишени среди клеток и вероятные дозы веществ для последующего исследования на экспериментальных моделях *in vivo*. Поэтому применение тестов *in vitro* является необходимым и важным звеном в цепи фармакологических исследований веществ.

На первом этапе скрининга иммуотропной активности *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами в условиях *in vitro*, нами было использовано два подхода. Первый заключался в изучении влияния соединений на ЛПС-индуцированную продукцию NO ПМ в культуре, параллельно с определением их жизнеспособности в МТТ-тесте. Вторым заключался в изучении зимозан-индуцированной продукции АФК перитонеальными нейтрофилами под влиянием исследуемых веществ.

На втором этапе скрининга изучали влияние соединений с наибольшей иммуотропной активностью (по результатам первого этапа) на секрецию провоспалительного цитокина ИЛ-6 и показатели фагоцитарной активности ПМ. Дополнительно исследовали их влияние на жизнеспособность клеток в тесте высвобождения ЛДГ.

Эффективность соединений с наибольшей иммуотропной активностью, выявленных в ходе двухэтапного скрининга, в зависимости от проявленных свойств, оценивалась на экспериментальных моделях патологии иммунной системы (иммуносупрессии и системного воспалительного ответа).

### **3.2 Оценка влияния исследуемых производных хиназолина на ЛПС-индуцированную продукцию NO макрофагами перитонеального экссудата**

Производство оксида азота оценивали по накоплению нитрит-аниона, (стабильного метаболита оксида азота) в культуральной среде, который вырабатывается клетками в ответ на введение ЛПС. В данной модели нитрит-анион является индикатором экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS).

В ходе проведенной работы выполнен первичный скрининг 25 *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами в концентрации 100 мкМ. Параллельно проводили оценку цитотоксичности соединений в МТТ-тесте, в той же концентрации.

Среди соединений под лабораторным шифром «ВМА» выявлен ряд соединений, статистически значимо подавляющих продукцию оксида азота в концентрации 100 мкМ (Таблица 4). По результатам исследования, также подтверждено, что препарат сравнения дексаметазон проявлял выраженную ингибирующую активность, полностью подавляя ЛПС-индуцированную продукцию NO в культуре клеток.

Таблица 4 - Влияние соединений на синтез NO и жизнеспособность ЛПС-стимулированных макрофагов мышей C57bl/6j ( $M \pm SD$ , n = 3)

№	Соединение	Синтез NO от ЛПС-контроля, %	Жизнеспособность клеток от ЛПС-контроля, МТТ-тест, %
1.	ВМА 13-10	100,78±1,16	104,42±1,65
2.	ВМА 13-15	59,92±2,78*	105,73±3,38
3.	ВМА 13-16	101,67±0,19	104,33±1,05
4.	ВМА 13-17	106,61±12,99	105,89±2,38
5.	ВМА 21-02	95,37±11,45	97,31±8,26
6.	ВМА 21-03	85,34±34,88	79,28±9,81
7.	ВМА 21-04	89,91±10,57	100,7±3,88
8.	ВМА 21-05	117,1±13,96	108,2±1,62
9.	ВМА 21-06	75,11±13,68	90,48±7,57
10.	ВМА 21-07	88,97±8,12	108,3±8,82
11.	ВМА 21-08	83,74±5,95	86,72±2,00
12.	ВМА 21-09	93,14±12,84	102,1±5,87
13.	ВМА 21-10	-1,32±2,06*	106,6±5,19
14.	ВМА 21-11	7,25±6,20*	98,95±10,21
15.	ВМА 21-12	0,98±3,91*	105,8±4,43
16.	ВМА 21-13	79,18±14,94	60,66±0,84

17.	ВМА 21-14	25,64±15,04*	51,64±15,59
18.	ВМА 21-15	99,87±8,72	91,48±5,25
19.	ВМА 21-16	12,94±6,97*	91,47±0,65
20.	ВМА 21-18	88,52±12,75	82,81±5,80
21.	ВМА 21-20	97,73±11,27	93,13±4,21
22.	ВМА 21-21	94,79±7,19	87,56±17,22
23.	ВМА 21-22	59,23±16,12*	96,32±6,21
24.	ВМА 21-23	75,43±8,72*	94,53±3,53
25.	ВМА 21-24	72,88±5,44*	91,91±1,96
	Дексаметазон	2,56±9,17*	92,08±5,89

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с контрольным показателем ( $p < 0,05$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение» по результатам не менее трех независимых экспериментов; статистическая значимость определялась к ЛПС-контролю по непараметрическому критерию Краскела-Уоллеса с пост-тестом Даннета; базальный уровень (клетки + ДМСО) принят за 0%, стимулированный уровень (клетки + ЛПС) принят за 100%.

### **3.3 Оценка влияния исследуемых производных хиназолина на зимозан-индуцированную продукцию активных форм кислорода нейтрофилами**

Для оценки влияния исследуемых производных хиназолина на интенсивность образования в нейтрофилах активных форм кислорода использовали метод хемилюминесценции. Данный метод позволяет изучить интенсивность окислительных процессов в нейтрофилах, как интегрального показателя, характеризующего кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита.

Спонтанная хемилюминесценция позволяет оценить базовый уровень продукции активных форм кислорода, которым обладает фагоцитирующая клетка в неактивном состоянии. Индуцированная хемилюминесценция позволяет оценить уровень продукции активных форм кислорода, который фагоцитирующая клетка

может проявлять в ответ на контакт с чужеродным агентом. ПН после совместного экспонирования с исследуемыми соединениями инкубировались с опсонизированным зимозаном, с последующим добавлением люминола. Люминол является детектирующим агентом для АФК, переходя при взаимодействии с ними в радикальную форму и излучая при этом квант света, детектируемый при измерении люминесценции.

В результате исследования было показано, что исследуемые соединения ингибируют синтез активных форм кислорода нейтрофилами в концентрации 50 мкМ, за исключением соединений под лабораторными шифрами ВМА-13-15 и ВМА-13-17, которые приводили к усиленной продукции АФК (Таблица 5).

В дальнейшем, в ходе дополнительной серии экспериментов для соединения ВМА-13-15 был установлен дозозависимый эффект (Рисунок 1). При внесении опсонизированного зимозана мы наблюдали достоверное увеличение интенсивности хемилюминесценции, зависящее от концентрации соединения в культуральной среде.

Таблица 5 - Влияние изучаемых субстанций в концентрации 50 мкМ на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами мышей линии С57bl/6

№ п.п	Субстанции	Зимозан-индуцированная активация нейтрофилов, %
Соединения, содержащие один линейный фрагмент гуанидина		
1.	ВМА 13-10	3,44
2.	ВМА 13-15	58,18
3.	ВМА 13-16	1,15
4.	ВМА 13-17	58,00
5.	ВМА 21-05	0,78
6.	ВМА 21-06	0,86
7.	ВМА 21-20	-0,58
8.	ВМА 21-03	2,57

9.	ВМА 21-04	11,67
Соединения, содержащие два линейных фрагмента гуанидина		
1.	ВМА 21-02	7,71
Соединения, содержащие один циклический фрагмент гуанидина		
1.	ВМА 21-14	5,03
2.	ВМА 21-18	-0,37
3.	ВМА 21-15	4,82
4.	ВМА 21-23	-4,03
5.	ВМА 21-24	4,6
Соединения, содержащие 2 циклических фрагмента гуанидина		
1.	ВМА 21-10	-4,02
2.	ВМА 21-11	-11,41
3.	ВМА 21-12	0,84
4.	ВМА 21-16	-2,99

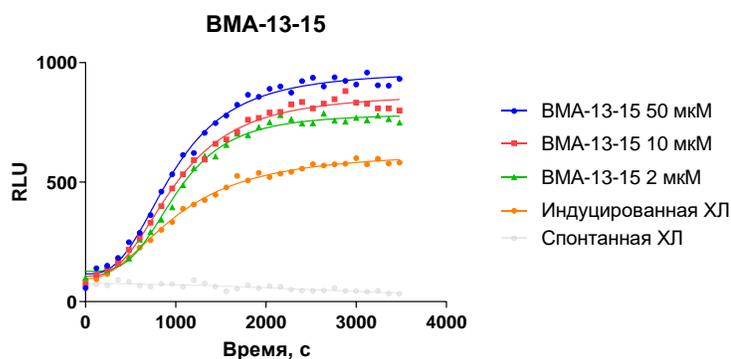


Рисунок 1 - Активация зимозан-индуцированного образование активных форм кислорода нейтрофилами мышей соединениями под лабораторными шифром ВМА-13-15.

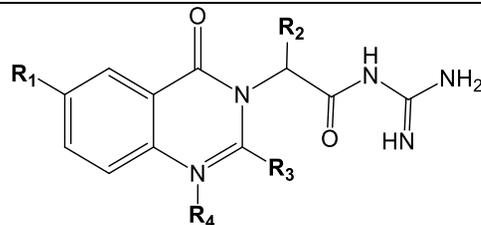
Примечание: RLU – относительные световые единицы (relative light units).

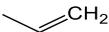
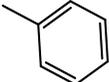
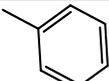
Таким образом, в результате изучения влияния исследуемых соединений на функциональную активность нейтрофилов методом спонтанной и индуцированной хемилюминесценции были установлены соединения – лидеры с разнонаправленным типом активности. По ингибирующей активности на продукцию АФК: ВМА-21-10, ВМА-21-11, ВМА-21-16 и ВМА-21-23. Соединения, стимулирующие продукцию АФК: ВМА-13-15 и ВМА-13-17.

#### **3.4 Взаимосвязь химической структуры соединений с их ингибирующим действием на продукцию оксида азота**

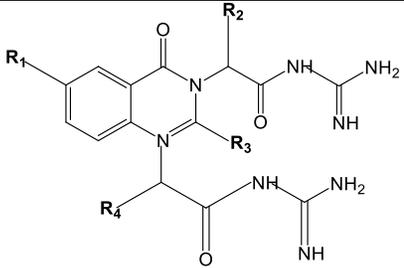
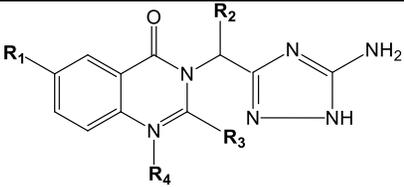
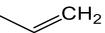
Результаты, полученные на первом этапе скрининга соединений на ЛПС-индуцированный синтез оксида азота, как индикатора экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и зимозан-индуцированной продукции АФК, как индикатора кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитов и МТТ-теста, как показателя жизнеспособности клеток являлись основными данными для проведения анализа зависимости ингибирующей активности от структуры новых производных хиназолина. В Таблице 6 представлены данные о химической структуре и величине ингибирующей активности исследованных соединений.

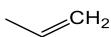
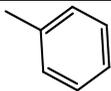
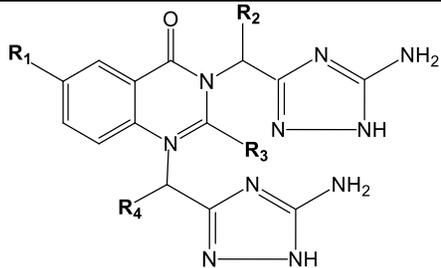
Таблица 6 - Химическая структура новых производных хиназолина и величина ингибирующей активности



№	Шифр соединения	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Синтез NO, % (M ± SD)	Продукция АФК, %	МТТ-тест, % (M ± SD)
1.	ВМА-13-10	-	-	-	-	100,78±1,16	3,44	104,42±1,65
2.	<b>ВМА- 13-15</b>	-	<b>CH<sub>3</sub></b>	-	-	<b>59,92±2,78*</b>	<b>58,18</b>	<b>105,73±3,38</b>
3.	ВМА- 13-16	-	-	CH <sub>3</sub>	-	101,67±0,19	1,15	104,33±1,05
4.	ВМА- 13-17	Br	-	-	-	106,61±12,99	58,00	105,89±2,4
5.	ВМА- 21-05	-	-	O	CH <sub>3</sub>	117,1±13,96	0,78	108,2±1,62
6.	ВМА- 21-06	-	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	75,11±13,68	0,86	90,48±7,57
7.	ВМА- 21-20	-	CH <sub>3</sub>	O		97,73±11,27	-0,58	93,13±4,21
8.	ВМА- 21-03	-	-	O		85,34±34,9	2,57	79,28±9,81
9.	ВМА- 21-04	-	CH <sub>3</sub>	O		89,91±10,57	11,67	100,7±3,88
10.	ВМА- 21-22	Br	-	O	CH <sub>3</sub>	59,23±16,12*	-	96,32±6,21

Продолжение Таблицы 6

								
№	Шифр соединения	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Синтез NO, % (M ± SD)	Продукция АФК, %	МТТ-тест, % (M ± SD)
1.	ВМА- 21-02	-	-	O	-	95,37±11,45	7,71	97,31±8,26
2.	ВМА- 21-07	Br	-	O	-	88,97±8,11	-	108,3±8,82
3.	ВМА- 21-08	-	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	83,74±5,95	-	86,72±2,00
4.	ВМА- 21-09	Br	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	93,14±12,84	-	102,1±5,87
								
№	Шифр соединения	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Синтез NO, % (M ± SD)	Продукция АФК, %	МТТ-тест, % (M ± SD)
1.	ВМА- 21-14	-	-	O	CH <sub>3</sub>	25,64±15,04*	5,03	51,64±15,6
2.	ВМА- 21-18	-	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	88,52±12,75	-0,37	82,81±5,80
3.	ВМА- 21-15	-	-	O		99,87±8,72	4,82	91,48±5,25

4.	ВМА- 21-21	-	CH <sub>3</sub>	O		94,79±7,18	-	87,56±17,22
5.	ВМА- 21-13	-	-	O		79,18±14,94	-	60,66±0,84
6.	ВМА- 21-23	Br	-	-	-	75,43±8,71*	-4,03	94,53±3,53
7.	ВМА- 21-24	Br	CH <sub>3</sub>	-	-	72,88±5,44*	4,6	91,91±1,96
								
№	Шифр соединения	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Синтез NO, % (M ± SD)	Продукция АФК, %	МТТ-тест, % (M ± SD)
1.	<b>ВМА- 21-10</b>	-	-	<b>O</b>	-	<b>-1,31±2,06*</b>	<b>-4,02</b>	<b>106,6±5,19</b>
2.	ВМА- 21-11	-	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	7,246±6,19*	-11,41	98,95±10,21
3.	ВМА- 21-12	Br	-	O	-	0,98±3,91*	0,84	105,8±4,43
4.	ВМА- 21-16	Br	CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>	12,94±6,97*	-2,99	91,47±0,65

В соответствии с базовым скаффолдом, исследованные новые производные хиназолина в зависимости от наличия линейных или циклических фрагментов гуанидина и их числа в структуре соединений можно разделить на 4 класса: I класс – один линейный фрагмент гуанидина, II класс – два линейных фрагмента гуанидина, III класс – один циклический фрагмент гуанидина и IV класс соединений с двумя циклическими фрагментами гуанидина.

Было показано, что наличие свободной или частично встроенной гуанидиновой группировки у производных хиназолина коррелирует с iNOS-ингибирующей активностью новых соединений, что позволило выявить соединения, статистически значимо снижающие продукцию оксида азота и АФК.

При анализе зависимости активности от структуры заместителей выявлено, что из I класса, два соединения (из 10 представленных) показали статистически значимое снижение продукции оксида азота, одно из них значительно повысило секрецию АФК (Таблица 6). Добавление еще одного линейного фрагмента гуанидина в структуру соединений не привело к появлению статистически значимой ингибирующей активности у 4 исследуемых соединений II класса. Введение в базовый скаффолд одного циклического фрагмента гуанидина (III класс) повысило число соединений с ингибирующей активностью, три соединения (из 7 представленных) статистически значимо снижали продукцию оксида азота и 2 соединения снижали генерацию АФК. Введение дополнительного циклического фрагмента гуанидина в структуру соединений III класса значительно повысило их ингибирующую способность (Таблица 6). Четыре соединения IV класса (из 4 представленных) показали статистически значимое снижение продукции оксида азота и генерации АФК, что свидетельствует о наличии иммуотропных свойств у соединений этого ряда.

Выявленные соединения под лабораторным шифром ВМА-13-15 и ВМА-21-10, статистически значимо влияющие на ингибирование продукции оксида азота и

генерацию АФК (ВМА-13-15 оказывает стимулирующее действие, а ВМА-21-10 ингибирующее), и не обладающие цитотоксичностью в МТТ-тесте, были взяты для дальнейшего изучения фагоцитарной активности и цитотоксичности в тесте высвобождения ЛДГ с целью установления спектра иммуотропных свойств соединений-лидеров и соответственно выбора модели экспериментальной патологии иммунной системы для оценки их иммуномодулирующей и противовоспалительной активности *in vivo*.

### 3.5 Определение ИЛ-6-ингибирующей активности соединений

Определение ИЛ-6-ингибирующей активности применялось в настоящем исследовании в отношении соединений - лидеров по результатам оценки продукции NO, как ведущего критерия для выявления противовоспалительной активности соединений. ИЛ-6 является одним из ключевых цитокинов воспалительного ответа (опосредующих формирование клеточного иммунного ответа) продукция которого инициируется введением бактериального ЛПС [245].

Имуотропные свойства соединения-лидера ВМА-21-10, ингибирующее образование оксида азота, и генерацию АФК в первичном скрининге, были подтверждены в последующих экспериментах, в широком диапазоне концентраций с определением синтеза NO и секреции ИЛ-6 (Таблица 7). По результатам расширенного изучения иммуотропной активности соединения ВМА-21-10 является микромолярным ингибитором продукции NO с  $IC_{50}$  более 70 мкМ и секреции ИЛ-6 с  $IC_{50}$  более 50 мкМ в сравнении с дексаметазоном.

Таблица 7 - Влияние исследуемых на синтез NO, секрецию ИЛ-6 ЛПС-стимулированными макрофагами мышей линии C57bl/6j

№ п.п.	Соединение	Синтез NO, $IC_{50}$ , мкМ	Секреция ИЛ-6, $IC_{50}$ , мкМ	ЛДГ 24 ч
1.	ВМА-21-10	72,96	51,75	>100

2.	ВМА-21-11	>100	>100	>100
3.	ВМА-21-12	>100	>100	>100
4.	ВМА-21-14	64,20	57,09	137,7
5.	Дексаметазон	0,003	0,003	-

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с контрольным показателем ( $p < 0,05$ ); данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение» по результатам не менее трех независимых экспериментов; статистическая значимость определялась к ЛПС-контролю по непараметрическому критерию Краскела-Уоллеса с пост-тестом Даннета; базальный уровень (клетки + ДМСО) принят за 0%, стимулированный уровень (клетки + ЛПС) принят за 100%.

Таким образом, соединение-лидер, под лабораторным шифром ВМА-21-10 по результатам первого этапа скрининга на ингибирование продукции оксида азота и генерацию АФК, достоверно в сравнении с официальным иммуносупрессором дексаметазоном, подавляет продукцию ключевого провоспалительного цитокина ИЛ-6, что свидетельствует о наличии выраженных противовоспалительных свойств у этого соединения.

### **3.6 Оценка влияния исследуемых производных хиназолина на жизнеспособность перитонеальных макрофагов**

Для выявленных соединений с наиболее выраженной иммуотропной активностью под лабораторными шифрами ВМА-21-10 и ВМА-13-15, были исследованы цитотоксические свойства на культуре ПМ в зависимости от конечной концентрации и времени экспозиции. Объектом тестирования для выявления цитотоксических свойств были выбраны мышинные перитонеальные макрофаги, по своей функциональности являющиеся клетками - эффекторами иммунной системы, одними из первых взаимодействующие как с ксенобиотиками, так и с чужеродными агентами биологического происхождения (белки, липополисахариды бактерий, вирусы, грибы бактерии, пыльца). Диапазон концентраций для изучаемых

соединений составлял от 1 до 100 мкМ. Время совместной экспозиции клеток с исследуемыми соединениями составляло 72 ч. Нами были использованы два высокоинформативных теста. МТТ-тест и тест высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ), в основе которых лежит оценка митохондриального дыхания и целостности клеточной мембраны.

На Рисунке 2 представлена концентрационная кривая зависимости жизнеспособности клеток от конечной концентрации и времени совместной экспозиции исследуемых веществ с клетками в 96-луночном культуральном микропланшете.

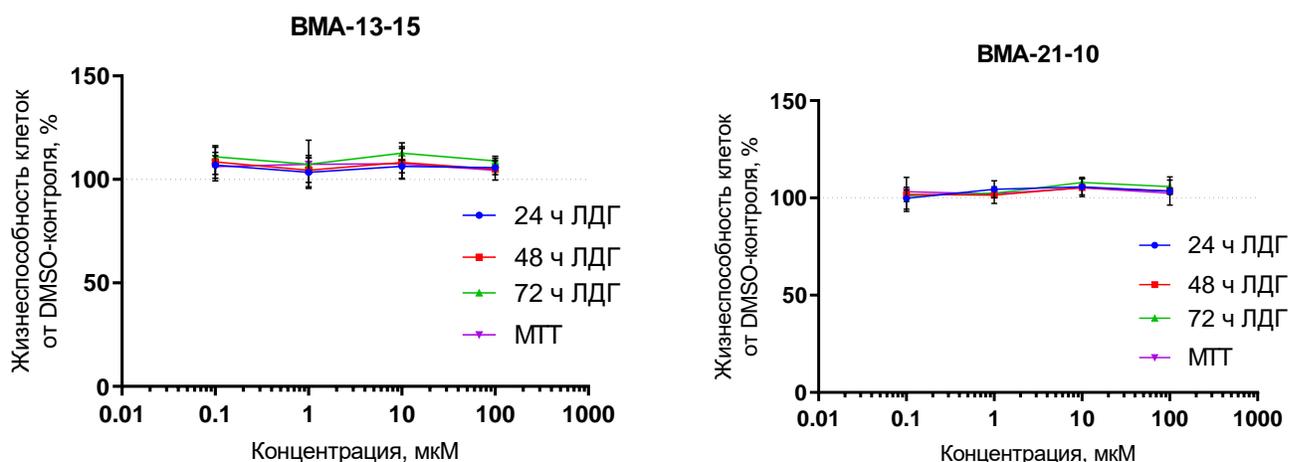


Рисунок 2 - Влияние изучаемых соединений на жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j после совместной инкубации в течение 72 ч.

*Примечание:* данные представлены как среднее и 95% доверительный интервал (n = 100); 1-направленный ANOVA с пост-тестом Даннета.

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод об отсутствии цитотоксических свойств у исследуемых веществ в диапазоне концентрации от 1 до 100 мкМ для данного типа клеток.

### 3.7 Исследование влияния производных хиназолина на фагоцитарную активность макрофагов

По результатам предварительных исследований иммуотропной активности соединений в тестах: подавление ЛПС-индуцированной продукции NO ПМ, влияние на зимозан-индуцированную продукцию АФК ПМ, методом хемилюминесценции и жизнеспособность ПМ в МТТ-тесте и тесте высвобождения ЛДГ, были определены соединения под лабораторными шифрами ВМА-21-10 и ВМА-13-15, которые обладали наиболее выраженной иммуотропной активностью и не являлись цитотоксичными для ПМ в тестируемых концентрациях.

На этом этапе исследования было определено их влияние на фагоцитарную активность ПМ. В качестве препарата сравнения был использован дексаметазон, объектом фагоцитоза служили дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*. Фагоцитарную активность ПМ оценивали морфологически, методом световой микроскопии по количеству фагоцитирующих клеток на 100 макрофагов и количеству захваченных дрожжевых клеток в каждом макрофаге. Исследование выполнено в трех технических повторах и двух сериях в течение 24-часовой инкубации макрофагов с исследуемыми соединениями. Расчет показателей фагоцитоза проводился в каждой пробе на 100 макрофагов. Результаты исследования приведены на Рисунках 3 и 4.

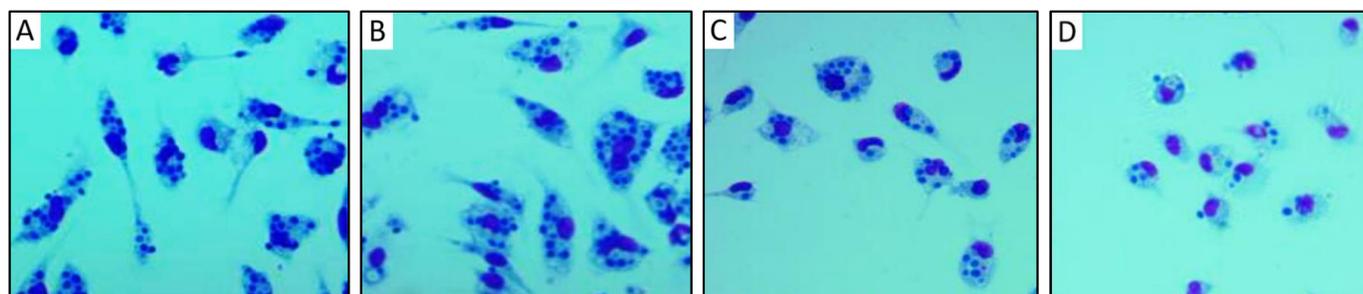


Рисунок 3 - Морфологическая картина, иллюстрирующая фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов под влиянием исследуемых соединений после 24 - часовой инкубации.

