

На правах рукописи

Цибизова Александра Александровна

**ИММУНОТРОПНАЯ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ
АКТИВНОСТЬ ХИНАЗОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

ВОЛГОГРАД–2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: член-корреспондент РАН,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Иван Николаевич Тюренков

Научный консультант: доктор медицинских наук, доцент
Марина Александровна Самотруева

Официальные оппоненты:

Гунар Ольга Викторовна – доктор фармацевтических наук, начальник лаборатории микробиологии испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ.

Яснецов Виктор Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес (индекс, город, улица, дом): Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29

Телефон приемной: +7 (863) 250-42-00

e-mail: okt@rostgmu.ru

сайт: www.rostgmu.ru

Защита состоится «___» _____ 20 __ г. в _____ ч. на заседании Диссертационного совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20 __ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследования последних лет дают основание утверждать, что иммунная система вовлечена во многие физиологические и патофизиологические процессы в организме, играя важную роль в адаптационных процессах организма, в накоплении энергетического и пластического материала (Инжутова А.И. и др., 2012; Gomes A. et al., 2016). (Петров Р.В. и др., 2017), в синтезе нуклеиновых кислот (Giuliani A.L. et al., 2018), гормонов, цитокинов (Кветной И.М. и др., 2000), нейромедиаторов (Александровский Ю.А. и др., 2005), ферментов антиоксидантной защиты и др. (Зборовская И.А. и др., 2013). Иммунной системе также отводится роль регулятора апоптоза, обусловленного дефицитом факторов роста, секретируемых в том числе иммунокомпетентными клетками (Самотруева М.А. и др., 2009; Геннадиник А.Г. и др., 2010; Тишевская Н.В. и др., 2015; Wang F. et al., 2017).

Не вызывает сомнений тот факт, что иммунопатология выступает в качестве этиопатогенетического звена в развитии инфекционных, аутоиммунных, аллергических, нейродегенеративных, онкологических и других заболеваний (Земсков А.М. и др., 2012). Нарушения иммунологической реактивности организма, возникающие нередко на фоне инфекционной патологии и длительной фармакотерапии антибактериальными и химиотерапевтическими средствами, обуславливают необходимость создания новых безопасных и эффективных иммуотропных лекарственных препаратов с противомикробной активностью (Манько В.М., 2016; Сепиашвили Р.И., 2016; Петров Р.В. и др., 2017).

В настоящее время внимание исследователей привлекают пиримидины – природные нуклеотиды, оказывающие полифункциональное влияние на процессы секреции иммуномедиаторов, пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоза и регенерации. Повышенное внимание к нуклеотидной регуляции обусловлено активным участием пиримидинов в таких процессах, как модуляция болевой чувствительности и стресс-реакций, опухолевая трансформация и прогрессия, воспаление, в том числе и инфекционной этиологии (Киселева Е.С. и др., 2010; Серебряная Н.Б., 2010; Giuliani A.L. et al., 2018; Morandi F. et al., 2018; Shinohara Y. et al., 2018). Среди пиримидиновых соединений, особый интерес представляют хиназолиновые производные с доказанной широкой фармакологической активностью, что актуализируют целесообразность поиска в их ряду новых средств с иммуотропным и противомикробным действием.

Степень разработанности проблемы. В последние годы проведено большое количество исследований, подтверждающих многогранность фармакологических эффектов хиназолиновых соединений. Выявлено, что хиназолиновые производные оказывают противовоспалительное, ноотропное, спазмолитическое, антиагрегантное, диуретическое, противоопухолевое, а также противоинфекционное и иммуотропное действие (Макляков Ю.С. и др., 2006; Гимадиева А.Р. и др., 2007; Зыкова С.И., 2011; Бандура А.Ф. и др., 2014; Poudapally S. et al., 2017; Hameed A. et al., 2018). Однако, противомикробные и иммуномодулирующие свойства бензаннелированных соединений из группы хиназолиновых производных изучены недостаточно.

Цель исследования: обосновать перспективы поиска средств с иммуно-тропной и противомикробной активностью в ряду бензаннелированных соединений из группы хиназолиновых производных.

Задачи исследования:

1. Провести в ряду синтезированных хиназолиновых производных скрининг веществ, обладающих иммунотропной активностью на фоне экспериментальной циклофосфамидной иммунодепрессии.
2. Изучить выраженность иммунотропного действия наиболее перспективных соединений хиназолинового ряда в аспектах «доза-эффект» и в зависимости от индукции иммуносупрессии.
3. Провести оценку иммунокорригирующего действия наиболее перспективных изучаемых веществ на фоне экспериментального иммунного стресса.
4. Оценить влияние наиболее перспективных хиназолиновых соединений на показатели белой крови и фагоцитарную активность нейтрофилов на фоне экспериментальных моделей циклофосфамидной иммунодепрессии и острого иммунного стресса.
5. Провести оценку противомикробной активности хиназолиновых производных *in vitro* в отношении *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* и *Acinetobacter baumannii*.
6. Исследовать эффективность изучаемых субстанций при экспериментальной генерализованной инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus*, *in vivo*.
7. Обосновать перспективность разработки новых иммунотропных средств на основе новых бензаннелированных соединений из группы хиназолиновых производных для коррекции различных иммунологических нарушений, а также в качестве противомикробных средств.

