

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-10-9-12

ПРОТИВОАЛЛЕРГЕННАЯ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 5-ОКСИПИРИМИДИНА (СНК-411 И СНК-578)

Л. П. Коваленко, К. В. Коржова, С. В. Никитин¹

Производные 5-оксипириимидина СНК-411 и СНК-578 (10–50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, однократно, мышцы) обладают выраженной противовоспалительной активностью, сопоставимой с диклофенаком. На модели анафилаксии к овалбумину у морских свинок-альбиносов выявлена противоаллергенная активность этих соединений. СНК-411 при внутрисердечном введении 50 мг/кг (после формирования модели) в 1,8 раза уменьшает индекс по Weigle анафилактической реакции у морских свинок на овалбумин. СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг снижает индекс анафилактической реакции в 2,8 и в 10 раз, соответственно ($p < 0,05$).

Ключевые слова: 5-оксипириимидины; конканавалин А; анафилаксия; овалбумин; мышцы; морские свинки.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время определена опухолеобразующая роль хронического воспаления, в частности около 20 % случаев различных типов рака вызвано хроническим воспалением [8]. В связи с этим поиск новых противоопухолевых соединений с противовоспалительной активностью, участвующих в регуляции действия цитокинов, продуцируемых Th1- и Th2- лимфоцитами, рассматривается одним из перспективных направлений в иммунотерапии онкологических заболеваний [10]. В отделе химии ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” синтезированы и запатентованы 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидин (СНК-411, патент RU2518889 C2, Bull. № 16, 10.06.2014, ФИПС, Москва) и СНК-578 (хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидина, патент RU 2686672 C1). У СНК-411 в экспериментах *in vivo* были выявлены иммуномодулирующие, противоопухолевые и антиметастатические свойства и показано отсутствие побочных эффектов, по сравнению с фторированным пиримидином фторафуром и антрациклиновым антибиотиком доксорубицином [4, 5]. При изучении противоопухолевых свойств СНК-411 было выявлено выраженное подавление уровней провоспалительного интерлейкина (ИЛ)-6 и плейотропного ИЛ-4 в сыворотке крови мышей C57BL/6 с эпидермоидной карциномой легкого Lewis (LLC) [6]. Целью настоящего исследования явилось изучение наличия противовоспалительной и противоаллергенной активности у производных 5-оксипириимидина СНК-411 и СНК-578 в реакции воспаления на конканавалин А (Кон А) у мышей линии СВА и на модели системной анафилаксии на овалбумин в опытах на морских свинках-альбиносах [3].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 100 мышах-самцах линии СВА массой 18–20 г и 62 самцах морских свинок-альбиносов массой 250–300 г, полученных из питомников “Столбовая” и “Андреевка”. Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды (18–26 °С и 30–70 % относительная влажность). При содержании животных поддерживали 12-часовой цикл освещения и 8–10-кратную смену объема воздуха в час. Использовали комбикорм производства ООО “МЭСТ” (Москва, Россия). Все эксперименты выполняли в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы национальной лабораторной практики”, Приказом Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”, согласно утвержденному протоколу. Противовоспалительные свойства производных 5-оксипириимидина изучали по степени выраженности реакции воспаления у мышей линии СВА на Кон А. Производные 5-оксипириимидина и препарат сравнения диклофенак (Agiо Pharmaceuticals, Индия) вводили 100 мышам в 2 сериях опытов по 10 мышей в каждой группе (табл. 1) однократно внутривнутрибрюшинно, диклофенак в дозе 10 мг/кг, СНК-411 и СНК-578 — в дозах 10, 25 и 50 мг/кг (диклофенак и СНК-578 в виде растворов в стерильной воде для инъекций в объеме 0,2 мл на 20 г массы тела мыши, СНК-411 в 1 % растворе крахмала в том же объеме). Контрольным мышам вводили внутривнутрибрюшинно по 0,2 мл на 20 г массы тела стерильной воды для инъекций. Через 60 мин мышам опытных и контрольных групп субплантарно в подушечку задней стопы микрошприцом фирмы Hamilton вводили Кон А (Sigma-Aldrich, Германия) [3] в дозе 100 мкг/20 г массы тела (20 мкл раствора в концентрации 5 мг/мл), в кон-

¹ ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” Россия, 125315, Москва, Балтийская ул., 8.