*Примечание:* Окраска азури-эозином по Романовскому-Гимзе. Общее увеличение  $\times 400$ . А – ПМ, экспонированные только с дрожжевыми клетками; В – ПМ, экспонированные с дрожжевыми клетками в присутствии соединения ВМА-13-15; С – ПМ, экспонированные с дрожжевыми

клетками в присутствии соединения ВМА-21-10; D – ПМ, экспонированные с дрожжевыми клетками в присутствии препарата сравнения, дексаметазона.

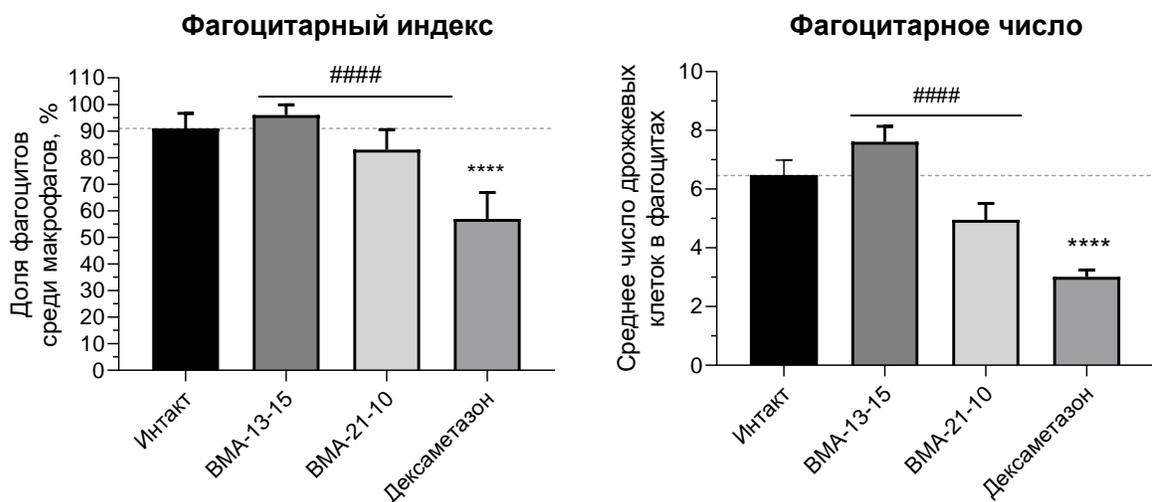


Рисунок 4 - Влияние исследуемых соединений на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей C57bl/6j после 24-часовой совместной инкубации

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с контролем ( $p < 0,0001$ ); #### – статистически значимые различия при сравнении с дексаметазоном ( $p < 0,0001$ ); данные представлены как «среднее и 95% доверительный интервал ( $n = 100$ )»; ANOVA с пост-тестом Данна.

По результатам исследования показано, что при 24-часовой инкубации дексаметазон существенно подавляет фагоцитоз (совпадает с литературными данными [59, 119]), в отличие от соединений-лидеров. ВМА-21-10 проявил небольшое, но статистически значимое подавление фагоцитарного числа (менее выраженное, чем у дексаметазона). Соединение ВМА-13-15 показало увеличение показателей фагоцитарной активности – фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа (Рисунок 4).

Соединение под лабораторным шифром ВМА-21-10 оказывает меньшее влияние на фагоцитарную активность макрофагов, чем дексаметазон, а ВМА-13-15 проявляет стимулирующее влияние на показатели фагоцитарной активности.

На основании полученных данных нами были проведены дополнительные исследования соединения ВМА-13-15, для выяснения механизма стимулирующего действия на фагоцитарную активность ПМ. Была изучена киллинговая и лизосомальная активность ПМ. Результаты исследования приведены на Рисунке 5 и в Таблице 8.

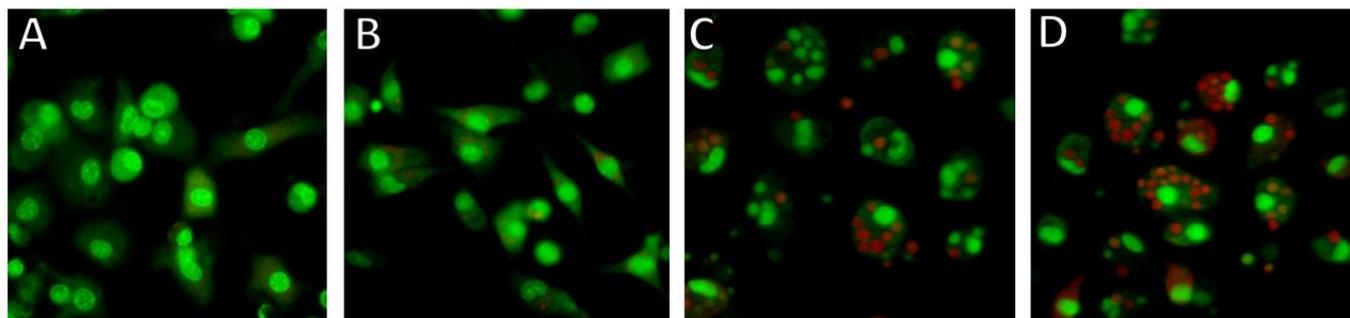


Рисунок 5 - Морфологическая картина, иллюстрирующая лизосомальную и киллинговую активность перитонеальных макрофагов под влиянием соединения ВМА-13-15 после часовой инкубации.

*Примечание:* Окраска акридиновым оранжевым. Общее увеличение  $\times 400$ . А – интактные ПМ; В – ПМ в присутствии соединения ВМА-13-15; С – ПМ, экспонированные с дрожжевыми клетками; D – ПМ, экспонированные с дрожжевыми клетками в присутствии соединения ВМА-13-15.

Таблица 8 - Влияние соединения ВМА-13-15 на лизосомальную и киллинговую активность перитонеальных макрофагов в отношении *Saccharomyces cerevisiae*

Группа	СЦК #	Киллинговая активность, %
Контроль	$2,20 \pm 0,11$	$79,1 \pm 1,61$
ВМА-13-15	<b><math>2,53 \pm 0,12^*</math></b>	<b><math>89,2 \pm 1,30^*</math></b>

*Примечание:* \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); # СЦК – средний цитохимический коэффициент

Люминесцентная микроскопия фагоцитирующих макрофагов позволила установить статистически значимое повышение показателей фагоцитарной

активности (повышение лизосомальной и киллинговой активности) под влиянием соединения VMA-13-15 по сравнению с клетками контрольной группы.

### 3.8 Заключение

В результате проведенного скрининга иммуотропной активности 25 *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами с линейными и циклическими фрагментами гуанидина на изолированных ПМ, были выявлены два соединения с наибольшей иммуотропной активностью: VMA-21-10 и VMA-13-15. Соединение VMA-21-10 статистически значимо подавляло синтез NO в концентрации 100 мкМ, не уступая по активности препарату сравнения, дексаметазону, при этом не влияя на жизнеспособность ПМ в МТТ-тесте. VMA-21-10 также ингибирует продукцию ключевого провоспалительного цитокина ИЛ-6 ( $IC_{50} = 51,75$  мкМ), что свидетельствует о наличии выраженных иммуносупрессивных свойств у этого соединения.

По результатам изучения влияния исследуемых соединений на функциональную активность нейтрофилов методом спонтанной и индуцированной хемилюминесценции были установлены соединения-лидеры с разнонаправленным типом активности: по ингибирующей активности на продукцию АФК – VMA-21-10, а из соединений, стимулирующих продукцию АФК – VMA-13-15.

По результатам дополнительного изучения влияния VMA-21-10 и VMA-13-15 на жизнеспособность ПМ в МТТ-тесте и тесте высвобождения ЛДГ, в зависимости от конечной концентрации и времени экспозиции, было показано, что данные соединения не проявляют цитотоксических свойств.

По результатам влияния соединений-лидеров на фагоцитарную активность ПМ, было показано, что VMA-21-10 оказывает подавляющее действие на показатели фагоцитарной активности макрофагов в меньшей степени, чем дексаметазон, а VMA-13-15, наоборот, демонстрирует стимулирующее влияние.

Таким образом, было показано, что наличие свободной или частично встроеной гуанидиновой группировки у производных хиназолина коррелирует с иммуностропной активностью, что позволило выявить среди 25 производных хиназолина, два соединения-лидера: соединение под лабораторным шифром ВМА-21-10, у которого высокая ингибирующая активность продукции оксида азота сочеталась со способностью снижать синтез АФК нейтрофилами при незначительном снижении фагоцитарной активности. В свою очередь соединение под лабораторным шифром ВМА-13-15 слабее ингибировало продукцию оксида азота, но сильнее увеличивало синтез АФК и повышало показатели фагоцитарной активности.

Исходя из полученных результатов, с целью подтверждения иммуномодулирующих свойств и установления механизма действия изучаемые соединения ВМА-13-15 и ВМА-21-10 были изучены в условиях экспериментальной патологии.

## ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ВМА-13-15 И ВМА-21-10 НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ

Настоящая глава посвящена изучению влияния хиназолиновых производных (ВМА-13-15 в дозе 5 мг/кг/сут и ВМА-21-10 в дозе 30 мг/кг/сут) на иммунную систему лабораторных животных в условиях экспериментальной патологии, вызванной введением бактериального ЛПС.

### 4.1 Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на массу и клеточный состав селезенки у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии

ЛИ и количество ЯСК, или лимфоцитов, в селезенке характеризует функциональное состояние этого органа. Селезенка является одним из главных периферических органов иммунной системы и выполняет ряд важных функций: элиминация утративших функциональную активность эритроцитов и лейкоцитов, образование и активация новых Т- и В-лимфоцитов в ответ на попавшие из кровотока чужеродные антигены, в том числе бактериальный ЛПС [249].

Результаты изучения влияния хиназолиновых производных на лимфоидный индекс и клеточный состав селезенки представлены в Таблице 9.

Таблица 9 - Влияние исследуемых соединений на лимфоидный индекс и количество ядродержащих клеток в селезенке у животных с ЛПС-индуцированной патологией

№ п.п.	Группа	Лимфоидный индекс ( $M \pm SD$ )	Количество ЯСК $\times 10^5$ ( $M \pm SD$ )
1.	Интакт	$3,17 \pm 0,37$	$10840 \pm 1371$
2.	ЛПС	$4,67^* \pm 0,47$	$21301^{***} \pm 453$
3.	ВМА-13-15	$3,23^\# \pm 0,25$	$14665^\# \pm 1810$
4.	ВМА-21-10	$3,25^\# \pm 0,36$	$16237^{\#\#} \pm 1425$

5.	Дексаметазон	2,03 <sup>###</sup> ± 0,187	5256 <sup>###</sup> ± 609
----	--------------	-----------------------------	---------------------------

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,05$ ); \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,001$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,05$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

При внутрибрюшинном введении ЛПС в дозе 5 мг/кг было отмечено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение ЛИ на 47% по сравнению с данным показателем у животных интактной группы. Курсовое введение исследуемых соединений статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижало лимфоидный индекс на 31 и 30% для ВМА-13-15 и ВМА-21-10 соответственно, при сравнении с животными с экспериментальной патологией, до значений, сопоставимых с показателем ЛИ интактных животных.

На фоне введения дексаметазона наблюдали статистически значимое ( $p < 0,001$ ) снижение ЛИ в 2 раза относительно ЛИ животных, которым вводили ЛПС, а также существенное снижение данного показателя в 1,5 раза при сравнении с интактными животными.

При подсчете ЯСК в селезенке выявили схожие изменения. ЛПС-индуцированная патология характеризовалась увеличением числа ЯСК практически в 2 раза относительно данного показателя у животных интактной группы, эти изменения были статистически значимыми ( $p < 0,001$ ).

Курсовое введение соединений ВМА-13-15 и ВМА-21-10 способствовало статистически значимому снижению числа ЯСК на 31 ( $p < 0,01$ ) и 24 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Число ЯСК также было снижено у животных, получавших дексаметазон. Под действием препарата сравнения данный показатель снизился в 4 раза при сравнении с животными, получавшими ЛПС ( $p < 0,001$ ) и в 2 раза при сравнении с интактными животными.

Таким образом, исследуемые *N*-замещенные производные хиназолина – ВМА-13-15 и ВМА-21-10 – в условиях ЛПС-индуцированной патологии демонстрировали стимулирующую активность на иммунопролиферативные процессы в селезенке.

#### 4.2 Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на экспрессию NF-κB в спленоцитах у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии

Поскольку активация NF-κB играет центральную роль в патофизиологии септического шока, ингибирование этого транскрипционного фактора предотвращает полиорганное поражение и улучшает выживаемость в моделях септического шока у грызунов [165].

Соответственно, воздействие *N*-замещенных производных хиназолина на один из основных регуляторов воспалительного ответа может дать представление об их возможном механизме действия. На Рисунке 6 приведены результаты исследования, посвященные изучению действия соединений на активацию NF-κB в спленоцитах животных с экспериментальной патологией, вызванной введением ЛПС.

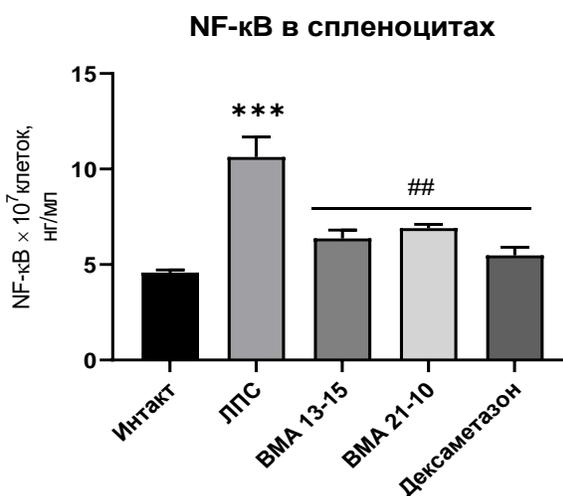


Рисунок 6 - Влияние исследуемых соединений на экспрессию NF-κB при ЛПС-индуцированной патологии

Примечание: \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,001$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-

индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

На фоне введения ЛПС в спленоцитах животных наблюдали статистически значимое повышение активации NF- $\kappa$ B в 2 раза по сравнению с интактными животными ( $p < 0,001$ ).

Соединение ВМА-13-15 статистически значимо ( $p < 0,01$ ) снижало активацию NF- $\kappa$ B в спленоцитах крыс на 40% относительно животных с экспериментальной патологией. ВМА-21-10 статистически значимо ( $p < 0,01$ ) снижало данный показатель на 35% при сравнении со спленоцитами животных, получавших ЛПС. Препарат сравнения дексаметазона также статистически значимо ( $p < 0,01$ ) снижал активацию NF- $\kappa$ B в 2 раза по сравнению с животными с ЛПС-индуцированной патологией, что было сопоставимо с уровнем активации NF- $\kappa$ B в спленоцитах интактных животных.

Таким образом, исследуемые соединения снижают активацию NF- $\kappa$ B в условиях экспериментальной патологии, вызванной введением бактериального ЛПС.

#### **4.3 Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на общее количество лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии**

Абсолютное число лейкоцитов и их субпопуляций является важным показателем неспецифической резистентности организма, отражающей состояние защитных функций врожденного иммунитета

В связи с этим мы посчитали целесообразным изучить содержание общего количества лейкоцитов и их субпопуляций при ЛПС-индуцированной патологии с целью выявления у исследуемых веществ иммунокорректирующего действия.

Результаты изучения влияния *N*-замещенных производных хиназолина на общее количество лейкоцитов и их субпопуляционный состав в периферической крови представлены в Таблице 10.

Таблица 10 - Влияние исследуемых соединений на отдельные субпопуляции лейкоцитов в лейкоцитарной формуле у животных с ЛПС-индуцированной патологией

№, п.п.	Группа	Общее число лейкоцитов, × 10 <sup>9</sup>	Субпопуляции лейкоцитов (без учета эозинофилов, базофилов и палочкоядерных нейтрофилов), %		
			Сегментоядерные нейтрофилы	Моноциты	Лимфоциты
1.	Интакт	9792 ± 309	30 ± 8,59	3 ± 0,1	64 ± 8,23
2.	ЛПС	13410** ± 453	52** ± 10,01	6** ± 0,8	37*** ± 1,02
3.	ВМА-13-15	9730## ± 586	26### ± 5,15	13### ± 0,89	59## ± 7,34
4.	ВМА-21-10	10280## ± 1111	28## ± 7,12	8 ± 0,06	61## ± 5,29
5.	Дексаметазон	10263# ± 324	75## ± 5,4	2### ± 0,1	20# ± 4,74

*Примечание:* \*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,001$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,05$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

На фоне введения бактериального ЛПС наблюдали повышение общего числа лейкоцитов (на 26%) по сравнению с интактными животными. Изменение данного показателя было статистически значимым ( $p < 0,01$ ).

Подсчет лейкоцитов в периферической крови животных, получавших одно из исследуемых соединений или препарат сравнения, показал, что число белых кровяных клеток было сравнимо с таковым у интактных животных.

При введении ВМА-13-15 общее число лейкоцитов снизилось на 27% относительно показателя, наблюдаемого у животных, получавших ЛПС. Под действием ВМА-21-10 снижение количества лейкоцитов произошло на 23% от значения, полученного у животных с ЛПС-индуцированной патологией, что было схоже с эффектом дексаметазона. Во всех случаях наблюдаемые изменения носили статистически значимый характер:  $p < 0,01$  для исследуемых соединений и  $p < 0,05$  для препарата сравнения.

Изучение содержания отдельных субпопуляций лейкоцитов показало, что при сравнении с интактными животными введение бактериального ЛПС статистически значимо повышало субпопуляцию сегментоядерных нейтрофилов на 22% ( $p < 0,01$ ), моноцитов – на 3% ( $p < 0,01$ ) и понижало процентное содержание лимфоцитов на 27% ( $p < 0,001$ ).

Под действием исследуемых соединений происходило изменение процентного соотношения субпопуляций лейкоцитов, при котором показатели лейкоцитарной формулы были сравнимы с таковыми у интактных животных. Введение как соединения ВМА-13-15, так и ВМА-21-10 достоверно снижало процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов в 2 раза ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно) и повышало содержание лимфоцитов на 22 и 24 % соответственно ( $p < 0,01$ ). В то же время исследуемое соединение под шифром ВМА-21-10 значимо не влияло на субпопуляцию моноцитов ( $p > 0,05$ ).

Введение дексаметазона на фоне ЛПС-индуцированной патологии также сопровождалось изменениями в лейкоцитарной формуле. Изменения выражались в повышении процентного числа сегментоядерных нейтрофилов почти в 1,5 по сравнению с животными, получавшими ЛПС, и в 2,5 раза – по сравнению с интактными. Под действием дексаметазона наблюдали статистически значимое ( $p < 0,001$ ) снижение субпопуляции моноцитов в 3 раза по сравнению с животными, которым вводили ЛПС. Процентное содержание лимфоцитов в периферической

крови крыс, получавших дексаметазон, было статистически значимо ниже (на 46%;  $p < 0,05$ ), чем у животных с ЛПС-индуцированной патологией и почти в 3 раза ниже, чем у интактных животных.

Таким образом, по результатам проведенного исследования можно сделать вывод о том, что *N*-замещенные производные хиназолина под лабораторными шифрами ВМА-13-15 и ВМА-21-10, оказывают иммунокорригирующее действие, возможно за счет влияния на процессы миело- и лимфопоэза, проявляющегося в нормализации показателей белой крови и восстановлении субпопуляционного состава лейкоцитов.

#### **4.4 Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии**

Изучение фагоцитарной активности позволяет получить четкое представление о состоянии клеточного звена неспецифической резистентности организма. Оценку фагоцитарно-метаболической активности полиморфноядерных лейкоцитов, а именно, поглотительной способности проводили общепринятым методом [12, 13] с расчетом показателя фагоцитарной активности. Для оценки кислородзависимых антиинфекционных систем НГ с расчетом индекса активации нейтрофилов (ИАН), был использован цитохимический вариант НСТ-теста, интегрального показателя, позволяющего оценить активность всех составляющих НАДФН-оксидазной системы клеток. Ряд патологических состояний, особенно связанных с метаболическими дефектами функции НГ, демонстрируют низкие или нормальные значения НСТ-теста. Эти состояния могут быть обнаружены путем модификации теста НСТ, включающей стимуляцию фагоцитарной системы *in vitro*, соответственно. [145, 209].

Результаты по исследованию влияния соединений ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови животных с ЛПС-индуцированным системным воспалительным ответом представлены в Таблице 11.

Таблица 11 - Влияние исследуемых соединений на индекс активации нейтрофилов в зимозан-индуцированном и спонтанном НСТ-тесте

№ п.п.	Группа	ИАН в зимозан-индуцированном НСТ-тесте	ИАН в спонтанном НСТ-тесте
1.	Инттакт	1,25 ± 0,14	0,57 ± 0,04
2.	ЛПС	1,81* ± 0,12	0,82* ± 0,05
3.	ВМА 13-15	1,30## ± 0,1	0,59# ± 0,04
4.	ВМА 21-10	1,04## ± 0,1	0,53## ± 0,06
5.	Дексаметазон	0,69### ± 0,14	0,40### ± 0,1

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,05$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,05$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

По результатам проведенного исследования, введение ЛПС повышало индекс активации нейтрофилов (ИАН) в зимозан-индуцированном и спонтанном НСТ-тесте на 44% ( $p < 0,05$ ).

У животных с ЛПС-индуцированной патологией ВМА-13-15 приводил к снижению ИАН в среднем на 28% в зимозан-индуцированном и спонтанном НСТ-тесте ( $p < 0,01$  и  $p < 0,05$ , соответственно) по сравнению с ИАН у животных, получавших ЛПС. Схожий эффект наблюдали у крыс с экспериментальной патологией, которым вводили ВМА-21-10. Статистически значимое снижение ИАН ( $p < 0,01$ ) в зимозан-индуцированном НСТ-тесте произошло на 42%, в спонтанном – на 35% от показателя животных контрольной группы.

Введение дексаметазона на фоне системного воспалительного ответа, вызванного ЛПС, статистически значимо ( $p < 0,001$ ) снижало ИАН. В зимозан-индуцированном НСТ-тесте на 62% от ИАН у крыс с экспериментальной патологией, а в спонтанном НСТ-тесте на 51%. Примечательно, что под действием дексаметазона ИАН был ниже, чем у интактных животных на 45 и 30% в зимозан-индуцированном и спонтанном НСТ-тесте соответственно.

Схожую картину наблюдали при изучении фагоцитарной активности нейтрофилов (Таблица 12).

Таблица 12 - Влияние исследуемых соединений на фагоцитарную активность нейтрофилов

№ п.п.	Группа	Фагоцитарная активность, %	Фагоцитарное число, ед.
1.	Интакт	66,0 ± 3,47	6,98 ± 0,49
2.	ЛПС	85,2* ± 5,94	9,17** ± 0,14
3.	ВМА-13-15	64,6# ± 5,31	6,59## ± 0,43
4.	ВМА-21-10	62,8# ± 7,35	5,78### ± 0,54
5.	Дексаметазон	17,5### ± 3,77	3,13### ± 0,36

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,05$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,05$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

В условиях экспериментальной патологии, вызванной введением ЛПС, зафиксировали статистически значимое, по сравнению с животными интактной группы, повышение фагоцитарной активности нейтрофилов до 85,2% (у интактных животных данный показатель был равен 66%) и увеличение фагоцитарного числа (ФЧ) на 31% ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно).

Под влиянием исследуемых соединений фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови статистически значимо снизилась ( $p < 0,05$ ) до

значений, сравнимых с измеренными у крыс интактной группы. Для ВМА-13-15 данный показатель составил 64,6%, для ВМА-21-10 – 62,8%.

Фагоцитарное число на фоне введения ВМА-13-15 было снижено на 28% ( $p < 0,01$ ) от фагоцитарного числа нейтрофилов животных с ЛПС-индуцированной патологией. Соединение ВМА-21-10 снижало фагоцитарное число на 36% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с животными контрольной группы.

Дексаметазон существенно снижал фагоцитарную активность как по сравнению с животными контрольной, так и интактной группы. Под действием препарата сравнения показатель фагоцитарной активности был ниже, чем у животных, получавших ЛПС, практически в 5 раз ( $p < 0,001$ ) и почти в 4 раза ниже, чем у интактных животных. Схожим образом дексаметазон снижал фагоцитарное число. Зафиксированное значение данного показателя было почти в 3 раза ниже, чем у животных контрольной группы ( $p < 0,001$ ) и почти в 2 раза ниже, чем у крыс интактной группы.

#### **4.5 Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии**

Индуцибельная NO-синтаза (iNOS) экспрессируется во многих типах клеток в ответ на действие ЛПС, цитокинов и др., продуцируя большое количество оксида азота, участвующего в иммунных реакциях и противоопухолевой защите [103]. При избыточной продукции оксид азота взаимодействует с супероксид-анионом и образует пероксинитрит, оказывающий повреждающее действие, вследствие ингибирования дыхательных комплексов митохондрий с последующим развитием дефицита АТФ в клетке [70, 206]. Пероксинитрит также индуцирует окислительный стресс, взаимодействуя с липидами, ДНК и белками [110]. Перечисленные факторы служат причиной развития апоптоза и гибели клетки [38]. В этом эксперименте

было изучено влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на уровень iNOS у животных с ЛПС-индуцированной патологией (Таблица 13).