Новизна результатов исследования. Впервые осуществлена оценка выраженности иммунотропных и противомикробных свойств новых бензаннелированных соединений из группы хиназолиновых производных, имеющих C = O фрагменты как непосредственно в пиримидиновом цикле, так и в составе заместителей при атоме азота в положении 3 гетероциклической системы, с целью определения наиболее перспективных из них. Определены наиболее эффективные дозы изученных хиназолиновых производных 3-[2-Бензилокси-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он (VMA-13-03 – 31 мг/кг), 3-[2-(1-Нафтил)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он (VMA-13-04 – 34 мг/кг), а также оптимальный период введения в зависимости от фазы индукции иммунопатологии.

Впервые получены сведения о том, что хиназолиновые производные VMA-13-03 и VMA-13-04 восстанавливают параметры клеточного и гуморального звеньев иммуногенеза, показатели белой крови и фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови на фоне экспериментальных моделей циклофосфамидной иммунодепрессии и иммунного стресса.

Доказана противомикробная активность хиназолиновых производных VMA-13-03 и VMA-13-04 в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* и *Acinetobacter baumannii*.

Впервые получены данные о том, что хиназолиновые производные VMA–13–03 и VMA–13–04 в условиях экспериментальной генерализованной инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus*, повышают выживаемость животных, снижают бактериальную обсемененность внутренних органов и крови.

Научно-практическая значимость работы и внедрение результатов исследования. Проведенные исследования позволили установить иммуотропное влияние новых бензаннелированных соединений – хиназолиновых производных, а также их противомикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* и *Acinetobacter baumannii*. В ходе экспериментальных исследований выбраны наиболее перспективные хиназолиновые производные для дальнейшего исследования с целью создания на их основе иммуотропных и противомикробных лекарственных препаратов.

Полученные результаты исследования иммуотропной и противомикробной активности хиназолиновых производных внедрены в образовательный и научный процесс в Астраханском государственном медицинском университете, Волгоградском государственном медицинском университете и его филиале – Пятигорском медико-фармацевтическом институте, Курском государственном медицинском университете, Петрозаводском государственном университете, Пермской государственной фармацевтической академии.

Методология и методы исследования. В работе использован комплексный подход к изучению иммуотропного влияния бензаннелированных соединений из группы хиназолиновых производных на клеточный, гуморальный и врожденный иммунитет, показатели белой крови на лабораторных животных в условиях иммунодепрессии и иммунного стресса. Противомикробную активность производных хиназолина изучали на штаммах *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, а противoinфекционную при генерализованной инфекции – с использованием методических рекомендаций по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012) и применением рекомендованных методов статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту.

1. Бензаннелированные соединения из группы хиназолиновых производных, имеющих C = O фрагменты как непосредственно в пиримидиновом цикле, так и в составе заместителей при атоме азота в положении 3 гетероциклической системы на фоне циклофосфамид-индуцированной иммунодепрессии, способствуют увеличению массы и клеточности иммунокомпетентных органов – проявляют иммуотропные свойства, что обосновывает перспективы поиска иммуотропных средств в данном химическом ряду.

2. Наиболее выраженный иммуотропный эффект проявляют новые хиназолиновые производные пиримидина из ряда кетонов с нафтильным заместителем боковой цепи (VMA–13–04, 3-[2-Бензилокси-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он) и сложноэфирное соединение с бензильным радикалом (VMA–13–03, 3-[2-(1-Нафтил)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он), которые активны как при профилактическом, так и при лечебном введении в широком диапазоне доз 15,5–124 мг/кг (максимальный эффект – 31 мг/кг) и 17–136 мг/кг (максимальный эффект –

34 мг/кг) соответственно, что обосновывает перспективность их дальнейшего изучения с целью разработки на их основе эффективных иммуотропных средств. Вещества VMA-13-03 и VMA-13-04 восстанавливают пролиферативные процессы в иммунных органах, индукцию реакции гиперчувствительности замедленного типа и уровень выработки антител к эритроцитам барана в реакции прямой гемагглютинации на фоне экспериментальной циклофосфамидной иммунодепрессии и острого липополисахаридного иммунного стресса.

3. Хиназолиновые производные VMA-13-03 и VMA-13-04 способствуют нормализации пролиферативных процессов в иммунных органах, индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа и уровня выработки антител к эритроцитам барана в реакции прямой гемагглютинации на фоне экспериментальной циклофосфамидной иммунодепрессии и острого липополисахаридного иммунного стресса, что свидетельствует о наличии у них иммуномодулирующего действия.