тралатеральную конечность — такой же объем изотонического раствора хлорида натрия. Далее через 60 мин мышей выводили из эксперимента методом ингаляции углекислым газом, ампутировали задние лапы на уровне голеностопного сустава и определяли массу лап на торсионных весах, затем подсчитывали индекс реакции. Доза 10 мг/кг диклофенака для инъекционного введения мышам соответствует дозе 75 мг/кг для человека, согласно нашим предыдущим данным, в этой дозе у диклофенака выявлено выраженное противовоспалительное действие на моделях реакции острого экссудативного воспаления на Кон А у мышей и на каррагенан — у крыс.

Индекс реакции воспаления рассчитывали по формуле:

$$I_p = \frac{P_{\text{оп}} - P_{\text{к}}}{P_{\text{к}}} \cdot 100 \%,$$

где $P_{\text{оп}}$ — масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили Кон А; $P_{\text{к}}$ — масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили изотонический раствор натрия хлорида.

При изучении противоаллергенных свойств 5-оксипиримидина была выбрана модель сенсibilизации интактных морских свинок-альбиносов 1 или 0,6 % раствором белка куриного яйца (БКЯ), основным аллергенным компонентом которого является овальбумин [3]. В предварительных экспериментах 6 интактным морским свинкам-альбиносам внутрисердечно вводили 1 % раствор БКЯ, токсичных и анафилактикоидных реакций не выявлено. В качестве препарата сравнения при изучении противоаллергенных свойств использовали супрастин (раствор для инъекций, Egis, Венгрия) в дозе 50 мг/кг. В первой серии опытов всем животным контрольной и 2 опытных групп (табл. 2) для получения системной реакции анафилаксии [3] перорально вводили 1 % раствор БКЯ в дозе 1 мл на 250 г массы тела однократно в течение 3 дней (растворенный в физиологическом растворе БКЯ морским свинкам вводили внутрь через мягкий пластмассовый зонд). Через 12 дней после начала иммунизации БКЯ животным 2 опытных групп в течение 3 дней внутрибрюшинно вводили СНК-411 или супрастин в дозе 50 мг/кг, во второй серии опытов морских свинок иммунизировали 0,6 % раствором БКЯ, через 12 сут вводили трехкратно СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг, а также супрастин в дозе 50 мг/кг, контрольным животным вводили соответствующий объем физиологического раствора. При изучении противоаллергенной активности СНК-411 в первой серии опытов на 16 день эксперимента животным опытных групп внутрибрюшинно вводили СНК-411 или супрастин в дозе 50 мг/кг, контрольным животным — физиологический раствор. При исследовании противоаллергенной активности СНК-578 на 16 день опыта животным 3 опытных групп внутрибрюшинно вводили СНК-578 в дозах 25 или 50 мг/кг и супрастин в дозе 50 мг/кг. Через 1 ч после введения СНК-411, СНК-578

или супрастина животным всех групп внутрисердечно вводили 0,3 мл 1 % раствора БКЯ на 300 г массы тела, после чего в течение 5 мин регистрировали развитие анафилактической реакции и проводили вычисление анафилактического индекса по Weigle [3] по следующей формуле:

$$\frac{(N \cdot 4) + (N_1 \cdot 3) + (N_2 \cdot 2) + (N_3 \cdot 1) + (N_4 \cdot 0)}{N + N_1 + N_2 + N_3 + N_4},$$