Таблица 13 - Влияние исследуемых соединений на уровень iNOS при ЛПС-индуцированной патологии

№ п.п.	Группа	Уровень iNOS, нг/мл (M ± SD)
1.	Интакт	4,91 ± 0,58
2.	ЛПС	10,52 <sup>***</sup> ± 0,93
3.	ВМА 13-15	4,38 <sup>###</sup> ± 0,93
4.	ВМА 21-10	5,25 <sup>##</sup> ± 1,1
5.	Дексаметазон	3,29 <sup>###</sup> ± 1,05

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,0001$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

По результатам исследования выявлено, что концентрация iNOS в сыворотке животных, получавших ЛПС, достоверно ( $p < 0,0001$ ) превышала таковую у интактных животных более чем в 2 раза.

На фоне введения исследуемых соединений наблюдали снижение концентрации iNOS, причем данный показатель был сопоставим со значениями, определенными в сыворотке интактных животных. Соединение ВМА-13-15 снижало на 58%, а ВМА-21-10 – на 50% от уровня iNOS в сыворотке животных с экспериментальной патологией ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно).

В сыворотке животных, получавших дексаметазон, концентрация iNOS статистически значимо ( $p < 0,0001$ ) снизилась более, чем в 3 раза по сравнению с животными, которым вводили ЛПС.

Таким образом, на фоне введения животным бактериального ЛПС увеличивается экспрессия iNOS, что выражается в увеличении ее концентрации в

сыворотке крови. В свою очередь, применение исследуемых *N*-замещенных производных хиназолина приводило к снижению концентрации iNOS.

#### 4.6 Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови у животных в условиях ЛПС-индуцированной патологии

Цитокины – это множество разнообразных регуляторных биологически активных небольших пептидных молекул, секретируемых клетками с целью воздействия через специфические рецепторы в процессе реализации иммунного ответа [35]. Отсутствие антигенной специфичности действия, начало синтеза в ответ на повреждение тканей или проникновение инфекции является частью клеточного ответа, связанного с распознаванием патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [48]. Ключевыми провоспалительными цитокинами являются ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ . При развитии системной воспалительной реакции (острофазового ответа) цитокины оказывают влияние на все органы и ткани организма, участвующие в регуляции гомеостаза [100, 216]. Соответственно, уровень цитокинов является достоверным критерием оценки степени тяжести воспалительного иммунного ответа, отражающим его течение и интенсивность.

По результатам исследования, представленного в Таблице 14, ЛПС повышал уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке. Секреция ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  статистически значимо повышалась в среднем в 2 раза по сравнению с интактными животными ( $p < 0,001$ ).

Таблица 14 - Влияние исследуемых соединений на секрецию провоспалительных цитокинов при ЛПС-индуцированной патологии

№ п.п.	Группа	Секреция ИЛ-6, пг/мл (M $\pm$ SD)	Секреция ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл (M $\pm$ SD)	Секреция ФНО $\alpha$ , пг/мл (M $\pm$ SD)
1.	Интакт	43,11 $\pm$ 3,47	31,06 $\pm$ 6,21	90,36 $\pm$ 3,9
2.	ЛПС	81,60 <sup>***</sup> $\pm$ 2,64	67,65 <sup>***</sup> $\pm$ 2,95	178,46 <sup>***</sup> $\pm$ 7,36

3.	ВМА 13-15	55,59 <sup>##</sup> ± 1,96	49,85 <sup>#</sup> ± 3,59	147,74 <sup>#</sup> ± 7,92
4.	ВМА 21-10	58,32 <sup>##</sup> ± 1,61	56 ± 2	141,41 <sup>#</sup> ± 9,24
5.	Дексаметазон	52,03 <sup>##</sup> ± 2,17	47,29 <sup>#</sup> ± 5,11	118,31 <sup>#</sup> ± 10,56

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,001$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,05$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

При введении ВМА-13-15 наблюдали статистически значимое снижение уровня исследуемых провоспалительных цитокинов по сравнению с животными, получавшими ЛПС. Секрция ИЛ-6 снизилась до 55,59 пг/мл или на 32% ( $p < 0,01$ ); уровень ИЛ-1 $\beta$  составил 49,85 пг/мл, снизившись на 26% ( $p < 0,05$ ), а ФНО $\alpha$  – 147,74 пг/мл, что было ниже, чем у животных с ЛПС-индуцированной патологией, на 17% ( $p < 0,05$ ).

Соединение ВМА-21-10 также снижало концентрацию провоспалительных цитокинов. Так, концентрация ИЛ-6 составила 58,32 пг/мл – это на 29% ниже, чем у животных, которые получали ЛПС ( $p < 0,01$ ). Секрция ФНО $\alpha$  уменьшилась на 20% или до 141,41 пг/мл ( $p < 0,05$ ). Несмотря на существенное снижение, статистически значимого влияния на уровень ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крыс с экспериментальной патологией ВМА-21-10 не оказал ( $p > 0,05$ ).

В сыворотке животных с ЛПС-индуцированной патологией дексаметазон приводил к снижению концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ . Уровень ИЛ-6 снизился на 36% ( $p < 0,01$ ), ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  – на 30 и 34%, соответственно ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, анализ динамики ключевых цитокинов воспалительного ответа, показал, что под влиянием исследуемых веществ происходит ингибирование «включения» биохимических механизмов, которые запускаются в клетках ФМС в ответ на воспалительные стимулы различного происхождения, в том числе бактериальный ЛПС. Данный факт может свидетельствовать о способности исследуемых соединений восстанавливать цитокиновую регуляцию иммунного

ответа посредством нормализации уровня провоспалительных цитокинов, среди которых ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ .

#### 4.7 Влияние ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) образуются из антител, антигена и компонентов комплемента в ответ на попадание в организм чужеродного агента и циркулируют в кровяном русле. Следовательно, уровень ЦИК дает определенное представление об активности иммунного воспаления и эффективности проводимой терапии, являясь одним из диагностических методов определения степени тяжести и активности течения различных иммунопатологических процессов.

Результаты по исследованию влияния исследуемых соединений и препарата сравнения на уровень ЦИК представлены на Рисунке 7.

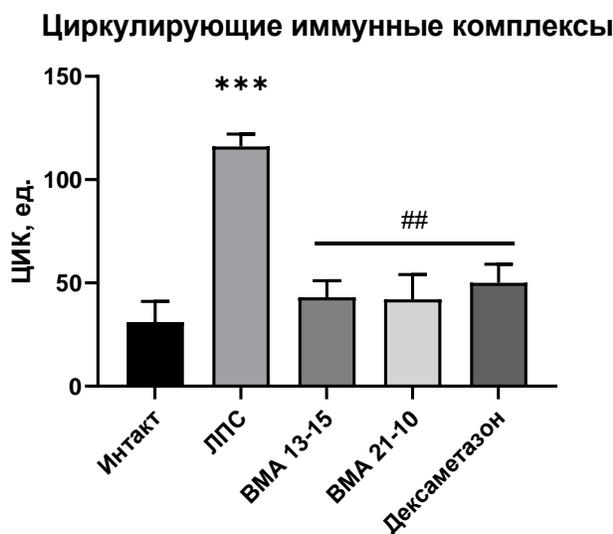


Рисунок 7 - Влияние исследуемых соединений на уровень циркулирующих иммунных комплексов

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными контрольной группы ( $p < 0,0001$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированной патологией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

На фоне введения бактериального ЛПС выявили статистически значимое ( $p < 0,001$ ) повышение уровня иммунных комплексов практически в 4 раза по сравнению с интактными животными.

Исследуемые соединения и препарат сравнения приводили к нормализации содержания ЦИК в сыворотке животных с ЛПС-индуцированной патологией. Во всех случаях снижение данного показателя было статистически значимым ( $p < 0,01$ ) и составляло 57–64% от уровня ЦИК в сыворотке животных, которым вводили ЛПС.

Таким образом, результаты, полученные при изучении уровня циркулирующих комплексов у животных, подверженных воздействию бактериального ЛПС, показали, статистически значимое снижение этого показателя под воздействием *N*-замещенных производных хиназолина, что, возможно, является одним из путей реализации иммуномодулирующего действия исследуемых соединений.

#### **4.8 Заключение**

Данный раздел диссертационного исследования был посвящен выявлению возможных механизмов иммуномодулирующего действия *N*-замещенных производных хиназолина в условиях ЛПС-индуцированной патологии. Анализ механизмов иммуномодулирующего действия основывался на следующих данных: лимфоидный индекс и количество ядродержащих клеток, число лейкоцитов и лейкоцитарная формула, активация NF-κB в спленоцитах, уровень циркулирующих иммунных комплексов и провоспалительных цитокинов, а также экспрессия iNOS.

Результаты, полученные при определении ЛИ и ЯСК селезенки, дают основание полагать, что их увеличение, вызванное введением ЛПС, сопряжено с усилением пролиферации и активации иммунокомпетентных клеток. В свою очередь, снижение данных показателей на фоне введения исследуемых соединений

или препарата сравнения указывают на подавление развития воспалительного процесса. Подтверждением этому служит достоверное уменьшение активации фактора транскрипции NF-κB в спленоцитах, который играет ключевую роль в развитии и поддержании воспаления. Причиной подавления активации NF-κB может служить снижение экспрессии iNOS и, как следствие, снижение продукции АФК, которые участвуют в активации транскрипционного фактора. Снижение активации NF-κB предположительно, угнетает несколько нисходящих звеньев механизма реализации иммунного ответа. Во-первых, уменьшение пролиферации иммунных клеток, что было подтверждено при подсчете общего числа лейкоцитов в периферической крови и установления процентного соотношения их субпопуляций. Во-вторых, подавление их активации, в том числе за счет ингибирования синтеза провоспалительных цитокинов. Следствием этого является уменьшение фагоцитарной активности нейтрофилов, в особенности на фоне введения дексаметазона, а также снижение синтеза иммуноглобулинов, о чем свидетельствует снижение ЦИК.

## **ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ВМА-21-10 НА ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС ПРИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОМ ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ЛЕГКИХ**

В настоящем исследовании мы проводили изучение иммуномодулирующей активности соединения под лабораторным шифром ВМА-21-10 (30 мг/кг/сут) на модели ЛПС-индуцированного острого повреждения легких. Исследование выполнено на 26 самцах мышей линии C57BL/6J. Рандомизация животных на экспериментальные группы была проведена по результатам клинического осмотра и измерения массы тела за 24 ч до начала эксперимента.

Основой для изучения влияния соединения ВМА-21-10 на воспалительный процесс при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких послужил морфологический и иммуногистохимический методы оценки. Интенсивность воспалительного ответа оценивали методом расчета индекса проницаемости легких и измерении уровня провоспалительных цитокинов в БАЛ и плазме. Наряду с этим определяли содержание лейкоцитов и их субпопуляций в лейкоцитарной формуле периферической крови и БАЛ.

### **5.1 Исследование влияния соединения ВМА-21-10 на клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких**

В ходе экспериментов нами была изучена противовоспалительная активность соединения ВМА-21-10 и препарата сравнения (дексаметазон) у животных с ЛПС-индуцированном ОПЛ, на основании количественно-качественного анализа изменений показателей клеточного состава БАЛ.

Через сутки после орофарингеального введения ЛПС у экспериментальных животных при изучении клеточного состава БАЛ было выявлено статистически значимое увеличение содержания сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с

животными интактной группы ( $p < 0,05$ ) на фоне резкого падения уровня моноцитов при незначительном снижении количества лимфоцитов у животных остальных групп (Рисунок 8).

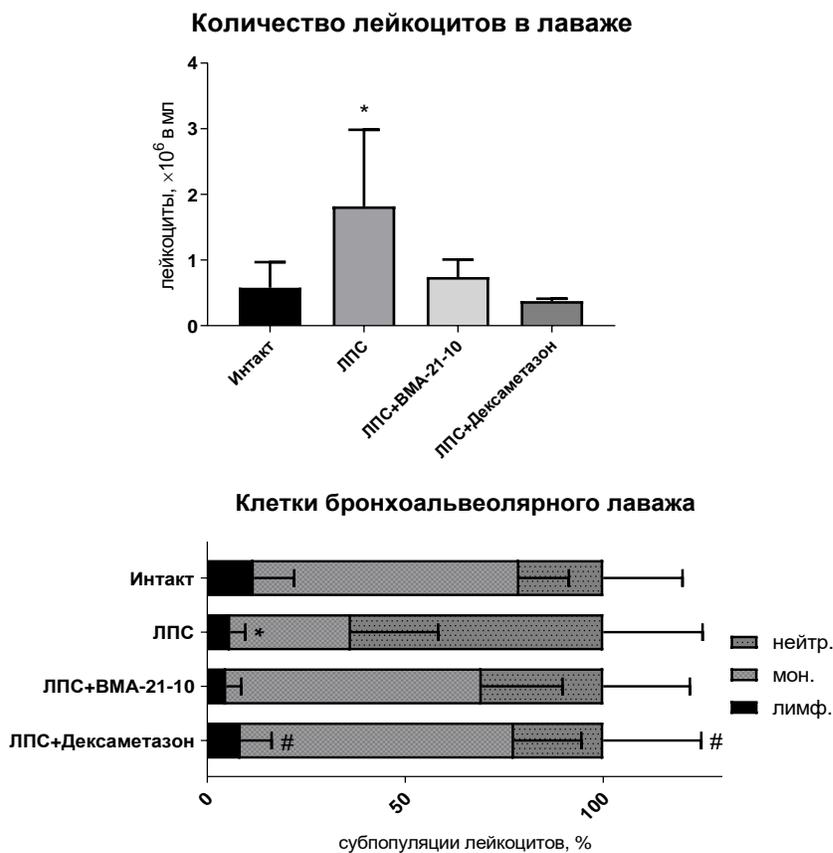


Рисунок 8 - Влияние соединения ВМА-21-10 на содержание лейкоцитов и их субпопуляций в бронхоальвеолярном лаваже у животных с ОПЛ

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,05$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными экспериментальным ОПЛ ( $p < 0,05$ ); нейтр. – нейтрофилы; мон. – моноциты; лимф. – лимфоциты; данные приведены как «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; однофакторный ANOVA.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о развитии острого воспалительного процесса.

На фоне воздействия ЛПС у мышей, получавших препарат сравнения, зафиксировано достоверное снижение содержания сегментоядерных нейтрофилов и увеличение содержания моноцитов в БАЛ относительно показателей у животных с ЛПС-индуцированным воспалением. Применение исследуемого соединения ВМА-21-10 позволило значительно снизить содержание сегментоядерных нейтрофилов и увеличить содержание моноцитов в БАЛ относительно показателей у животных с ЛПС-индуцированным ОПЛ. Таким образом, эффект от применения исследуемого соединения ВМА-21-10 оказался сопоставим с эффектом от применения дексаметазона, при котором наблюдалось снижение воспалительных явлений, проявлявшихся в восстановлении соотношения иммунокомпетентных клеток в БАЛ «сегментоядерные нейтрофилы/моноциты» в сторону увеличения мононуклеаров. На основании вышесказанного, можем констатировать, что изучаемое соединение, как и препарат сравнения устраняли ингибирующее влияния ЛПС на лимфоидный росток кроветворения также снижали миграцию сегментоядерных нейтрофилов в очаг воспаления.

## **5.2 Исследование влияния соединения ВМА-21-10 на показатели белой крови при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких**

В ходе эксперимента по изучению действия соединения ВМА-21-10 и препарата сравнения дексаметазона на процессы лейкопоза у животных с ЛПС-индуцированным ОПЛ была установлена их иммунокорригирующая активность. Оценка проводилась на основании количественно-качественного анализа изменений показателей лейкограммы у животных с ЛПС-индуцированным воспалением.

Через сутки после орофарингеального введения ЛПС у экспериментальных животных при изучении лейкограммы было выявлено статистически значимое увеличение содержания сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с группой интактных животных ( $p < 0,05$ ) на фоне падения содержания лимфоцитов при

нормальном содержании моноцитов у животных во всех экспериментальных группах (Рисунок 9). Данный факт свидетельствует о развитии острого воспалительного процесса. На фоне ЛПС- индуцированной патологии у мышей, получавших препарат сравнения дексаметазон, зафиксировано достоверное снижение общего количества лейкоцитов крови относительно показателей у животных с ОПЛ. По результатам анализа гемограмм, произошло восстановление субпопуляционного состава лейкоцитов крови, проявившееся в стабилизации соотношения «сегментоядерные нейтрофилы/лимфоциты» в сторону увеличения последних.

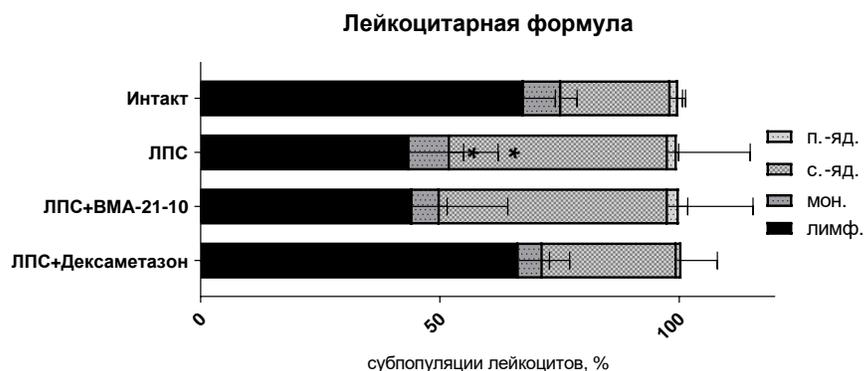
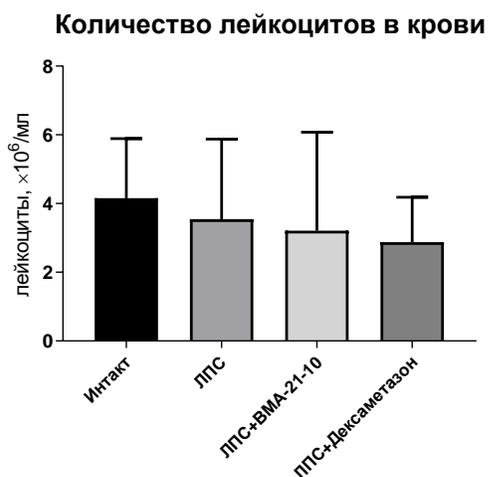


Рисунок 9 - Влияние соединения ВМА-21-10 на содержание лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови у животных с ОПЛ

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,05$ ); п.-яд. – палочкоядерные нейтрофилы; с.-яд. – сегментоядерные нейтрофилы; мон. – моноциты; лимф. – лимфоциты; данные приведены как «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; однофакторный ANOVA.

Таким образом, противовоспалительное действие дексаметазона проявляется в снижении доли зрелых сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с показателями у животных из группы ЛПС, устранении ингибирующего влияния ЛПС на лимфоидный росток кроветворения, а также уменьшении явления гранулоцитарной гиперплазии клеток крови. Соединение ВМА-21-10 не оказывало выраженного лейкопоз-корректирующего действия на показатели белой крови. Со стороны других субпопуляций лейкоцитов патологических изменений не отмечалось, показатели соответствовали значениям у интактных животных.

### **5.3 Изучение влияния соединения ВМА-21-10 на показатель проницаемости легких и секрецию провоспалительных цитокинов при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких**

Через сутки после введения ЛПС животные были выведены из эксперимента для изучения влияния соединения ВМА-21-10 для оценки развития воспалительного процесса и повреждения легких. Противовоспалительное действие оценивали посредством определения секреции провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО $\alpha$  при ЛПС-индуцированном ОПЛ. Как показано на Рисунке 10, введение ЛПС было ассоциировано со значительным повышением уровня ИЛ-6 в бронхоальвеолярном лаваже и плазме крови у животных, напрямую индуцируя воспалительный фенотип иммунокомпетентных клеток. При этом секреция ФНО $\alpha$  через сутки после развития патологии была снижена, что согласуется с данными других авторов [98, 217].

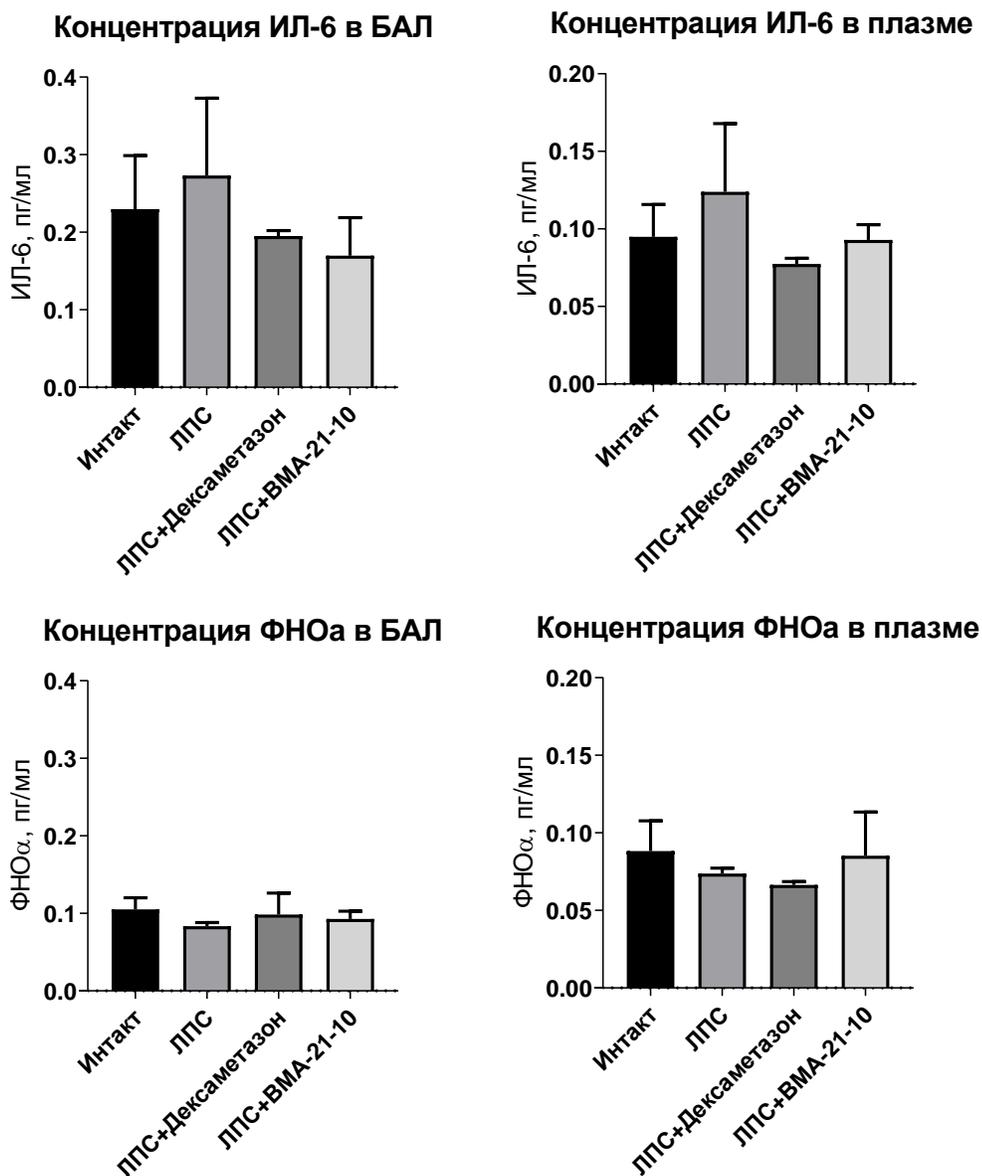


Рисунок 10 - Влияние соединения ВМА-21-10 на уровень цитокинов у животных с ОПЛ

*Примечание:* \* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,05$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными экспериментальным ОПЛ ( $p < 0,05$ ); БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; данные приведены как «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; однофакторный ANOVA.

Развитие острого повреждения легких подтверждается повышением индекса проницаемости альвеолярных сосудов для белков плазмы крови (Рисунок 11). Соединение ВМА-21-10 и дексаметазон нормализовали указанные маркеры воспаления и повреждения легких. В плазме крови уровень ИЛ-6 статистически значимо ниже при сравнении с данным показателем у животных контрольной группы. Показано также, что дексаметазон и соединение ВМА-21-10 предотвращают повышение проницаемости легочных сосудов и препятствуют развитию отека легких. В данном случае концентрация ФНО $\alpha$  как в БАЛ, так и в плазме крови оказалась неинформативным маркером, т.к. пик его секреции приходится на 3–6 ч после введения ЛПС [140] и через 24 ч после введения ЛПС его уровень не отличается от уровня, наблюдаемого у интактных животных.

**Индекс проницаемости легких**

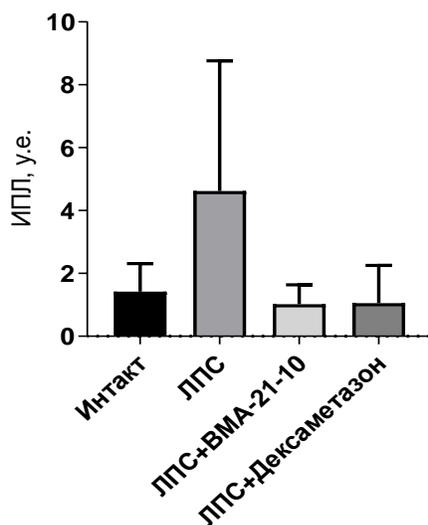


Рисунок 11 - Влияние соединения ВМА-21-10 на проницаемость сосудов альвеол при остром ЛПС-индуцированном повреждении легких.

*Примечание:* данные приведены как «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; однофакторный ANOVA.

#### **5.4 Исследование влияния соединения ВМА-21-10 на морфологические изменения легочной ткани при ЛПС-индуцированном остром повреждении легких<sup>5</sup>**

Степень выраженности патологических изменений в легких при ОПЛ характеризуют специфические для воспалительного процесса морфологические (макроскопические и гистологические) изменения, возникающие у экспериментальных животных в тканях в месте введения ЛПС.

Результаты ИГХ исследования показали, что в легочной ткани интактных животных CD68+ клетки локализовались в адвентициальной оболочке респираторных бронхиол (Рисунок 12 С). Также отдельные иммунопозитивные клетки встречались на поверхности альвеол, в межальвеолярных перегородках и инвазии легких. При введении мышам ЛПС среди клеток в составе инфильтрата в межуточной ткани легкого значительно чаще встречались крупные CD68+ макрофаги, дающие положительную реакцию на специфический маркер CD68, которые чаще располагались в утолщенных стенках и на поверхности альвеол, а также среди клеток инфильтрата (Рисунок 12 С).

---

<sup>5</sup> Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования д.м.н, профессору Смирнову А. В., н.с. Великородной Ю. И.

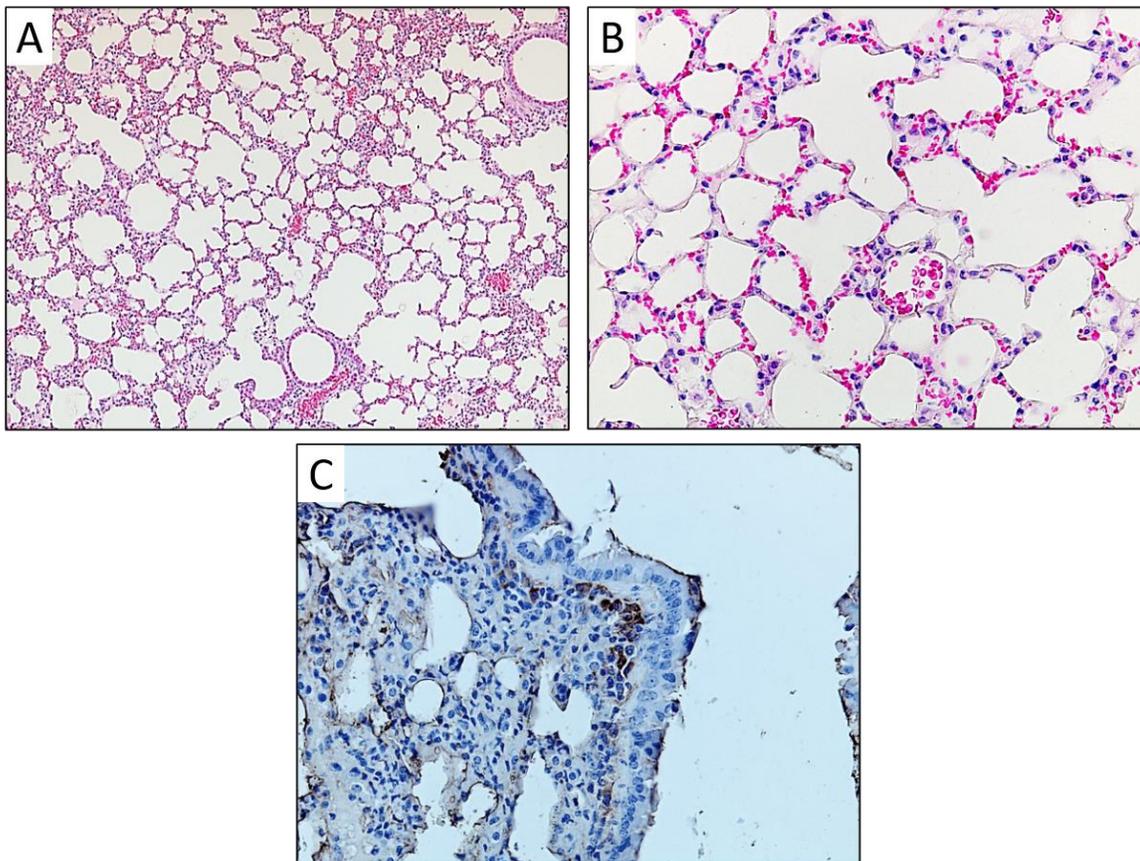


Рисунок 12 - Нормальное гистологическое строение легочной ткани

*Примечание:* Окраска гематоксилин-эозином; А – общее увеличение  $\times 100$ ; В – общее увеличение  $\times 400$ . С – ядра окрашены гематоксилином Майера, антитела к CD68 (ПАП-метод), общее увеличение  $\times 400$ .

Гистологическое исследование легочной ткани мышей через 24 часа после однократного орофарингеального введения ЛПС выявило у всех подопытных животных значительную инфильтрацию полиморфно-ядерными нейтрофилами (ПЯН) межочной ткани легкого, а также наличие гнойного экссудата в просвете альвеол и легочных бронхиол (Рисунок 13 А, В). При этом присутствие большого количества клеток острого воспаления приводило к диффузному повреждению стенок альвеол и интерстициальному отеку, обусловленному застойными ателектазами. При этом если часть альвеолярных стенок значительно утолщалась, то в другой части альвеол, наоборот, отмечалось истончение и перерастяжение

межалвеолярных перегородок (Рисунок 13 А, В). Кроме того, регистрировали утолщение и отек альвеолярных перегородок, явления диапедеза эритроцитов в межалвеолярные перегородки.

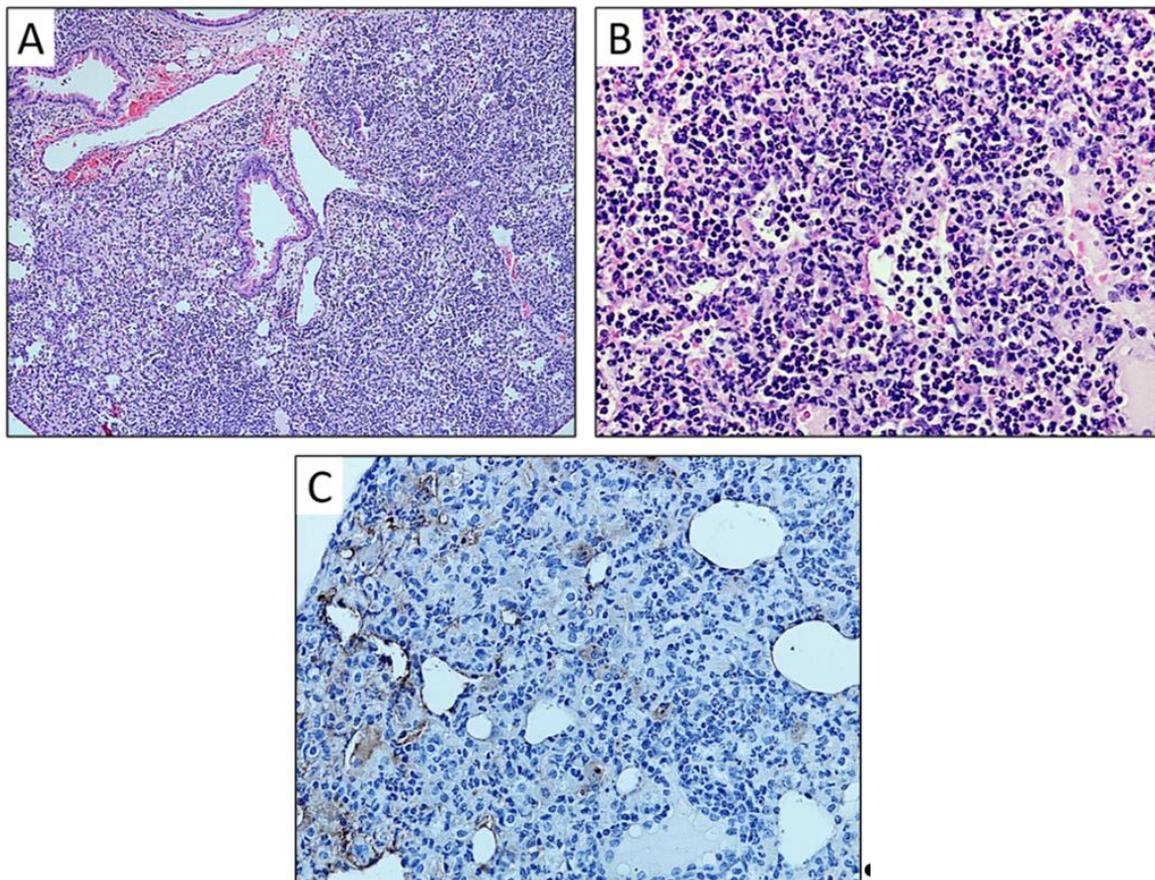


Рисунок 13 - Легочная ткань через 24 часа после орофарингеального введения ЛПС  
Тотальная инфильтрация межуточной ткани легкого полиморфно-ядерными нейтрофилами и гнойный экссудат в просвете альвеол.

*Примечание:* Окраска гематоксилин-эозином; А – общее увеличение  $\times 100$ ; В – общее увеличение  $\times 400$ . С – ядра окрашены гематоксилином Майера, антитела к CD68 (ПАП-метод), общее увеличение  $\times 400$ .

Введение дексаметазона в качестве противовоспалительного агента значительно уменьшало явления воспаления в легочной ткани подопытных мышей. Так, клеточный состав воспалительного инфильтрата был представлен преимущественно альвеолярными макрофагами и макрофагоподобными клетками

(Рисунок 14 В), а утолщение альвеолярных перегородок и межлунный отек, обусловленные преимущественно экссудативным воспалением серозного и серозно-геморрагического характера, были менее выражены (Рисунок 14 А). В составе клеточного инфильтрата редко выявлялись крупные CD68+ клетки, т.е. макрофаги. Кроме того, единичные небольшие CD68+ клетки располагались на поверхности стенок альвеол (Рисунок 14 С).

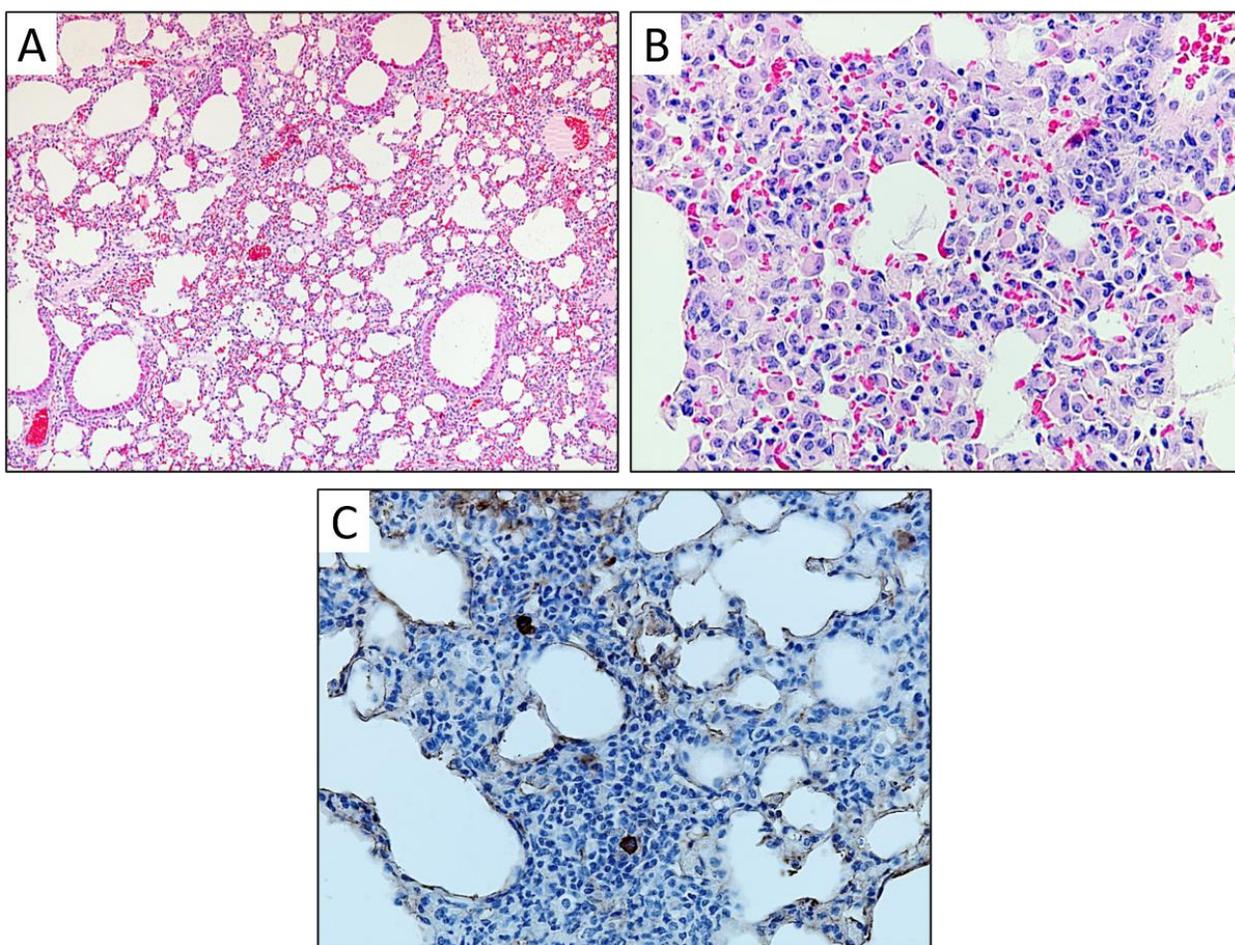


Рисунок 14 - Легочная ткань через 24 часа после введения ЛПС в сочетании с дексаметазоном. Умеренное утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека и скопление макрофагов, и макрофаг-подобных клеток в межлунной ткани легкого  
*Примечание:* Окраска гематоксилин-эозином; А – общее увеличение  $\times 100$ ; В – общее увеличение  $\times 400$ . С – ядра окрашены гематоксилином Майера, антитела к CD68 (ПАП-метод), общее увеличение  $\times 400$ .

Введение соединения ВМА-21-10 эффективно нивелировало явления ЛПС-индуцированного воспаления в легочной ткани подопытных мышей. Так, через 24 часа от начала эксперимента только у двух подопытных животных отмечали очаговую инфильтрацию нейтрофильными лейкоцитами межочной ткани легкого, но без выхода гнойного экссудата в просвет альвеол. Также обращала на себя внимание сохранность структур легочной ткани, особенно альвеолярных перегородок, незначительное утолщение которых и межочный отек были обусловлены преимущественно экссудативным воспалением серозно-геморрагического характера (Рисунок 15 А). В составе инфильтрата встречались единичные CD68+ клетки, которые чаще располагались на поверхности и в стенках альвеол, распределение иммунофенотипических CD68+ макрофагов соответствовало нормальным гистологическим критериям (Рисунок 15 С).

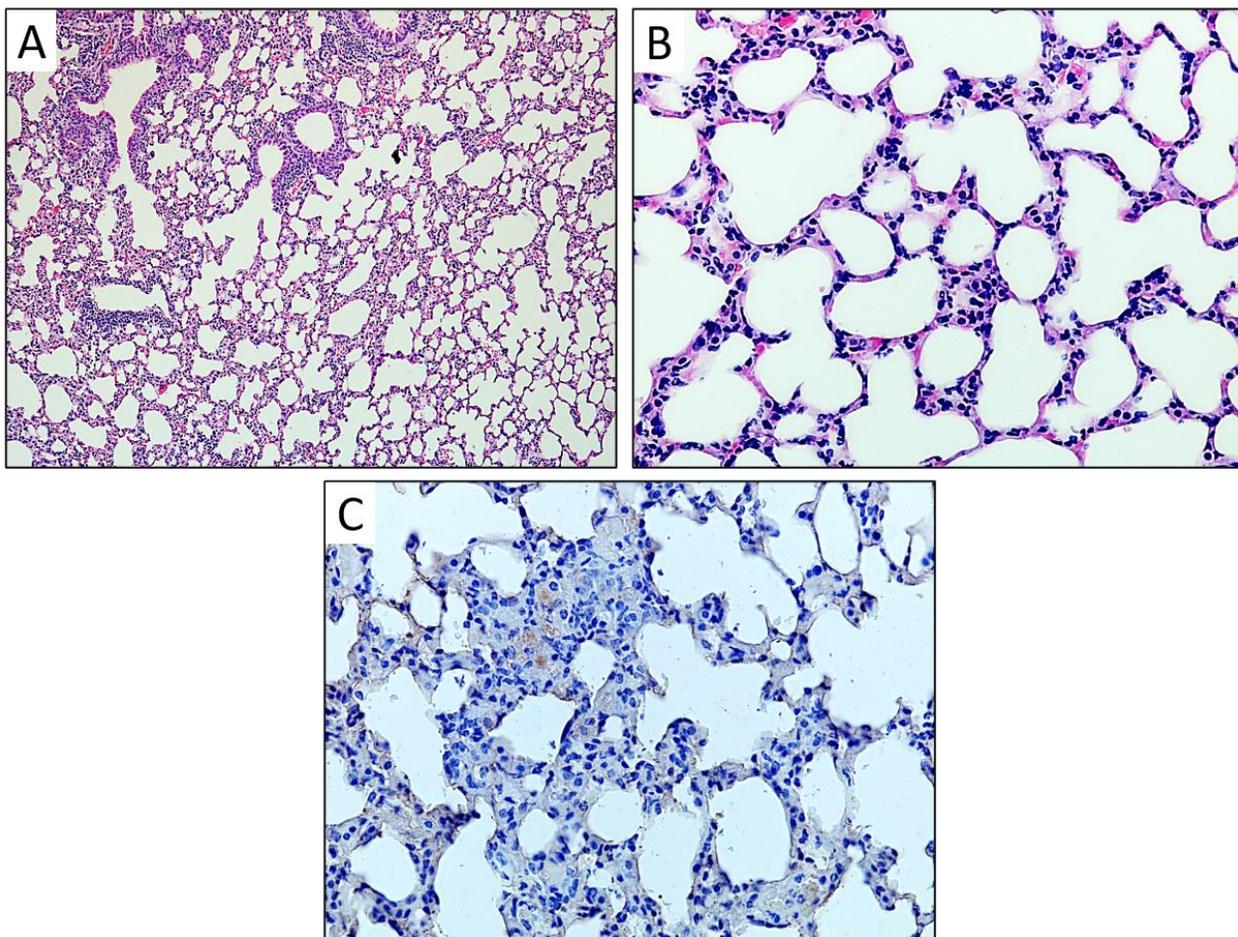


Рисунок 15 - Легочная ткань через 24 часа после введения ЛПС в сочетании с ВМА-21-10. Слабо выраженная инфильтрация ПЯН и серозно-геморрагический отек стенок альвеол.

*Примечание:* Окраска гематоксилин-эозином. Общее увеличение  $\times 100$  (А);  $\times 400$  (В). Антитела к CD68. ПАП-метод. Ядра окрашены гематоксилином Майера. Общее увеличение  $\times 400$  (С).

Обобщенные результаты исследования влияния соединения ВМА-21-10 с противовоспалительным эффектом на коррекцию ЛПС-индуцированного воспаления представлены в Таблице 15.

Таблица 15 - Полуколичественная оценка степени воспаления в легочной ткани

№ п.п.	Группа	Число животных в группе	Степень выраженности воспаления
1.	Контроль	8	0,25 [0;0,25]
2.	ЛПС	6	2,83*** [3;3]
3.	ЛПС + ВМА-21-10	6	0,83## [0,25;1]
4.	ЛПС + Дексаметазон	6	1,33***## [1;1,75]

*Примечание:* \*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,01$ ); \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЛПС-индуцированным ОПЛ ( $p < 0,01$ ); данные представлены в виде «М [Q1;Q3]», где М – медиана, Q1, Q3 – нижний и верхний квартили соответственно.

## 5.5 Заключение

По данным морфологического исследования, оценке содержания лейкоцитов и лейкоцитарной формулы периферической крови, качественного и количественного состава БАЛ было показано, что введение бактериального ЛПС вызывало у мышей развитие очаговой сливной гнойной пневмонии, сопровождавшейся диффузным повреждением межальвеолярных перегородок, их утолщением и накоплением гнойного экссудата в просветах альвеол. Соединение ВМА-21-10 обладало выраженным противовоспалительным действием, вследствие снижения степени

морфологических проявлений острого повреждения легочной ткани, вызванного введением ЛПС. По результатам патоморфологического исследования, ВМА-21-10 не только защищало альвеолы от острого повреждения, но и значительно снижало экссудативные проявления острого воспаления.

Таким образом, полученные в ходе представленной серии экспериментов результаты, свидетельствуют о том, что изучаемое соединение ВМА-21-10 и препарат сравнения дексаметазон способны уменьшать патологические явления, развивающиеся при ЛПС-индуцированном ОПЛ.

## **ГЛАВА 6. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ СОЕДИНЕНИЯ ВМА-13-15 В УСЛОВИЯХ ИММУНОСУПРЕССИИ, ВЫЗВАННОЙ ЦИКЛОФОСФАМИДОМ**

Настоящая глава посвящена изучению иммуномодулирующей активности *N*-замещенного производного хиназолина под лабораторным шифром ВМА-13-15 на модели экспериментальной иммуносупрессии, вызванной циклофосфамидом (ЦФ).

Изучение влияния соединения ВМА-13-15 (в дозе 10 мг/кг/сут) и препарата сравнения полиоксидония (в дозе 200 мг/кг/сут) на гуморальное и клеточные звенья иммунитета осуществляли на основе РПГА и РГЗТ соответственно, а также проводили определение индексов лимфоидных органов, оценку изменений фагоцитарного звена иммунитета, общего количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы.

### **6.1 Влияние соединения ВМА-13-15 на лимфоидный индекс и количество ядродержащих клеток селезенки и тимуса**

Органный коэффициент определяется как отношение массы органа к массе тела. Этот коэффициент может изменяться из-за повреждения органов, например при токсическом действии ксенобиотиков [247]. Лимфоидный индекс (ЛИ) органов иммунной системы характеризует их функциональное состояние. Следовательно, можно говорить о том, что данный показатель отражает состояние иммунной системы организма в целом [161, 248].

Результаты изучения влияния исследуемого соединения на ЛИ селезенки и тимуса и количество ЯСК в них представлены в Таблице 16.

Таблица 16 - Влияние соединения ВМА-13-15 на лимфоидный индекс и количество ядросодержащих клеток в селезенке и тимусе у животных с иммуносупрессией, вызванной циклофосфамидом

№ п.п.	Группа	Лимфоидный индекс селезенки	Количество ЯСК в селезенке $\times 10^5$	Лимфоидный индекс тимуса	Количество ЯСК в тимусе $\times 10^5$
1.	Интакт	4,38 $\pm$ 0,25	1376 $\pm$ 137,19	1,49 $\pm$ 0,13	282,7 $\pm$ 13,09
2.	ЦФ	2,41 <sup>***</sup> $\pm$ 0,18	731,8 <sup>***</sup> $\pm$ 63,91	0,69 <sup>***</sup> $\pm$ 0,6	187,6 <sup>***</sup> $\pm$ 10,66
3.	ЦФ + ВМА-13-15	3,396 <sup>#</sup> $\pm$ 0,23	1126,4 <sup>##</sup> $\pm$ 86,61	1,1 <sup>#</sup> $\pm$ 0,11	231,1 <sup>#</sup> $\pm$ 13,48
4.	ЦФ + Полиоксидоний	3,335 <sup>#</sup> $\pm$ 0,277	1056,7 <sup>##</sup> $\pm$ 56,27	1,28 <sup>###</sup> $\pm$ 0,11	233,5 <sup>#</sup> $\pm$ 10,18

*Примечание:*\*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ); # – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,05$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,01$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

ЛИ селезенки мышей, которым вводили ЦФ, был статистически значимо ( $p < 0,001$ ) ниже на 45 % по сравнению с ЛИ селезенки интактных животных.

Под действием ВМА-13-15 и препарата сравнения полиоксидония наблюдали повышение ЛИ селезенки на 41 % и 38 % соответственно, по сравнению с животными контрольной группы. Эффекты обоих веществ сопоставимы и статистически значимо ( $p < 0,05$ ) превышали показатель в контрольной группе.

В селезенке животных с экспериментальной иммуносупрессией, вызванной введением ЦФ, выявили статистически значимое ( $p < 0,001$ ) уменьшение количества ЯСК на 46% по сравнению с животными интактной группы.

Исследуемое соединение, наряду с препаратом сравнения, приводило к статистически значимому ( $p < 0,01$ ) увеличению числа спленоцитов по сравнению с

мышами, которым вводили ЦФ. Соединения ВМА-13-15 повышало количество спленоцитов на 54%, а полиоксидоний – на 44 %.

Схожие изменения наблюдали со стороны тимуса. ЛИ тимуса мышей контрольной группы статистически значимо ( $p < 0,001$ ) снизился более, чем в 2 раза ниже по сравнению с интактными животными. Под действием как ВМА-13-15, так и полиоксидония, ЛИ тимуса мышей был статистически значимо выше, чем у животных с экспериментальной иммуносупрессией. Исследуемое соединение привело к повышению данного показателя на 59% ( $p < 0,05$ ), а полиоксидоний – на 85% ( $p < 0,001$ ).