где N — число морских свинок, у которых наступила смерть (спазм дыхательных путей, прыжки, судороги, гибель животного); N_1 — число морских свинок, у которых развился тяжелый шок (спастический кашель, боковое положение животного, мочеиспускание, у части животных паралич задних конечностей); N_2 — число морских свинок, у которых развился умеренный шок (четко выраженные частые почесывания лапками носа, единичные чихания); N_3 — число морских свинок, у которых развился слабый шок (кратковременное почесывание лапами носа, взъерошивание шерсти); N_4 — морские свинки, у которых отсутствовали анафилактические реакции. При гибели всех животных в группе индекс Weigle составляет 4 (++++). При тяжелом шоке — 3 (+++), при умеренном шоке — 2 (++) , при слабом шоке — 1 (+), при отсутствии анафилактоидных реакций у морских свинок — индекс равен 0. Иммунизация 1% раствором БКЯ приводила в контрольной группе к быстрой 100 % гибели всех животных, максимальный индекс реакции по Weigle составил 4,0. Согласно ранее проведенным исследованиям [3], для получения системной реакции анафилаксии различной степени тяжести во второй серии опытов животных контрольной ($n = 8$) и опытных ($n = 8$) групп иммунизировали 0,6 % раствором БКЯ (перорально) в течение 3 дней, далее по аналогичной схеме вводили СНК-578 дозах 25 и 50 мг/кг, препарат сравнения супрастин вводили в дозе 50 мг/кг, на 4 сут после 3-кратного применения СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг и супрастина в дозе 50 мг/кг через 1 ч внутрисердечно вводили 0,3 мл 1 % раствора БКЯ [3, 7]. Полученные данные представляли как $MEAN \pm SEM$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего), проверку данных на нормальность распределения выборок определяли по критерию Шапиро — Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью непарного t -критерия Стьюдента и критерия Манна — Уитни. Достоверность результатов исследований подтверждается использованием адекватных методов статистической обработки, а также повторами серий опытов. Обработка экспериментальных данных была проведена с помощью программы Statistica 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения противовоспалительных свойств СНК-411 и СНК-578 в сравнении с диклофенаком представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, ин-

декссы реакции воспаления в обеих сериях опытов у животных контрольных групп и препарата сравнения диклофенака статистически не различаются. В первой серии опытов диклофенак подавлял реакцию воспаления на Кон А на 37 %, во второй серии — на 44 %. Однократное внутрибрюшинное введение СНК-411 в дозе 10 мг/кг приводило к подавлению реакции воспаления на Кон А на 51 %, введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг — на 72 %. Введение СНК-411 и СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг достоверно не сопровождалось усилением противовоспалительного эффекта, по сравнению с производными 5-оксипириимидина в дозе 10 мг/кг. Таким образом, производные 5-оксипириимидина СНК-411 и СНК-578 в диапазоне доз 10 – 50 мг/кг при внутрибрюшинном введении обладают выраженной противовоспалительной активностью в опытах на мышцах-самцах линии СВА, сопоставимой с диклофенаком в реакции воспаления на Кон А. В наших ранее проведенных исследованиях при изучении противовоспалительных свойств ноопепта и диклофенака в реакции воспаления на Кон А субплантарное введение 20 мкл Кон А мышам линии СВА в 15,5 раз увеличивало концентрацию ИЛ-6 в сыворотке крови контрольных животных. Однократное внутрибрюшинное введение диклофенака в дозе 10 мг/кг на 63 % подавляло реакцию воспаления на Кон А и в 2,5 раза уменьшало концентрацию ИЛ-6 в сыворотке крови мышей опытной группы [1]. Согласно данным литературы, провоспалительный ИЛ-6 является связующим звеном в сигнальном пути JAK/STAT3 между воспалением и стимуляцией метастазирования многих видов рака, в частности LLC [9].

При изучении противоаллергической активности в первой серии опытов иммунизация свинок 1 % БКЯ (табл. 2) в контрольной группе у всех 8 морских свинок вызывала тяжелую реакцию системной анафилаксии, которая закончилась быстрой гибелью всех животных, индекс реакции по Weigle составил 4,0. При внутрибрюшинном введении на 16 день опыта супрастина или СНК-411 в дозе 50 мг/кг, затем через 1 ч при внутрисердечном введении разрешающей дозы аллергена (1 % раствора БКЯ) у 3 из 8 животных, которым в течение

Таблица 1. Влияние производных 5-оксипириимидина и диклофенака на индекс реакции воспаления у мышей линии СВА на конканавалин А ($M \pm m$)