Подсчет числа ЯСК в тимусе показал, что у животных, подверженных действию ЦФ, количество тимоцитов было статистически значимо ниже ( $p < 0,001$ ) на 33%, чем у интактных. У животных, которым вводили ВМА-13-15 или полиоксидоний, количество тимоцитов было сопоставимо и на 23–24% выше по сравнению с мышами контрольной группы. Изменения носили статистически значимый характер ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, исследуемое соединение – *N*-замещенное производное хиназолина под шифром ВМА-13-15 – в условиях экспериментальной иммуносупрессии приводит к коррекции пролиферативных процессов в иммунокомпетентных органах.

## **6.2 Влияние исследуемого соединения на общее количество лейкоцитов и их субпопуляций в периферической крови**

Общее количество лейкоцитов и лейкоцитарная формула являются достоверным критерием, позволяющим на ранних этапах оценить развитие функциональных изменений в работе иммунной системы. Изменение общего числа лейкоцитов и морфологический состав их субпопуляций в периферической крови

служит важным индикатором наличия нарушений в работе иммунной системы [143].

На Рисунке 16 представлены результаты эксперимента по изучению влияния соединения ВМА-13-15 на общее количество лейкоцитов у животных с экспериментальной иммуносупрессией, вызванной ЦФ.

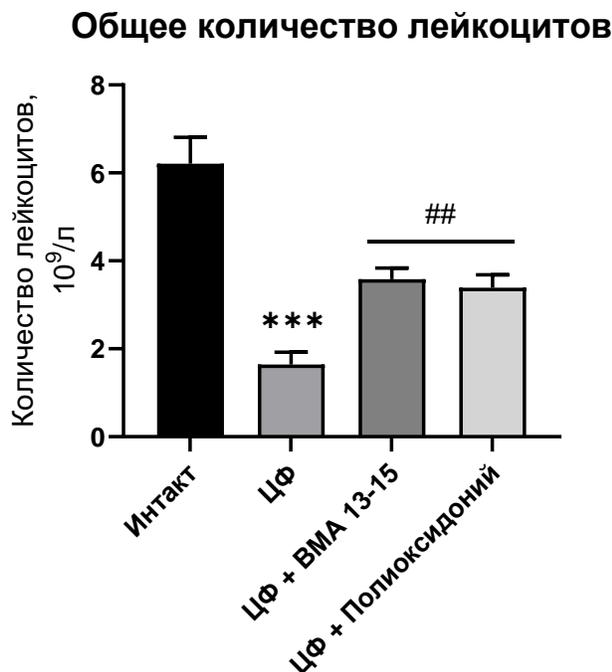


Рисунок 16 - Влияние соединения ВМА-13-15 на общее число лейкоцитов у животных с иммуносупрессией, вызванной циклофосфамидом

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,01$ ); данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

После введения ЦФ общее количество лейкоцитов в периферической крови животных снизилось более чем в 3,5 раза по сравнению с интактными, что было статистически значимо ( $p < 0,001$ ). У мышей, которым на фоне экспериментальной иммуносупрессии вводили ВМА-13-15, число лейкоцитов было почти в 2 раза выше, чем у животных контрольной группы. Действие исследуемого соединения было

сопоставимо действием полиоксидония. Под влиянием препарата сравнения общее число лейкоцитов также выросло почти в 2 раза. В обоих случаях изменения были статистически значимыми ( $p < 0,01$ ).

Результаты изучения влияния ВМА-13-15 на отдельные субпопуляции лейкоцитов в периферической крови в условиях экспериментальной иммуносупрессии представлены в Таблице 17.

Таблица 17 - Влияние соединения ВМА-13-15 на отдельные субпопуляции лейкоцитов в лейкоцитарной формуле у животных с иммуносупрессией, вызванной циклофосфамидом

№ п.п.	Группа	Субпопуляции лейкоцитов (без эозинофилов и базофилов), %			
		Палочкоядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Моноциты	Лимфоциты
1.	Интакт	1,1 ± 0,3	27,3 ± 1,56	6,8 ± 0,57	62,8 ± 1,8
2.	ЦФ	9,9 <sup>***</sup> ± 0,6	39,1 <sup>***</sup> ± 1,43	6 ± 0,91	42,9 <sup>***</sup> ± 1
3.	ЦФ + ВМА 13-15	8,8 ± 0,7	25,9 <sup>###</sup> ± 0,9	8,3 ± 0,82	55,6 <sup>###</sup> ± 1,5
4.	ЦФ + Полиоксидоний	7,3 ± 0,8	26,8 <sup>###</sup> ± 0,73	5,6 ± 0,79	57,8 <sup>###</sup> ± 0,7

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

Изучение отдельных субпопуляций лейкоцитов показало, что действие ЦФ приводило к повышению процентного содержания палочкоядерных нейтрофилов в 9 раз, сегментоядерных почти в 1,5 раза по сравнению с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ). В то же время, процент лимфоцитов снизился почти в 1,5 раза относительно интактных животных ( $p < 0,001$ ). Несмотря на снижение, статистически значимого влияния на содержание моноцитов ЦФ не оказывал ( $p > 0,05$ ).

Действие ВМА-13-15 приводило к частичному восстановлению субпопуляционного состава лейкоцитарной формулы, что проявлялось в снижении процентного числа сегментоядерных нейтрофилов в 1,5 раза по сравнению с животными контрольной группы, а также повышению содержания лимфоцитов до 55,6% (у животных контрольной группы данный показатель составлял 42,9%). Данные изменения были статистически значимыми ( $p < 0,001$ ). На фоне экспериментальной иммуносупрессии ВМА-13-15 статистически значимо не влиял на субпопуляцию палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов ( $p > 0,05$ ), хотя со стороны последних и наблюдали заметное повышение процентного числа как относительно контрольных, так и интактных животных.

На фоне экспериментальной иммуносупрессии полиоксидоний также приводил к статистически значимому ( $p < 0,001$ ) снижению процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов почти в 1,5 раза по сравнению с животными контрольной группы. Субпопуляция лимфоцитов статистически значимо ( $p < 0,001$ ) увеличилась до 57,8%. Примечательно, что в отличие от исследуемого соединения препарат сравнения практически не оказывал влияния на содержание моноцитов, но существенно снижал содержание палочкоядерных нейтрофилов, хотя в обоих случаях статистически значимых различий по сравнению с животными контрольной группы обнаружено не было ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, исследуемое соединение ВМА-13-15 оказывает иммунокорригирующее влияние за счет действия на процессы лимфопоэза, что проявляется в частичном восстановлении процентного соотношения субпопуляций лейкоцитов.

### **6.3 Влияние исследуемого соединения на гуморальный иммунный ответ**

Влияние исследуемого соединения на функциональную активность гуморального звена иммунитета в условиях экспериментальной патологии

оценивали посредством определения титра антител в РПГА. Результаты представлены на Рисунке 17.

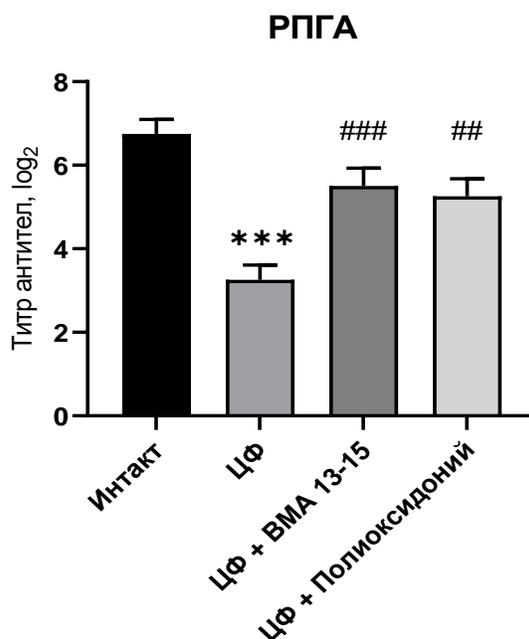


Рисунок 17 - Влияние соединения ВМА-13-15 на гуморальное звено иммунитета у животных с иммуносупрессией, вызванной циклофосфамидом

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной патологией ( $p < 0,01$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

В условиях иммуносупрессии, вызванной ЦФ, наблюдали статистически значимое ( $p < 0,001$ ) снижение титра АТ на 51% по сравнению с интактными животными. Аналогично препарату сравнения, действие ВМА-13-15 сопровождалось повышением титра АТ. По сравнению с мышами контрольной группы данный показатель был статистически значимо выше на 68 ( $p < 0,001$ ) и 61% ( $p < 0,01$ ) после введения исследуемого соединения и полиоксидония, соответственно.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что ВМА-13-15 оказывает выраженное действие на гуморальное звено иммунного ответа, повышая синтез АТ.

#### 6.4 Влияние исследуемого соединения на клеточный иммунный ответ

Действие соединения ВМА-13-15 на клеточное звено иммунитета оценивали по интенсивности РГЗТ у животных с экспериментальной иммуносупрессией.

По результатам, представленным на Рисунке 18, введение ЦФ вызвало существенное угнетение клеточного звена иммунитета, что выразалось в статистически значимом ( $p < 0,001$ ) уменьшении индекса РГЗТ более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными.

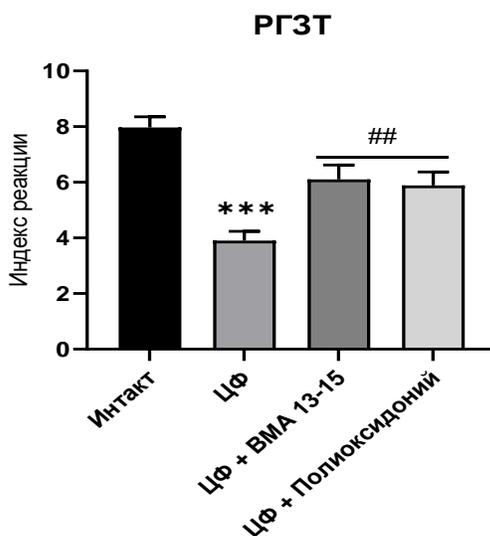


Рисунок 18 - Влияние соединения ВМА-13-15 на клеточное звено иммунитета у животных с иммуносупрессией, вызванной циклофосфамидом

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ); ## – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,01$ ); данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

Действие ВМА-13-15, также как и препарата сравнения, сопровождалось статистически значимым ( $p < 0,01$ ) повышением индекса РГЗТ. По сравнению с контрольными животными исследуемое соединение повышало данный показатель на 56%, а полиоксидоний – на 48%.

Полученные результаты свидетельствуют об иммунокорригирующем действии *N*-замещенного производного хиназолина под лабораторным шифром ВМА-13-15 посредством воздействия на клеточное звено иммунитета.

### **6.5 Влияние исследуемого соединения на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови**

Изучение фагоцитарной активности в настоящее время считается одним из основных критериев оценки состояния врожденного иммунитета. Различные нарушения фагоцитарной активности существенным образом ослабляют всю систему неспецифической резистентности. Определение функциональной активности нейтрофилов проводили с целью комплексной оценки нарушений неспецифической резистентности организма и потенциальной возможности их коррекции исследуемыми соединениями в экспериментальных условиях.

Результаты оценки влияния соединения ВМА-13-15 на фагоцитарную активность нейтрофилов в условиях экспериментальной иммуносупрессии представлены в Таблице 18.

Таблица 18 - Влияние соединения ВМА-13-15 на фагоцитарную активность нейтрофилов животных с иммуносупрессией, вызванной циклофосфамидом

№ п.п.	Группа	Фагоцитарная активность, % ( $M \pm SD$ )	Фагоцитарное число, ед. ( $M \pm SD$ )
1.	Интакт	$71,5 \pm 1,52$	$8,99 \pm 0,14$

2.	ЦФ	37,1 <sup>***</sup> ± 1,44	3,62 <sup>***</sup> ± 0,11
3.	ЦФ + ВМА 13-15	63,3 <sup>###</sup> ± 3,68	7,84 <sup>###</sup> ± 0,66
4.	ЦФ + Полиоксидоний	59,4 <sup>###</sup> ± 4,28	6,45 <sup>###</sup> ± 0,33

*Примечание:* \*\*\* – статистически значимые различия при сравнении с животными интактной группы ( $p < 0,001$ ); ### – статистически значимые различия при сравнении с животными с ЦФ-индуцированной иммуносупрессией ( $p < 0,001$ ); данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение»; ANOVA с пост-тестом Данна.

Введение ЦФ способствовало статистически значимому ( $p < 0,001$ ) снижению ФА и ФЧ нейтрофилов в 2 и 2,5 раза соответственно по сравнению с интактными животными.

На фоне экспериментальной иммуносупрессии у животных, получавших ВМА-13-15, ФА была статистически значимо ( $p < 0,001$ ) выше почти в 2 раза выше, чем у животных контрольной группы. Показатель ФЧ также был статистически значимо ( $p < 0,001$ ) выше более, чем в 2 раза по сравнению с контрольными животными.

Похожим образом действовал препарат сравнения. Полиоксидоний, как и соединение ВМА-13-15 повышал ФА практически в 2 раза по сравнению с ФА животных с экспериментальной патологией. ФЧ на фоне введения полиоксидония также повышалось: данный показатель был выше в 1,7 раз, чем у мышей контрольной группы. Изменения были статистически значимыми ( $p < 0,001$ ).

Полученные результаты свидетельствуют об иммуностимулирующем влиянии производного хиназолина под лабораторным шифром ВМА-13-15 на неспецифическую резистентность организма в условиях вызванной ЦФ иммуносупрессии.

## 6.6 Заключение

Селезенка и тимус являются наиболее важными органами периферической иммунной системы у млекопитающих, в частности, у человека. В проведенном

эксперименте уменьшение ЛИ этих органов, в том числе за счет снижения количества ЯСК, указывало на угнетение пролиферации и активации иммунокомпетентных клеток, а также их миграции в системный кровоток. Эти события, по-видимому, являлись причиной уменьшения общего числа лейкоцитов и изменения процентного состава их субпопуляций. Кроме того, существенное понижение показателей ФА и ФЧ свидетельствовало о ухудшении неспецифической резистентности организма. Снижение индекса РГЗТ указывало на угнетение клеточного звена иммунного ответа, в то время как низкие титры АТ в РПГА свидетельствовали об угнетении гуморального звена. Полученные результаты служат подтверждением тому, что ЦФ обладает выраженным иммуносупрессивным действием.

В условиях экспериментальной иммуносупрессии ВМА-13-15 наряду с препаратом сравнения проявлял выраженное иммуностимулирующее действие, предположительно, за счет активации лимфопоэза. Следствием этого является увеличение ЛИ селезенки и тимуса, которое, вероятно, происходило из-за увеличения ЯСК в них, а также повышение общего числа лейкоцитов, сопровождавшееся частичным восстановлением процентного соотношения их субпопуляций. Увеличение значений ФА и ФЧ указывало на повышение неспецифической резистентности организма. Дополнительно, полученные результаты свидетельствуют о способности исследуемого соединения улучшать работу клеточного звена иммунитета, что выражалось в повышении индекса РГЗТ у животных с экспериментальной иммуносупрессией. Также на фоне экспериментальной патологии наблюдали улучшение состояния гуморального звена иммунного ответа, проявлявшееся в повышении титра АТ в РПГА. Следует отметить, что более выраженно ВМА-13-15 действовал на гуморальное звено.

Таким образом, исследуемое соединение обладает иммунокорригирующим действием в условиях экспериментальной иммуносупрессии, вызванной ЦФ.

## ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ литературных данных свидетельствует о высокой фармакологической активности различных производных хиназолина и, в частности, их иммуотропном действии [27, 28, 44, 54, 64, 124]. Поэтому мы сочли целесообразным провести скрининг веществ с иммуотропным действием в ряду производных на основе хиназолинового каркаса.

**На первом этапе диссертационного исследования** был проведен скрининг 25 новых *N*-замещенных производных хиназолина на наличие иммуотропной активности. Скрининговое исследование было проведено *in vitro* с использованием перитонеальных нейтрофилов и макрофагов.

Клетки моноцитарно-макрофагальной системы являются ключевыми в сохранении и поддержании иммунного гомеостаза при различных патологических состояниях, сопровождающихся изменением реактивности иммунной системы (иммуносупрессия и воспалительный ответ). Одним из главных инициаторов воспаления в клетках данной системы является транскрипционный ядерный фактор NF-κB. Сигнальный путь NF-κB, активированный неспецифическими лигандами, в частности, липополисахаридом бактериальной стенки *E. coli* через вовлечение TLR2 и TLR4, приводит к усиленной транскрипции генов, ответственных за экспрессию провоспалительных цитокинов, и ряда других медиаторов воспалительного ответа [46]. Среди которых, важную роль играет избыточная продукция оксида азота в результате активации гена экспрессии iNOS, в основном регулируемая NF-κB [52] В качестве скринингового теста на продукцию оксида азота мы использовали методику, основанную на определении нитритов в среде культивирования [146]. По результатам исследования выявлен ряд соединений под лабораторным шифром ВМА (ВМА-13-15, ВМА-21-10, ВМА-21-11, ВМА-21-12, ВМА-21-14, ВМА-21-16, ВМА-21-22, ВМА-21-23 и ВМА-21-24), статистически значимо подавляющих продукцию NO в концентрации 100 мкМ.

Параллельно с определением влияния соединений на продукцию NO изучали их цитотоксичность в концентрации 100 мкМ по истечении 24 ч посредством МТТ-теста в культуре ПМ. Данный метод прост в использовании, дает воспроизводимые результаты [220] и прекрасно подходит для скрининговых исследований.

Активные формы кислорода (АФК) – супероксидный анион-радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород, образующиеся в результате активации НАДФН-зависимой оксидазы обладают мощным окислительным и антимикробным действием, определяющим в значительной степени цитостатическое и цитотоксическое действие нейтрофилов [60]. Следует отметить, что адгезия нейтрофила с микробной клеткой не только служит спусковым механизмом для последующих стадий фагоцитоза, но и инициирует ряд метаболических сдвигов, характеризующих процесс активации нейтрофила. Изменения структуры цитоплазматической мембраны, развивающиеся при взаимодействии нейтрофила с микроорганизмом, инициируют в них характерную цепь биохимических реакций, сопровождающихся образованием АФК – «респираторный взрыв», который через активацию НАДФН-оксидазы приводит к образованию супероксид-аниона и других высокореактивных метаболитов с целью дезинтеграции поглощенного инфекционного агента [86, 111]. Следовательно, по интенсивности продукции АФК можно судить о функциональной способности клеточного компонента системы неспецифической резистентности организма. Одним из высокочувствительных методов регистрации кислородных метаболитов является измерение люминолзависимой хемилюминесценции [182], что представляет собой важное звено в оценке функциональной способности фагоцитарных клеток. Для скринингового теста на выявление АФК мы использовали методику, основанную на зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов [149]

В результате изучения влияния исследуемых соединений на функциональную активность нейтрофилов методом спонтанной и индуцированной хемилюминесценции были установлены соединения-лидеры с разнонаправленным типом активности. Ингибирующая активности на продукцию АФК была выявлена у соединений ВМА-21-10, ВМА-21-11, ВМА-21-16 и ВМА-21-23. В то время как соединения ВМА-13-15 и ВМА-13-17 стимулировали продукцию АФК. Разнонаправленность эффектов, вероятно, была связана со структурными различиями фрагментов гуанидина в базовом скаффолде исследуемых соединений.

Изучение влияния исследуемых соединений-лидеров (по результатам ингибирования продукции NO и подавление образования АФК) на жизнеспособность клеток проводилось на культуре ПМ мышей [199] с использованием комбинации методов оценки клеточной цитотоксичности: МТТ-теста [127] и анализа высвобождения ЛДГ [153]. После совместной 72-часовой инкубации клеток с исследуемыми веществами в конечных концентрациях 0,1, 1, 10 и 100 мкМ оценивали жизнеспособность клеток вышеперечисленными методами. В основе МТТ-теста лежит измерение активности митохондриальных дегидрогеназ, которая отражает метаболическую активность живых клеток, посредством восстановления этими ферментами 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромида (МТТ) до формазана [152].

Многочисленные исследования показали, что ИЛ-6 является одним из основных провоспалительных цитокинов, играющих важную роль в развитии заболеваний различной этиологии, при которых ведущую роль в патогенезе играет воспаление [224]. В рамках диссертационного исследования определение уровня ИЛ-6 было использовано нами в качестве дополнительного биомаркера для соединений-лидеров, продемонстрировавших ингибирование продукции NO и синтеза АФК, при отсутствии цитотоксичности *in vitro*. В нашем случае данным требованиям отвечало соединение ВМА-21-10. По результатам исследования ВМА-

21-10 достоверно, наряду с дексаметазоном, подавляет продукцию ИЛ-6, что свидетельствует о наличии выраженных противовоспалительных свойств у этого соединения.

На завершающем этапе скрининга нами была проведена оценка влияния соединений-лидеров ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на показатели фагоцитарной активности. Было показано, что после 24-часовой инкубации ВМА-21-10 проявил небольшое, но статистически значимое подавление фагоцитарного числа (менее выраженное, чем у дексаметазона). Соединение ВМА-13-15 повысило фагоцитарный индекс и фагоцитарное число, что свидетельствует о его стимулирующем влиянии на показатели фагоцитарной активности. На основании полученных данных нами были проведены дополнительные исследования соединения ВМА-13-15, для выяснения механизма стимулирующего действия на фагоцитарную активность ПМ. Люминесцентная микроскопия фагоцитирующих макрофагов позволила установить статистически значимое повышение их лизосомальной и киллинговой активности, что коррелирует с гиперпродукцией АФК ПН, чем и объясняется стимулирующее влияние на фагоцитарную активность.

По завершении скрининга новых *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими заместителями были выявлены соединения-лидеры под лабораторными шифрами ВМА-13-15 и ВМА-21-10, проявившие выраженные иммуностропные свойства с разной направленностью в тестах *in vitro*: ВМА-13-15, обладает выраженным стимулирующим действием на продукцию АФК ПН, статистически значимо повышает показатели фагоцитарной активности ПМ при незначительном ингибировании продукции NO. Соединение ВМА-21-10, напротив демонстрирует выраженные ингибирующие свойства на продукцию NO и ИЛ-6 ПМ и генерацию АФК ПН, при незначительном снижении показателей фагоцитарной активности. Следует отметить, что оба соединения-лидера не оказывают

цитотоксическое действие в культуре ПМ в двух тестах, в широком диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ, в зависимости от времени экспозиции 24–72 ч.

После выявления наиболее активных производных хиназолина было проведено исследование их иммунокорректирующего действия на экспериментальных моделях нарушений функционирования иммунной системы с учетом характера их иммуотропных свойств (ингибирование или активация иммунных реакций) выявленных на этапе скрининга, а именно избыточной активации иммунного ответа (на системном и органном уровне) и иммуносупрессии.

**Второй этап диссертационного исследования** был посвящен изучению влияния новых *N*-замещенных производных хиназолина под лабораторными шифрами ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на состояние иммунной системы в условиях системного воспаления, вызванного ЛПС.

Воспаление представляет собой совокупность биохимических реакций, которая опосредует защиту организма и отражает его ответ на различные стимулы, инициируя процессы элиминации повреждающего фактора и заживления тканей [101]. Обычно во время острых воспалительных реакций клеточные и молекулярные события и взаимодействия эффективно минимизируют повреждение, активируют хемотаксис лейкоцитов из системного кровотока в очаги воспаления. Активированные лейкоциты продуцируют цитокины, являющиеся регуляторами воспалительной реакции [132]. Однако избыточная активация сигнальных каскадов иммунного ответа связана с развитием различных патологических состояний [162].

Ядерный фактор транскрипции NF-κB является центральным участником модуляции экспрессии многих иммунорегуляторных медиаторов, вовлеченных в важные физиологические и патологические процессы, включая воспаление, иммунные реакции и др. [215, 218, 225]. Сигнальные пути, инициированные бактериальным ЛПС или рецепторами цитокинов (ФНОα и ИЛ-1), через TLR2 и

TLR4, приводят к накоплению в ядре NF-κB и усилению транскрипции генов, ответственных за экспрессию цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, факторов апоптоза и других медиаторов воспалительного ответа [173]. В свою очередь активация NF-κB стимулирует экспрессию ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНОα и других провоспалительных цитокинов [155, 173]. Поскольку NF-κB регулирует экспрессию медиаторов, играющих ключевую роль при системном воспалении, возможности его ингибирования представляют интерес при разработке новых лекарственных средств [205, 213].

В рамках диссертационного исследования уровень экспрессии транскрипционного ядерного фактора NF-κB определяли в спленocyтах экспериментальных животных после курсового введения исследуемых субстанций при ЛПС-индуцированном системном воспалительном ответе. На фоне экспериментальной патологии наблюдали значительное повышение активации NF-κB, что свидетельствовало об интенсивности воспалительного процесса [165]. Препарат сравнения (дексаметазон) приводил к достоверному ( $p < 0,01$ ) снижению активации транскрипционного фактора до уровня сопоставимого с измеренным у интактных животных. По литературным данным, дексаметазон способен подавлять активацию NF-κB [67, 83], что согласуется с полученными нами результатами. Исследуемые соединения наряду с препаратом сравнения приводили к статистически значимому ( $p < 0,01$ ) снижению экспрессии NF-κB в спленocyтах экспериментальных животных. Действие ВМА-13-15 сопровождалось снижением уровня NF-κB в спленocyтах крыс на 40%, а ВМА-21-10 – на 35% относительно животных с экспериментальной патологией. Полученные результаты дают основание полагать, что исследуемые соединения ингибируя экспрессию NF-κB, по-видимому, приводят к снижению экспрессии провоспалительных медиаторов при системном воспалении.

С целью подтверждения этого предположения нами было проведено исследование секреции ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 как ключевых цитокинов, регулирующих иммунные взаимодействия и находящихся под транскрипционным контролем NF- $\kappa$ B [140, 205, 213]. Следовательно, они могут служить надежным критерием оценки интенсивности воспалительного процесса, а также эффективности проводимой терапии при остром и хроническом воспалении [147]. В условиях экспериментального системного воспалительного ответа наблюдали повышение секреции ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ . В сыворотке крыс с ЛПС-индуцированной патологией дексаметазон приводил к снижению концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ . Схожее действие оказывали исследуемые соединения. На фоне экспериментальной патологии действие ВМА-13-15 и ВМА-21-10 сопровождалось снижением уровня исследуемых цитокинов.

Таким образом, *N*-замещенные производные хиназолина под лабораторными шифрами ВМА-13-15 и ВМА-21-10 в условиях ЛПС-индуцированной патологии привели к снижению концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ , которое характеризуется редукцией их синтеза макрофагами, моноцитами, естественными киллерами и лимфоидными дендритными клетками [243]. Этот факт позволяет судить о том, что противовоспалительное действие исследуемых соединений реализуется за счет восстановления цитокиновой регуляции, которая опосредует взаимодействие компонентов системы иммунитета между собой.

Как уже было упомянуто, пролиферация, активация и миграция иммунокомпетентных клеток необходима для реализации иммунного ответа. Поэтому для комплексной оценки этих процессов нами была использована совокупность методов.

Показатели лимфоидного индекса ЛИ и содержания ЯСК (лимфоцитов) в селезенке характеризуют ее функциональное состояние. Эти параметры представляют интерес, поскольку селезенка является одним из главных

периферических органов иммунной системы и выполняет ряд важных функций. Показатель ЛИ позволяет судить о процессах активации, пролиферации, апоптоза спленоцитов и их миграции в системный кровоток под влиянием различных факторов, среди которых воздействие эндогенных и экзогенных биологически активных веществ, например кортикостероидов [174] или ЛПС [249]. Кроме того, величина ЛИ селезенки прямо коррелирует с продукцией антител [94]. Следовательно, данные параметры являются косвенными критериями оценки функционального состояния иммунной системы [7].

Введение ЛПС сопровождалось повышением ЛИ. Эти результаты коррелировали с результатами, полученными при подсчете ЯСК. Действие ЛПС приводило к увеличению числа ЯСК. В основе наблюдаемых изменений лежит, с одной стороны, избыточная пролиферация лимфоцитов и массивная стимуляция синтеза цитокинов [186], с другой – снижение массы тела животных под воздействием ЛПС [249]. Курсовое введение исследуемых соединений ВМА-13-15 и ВМА-21-10 привело к снижению ЛИ и ЯСК.

На фоне введения дексаметазона наблюдали выраженное снижение ЛИ в 2 раза по сравнению с ЛИ животных, которым вводили ЛПС ( $p < 0,001$ ) и в 1,5 раза по сравнению с интактными животными. Также дексаметазон приводил к снижению числа ЯСК в 4 раза по сравнению с животными, получавшими ЛПС ( $p < 0,001$ ) и в 2 раза – по сравнению с интактными животными. Полученные результаты свидетельствуют о том, что дексаметазон существенно снижает функциональную активность лимфоцитов и даже оказывает иммуносупрессивное действие, что подтверждается многочисленными исследованиями [61, 133, 168, 174].

В условиях ЛПС-индуцированной патологии *N*-замещенные производные хиназолина оказывают корригирующее действие в отношении иммунопролиферативных процессов в селезенке. При этом исследуемые соединения не обладают выраженными иммуносупрессивными свойствами.

Динамика иммунопролиферативных процессов также исследовалась нами посредством оценки показателей белой крови. Общее число лейкоцитов и процентное соотношение их субпопуляций (лейкоцитарная формула) и их изменение являются достаточно достоверным критерием, позволяющим на ранних этапах оценить развитие функциональных изменений в работе иммунной системы в ответ на действие провоспалительных стимулов, в частности, бактериального ЛПС и ксенобиотиков [143].

Лейкоцитоз считается индикатором интенсивности развития и степени тяжести воспалительного процесса [78] и сопряжен с усилением процессов миело- и лимфопоэза в костном мозге [183]. При активации иммунного ответа на введение бактериального ЛПС было отмечено увеличение общего числа лейкоцитов в периферической крови. Изучение субпопуляционного состава лейкоцитов показало, что при сравнении с интактными животными введение бактериального ЛПС приводило к статистически повышению содержания сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и понижению процентного содержания моноцитов. Обильное присутствие нейтрофилов и лимфоцитов связано с повышенной продукцией хемокинов и хемоаттрактантных факторов иммунными клетками, а снижение числа моноцитов в связи с этим может быть обусловлено их миграцией в ткани [80]. При введении ВМА-13-15 и ВМА -21-10 общее число лейкоцитов снизилось, что было схоже с эффектом дексаметазона. Введение как соединения ВМА-13-15, так и ВМА-21-10 снижало процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов и повышало содержание лимфоцитов. В то же время, соединение ВМА-21-10 не влияло на процентное содержание моноцитов. Введение дексаметазона на фоне ЛПС-индуцированной патологии сопровождалось восстановлением общего числа лейкоцитов до значений, сопоставимых с полученными у интактных животных. Однако при исследовании субпопуляционного состава нами были выявлены изменения, выразившиеся в повышении процентного числа сегментоядерных

нейтрофилов. Под действием дексаметазона наблюдали снижение субпопуляции. Процентное содержание лимфоцитов в периферической крови крыс, получавших дексаметазон, было ниже, чем у контрольных животных и ниже, чем у интактных животных. Эффекты ВМА-13-15 и ВМА-21-10 на данной экспериментальной модели были сопоставимы с действием дексаметазона.

Полученные результаты не противоречат результатам исследования функционального состояния селезенки, проведенного нами ранее, и позволяют сделать вывод о наличии иммуносупрессивного эффекта у дексаметазона, опосредованного также за счет изменения количественного изменения состава циркулирующих лейкоцитов, что согласуется с существующими литературными данными [133, 168, 187]. В то же время, наблюдаемая нормализация гематологических показателей белой крови под действием исследуемых соединений может свидетельствовать о наличии у них корригирующего действия в отношении процессов миело- и лимфопоэза без выраженного иммуносупрессивного действия.

Наряду с определением количественного состава, оценка функциональной активности иммунокомпетентных клеток является важным критерием, позволяющим получить представление о работе иммунной системы. Определение функциональной активности нейтрофилов проводили с целью комплексной оценки нарушений неспецифической резистентности организма и потенциальной возможности их коррекции исследуемыми соединениями в экспериментальных условиях. В нашей работе были использованы подходы, широко применяющиеся как в эксперименте, так и в клинической практике: исследование фагоцитарной (поглощительной и переваривающей) активности и кислородзависимого метаболизма (кислородзависимые антиинфекционные системы) нейтрофилов периферической крови [12, 18].

Введение ЛПС повышало индекс активации нейтрофилов (ИАН) в зимозан-индуцированном и спонтанном НСТ-тесте. В условиях экспериментальной

патологии, вызванной введением ЛПС, зафиксировали повышение фагоцитарной активности нейтрофилов и увеличение ФЧ. У животных с ЛПС-индуцированной патологией ВМА-13-15 приводил к снижению ИАН в зимозан-индуцированном и спонтанном НСТ-тесте по сравнению с ИАН у животных, получавших ЛПС. Схожий эффект наблюдали у крыс с экспериментальной патологией, которым вводили ВМА-21-10. Под влиянием исследуемых соединений ФА и ФЧ нейтрофилов периферической крови снизилась до значений, сравнимых с измеренными у крыс интактной группы.

Введение препарата сравнения дексаметазона на фоне экспериментального воспалительного ответа сопровождалось значительным снижением функциональной активности нейтрофилов. Угнетение процесса фагоцитоза под действием дексаметазона является также одним из аспектов его иммуносупрессивного действия [181, 189], что проявлялось в существенном снижении ИАН. В зимозан-индуцированном НСТ-тесте снижение ИАН произошло у крыс контрольной группы, а в спонтанном НСТ-тесте. Примечательно, что под действием дексаметазона ИАН был ниже, чем у интактных животных в зимозан-индуцированном и спонтанном НСТ-тесте, соответственно. Действие дексаметазона также способствовало существенному снижению ФА как по сравнению с животными контрольной, так и интактной группы. Под действием препарата сравнения ФА была ниже по сравнению с контрольными и интактными животными. Схожим образом дексаметазон снижал ФЧ: данный показатель был снижен по сравнению с контрольными животными и интактными.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что новые производные хиназолина нормализуют функциональную активность нейтрофилов периферической крови, не угнетая процесс фагоцитоза в отличие от дексаметазона. Тот факт, что под влиянием дексаметазона, индуцированный введением ЛПС нейтрофилез, не сопровождался повышением функциональной активности

нейтрофилов, а сопровождался ее угнетением (в тесте на фагоцитарную активность), объясняется стабилизацией клеточных мембран и мембран органелл (особенно лизосомальных). Это свойство дексаметазона делает весьма ограниченным его применение при инфекционных и паразитарных заболеваниях. Таким образом несмотря на то, что изучаемые соединения уступают дексаметазону по спектру иммуностропной активности, но не оказывают негативного влияния на функциональность клеточного звена неспецифической резистентности организма.

Индукцибельная синтаза оксида азота является одной из трех изоформ фермента, участвующих в продукции NO у млекопитающих. В отличие от других изоформ она экспрессируется макрофагами (прежде всего) и другими клетками организма только в ответ на воспалительные стимулы (бактериальный ЛПС, провоспалительные цитокины и др.). Генерируемый NO представляет собой свободный радикал, в физиологических условиях являющийся молекулой-мессенджером, которая опосредует различные функции: вазодилатация, нейротрансмиссия, антимикробная и противоопухолевая защита и др. [79]. Под воздействием экзогенных факторов высокий уровень экспрессии iNOS приводит к избыточной продукции NO, который взаимодействует с другими свободными радикалами, такими как супероксид, с образованием вторичных метаболитов, пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ). Последний способен влиять на функцию ферментов посредством их окисления или нитрования, индуцирует повреждение клеток путем перекисного окисления липидов и нарушает работу митохондриальных ферментов, что приводит к митохондриальной дисфункции, вызывая системные повреждения [156, 232]. Также образующиеся АФК могут активировать NF-κB, который является редокс-чувствительным фактором транскрипции. Активация NF-κB, как было упомянуто выше, приводит к увеличению продукции провоспалительных цитокинов и активации нисходящих регуляторных звеньев иммунного ответа. По результатам

исследования, введение ЛПС приводило к повышению iNOS в сыворотке животных более чем в 2 раза по сравнению с интактными ( $p < 0,0001$ ).

На фоне введения исследуемых соединений наблюдали снижение концентрации iNOS, причем данный показатель был сопоставим со значениями, определенными в сыворотке интактных животных.

По полученным данным можно сделать вывод, что исследуемые соединения могут подавлять активность iNOS и, как следствие, снижать уровень АФК, что может влиять на активацию NF-κB. Таким образом, представляется возможным рассматривать ингибирование iNOS в качестве предполагаемого механизма иммуномодулирующего действия. Samacho et al. (2016) продемонстрировали способность некоторых производных хиназолина ингибировать iNOS, причем исследованные соединения обладали высокой селективностью [64].

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) образуются из антител, антигена и компонентов комплемента в ответ на попадание в организм чужеродного агента и циркулируют в кровяном русле. Образование ЦИК – физиологический механизм защиты, приводящий к быстрому удалению эндогенных и экзогенных антигенов (вирусы, паразиты, бактерии, микроорганизмы, антигены растений, пыльца, пищевые продукты) через ретикуло-эндотелиальную систему. В норме данные комплексы фагоцитируются и разрушаются с последующим удалением из организма. Различные иммунопатологические состояния приводят к повышенному образованию ЦИК, и, в ряде случаев, их отложению и избыточному накоплению с последующей активацией комплемента и лизосомальных ферментов в различных тканях, в частности, в капиллярах, мелких артериолах и мезангии. В свою очередь, эти события служат причиной развития острого воспаления с повышением сосудистой проницаемости, выходом жидкой части плазмы в ткани и кровоизлияниями [238].

Содержание ЦИК в крови – показатель развития различных воспалительных процессов в организме и показатель активности течения заболеваний [235]. На основании вышесказанного определение уровня ЦИК в сыворотке крови является одним из важных методов диагностики активности и определения тяжести иммунопатологического процесса. На фоне введения бактериального ЛПС выявили повышение уровня иммунных комплексов практически по сравнению с интактными животными. Исследуемые соединения и препарат сравнения приводили к нормализации содержания ЦИК в сыворотке животных с ЛПС-индуцированной патологией.

Полученные результаты указывают на уменьшении продукции АТ, которое может быть результатом снижения ЛПС-индуцированной активации антителопродуцирующих клеток.

**Третий этап диссертационного исследования состоял из двух разделов и был посвящен изучению влияния соединений ВМА-21-10 и ВМА-13-15 на течение экспериментальной патологии.**

Первый раздел был посвящен изучению влияния соединения ВМА-21-10 на воспалительный процесс при ЛПС-индуцированном остром респираторном дистресс синдроме.

Легочные макрофаги являются важным защитным компонентом органа, выполняя барьерную функцию в респираторной системе. В здоровом легком присутствует как минимум две популяции макрофагов: альвеолярные макрофаги (АМ), свободно локализованные в дыхательных путях, и резидентные или интерстициальные макрофаги, расположенные в паренхиме легких [62]. Макрофаги легких относятся к долгоживущим клеткам, и их репопуляция происходит за счет пролиферации *in situ*, а не за счет поступления из костного мозга [121, 125]. Последнее обстоятельство может играть существенную роль при легочных заболеваниях, так как постоянное негативное воздействие внешних стимулов

(воспаление) на макрофаги на протяжении всего их жизненного цикла может привести к формированию популяции АМ с нарушенным метаболическим статусом, постоянно циркулирующей в легочной ткани [179]. Традиционно в качестве информативного маркера для детекции моноцитов/макрофагов при иммуногистохимическом анализе используется CD68. CD68 – высокогликозилированный трансмембранный гликопротеин из семейства LAMP, который экспрессируется в макрофагах и других мононуклеарных фагоцитах, однако немиелоидные клетки также могут экспрессировать CD68, но в гораздо меньшей степени [76]. При изучении влияния наиболее активных соединений на фагоцитарную активность и жизнеспособность макрофагов было показано отсутствие у соединения-лидера существенного подавления фагоцитоза, которое было установлено для дексаметазона, что означает отсутствие у него иммуносупрессивных свойств, характерных для препарата сравнения дексаметазон. При этом дексаметазон и соединение ВМА-21-10 нормализовали уровень ИЛ-6 в плазме крови и предотвращали повышение проницаемости легочных сосудов и развитие отека легких. Изменение субпопуляций лейкоцитов в лейкоцитарной формуле под действием соединения ВМА-21-10 обусловлено восстановлением соотношения «сегментоядерные нейтрофилы/лимфоциты» характерного для здоровых животных.

**Второй раздел третьего этапа диссертационного исследования** был посвящен изучению иммунокорригирующего действия соединения ВМА-13-15 в условиях циклофосфамид-индуцированной иммуносупрессии.

Иммуносупрессия характеризуется снижением или полным отсутствием способности иммунной системы противостоять нарушениям гомеостаза различной этиологии. Данное состояние может возникнуть вследствие воздействия внешних факторов, генетических заболеваний, а также из-за применения лекарственных средств (как побочное действие или как терапевтический эффект) [74]. Влияние

исследуемых соединений на иммунный статус животных в условиях экспериментальной патологии оценивали на основании стандартных иммунофармакологических тестов: расчет лимфоидного индекса (ЛИ) органов иммунной системы, реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) с определением индекса реакции, реакции прямой гемагглютинации (РПГА) с определением титра антител и изучения влияния исследуемых субстанций на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов [18]. Дополнительно для оценки кислородзависимых антиинфекционных систем нейтрофилов, изучали продукцию ими АФК [77].

Тимус и селезенка являются жизненно важными иммунокомпетентными органами. Тимус регулирует работу периферических иммунных органов и иммунных клеток, а также обеспечивает дифференцировку и созревание Т-клеток [164]. Селезенка является местом колонизации Т- и В-клеток, иммунного ответа и синтеза биологически активных веществ [172]. ЛИ этих органов характеризует их функциональное состояние, в частности является косвенным лимфопролиферативных процессов и тесно коррелирует с продукцией антител. Следовательно, можно говорить о том, что данные показатели отражают состояние иммунной системы организма в целом [161, 248]. И могут быть использованы в качестве предварительного теста для изучения иммунофармакологических механизмов действия исследуемых соединений [135].

Введение ЦФ оказывало выраженное иммуносупрессивное действие за счет угнетения процессов лимфо- и миелооза [118], что в дальнейшем приводило к снижению миграции иммунокомпетентных клеток в периферические органы иммунной системы и, как следствие, снижению ЛИ селезенки и числа ЯСК по сравнению с животными интактной группы. Под действием ВМА-13-15 наблюдали повышение ЛИ селезенки и содержания ЯСК по сравнению с животными контрольной группы. Схожие изменения наблюдали со стороны тимуса: ЛИ тимуса

мышей контрольной группы снизился более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными. Действие ВМА-13-15 сопровождалось повышением ЛИ и числа ЯСК. Препарат сравнения (полиоксидоний) существенно повышал ЛИ тимуса и число ЯСК.

На основании полученных результатов можно судить о том, что ВМА-13-15, наряду с препаратом сравнения, нивелирует иммуносупрессивный эффект ЦФ, восстанавливая иммунопролиферативные процессы в костном мозге, следствием чего является также восстановление органных коэффициентов и числа лимфоцитов в периферических органах иммунной системы.

Дальнейшая оценка иммуномодулирующего действия ВМА-13-15 заключалась в изучении изменения общего числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы в условиях экспериментальной патологии. Выбор этих показателей был сделан нами на тех же основаниях, что и при проведении второго этапа диссертационного исследования. ЦФ, алкилируя молекулы ДНК, обладает антипролиферативным и проапоптотическим эффектом, особенно в отношении быстро делящихся клеток [251]. В рамках эксперимента данное действие проявлялось снижением общего числа лейкоцитов, более чем в 3 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с интактными животными. При исследовании субпопуляционного состава было выявлено повышение процентного числа палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, что являлось компенсаторной реакцией, выражавшейся в усилении миелопоэза после резкого снижения количества лейкоцитов, вызванного введением ЦФ. Высокое содержание нейтрофилов/эозинофилов является характерным признаком воздействия ЦФ [172, 251]. Введение ВМА 13-15, также как и полиоксидония, сопровождалось восстановлением общего числа лейкоцитов на фоне экспериментальной иммуносупрессии. При этом отсутствие резкого повышения содержания нейтрофилов указывало на частичное устранение действия ЦФ. Также наблюдали

частичное восстановление субпопуляции моноцитов и существенное повышение содержания лимфоцитов, до значений сопоставимых с процентом лимфоцитов интактных животных.

Далее нами было проведено исследование функциональной активности нейтрофилов периферической крови в условиях экспериментальной иммуносупрессии. Фагоцитарная активность считается одним из основных показателей состояния врожденного иммунитета – фундаментальной основы иммунной системы. Различные нарушения фагоцитарной активности существенным образом ослабляют всю систему неспецифической резистентности. Фагоцитоз относится к клеточному фактору неспецифической резистентности организма. Процесс фагоцитоза осуществляется гранулоцитами и макрофагами (моноцитами крови, клетками пульпы селезенки, эндотелия кровеносных сосудов, гистиоцитами и др.) [89, 190]. Введение ЦФ способствовало снижению ФА и ФЧ нейтрофилов по сравнению с интактными животными. На фоне экспериментальной иммуносупрессии у животных, получавших ВМА-13-15, ФА была выше, чем у животных контрольной группы. Показатель ФЧ также был выше по сравнению с контрольными животными. Похожим образом действовал препарат сравнения. Введение полиоксидония повышало ФА сопоставимо с ВМА-13-15 по сравнению с ФА животных с экспериментальной патологией.

Полученные результаты свидетельствуют об иммуностимулирующем влиянии хиназолинового производного ВМА-13-15 в отношении неспецифической резистентности организма в условиях экспериментальной иммуносупрессии.

Для изучения реактивности иммунной системы на антиген, особенно при формировании патологических процессов, нами использовались методы оценки клеточного и гуморального звена иммунитета, а именно постановка РГЗТ и РПГА, соответственно.

В условиях иммуносупрессии, вызванной ЦФ, наблюдали угнетение гуморального звена иммунитета. Продукция АТ снизилась по сравнению с интактными животными. Аналогично препарату сравнения, действие ВМА-13-15 приводило к повышению титра АТ. По сравнению с мышами контрольной группы данный показатель выше после введения исследуемого соединения и полиоксидония, соответственно.

Также введение ЦФ вызвало существенное угнетение клеточного звена иммунитета, что выражалось в снижении индекса РГЗТ более чем в 2 раза по сравнению с интактными животными. Действие ВМА-13-15, также как и препарата сравнения, сопровождалось повышением индекса РГЗТ. По сравнению с контрольными животными исследуемое соединение повышало данный показатель, как и полиоксидоний.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о наличии у ВМА-13-15 иммуномодулирующего действия, выраженного в улучшении клеточного и гуморального звеньев иммунитета в условиях иммуносупрессии, что согласуется с предположением о его стимулирующем действии в отношении процессов миело- и лимфопоэза.

Два различных скаффолда, обуславливают два различных механизма действия (TLR4; TLR2/6) и соответственно разнонаправленность иммуномодулирующих эффектов. Учитывая то, что общим эффектором каскадов TLR4 и TLR2/6 является NF-κB, соответственно оба соединения оказывают на него схожий эффект.

Лидером по противовоспалительной активности является соединение ВМА-21-10, а лидером по иммуномодулирующей активности соединение ВМА-13-15.

Таким образом, подводя итог вышесказанному, можно отметить следующее, что рассмотрение *N* – замещенных производных хиназолина как кандидатов на разработку препаратов, обладающих иммуномодулирующей активностью является актуальной и целесообразной задачей, что в дальнейшем может значительно

повысить эффективность фармакотерапии у пациентов с различными формами дисфункций иммунной системы, а учитывая возможный поливалентный спектр фармакологических эффектов этих соединений, позволит минимизировать полипрагмазию у пациентов с этими нарушениями, тем самым снизив риск развития нежелательных лекарственных реакций.

## ВЫВОДЫ

1. В ходе скрининга *in vitro* в ряду 25 *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами были выявлены соединения ВМА-21-10 и ВМА-13-15, обладающие наиболее выраженной иммуномодулирующей активностью. Для этих соединений были установлены элементы зависимости структура-активность. ВМА-13-15, содержит линейный фрагмент гуанидина и метильную группу, а ВМА-21-10 два циклических фрагмента гуанидина.

2. Соединение ВМА-21-10 (1,3-бис-[(5-амино-1*H*-1,2,4-триазол-3-ил)метил]-хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион), обладает выраженной противовоспалительной активностью. В условиях ЛПС-индуцированной активации перитонеальных макрофагов ВМА-21-10 снижает секрецию ИЛ-6 ( $IC_{50} = 51,75$  мкМ) и ингибирует продукцию оксида азота ( $IC_{50} = 72,96$  мкМ). Также исследуемое соединение снижает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов на 8,7% и приводит к ингибированию продукции АФК перитонеальными нейтрофилами в концентрации 50 мкМ.

3. Соединение ВМА-13-15 (N-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин), обладает незначительной ингибирующей активностью в отношении iNOS, активировывает синтез АФК перитонеальными нейтрофилами дозозависимым образом (в диапазоне концентраций 2–50 мкМ). В модельных условиях *in vitro* ВМА-13-15 стимулирует фагоцитоз, усиливает лизосомальную и киллинговую активность перитонеальных макрофагов.

4. Наиболее активные соединения под лабораторными шифрами – ВМА-21-10, содержащее два циклических фрагмента гуанидина, и ВМА-13-15, содержащее линейный фрагмент гуанидина – в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ не оказывают цитотоксическое действие на перитонеальные макрофаги *in vitro* после экспозиции в течение 72 ч, что подтверждается результатами МТТ-теста и теста высвобождения ЛДГ.

5. В условиях ЛПС-индуцированного системного воспаления соединения ВМА-13-15 и ВМА-21-10 оказывают иммуномодулирующий эффект при курсовом введении, что связано с их действием на различные системы неспецифической резистентности, клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Об этом свидетельствует снижение пролиферации иммунокомпетентных клеток (ЛИ и ЯСК селезенки), ингибирование активации фактора транскрипции NF-κB и снижение экспрессии iNOS, следствием чего является уменьшение активности кислородзависимых микробицидных систем нейтрофилов крови и их фагоцитарной активности. Также ВМА-13-15 и ВМА-21-10 приводили к снижению общего числа лейкоцитов в периферической крови и восстановлению процентного соотношения их субпопуляций, ингибированию синтеза провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНОα) и снижению синтеза иммуноглобулинов, что выражалось в снижении ЦИК.