Группа, $n = 10$	Индекс реакции воспаления на Кон А
1-я серия опытов	
Контроль (физиологический раствор)	17,8 ± 2,1
Диклофенак, 10 мг/кг	11,2 ± 1,1*
СНК-411, 10 мг/кг	8,7 ± 2,1**
СНК-411, 25 мг/кг	6,0 ± 2,3**
СНК-411, 50 мг/кг	9,5 ± 2,3*
2-я серия опытов	
Контроль (физиологический раствор)	16,3 ± 1,8
Диклофенак, 10 мг/кг	9,1 ± 1,3**
СНК-578, 10 мг/кг	4,6 ± 2,0**
СНК-578, 25 мг/кг	6,2 ± 2,5**
СНК-578, 50 мг/кг	6,0 ± 1,8**

Примечание: n — количество животных в каждой группе; по сравнению с контрольной группой по t -критерию Стьюдента: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

опыта вводили супрастин, и у 2 из 8 животных, которым вводили СНК-411, реакция анафилаксии на овальбумин отсутствовала. У остальных животных наблюдали анафилактическую реакцию различной степени тяжести, индекс реакции по Weigle в группе животных, которым вводили супрастин составил 1,1, СНК-411-2,25.

Во второй серии опытов при введении 0,6 % раствора БКЯ у всех животных контрольной группы развивалась реакция анафилаксии различной степени тяжести, индекс реакции по Weigle составил 2,5. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг индекс по Weigle составил 0,9. При введении СНК-578 в дозе 50 мг/кг индекс реакции по Weigle составил 0,25. Супрастин в дозе 50 мг/кг обладал достоверным противоаллергенным эффектом, индекс реакции по Weigle составил 0,6. Таким образом, СНК-411 при внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг в 1,8 раза уменьшает индекс анафилактической реакции по Weigle на 1 % раствор овальбумина

Таблица 2. Противоаллергенные свойства СНК-411 и СНК-578 на модели реакции общей анафилаксии на овальбумин у морских свинок

Число животных в каждой группе $n = 8$	Индекс реакции по Weigle	Отсутствие реакции	Слабый шок	Умеренный шок	Тяжелый шок	Гибель
		0	+	++	+++	++++
число животных с различной степенью реакции анафилаксии						
Контроль БКЯ 1 %	4,0	—	—	—	—	8
Супрастин 50 мг/кг	1,1*	3	2	2	1	—
СНК-411 50 мг/кг	2,25*	2	2	—	—	4
Контроль БКЯ 0,6 %	2,5	—	3	1	1	3
Супрастин 50 мг/кг	0,6*	5	1	2	—	—
СНК-578 25 мг/кг	0,9*	5	1	1	—	1
СНК-578 50 мг/кг	0,25*	6	2	—	—	—

Примечание: n — количество животных в каждой группе; * $p < 0,05$, при сравнении с контрольной группой по критерию Манна — Уитни.

($p < 0,05$), СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг — в 2,8 и в 10 раз снижает индекс анафилактической реакции на 0,6 % раствор овальбумина ($p < 0,05$). Полученные данные указывают на наличие противоаллергенной активности у СНК-411 и СНК-578. СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг обладает противоаллергенным действием, сопоставимым с действием супрастина.

По данным литературы, хроническое воспаление и стресс часто являются причиной активации синтеза провоспалительных цитокинов, изменения сигнальных путей, вторичного иммунодефицита, в результате которого нарушается баланс Th1- и Th2-лимфоцитов [8, 9]. При аллергии и ряде онкологических заболеваний наблюдается сдвиг в сторону синтеза Th2-лимфоцитов. ИЛ-4 и ИЛ-13 являются основными стимулами для “альтернативной” активации иммунного ответа, приводящей к синтезу специфического иммуноглобулина Е (IgE) и аллергическим реакциям немедленного типа [2, 10]. Согласно экспериментальным и клиническим исследованиям последних лет, плейотропный ИЛ-4 действует также как опухольстимулирующий цитокин и играет ключевую роль в течение опухолевой прогрессии, блокада ИЛ-4 замедляет опухолевый рост и продлевает выживаемость мышей с различными опухолями [9, 10].