6. Соединение под лабораторным шифром ВМА-21-10 обладает выраженным противовоспалительным действием при однократном введении в условиях экспериментального ОПЛ, что проявляется нормализацией морфологической картины легочной ткани, уменьшением явлений экссудации и снижением индекса проницаемости легких.

7. Соединение ВМА-13-15 при курсовом введении на фоне экспериментальной иммуносупрессии, вызванной циклофосфамидом, оказывало выраженное иммунокорректирующее действие, выражавшееся в увеличении ЛИ селезенки и тимуса, повышении общего числа лейкоцитов, сопровождавшееся частичным восстановлением процентного соотношения их субпопуляций, и показателей фагоцитарной активности нейтрофилов. Действие ВМА-13-15 также улучшало состояние клеточного и гуморального звена иммунного ответа, о чем свидетельствовало повышение индекса реакции ГЗТ и титра антител в РПГА.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Новые *N*-замещенные производные хиназолина с азотсодержащими функциональными группами под лабораторными шифрами ВМА-21-10 и ВМА-13-15 рекомендуется представить на рассмотрение как перспективную основу для разработки лекарственных средств, обладающих иммуностимулирующим и иммунокорректирующим действием.
2. Рекомендуется проведение доклинических исследований *N*-замещенных производных хиназолина с азотсодержащими функциональными группами под лабораторными шифрами ВМА-21-10 и ВМА-13-15.
3. Модели экспериментальной патологии, используемые в работе, рекомендованы как для скрининга соединений с противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью *in vitro*, так и для поиска подходов к коррекции воспалительного процесса и восстановления нарушенной функции иммунной системы *in vivo*.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

DMEM – (Dulbecco's modified Eagles medium)

EGFR – эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor)

NHE-1 – изоформа 1 натрий-протонного обменника ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 1)

IC<sub>50</sub> – полумаксимальная ингибирующая концентрация

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота (inducible nitric oxide synthase)

NF-κB – ядерный фактор «каппа-би» (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns)

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PRR – паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors)

RPMI – (Roswell Park Memorial Institute medium)

VDSC – потенциал-зависимые натриевые каналы (voltage-dependent sodium channels)

АГ – антиген

АМ – альвеолярные макрофаги

АТ – антитело

АФК – активные формы кислорода

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ИАН – индекс активации нейтрофилов

ИЛ – интерлейкин

ИР – индекс реакции

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛИ – лимфоидный индекс

ЛПС – липополисахарид

МАО – моноаминоксидаза

ОПЛ – острое повреждение легких  
ПМ – перитонеальные макрофаги  
ПН – перитонеальные нейтрофилы  
ПЯН – полиморфно-ядерные нейтрофилы  
РГЗТ – реакция гиперчувствительности замедленного типа  
РПГА – реакция прямой гемагглютинации  
ТК – тирозинкиназа  
ФА – фагоцитарная активность  
ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$   
ФЧ – фагоцитарное число  
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы  
ЦФ – циклофосфамид

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бандура А.Ф., Оганесян Э.Т., Кодониди И.П., Сергеева Е.О., Саджая Л.А., Сочнев В.С., Золотых Д.С., Луговой И.С., Базганов А.Ю. О противовоспалительной активности новых гетерилзамещенных производных 2,3-дигидро-1H-хиназолин-4-она // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 9 (часть 6) – С. 1260-1263.
2. Барышева С. В., Брюхин Г. В. Морфофункциональные особенности перитонеальных макрофагов у животных с экспериментальным гепатитом // *Вестник Челябинского государственного университета: Биология*. – 2008. – В.1. – №4. – С. 60–64.
3. Булгакова В.А. Иммуномодуляторы для профилактики и лечения острых респираторных инфекций: эффективность азоксимера бромида // *Терапевтический архив*. – 2014. – № 86(12) – С. 92-97.
4. Воробьев А.А. Иммунология и аллергология. Учебное пособие. // *Практическая медицина*. 2006. – С. 287.
5. Герасимов А.Н. Медицинская статистика // М. МИА. 2007.– С. 480.
6. Горчаков А. М., Кручинский Ф. Т., Коростелева И. Н. Метод комплексной оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови // Минск: НИИ экологической и профессиональной патологии. 2003. – С. 15.
7. Забродский П. Ф., Мальцева Г. М. Влияние на систему иммунитета м-холиноблокаторов // Саратов: "Научная книга". 2008. – С. 153.
8. Земсков А. М. Земсков В.М., Журихина И.И., Ильина Е.В., Карякин А.В., Земскова В.А. Типовые иммунные расстройства при различных заболеваниях // *Рмж*. – 2012. – № 3 (20). – С. 82.
9. Земсков А. М., Земсков В.М., Земскова В.А. и др. Особенности и алгоритмы иммунокоррекции // *Аллергология и Иммунология*. – 2016. –№ 3 (17). – С. 180–185.
10. Земсков А.М., Земсков В.М., Земскова В.А., Золоедов В.И. Настольная книга клинического иммунолога. Теоретические, практические и прикладные аспекты

клинической иммунологии на современном этапе. // Триада-Х-е изд., Москва. – 2015. – С. 704.

11. Калинина Н. М., Кетлинский С. А., Оковитый С. В., Шуленин С. Н. Заболевания иммунной системы. Диагностика и фармакотерапия // М: Эксмо. – 2015. – С. 496.

12. Карпищенко П. А. И. Медицинские лабораторные технологии: Руководство по клинической лабораторной диагностике в 2 т. Том 2. // Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – С. 472.

13. Ковальчук Л. В. Иммунология: клеточные, молекулярные и генетические методы исследования. Практикум. // Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2014. – С. 174.

14. Козлов В. А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей // Новосибирск: Наука. – 2009. – С. 274.

15. Красильщикова М. С., Белозерцева И. В. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях (перевод) // СПб: Rus-LASA. – 2012. – С. 48.

16. Ланг Т.А. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов // Практическая медицина. – 2016. – С. 480.

17. Манько В. М. Иммунологическая недостаточность и ее влияние на опухолевый рост // Физиология и патология иммунной системы. – 2016. – Т. 20, № 12. – С. 25–34.

18. Миронов А., Бунатян Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая // М: Гриф и К. 2012. – С. 944.

19. Михайлова А.А. Миелопептиды эндогенные иммуномодуляторы // Клиническая геронтология. – 2003. – Т. 9. – № 3. – С. 41-44.

20. Морозов, С. Ю. Иммунокоррекция и принципы ее применения // Русский медицинский журнал. – 2008. – Т.16. – № 4. – С. 242-244.

21. Новиков Д. К. Клиническая иммунология и аллергология. Учебник // Минск: Вышэйшая школа. – 2019. – С. 495.
22. Новиков Д. К., Новиков П. Д. Клиническая иммунопатология. Руководство // Медицинская литература. – 2009. – С. 464.
23. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Титова Н. Д. Иммунокоррекция, иммунопрофилактика, иммунореабилитация. Руководство // Витебск: ВГМУ – 2006. – С. 198.
24. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Черешнев В. А. Физиология иммунной системы: клеточные и молекулярно-биологические механизмы // Вестник РФФИ. – 2017. – № 1. Спец. вып. 100 лет физиологии в России. К столетию Физиологического общества им. И. П. Павлова. – С. 96–120.
25. Петрова И. В., Катаев В. А., Мещерякова С. А., Фархутдинов Р. Р. Влияние производных пиримидина на фагоцитарную активность крови при физических нагрузках // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т.9. – №6. – С. 67–69.
26. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии //М.: РАМН. – 2000. – С. 52.
27. Самотруева, М. А., Цибизова А. А., Ясенявская А. Л., Озеров А. А., Тюренков И. Н. Фармакологическая активность производных пиримидинов // Астраханский медицинский журнал. – 2015. – Т. 15. – № 1. – С. 12–29.
28. Самотруева, М. А., Цибизова А. А., Озеров А. А., Лужнова С. А., Е. Г. Глухова, Тюренков И. Н. Синтез и иммуностропная активность карбонильных производных хиразолин4(3H)-она // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50. – № 6. – С. 12–14.
29. Самотруева М. А., Цибизова А. А., Габитова Н. М., Озеров А. А., Тюренков И. Н. Противомикробная активность нового производного хиразолина VMA-13-03 // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83 – №8. – С. 24–28.

30. Сепиашвили Р. И. Иммунотропные Препараты: Классификация, Проблемы и Перспективы // Аллергология и Иммунология. – 2015. – Т. 16. – № 1. – С. 64–69.
31. Сепиашвили, Р. И. Иммунореабилитология: истоки, будни и перспективы. От иммунотерапии к персонализированной таргетной иммунореабилитации // Аллергология и иммунология. – 2016.– Т. 17.– № 3. – С. 165–175.
32. Сепиашвили Р. И., Бережная Н. М. Система иммунитета как регулятор тканевого гомеостаза (регенерация, репарация, ремоделирование) // Аллергология и иммунология. – 2015. – Т. 16. – № 1. – С. 127–137.
33. Сепиашвили Р.И. Иммуномодулирующие препараты в клинической практике: классификация, основные принципы и методы применения, показания и противопоказания // Аллергология и иммунология. – 2015. – Т. 16. – № 2. – С. 189–195.
34. Серебряная, Н. Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа / Н. Б. Серебряная // Иммунология. – 2010. – Т. 31. – № 5. – С. 273–280.
35. Симбирцев А. С. Цитокины - новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и Воспаление. – 2002. – Т.1. – № 1. – С. 9–16.
36. Тюренков И. Н., Озеров А. А., Шматова Е. Н., Арчакова Ю. В. Ноотропная активность амидов хиназолинового ряда // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49. – № 2. – С. 18–20.
37. Фёдоров Ю. Н., Клюкина В. И., Романенко М. Н., Богомолова О. А., Денисенко А. Н. Стратегия и принципы иммунокоррекции и иммуномодулирующей терапии миокарда // Вестн. Новг. гос. ун-та. Сер.: Сельскохозяйственные науки. – 2015. – Т.86 – № 3 – ч. 1. – С.84–87.
38. Филимонова М.В. Фармакологические свойства и радиобиологические эффекты линейных и циклических производных изотиомочевины – конкурентных ингибиторов синтаз оксида азота // автореф...докт. биол. наук. – Обнинск. –2015. – С.47.

39. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы. Классификация. Механизм действия // М.: Фармарус Принт. – 2005. – С.27.
40. Хаитов Р. М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность // Иммунология. – 2020. – Т.41 – № 2. – С.101-106.
41. Хаитов Р.М., Пинегин Б. В., Ярилин А. А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей // Москва: ГЭОТАР-Медиа. –2009. – С. 352.
42. Хаитов Р.М. Иммуноterapia: руководство // ГЭОТАР-Медиа. – 2011. – С.672.
43. Цибизова А. А., Самотруева М. А., Ковалев В. Б., Тюренков И. Н. Фармакологическая Активность Производных Бензодиазина // Астраханский Медицинский Журнал. – 2017. – Т.12. – № 4. – С.27 – 43.
44. Цибизова А. А., Озеров А. А., Новиков М. С., Самотруева М. А., Ясенявская А. Л., Тюренков И. Н. Синтез и иммуностропная активность новых производных хиразолина у мышей // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. – 54. – № 10. – С. 26–29.
45. Шекунова Е. В., Ковалева М.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2020. – Т.10. – № 1. – С. 19–28.
46. Abraham E. Nuclear factor-kappa B and its role in sepsis-associated organ failure // The Journal of Infectious Diseases. 2003. – (187 Suppl 2). – С. 364 –369.
47. Abuelizz H. A., Marzouk M., Ghabbour H. et al. Synthesis and anticancer activity of new quinazoline derivatives // Saudi Pharmaceutical Journal. 2017. – № 7 (25). – С.1047–1054.
48. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity // Cell. 2006. – № 4 (124). – С. 783–801.

49. Ali Z., Akhtar M.J., Haider M.R. et al. Design and synthesis of quinazoline-3,4-(4H)-diamine endowed with thiazoline moiety as new class for DPP-4 and DPPH inhibitor // *Bioorganic Chemistry*. 2017. – (71). – C. 181–191.
50. Altenburg J., de Graaff C. S., van der Werf T. S. et al. Immunomodulatory effects of macrolide antibiotics - part 1: biological mechanisms // *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*. 2011. – № 1 (81). – C. 67–74.
51. Amer A., Hegazi A.H., Alshekh M.K. et al. Design, synthesis, molecular modelling and in vitro screening of monoamine oxidase inhibitory activities of novel quinazolyl hydrazine derivatives // *Royal Society Open Science*. 2020. – № 4 (7). – C. 200050.
52. Arias-Salvatierra D., Silbergeld E. K., Acosta-Saavedra L.C. et al. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- $\kappa$ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide // *Cellular Signalling*. 2011. – № 2 (23). – C. 425–435.
53. Arutyunyan I., Elchainov A., Fatudinov T. et al. Elimination of allogeneic multipotent stromal cells by host macrophages in different models of regeneration // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015. – № 5 (8). – C. 4469–4480.
54. Asif M. Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives // *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. – (2014). – C. 395637.
55. AVMA guidelines for the euthanasia of animals | American Veterinary Medical Association [Электронный ресурс]. URL: <https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals>.
56. Bahadur S., Saxena (Miss) M. Syntheses and Biological Activities of Some New 4(3H)-Quinazolinones // *Archiv der Pharmazie*. 1983. – № 11 (316). – C. 964–968.
57. Bascones-Martinez A. et al. Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects // *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2014. – № 1 (19). – C. 24–31.
58. Bathula R., Mondal P., Raparla R. et al. Evaluation of antitumor potential of synthesized novel 2-substituted 4-anilinoquinazolines as quinazoline-pyrrole hybrids in

MCF-7 human breast cancer cell line and A-549 human lung adenocarcinoma cell lines // *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. – № 1 (6). – C. 44.

59. Becker J., Grasso R. J. Suppression of phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures: inability of arachidonic acid, indomethacin, and nordihydroguaiaretic acid to reverse the inhibitory response mediated by a steroid-inducible factor // *International Journal of Immunopharmacology*. 1985. – № 6 (7). – C. 839–847.

60. Bedouhène S., Moulti-Mati F., Hurtado-Nedelec M. et al. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils // *American Journal of Blood Research*. 2017. – № 4 (7). – C. 41–48.

61. Bianchini R. et al. Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4(+) CD8(+)) thymocytes following dexamethasone treatment (vol 319, pg 887, 2006) // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007. – № 1 (321). – C. 422.

62. Byrne A. J., Mathie S.A., Gregory L.G., Lloyd C.M. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways // *Thorax*. 2015. – № 12 (70). – C. 1189–1196.

63. Cabral F., Al-Rahem M., Skaggs J. et al. Stabilin receptors clear LPS and control systemic inflammation // *iScience*. 2021. – № 11 (24). – C. 103337.

64. Camacho M. E., Chayah M., García M.E. et al. Quinazolinones, Quinazolinthiones, and Quinazolinimines as Nitric Oxide Synthase Inhibitors: Synthetic Study and Biological Evaluation // *Archiv Der Pharmazie*. 2016. – № 8 (349). – C. 638–650.

65. Cardiff R. D., Miller C. H., Munn R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014. – № 6 (2014). – C. 655–658.

66. Carreiras M. C., Marco J. L. Recent approaches to novel anti-Alzheimer therapy // *Current Pharmaceutical Design*. 2004. – № 25 (10). – C. 3167–3175.

67. Chang C. K., Llanes S., Schumer W. Effect of dexamethasone on NF-kB activation, tumor necrosis factor formation, and glucose dyshomeostasis in septic rats // *The Journal of Surgical Research*. 1997. – № 2 (72). – C. 141–145.

68. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration // *Immunobiology*. 2014. – № 3 (219). – C. 172–178.
69. Chen D., Chen G., Ding Y. et al. Polysaccharides from the flowers of tea (*Camellia sinensis* L.) modulate gut health and ameliorate cyclophosphamide-induced immunosuppression // *Journal of functional foods*. 2019. – Vol. 61. – C.103470.
70. Chen H.-J.C., Spiers JG., Sernia C. et al. Response of the nitrenergic system to activation of the neuroendocrine stress axis // *Frontiers in Neuroscience*. 2015. – (9). – C.3.
71. Chen T. et al. The protective effect of CDDO-Me on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice // *International Immunopharmacology*. 2015. – № 1 (25). – C. 55–64.
72. Chen T., Guo Q., Wang H. et al. Effects of esculetin on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via regulation of RhoA/Rho Kinase/NF- $\kappa$ B pathways in vivo and in vitro // *Free Radical Research*. 2015. – № 12 (49). – C. 1459–1468.
73. Chen T., Wang R., Jiang W. et al. Protective Effect of Astragaloside IV Against Paraquat-Induced Lung Injury in Mice by Suppressing Rho Signaling // *Inflammation*. 2016. – № 1 (39). – C. 483–492.
74. Chinen J., Shearer W. T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection // *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010. – № 2 Suppl 2 (125). – C. 195–203.
75. Chinigo G. M. et al. Asymmetric Synthesis of 2,3-Dihydro-2-arylquinazolin-4-ones: Methodology and Application to a Potent Fluorescent Tubulin Inhibitor with Anticancer Activity // *Journal of medicinal chemistry*. 2008. – № 15 (51). – C. 4620–4631.
76. Chistiakov D. A., Killingsworth M.C, Myasoedova V.A. et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker // *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 2017. – № 1 (97). – C. 4–13.
77. Choi H. S., Kim J.W., Cha Y.N., Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells // *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*. 2006. – № 1 (27). – C. 31–44.

78. Chung G. E., Yim J.Y., Kim D. et al. Associations between White Blood Cell Count and the Development of Incidental Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *Gastroenterology Research and Practice*. 2016. – (2016). – C. 7653689.
79. Cinelli M. A., Do H.T., Miley GP. et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition // *Medicinal Research Reviews*. 2020. – № 1 (40). – C. 158–189.
80. Cinkajzlová A., Mráz M., Haluzík M. Lymphocytes and macrophages in adipose tissue in obesity: markers or makers of subclinical inflammation? // *Protoplasma*. 2017. – № 3 (254). – C. 1219–1232.
81. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis // *Nature*. 2002. – № 6917 (420). – C. 885–891.
82. Cooray S., Zhang H., Breen R. et al. Cerebral tuberculosis in a patient with systemic lupus erythematosus following cyclophosphamide treatment: a case report // *Lupus*. 2018. – № 4 (27). – C. 670–675.
83. Crinelli R., Antonelli A., Bianchi M. et al. Selective inhibition of NF-kB activation and TNF-alpha production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone // *Blood Cells, Molecules & Diseases*. 2000. – № 3 (26). – C. 211–222.
84. Cyclophosphamide. DrugBank Release Version 5.1.9 URL: (<https://go.drugbank.com/drugs/DB00531>). [Электронный ресурс]
85. D'Alessio F. R. Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 2018. – 1809. – C. 341–350.
86. Davies L. C. et al. Diversity and environmental adaptation of phagocytic cell metabolism // *Journal of Leukocyte Biology*. 2019. – № 1 (105). – C. 37–48.
87. De Vito P. The sodium/hydrogen exchanger: a possible mediator of immunity // *Cellular Immunology*. 2006. – № 2 (240). – C. 69–85.
88. Deitch E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned // *Shock* (Augusta, Ga.). 1998. – № 1 (9). – C. 1–11.

89. Delves P. J., Martin S. J., Burton D. R., Roitt I. M. Roitt's Essential Immunology // Wiley-Blackwell. 2017. – C. 576.
90. Dempcy R. O., Skibo E. B. Rational design of quinazoline-based irreversible inhibitors of human erythrocyte purine nucleoside phosphorylase // Biochemistry. 1991. – № 34 (30). –C. 8480–8487.
91. Denning N.-L., Aziz M., Gurien S.D., Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis // Frontiers in Immunology. 2019. (10). – C. 2536.
92. Ding P.-P. et al. Synthesis and biological evaluation of quinazolin-4(3H)-one derivatives bearing dithiocarbamate side chain at C2-position as potential antitumor agents // European Journal of Medicinal Chemistry. 2016. – (108). – C. 364–373.
93. Dolasia K., Bisht M.K., Pradhan G. et al. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity // International Reviews of Immunology. 2018. – № 1 (37). – C. 3–19.
94. Dzhalilova D. Sh. et al. Morphological Characteristics of the Thymus and Spleen and the Subpopulation Composition of Lymphocytes in Peripheral Blood during Systemic Inflammatory Response in Male Rats with Different Resistance to Hypoxia // International Journal of Inflammation. 2019. – (2019). – C. 7584685.
95. El-Sayed N. N. E., Almanai N.M., Ben Bacha A. et al. Synthesis and evaluation of anticancer, antiphospholipases, antiproteases, and antimetabolic syndrome activities of some 3H-quinazolin-4-one derivatives // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2019. – № 1 (34). –C. 672–683.
96. Emadi A., Jones R. J., Brodsky R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary // Nature Reviews Clinical Oncology. 2009. – № 11 (6). – C. 638–647.
97. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers // U.S. Food and Drug Administration [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fda.gov/regulatory->

information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers.

98. Faffe D. S. et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice // *The European Respiratory Journal*. 2000. – № 1 (15). – C. 85–91.

99. Fernandez H. H., Chen J. J. Monoamine Oxidase-B Inhibition in the Treatment of Parkinson's Disease // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2007. – № 12 (27). – C. 174-185.

100. Feroze U., Kalantar-Zadeh K., Sterling K.A. et al. Examining Associations of Circulating Endotoxin With Nutritional Status, Inflammation, and Mortality in Hemodialysis Patients // *Journal of Renal Nutrition*. 2012. – № 3 (22). – C. 317–326.

101. Ferrero-Miliani L., Nielsen O.H., Andersen P.S., Girardin S.E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation // *Clinical and Experimental Immunology*. 2007. – № 2 (147). – C. 227–235.

102. Fitzgerald K. A., Kagan J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity // *Cell*. 2020. – № 6 (180). – C. 1044–1066.

103. Förstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *European Heart Journal*. 2012. – № 7 (33). – C. 829–837.

104. Frank C., Hay Olwyn M. R. W. *Practical Immunology* // 4th Edition, Wiley-Blackwell. 2002. – C. 412.

105. Frank M. G., Adhikary S., Sobesky J.L. et al. The danger-associated molecular pattern HMGB1 mediates the neuroinflammatory effects of methamphetamine // *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016. – (51). – C. 99–108.

106. Franken L., Schiwon M., Kurts C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system // *Cellular Microbiology*. 2016. – № 4 (18). – C. 475–487.

107. Freeman R., King B. Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test. // *Journal of Clinical Pathology*. 1972. – № 10 (25). – C. 912–914.

108. Freireich E. J., Gehan E.A., Rall D.P., Schmidt L.H., Skipper H.E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man // *Cancer Chemotherapy Reports*. 1966. – № 4 (50). – C. 219–244.
109. Fuster F., Vargas J.I., Jensen D. et al. CD4/CD8 ratio as a predictor of the response to HBV vaccination in HIV-positive patients: A prospective cohort study // *Vaccine*. 2016. – № 16 (34). – C. 1889–1895.
110. Gebicka L., Didik J. [Oxidative stress induced by peroxynitrite] // *Postepy Biochemii*. 2010. – № 2 (56). – C. 103–106.
111. Gierlikowska B. et al. Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils—The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects // *Frontiers in Pharmacology*. 2021. – (12). – C. 666732.
112. Giuliani A. L., Sarti A. C., Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules // *Immunology Letters*. 2019. – (205). – C. 16–24.
113. Gökhan-Kelekçi N., Koyunoğlu S., Yabanoğlu S. et al. New pyrazoline bearing 4(3H)-quinazolinone inhibitors of monoamine oxidase: Synthesis, biological evaluation, and structural determinants of MAO-A and MAO-B selectivity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009. – № 2 (17). – C. 675–689.
114. Gonçalves R., Mosser D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages // *Current Protocols in Immunology*. 2015. – № 1 (111). – C. 14.1.1-14.1.16.
115. Gordon S., Plüddemann A., Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions // *Immunological Reviews*. 2014. – № 1 (262). – C. 36–55.
116. Gosselin D. et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities // *Cell*. 2014. – № 6 (159). – C. 1327–1340.
117. Gouhar R. S., Kamel M. M. Synthesis and Reactions of Some New Quinazoline Derivatives for In Vitro Evaluation as Anticancer and Antimicrobial Agents // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2018. – № 9 (55). – C. 2082–2089.