Таким образом, у производных 5-оксипиримидина СНК-411 и СНК-578 с противоопухолевой активностью [4, 5] выявлено наличие противовоспалительных и противоаллергенных свойств, что согласуется с полученными ранее данными о подавлении уровня провоспалительного ИЛ-6 и плейотропного ИЛ-4 в сыворотке крови мышей C57BL/6 с LLC.

ВЫВОДЫ

1. Производные 5-оксипиримидина СНК-411 и СНК-578 в дозе 10 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии СВА подавляли реакцию воспаления на конканавалин А на 51 и 72 %, соответственно ($p < 0,01$). Введение СНК-411 и СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг не приводило к достоверному увеличению противовоспалительной активности по сравнению с дозой 10 мг/кг.

2. СНК-411 при 4-кратном внутрибрюшинном введении морским свинкам в дозе 50 мг/кг (после моделирования реакции системной анафилаксии) в 1,8 раза уменьшает индекс анафилактической реакции по Weigle на внутрисердечное введение 1 % раствора овальбумина ($p < 0,05$), СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг — в 2,8 и в 10 раз снижает индекс анафилактической реакции на 0,6 % раствор овальбумина ($p < 0,05$) по сравнению с активным контролем, что указывает на наличие у производных 5-оксипиримидина противоаллергенной активности.

Работа выполнена в рамках Госзадания по теме № 0521-2019-0004”.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Алексеева, Л. П. Коваленко, А. В. Таллерова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(9), 25 – 27 (2012); doi: 10.30906 / 0869-2092-2012-75-9-25-27.
2. И. С. Гушин, *Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль*, Формаруспринт, Москва (1998).
3. Л. П. Коваленко, В. Н. Федосеева, А. Д. Дурнев и др., *Методические рекомендации по оценке аллергизирующих свойств лекарственных средств*, в: *Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Москва (2012), сс. 51 – 63.
4. Л. П. Коваленко, О. С. Кузнецова, А. В. Таллерова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **161**(1), 114 – 118 (2016); doi: 10.1007 / s10517-016-3355-9.
5. С. В. Никитин, Л. П. Коваленко, А. Г. Ребеко и др., *Хим.-фарм. журн.*, (8), 20 – 23 (2019); doi: 10.30906 / 0023-1134-2019-53-8-20-23.
6. О. С. Кузнецова, А. В. Таллерова, С. В. Никитин и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **160**(10), 488 – 491 (2015).
7. Т. Г. Хлопушина, А. В. Кринская, Л. П. Коваленко. и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **7**, 67 – 69 (1991).
8. M. R. Galdiero, G. Marone, A. Mantovani, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**(8), a028662 (2017); doi: 10.1101 / cshperspect.a028662.
9. K. Taniguchi, M. Karin, *Seminars in Immunol.*, **26**(1), 54 – 74 (2014); doi: 10.1016 / j.smim.2014.01.001
10. H. W. Wang, J. A. Joyce, *Cell Cycle*, **9**(24), 4824 – 4835 (2010); doi: 10.4161 / cc.9.24.14322.

Поступила 30.09.20

ANTIALLERGIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF 5-OXYPYRIMIDINE DERIVATIVES (SNK-411 AND SNK-578)

L. P. Kovalenko, K. V. Korzhova, and S. V. Nikitin

V. V. Zakusov State Research Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

5-Oxypyrimidine derivatives SNK-411 and SNK-578 (administered at 10 – 50 mg/kg i.p.) in mice exhibit pronounced anti-inflammatory activity comparable to that of diclofenac in the inflammatory response to concanavalin A. Antiallergic activity was revealed on the model of systemic anaphylaxis reaction to ovalbumin in experiments on albino guinea pigs. When administered intraperitoneally at a dose of 50 mg/kg (after the model damage formation), SNK-411 reduces the Weigle index of anaphylactic reaction to ovalbumin 1.8 times (at $p < 0.05$). SNK-578 also produces antiallergic effect at doses of 25 and 50 mg/kg by reducing the anaphylactic reaction index 2.8 and 10 times, respectively ($p < 0.05$).

Keywords: 5-oxypyrimidine; concanavalin A; anaphylaxis; ovalbumin; mice; guinea pigs.