118. Gramajo Lopez A., Gutiérrez F., Saavedra L. et al. Improvement of Myelopoiesis in Cyclophosphamide-Immunosuppressed Mice by Oral Administration of Viable or Non-Viable Lactobacillus Strains // *Frontiers in Immunology*. 2021. – (12). – C.647049.
119. Grasso R. J. et al. Inhibition of yeast phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures: reversibility of the effect and enhanced suppression in cultures of stimulated macrophages // *Journal of Immunopharmacology*. 1982. – № 4 (4). – C. 265–278.
120. Green S. J., Anigolu J., Raney J. J. Oxidative metabolism of murine macrophages // *Current Protocols in Immunology*. 2001. (Chapter 14). C. Unit 14.5. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1405s12>
121. Guilliams M., De Kleer I., Henri S. et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF // *The Journal of Experimental Medicine*. 2013. – № 10 (210). – C. 1977–1992.
122. Gunes S., Ayhanci A., Sahinturk V., Altay D.U., Uyar R. Carvacrol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat kidney // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2017. – № 7 (95). – C. 844–849.
123. Gupta T., Rohilla A., Pathak A. et al. Current perspectives on quinazolines with potent biological activities: A review // *Synthetic Communications*. 2018. – № 10 (48). – C. 1099–1127.
124. Hameed A., Al-Rashida M., Uroos M. et al. Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011-2016) // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018. – № 4 (28). – C. 281–297.
125. Hashimoto D., Chow A., Noizat C. et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes // *Immunity*. 2013. – № 4 (38). – C. 792–804.
126. Hasková V., Kaslík J., Ríha I., Matl I., Rovenský J. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation // *Zeitschrift Fur Immunitatsforschung. Immunobiology*. 1978. – № 4 (154). – C. 399–406.

127. Hassanzadeh F., Sadeghi-Aliabadi H., Nikooei S. et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of some derivatives of triazole-quinazolinone hybrids // *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2019. – № 2 (14). – C. 130–137.
128. Hou F. X., Yang H.F., Yu T., Chen W. The immunosuppressive effects of 10mg/kg cyclophosphamide in Wistar rats // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2007. – № 1 (24). – C. 30–36.
129. Hu J. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Quinazoline Derivatives as Anti-inflammatory Agents against Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury in Rats // *Chemical Biology & Drug Design*. 2015. – № 6 (85). – C. 672–684.
130. Huyan X.-H., Lin Y.P., Gao T. et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice // *International Immunopharmacology*. 2011. – № 9 (11). – C. 1293–1297.
131. Ismail E. M. O. A. et al. Quinoline and Quinazoline Alkaloids against COVID-19: An In Silico Multitarget Approach // *Journal of Chemistry*. 2021. – (2021). – C. e3613268.
132. Jabbour H. N. et al. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease // *Reproduction (Cambridge, England)*. 2009. – № 6 (138). – C. 903–919.
133. Jeklova E. et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008. – № 3–4 (122). – C. 231–240.
134. Jiang Q., Yi M., Guo Q. et al. Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- $\kappa$ B pathway // *International Immunopharmacology*. 2015. – № 2 (29). – C. 370–376.
135. Jiang S., Qiu L., Li Y. et al. Effects of *Marsdenia tenacissima* polysaccharide on the immune regulation and tumor growth in H22 tumor-bearing mice // *Carbohydrate Polymers*. 2016. – (137). – C. 52–58.
136. Jiang W., Luo F., Lu Q. et al. The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state // *Chemico-Biological Interactions*. 2016. – (243). – C. 127–134.

137. Jiang W., Liu J., Li P. et al. Magnesium isoglycyrrhizinate shows hepatoprotective effects in a cyclophosphamide-induced model of hepatic injury // *Oncotarget*. 2017. – № 20 (8). – C. 33252–33264.
138. Jing W., Chunhua M., Shumin W. Effects of acteoside on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via regulation of NF- $\kappa$ B pathway in vivo and in vitro // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2015. – № 2 (285). – C. 128–135.
139. Jonge M. E. de., Huitema AD., Rodenhuis S., Beijnen J.H. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide // *Clinical Pharmacokinetics*. 2005. – № 11 (44). – C. 1135–1164.
140. Kany S., Vollrath J. T., Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. – № 23 (20). – C. 6008.
141. Kaplow L. S. A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow // *Blood*. 1955. – № 10 (10). – C. 1023–1029.
142. Karmazyn M. NHE-1: still a viable therapeutic target // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2013. – (61). – C. 77–82.
143. Kaushansky K., Lichtman M. A., Prchal J. T., Levi M. M., Burns L. J. Williams Hematology // 10th Edition, McGraw-Hill Education. 2021. – C.2704.
144. Khan M. M. Immunopharmacology // M. M. Khan, Boston, MA: Springer US, 2008. – C.296.
145. Khudan R. et al. The influence of chronic hyperhomocysteinemia on phagocytic and metabolic activity of peripheral blood neutrophils in case of lipopolysaccharide-induced periodontitis // *Georgian Medical News*. 2021. – № 321. – C. 119–125.
146. Kim S.J., Ha M.S., Choi E.Y. et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression induced by *Prevotella nigrescens* lipopolysaccharide // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2005. – № 1 (43). – C. 51–58.

147. Koelman L., Pivovarova-Ramich O., Pfeiffer A.F.H. et al. Cytokines for evaluation of chronic inflammatory status in ageing research: reliability and phenotypic characterisation // *Immunity & Ageing*. 2019. – № 1 (16). – C. 11.
148. Komarova Andreyanova E.S. Osterman I., Pletnev P. et al. 2-Guanidino-quinazolines as a novel class of translation inhibitors // *Biochimie*. 2017. – (133). – C. 45–55.
149. Kopprasch S., Pietzsch J., Graessler J. Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells // *Luminescence*. 2003. – № 5 (18). – C. 268–273.
150. Krapf M. K., Gallus J., Spindler A., Wiese M. Synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives - A SAR study of novel inhibitors of ABCG2 // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. – (161). – C. 506–525.
151. Krapf M. K., Gallus J., Wiese M. Synthesis and biological investigation of 2,4-substituted quinazolines as highly potent inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017. – (139). – C. 587–611.
152. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. – Vol. 2018. – 6. doi:10.1101/pdb.prot095505
153. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. – Vol. 2018. – 6. doi:10.1101/pdb.prot095497
154. Kumar Tiwary B. et al. Implication of Quinazoline-4(3H)-ones in Medicinal Chemistry: A Brief Review // *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*. 2016. – № 02.
155. Lai J.L., Liu Y.H., Liu C. et al. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF-kB and MAPK Signaling Pathways // *Inflammation*. 2017. – № 1 (40). – C. 1–12.
156. Lambden S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis—an update // *Intensive Care Medicine Experimental*. 2019. – № 1 (7). – C. 64.

157. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2009. – № 6 (1). – C. a001651.
158. Lee Ching C., Kenyon L., Berk M., Park C. Rheumatoid meningitis sine arthritis // Journal of Neuroimmunology. 2019. – (328). – C. 73–75.
159. Li R., Zou X., Huang H. et al. HMGB1/PI3K/Akt/mTOR Signaling Participates in the Pathological Process of Acute Lung Injury by Regulating the Maturation and Function of Dendritic Cells // Frontiers in Immunology. 2020. – (11). – C.1104.
160. Li W., Yin Y., Shuai W. et al. Discovery of novel quinazolines as potential anti-tubulin agents occupying three zones of colchicine domain // Bioorganic Chemistry. 2019. – (83). – C. 380–390.
161. Li X., Jiao L.L., Zhang X. et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of proteoglycans from mycelium of *Phellinus nigricans* and culture medium // International Immunopharmacology. 2008. – № 6 (8). – C. 909–915.
162. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease // Nutrition Reviews. 2007. – № 12 Pt 2 (65). – C. 140-146.
163. Liddiard K., Rosas M., Davies L.C. et al. Macrophage heterogeneity and acute inflammation // European Journal of Immunology. 2011. – № 9 (41). – C. 2503–2508.
164. Liu C., Xi T., Lin Q. et al. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Strongylocentrotus nudus* eggs // International Immunopharmacology. 2008. – № 13–14 (8). – C. 1835–1841.
165. Liu S. F., Malik A. B. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation // American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology. 2006. – № 4 (290). – C. 622–645.
166. Liu Y. et al. Activation of Microglia Depends on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange-Mediated H<sup>+</sup> Homeostasis // The Journal of Neuroscience. 2010. – № 45 (30). – C. 15210–15220.
167. Macarron R., Banks M.N., Bojanic D. et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research // Nature Reviews. Drug Discovery. 2011. – № 3 (10). – C. 188–195.

168. Marchetti M. C., Di Marco B., Cifone G., Migliorati G., Riccardi C. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation // *Blood*. 2003. – № 2 (101). – C. 585–593.
169. Mathew T., Papp A.Á., Paknia F. et al. Benzodiazines: recent synthetic advances // *Chemical Society Reviews*. 2017. – № 10 (46). – C. 3060–3094.
170. Matthay M. A., Zemans R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment // *Annual Review of Pathology*. 2011. – (6). – C. 147–163.
171. Mendoza-Martínez C. et al. Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline derivatives as anti-trypanosomatid and anti-plasmodial agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. – (96). – C. 296–307.
172. Meng M. et al. Protective effects of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia against cyclophosphamide-induced immunosuppression to TLR4/TRAF6/NF- $\kappa$ B signalling in BALB/c mice // *Food & Function*. 2019. – № 6 (10). – C. 3262–3271.
173. Mitchell J. P., Carmody R. J. NF- $\kappa$ B and the Transcriptional Control of Inflammation // *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2018. – (335). – C. 41–84.
174. Mitevaska E., Kostadinova-Petrova I., Kostovska N. Changes of Spleen in Wistar Rats Exposed to Therapeutic Doses of Dexamethasone and Medroxyprogesterone Acetate Evaluated by Stereological Parameters // *Prilozi (Makedonska Akademija Na Naukite I Umetnostite. Oddelenie Za Medicinski Nauki)*. 2015. – № 3 (36). – C. 13–25.
175. Moghe A., Ghare S., Lamoreau B. et al. Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease // *Toxicological Sciences*. 2015. – № 2 (143). – C. 242–255.
176. Mohamed T., Rao P. P. N. 2,4-Disubstituted quinazolines as amyloid- $\beta$  aggregation inhibitors with dual cholinesterase inhibition and antioxidant properties: Development and structure-activity relationship (SAR) studies // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017. – (126). – C. 823–843.
177. Mohamed Y. A., Amr A.E.G.E., Mohamed S.F. et al. Cytotoxicity and anti-HIV evaluations of some new synthesized quinazoline and thioxopyrimidine derivatives using

- 4-(thiophen-2-yl)-3,4,5,6-tetrahydrobenzo[h]quinazoline-2(1H)-thione as synthon // Journal of Chemical Sciences. 2012. – № 3 (124). – C. 693–702.
178. Mokale S. N., Palkar A.D., Dube P.N. et al. Design, synthesis and in vivo screening of some novel quinazoline analogs as anti-hyperlipidemic and hypoglycemic agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2016. – № 2 (26). – C. 272–276.
179. Morales-Nebreda L., Misharin A.V., Perlman H., Budinger GR. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease // European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society. 2015. – № 137 (24). – C. 505–509.
180. Morandi F., Horenstein A.L., Rizzo R., Malavasi F. The Role of Extracellular Adenosine Generation in the Development of Autoimmune Diseases // Mediators of Inflammation. 2018. – (2018). – C. 7019398.
181. Nakamura Y., Murai T., Ogawa Y. Effect of in vitro and in vivo administration of dexamethasone on rat macrophage functions: comparison between alveolar and peritoneal macrophages // The European Respiratory Journal. 1996. – № 2 (9). – C. 301–306.
182. Nauseef W. M. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases // Biochimica Et Biophysica Acta. 2014. – № 2 (1840). – C. 757–767.
183. Nicolás-Ávila J. Á., Adrover J. M., Hidalgo A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer // Immunity. 2017. – № 1 (46). – C. 15–28.
184. Nilius B., Droogmans G. A Role for K<sup>+</sup> Channels in Cell Proliferation // Physiology. 1994. – № 3 (9). – C. 105–110.
185. Nour A., Hayashi T., Chan M. et al. Discovery of substituted 4-aminoquinazolines as selective Toll-like receptor 4 ligands // Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2014. – № 21 (24). – C. 4931–4938.
186. Obernikhin S. S., Yaglova N. V. Morphological and functional changes in the thymus and spleen of mouse offspring in the development of systemic inflammatory response after

a single immunity stimulation in early pregnancy // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014. – № 6 (157). – C. 812–815.

187. Ohkaru Y. et al. Acute and Subacute Effects of Dexamethasone on the Number of White Blood Cells in Rats // *Journal of Health Science*. 2010. – № 2 (56). – C. 215–220.

188. Olefsky J. M., Glass C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance // *Annual Review of Physiology*. 2010. – (72). – C. 219–246.

189. Olivares-Morales M.J. De La Fuente M., Dubois-Camacho K. et al. Glucocorticoids Impair Phagocytosis and Inflammatory Response Against Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* // *Frontiers in Immunology*. 2018. – (9). – C. 1026.

190. Owen J. Punt J., Stranford S., Jones P. Kuby Immunology // *Macmillan Learning*. 2018. C. 944.

191. Park B. H., Fikrig S. M., Smithwick E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid // *Lancet (London, England)*. 1968. – № 7567 (2). – C. 532–534.

192. Paulnock D. M. Macrophages: A Practical Approach (Practical Approach Series, 239) // *New York: Oxford University Press*. 2000. – C. 211.

193. Pedersen S. F., Counillon L. The SLC9A-C Mammalian Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Family: Molecules, Mechanisms, and Physiology // *Physiological Reviews*. 2019. – № 4 (99). – C. 2015–2113.

194. Peng W., Tu Z.C., Long Z.J. et al. Discovery of 2-(2-aminopyrimidin-5-yl)-4-morpholino-N-(pyridin-3-yl)quinazolin-7-amines as novel PI3K/mTOR inhibitors and anticancer agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016. – (108). – C. 644–654.

195. Pilaczyńska-Cemel M. et al. Analysis of the level of selected parameters of inflammation, circulating immune complexes, and related indicators (neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte, CRP/CIC) in patients with obstructive diseases // *Central-European Journal of Immunology*. 2019. – № 3 (44). – C. 292–298.

196. Poudapally S., Battu S., Velatooru L.R. et al. Synthesis and biological evaluation of novel quinazoline-sulfonamides as anti-cancer agents // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017. – № 9 (27). – C. 1923–1928.
197. Pu Y., Cao D., Xie C. et al. Anti-arthritis effect of a novel quinazoline derivative through inhibiting production of TNF- $\alpha$  mediated by TNF- $\alpha$  converting enzyme in murine collagen-induced arthritis model // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015. – № 4 (462). – C. 288–293.
198. Qhobosheane M. A., Legoabe L.J, Petzer A., Petzer J.P. The monoamine oxidase inhibition properties of C6-mono- and N3/C6-disubstituted derivatives of 4(3H)-quinazolinone // *Bioorganic Chemistry*. 2019. – (85). – C. 60–65.
199. Ray A., Dittel B. N. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2010. – № 35. – C. 1488.
200. Recknagel P., Gonnert F.A., Halilbasic E. et al. Mechanisms and functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats // *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2013. – № 2 (33). – C. 283–293.
201. Remick D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture // *Shock (Augusta, Ga.)*. 2000. – № 2 (13). – C. 110–116.
202. Rietschel, E. Th., Kirikae, T., Schade, F. U. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function // *The FASEB Journal*. 1994. – № 2 (8). – C. 217–225.
203. Rubenfeld G.D., Caldwell E., Peabody E. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury // *The New England Journal of Medicine*. 2005. – № 16 (353). – C. 1685–1693.
204. Sabnis R. W. Novel N-Heteroaryl Quinazolin-2-amine Derivatives as LRRK2 Inhibitors for Treating Parkinson's Disease // *ACS medicinal chemistry letters*. 2021. – № 7 (12). – C. 1063–1064.

205. Saleh H. A., Yousef M. H., Abdelnaser A. The Anti-Inflammatory Properties of Phytochemicals and Their Effects on Epigenetic Mechanisms Involved in TLR4/NF- $\kappa$ B-Mediated Inflammation // *Frontiers in Immunology*. 2021. – (12). – C. 606069.
206. Sarti P., Forte E., Mastronicola D. et al. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: molecular mechanisms and pathophysiological implications // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2012. – № 4 (1817). – C. 610–619.
207. Scanlon K. J., Moroson B.A., Bertino J.R., Hynes J.B. Quinazoline analogues of folic acid as inhibitors of thymidylate synthetase from bacterial and mammalian sources // *Molecular Pharmacology*. 1979. – № 1 (16). – C. 261–269.
208. Seemann S., Zohles F., Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation // *Journal of Biomedical Science*. 2017. – № 1 (24). – C. 60.
209. Segal A. W. Nitroblue-tetrazolium tests // *Lancet (London, England)*. 1974. – № 7891 (2). – C. 1248–1252.
210. Selvam T. P., Kumar P. V. Quinazoline Marketed drugs // *Research in Pharmacy*. 2011. – № 1 (1). – C.1–21.
211. Sert du Percie N. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research // *PLOS Biology*. 2020. – № 7 (18). – C. e3000410.
212. Shi Y., Kim D., Caldwell M., Sun D. The role of Na(+)/h (+) exchanger isoform 1 in inflammatory responses: maintaining H(+) homeostasis of immune cells // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013. – (961). – C. 411–418.
213. Shin, S.A., Joo, B.J., Lee, J.S. et al. Phytochemicals as Anti-Inflammatory Agents in Animal Models of Prevalent Inflammatory Diseases // *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020. – № 24 (25). – C. E5932.
214. Shokrzadeh M., Ahmadi A., Naghshvar F. et al. Prophylactic Efficacy of Melatonin on Cyclophosphamide-Induced Liver Toxicity in Mice // *BioMed Research International*. 2014. – (2014). – C. e470425.

215. Silke J., O'Reilly L. A. NF- $\kappa$ B and Pancreatic Cancer; Chapter and Verse // *Cancers*. 2021. – № 18 (13). – C. 4510.
216. Silverman J. H. WHAT IS...the p-adic Mandelbrot Set? / J. H. Silverman // *Notices of the American Mathematical Society*. 2013. – № 08 (60). – C. 13–19.
217. Simons R. K., Junger, W. G., Loomis, W. H. et al. Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment--role of circulating TNF-alpha and IL-beta? // *Shock* (Augusta, Ga.). 1996. – № 1 (6). – C. 39–45.
218. Singh, S.S., Rai, S.N., Birla, H. et al. NF- $\kappa$ B-Mediated Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Potential Therapeutic Effect of Polyphenols // *Neurotoxicity Research*. 2020. – № 3 (37). –C. 491–507.
219. Sirisoma N., Pervin A., Zhang H. et al. Discovery of N-methyl-4-(4-methoxyanilino)quinazolines as potent apoptosis inducers. Structure-activity relationship of the quinazoline ring // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010. – № 7 (20). – C. 2330–2334.
220. Stepanenko A. A., Dmitrenko V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability / A. A Stepanenko, V. V. Dmitrenko // *Gene*. 2015. – № 2 (574). – C. 193–203.
221. Stortz J.A., Raymond S.L., Mira J.C., Moldawer L.L., Mohr A.M., Efron P.A. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap?/ J.A. Stortz, S.L. Raymond, J.C. Mira, L.L. Moldawer, A.M. Mohr, P.A. Efron // *ILAR Journal*. 2017. – № 1 (58). – C. 90–105.
222. Szewc M., Radzikowska-Büchner E., Wdowiak P. et al. MSCs as Tumor-Specific Vectors for the Delivery of Anticancer Agents—A Potential Therapeutic Strategy in Cancer Diseases: Perspectives for Quinazoline Derivatives // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. – № 5 (23). – C. 2745.

223. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation // *Cell*. 2010. – № 6 (140). – C. 805–820.
224. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014. – № 10 (6). – C. a016295.
225. Thoms H. C., Stark L. A. The NF- $\kappa$ B Nucleolar Stress Response Pathway // *Biomedicines*. 2021. – № 9 (9). – C. 1082.
226. Wainwright M. S., Rossi J., Schavocky J. et al. Protein kinase involved in lung injury susceptibility: Evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. – № 10 (100). – C. 6233–6238.
227. Wang F., Zuo Z., Chen K. et al. Histopathological Changes Caused by Inflammation and Oxidative Stress in Diet-Induced-Obese Mouse following Experimental Lung Injury // *Scientific Reports*. 2018. – № 1 (8). – C. 14250.
228. Wang L., Li P., Li B. et al. Design, Synthesis, and Antitumor Activity of Novel Quinazoline Derivatives // *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*. 2017. – № 10 (22). – C. 1624.
229. Wang M., Zhang G., Wang Y. et al. Design, synthesis and anti-influenza A virus activity of novel 2,4-disubstituted quinazoline derivatives // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020. – № 11 (30). – C. 127143.
230. Wassermann A. M., Camargo L. M., Auld D. S. Composition and applications of focus libraries to phenotypic assays // *Frontiers in Pharmacology*. 2014. – (5). – C. 164.
231. Wdowiak P. et al. Quinazoline Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Urinary Bladder Cancer Therapy // *Frontiers in Chemistry*. 2021. – (9). – C.765552
232. Webber R. J., Sweet R. M., Webber D. S. Inducible Nitric Oxide Synthase in Circulating Microvesicles: Discovery, Evolution, and Evidence as a Novel Biomarker and the Probable Causative Agent for Sepsis // *The journal of applied laboratory medicine*. 2019. – № 4 (3). – C. 698–711.

233. Wilson D., Fanning L. T. D., Krenitsky P. et al. Quinazolines useful as modulators of voltage gated ion channels // WO2007058989A3. 2012.
234. Włodarczyk M., Ograczyk E., Kowalewicz-Kulbat M. et al. Effect of Cyclophosphamide Treatment on Central and Effector Memory T Cells in Mice // International Journal of Toxicology. 2018. – № 5 (37). – C. 373–382.
235. Wu A. H. B. Tietz clinical guide to laboratory tests // 4th ed., St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier. 2006. – C. 1952
236. Xia L.Y., Zhang Y.L., Yang R. et al. Tubulin Inhibitors Binding to Colchicine-Site: A Review from 2015 to 2019 // Current Medicinal Chemistry. 2020. – № 40 (27). – C. 6787–6814.
237. Xu Y., Wang H., Zhou S. et al. Risk of second malignant neoplasms after cyclophosphamide-based chemotherapy with or without radiotherapy for non-Hodgkin lymphoma // Leukemia & Lymphoma. 2013. – № 7 (54). – C. 1396–1404.
238. Yancey K. B., Lawley T. J. Circulating immune complexes: their immunochemistry, biology, and detection in selected dermatologic and systemic diseases // Journal of the American Academy of Dermatology. 1984. – № 5 Pt 1 (10). – C. 711–731.
239. Yang L., Liu S., Chu J., et al. Novel anilino quinazoline-based EGFR tyrosine kinase inhibitors for treatment of non-small cell lung cancer // Biomaterials Science. 2021. – № 2 (9). – C. 443–455.
240. Youdim M. B. H., Bakhle Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness // British Journal of Pharmacology. 2006. – № 147 (Suppl 1). – C. 287–296.
241. Zabrodskii P.F., Mandych V.G. Immunotoxicology of xenobiotics // Saratov, Saratov Military Institute of Biological and Chemical Safety. 2007. – C. 420.
242. Zayed M. F., Rateb H.S., Ahmed S. et al. Quinazolinone-Amino Acid Hybrids as Dual Inhibitors of EGFR Kinase and Tubulin Polymerization // Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry. 2018. – № 7 (23). – C. 1699.

243. Zhang J.-M., An J. Cytokines, Inflammation and Pain // International anesthesiology clinics. 2007. – № 2 (45). – C. 27–37.
244. Zhang T., Wang J., Wang S., Ma C. Timosaponin B-II inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung toxicity via TLR/NF- $\kappa$ B pathway // Toxicology Mechanisms and Methods. 2015. – № 9 (25). – C. 665–671.
245. Zhang X., Yan F., Feng J. et al. Dexmedetomidine inhibits inflammatory reaction in the hippocampus of septic rats by suppressing NF- $\kappa$ B pathway // PloS One. 2018. – № 5 (13). – C. e0196897.
246. Zhang Y., He H., Zhang B. et al. Amelioration of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Rats by Na-H Exchanger-1 Inhibitor Amiloride Is Associated with Reversal of ERK Mitogen-Activated Protein Kinase // BioMed Research International. 2018. – (2018). – C. 3560234.
247. Zhang Z., Pan T., Liu C. et al. Cyclophosphamide induced physiological and biochemical changes in mice with an emphasis on sensitivity analysis // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2021. – (211). – C. 111889.
248. Zhao J., Niu X., Yu J. et al. Poria cocos polysaccharides attenuated ox-LDL-induced inflammation and oxidative stress via ERK activated Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibited foam cell formation in VSMCs // International Immunopharmacology. 2020. – (80). – C. 106173.
249. Zhong Y., Zhang X., Hu X. et al. Effects of Repeated Lipopolysaccharide Treatment on Growth Performance, Immune Organ Index, and Blood Parameters of Sprague-Dawley Rats // Journal of Veterinary Research. 2018. – № 3 (62). – C. 341–346.
250. Zhou R., Luo F., Lei H. et al. Liujunzi Tang, a famous traditional Chinese medicine, ameliorates cigarette smoke-induced mouse model of COPD // Journal of Ethnopharmacology. 2016. – (193). – C. 643–651.

251. Zimecki M., Artym J., Kocięba M. et al. Immune function in cyclophosphamide-treated mice is restored by the T-cell-tropic isoxazole derivative R-13 // *Journal of Immunotoxicology*. 2015. – № 4 (12). – C. 322–329.
252. Zwick E., Bange J., Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies // *Endocrine-Related Cancer*. 2001. – № 3 (8). – C. 161–173.