4. Субстанции VMA-13-03 и VMA-13-04 проявляют иммунокорригирующее действие в отношении показателей белой крови и процессов лимфопоэза и стимулируют фагоцитарную активность нейтрофилов.

5. Хиназолиновые производные VMA-13-03 и VMA-13-04 оказывают противомикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*.

6. Соединения VMA-13-03 и VMA-13-04 в условиях экспериментальной генерализованной инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus*, способствуют увеличению продолжительности жизни лабораторных животных и формированию противомикробного иммунитета.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в формулировке рабочей концепции исследования, задач, выводов и научно-практических рекомендаций, разработке дизайна исследования, подборе его методов, разработке протоколов экспериментов. Автором самостоятельно обобщены и проанализированы данные литературы по проблеме, выполнена экспериментальная часть работы, проведена статистическая обработка и описаны результаты исследования.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность результатов подтверждается значительным объемом экспериментальных данных и адекватных, общепринятых методов и критериев статистической обработки данных. Апробация диссертационного исследования осуществлена в ходе следующих конференций: Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы и перспективы развития медицины» (Омск, 2015); Международная научно-практическая конференция «Приоритетные задачи и стратегии развития медицины и фармакологии» (Тольятти, 2016 г.); Научно-практическая конференция с международным участием «Фармацевтические науки: от теории к практике» (Астрахань, 2016 г.); IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2016 г.); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 50-летию фармацевтического факультета КГМУ, «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития» (Курск, 2016 г.); Научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической

разработке» (Москва, 2018 г.); Межрегиональный конгресс «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении» (Ярославль, 2018 г.).

По тематике диссертационного исследования опубликовано 16 печатных работ, в том числе 6 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 2 работы, индексируемые в Scopus.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 4 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций и библиографического списка, включающего в себя 274 источника, из них – 193 отечественных и 81 зарубежных авторов. Работа проиллюстрирована 17 таблицами, 30 рисунками и 8 схемами.

СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой главе рассмотрены современные представления о механизмах реализации иммунологических процессов в норме и патологии, дана характеристика современным иммуностропным средствам, приведена их классификация и проанализированы основные механизмы действия, а также представлен спектр фармакологической активности и механизм действия производных пиримидинов.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования, которое выполняли на 460 мышах линии СВА 3–4-месячного возраста обоего пола. При проведении экспериментальных исследований учитывали требования Комиссии по проблеме этики отношения к животным Российского национального Комитета по биоэтике при Российской академии наук и этические нормы, изложенные в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1989). Кроме того, исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России (протокол № 6 от 27.11.2018 г.).

В экспериментальной части использовали методики, рекомендованные при проведении доклинических исследований новых фармакологических субстанций. Иммунореактивность животных оценивали на основании стандартных иммунофармакологических тестов: реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), реакции прямой гемагглютинации (РПГА), латексного теста по изучению фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови, определения массы и количества клеток иммунокомпетентных органов, изучения лейкоцитарной формулы (Миронов А.Н. и др., 2012). Оценку противомикробной активности для хиназолиновых производных под лабораторными шифрами VMA–13–03 и VMA–13–04 осуществляли *in vitro* методом последовательных разведений с применением тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, выделенных из мокроты больных (ГБУЗ АО «Городская клиническая больница № 3 им. С.М. Кирова», Астрахань). Оценку влияния хиназолиновых производных на формирование противоинфекционного иммунитета проводили *in vivo* на мышах 5-недельного возраста. Генерализованную инфекцию моделировали внутрибрюшинным введением *Staphylococcus aureus* в минимальной летальной дозе возбудителя ($\times 10^8$ микробных тел), вызывающей

100 % гибель животных. Оценивали влияние хиназолиновых производных на выживаемость мышей. После выведения животных из эксперимента проводили подсчет индекса обсемененности крови и внутренних органов (печени и селезенки).

Третья глава посвящена изучению потенциальной иммуотропной активности девяти хиназолиновых производных¹ (табл. 1).

Таблица 1 – Хиназолиновые производные

Шифр соединения	Химическая формула	Радикалы			
		R ¹	R ²	R ³	R ⁴
VMA–13–01	3-(2-Оксопропил)хиназолин-4(3H)-он	H	H	CH ₃	H
VMA–13–02	3-(2-Фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он	H	H	C ₆ H ₅	H
VMA–13–04	3-[2-(1-Нафтил)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он	H	H	1-C ₁₀ H ₇	H
VMA–13–06	3-[2-(1-Нафтил)-2-оксоэтил]-6-бромхиназолин-4(3H)-он	H	Br	1-C ₁₀ H ₇	H
VMA–13–11	3-(2-Трет.-бутил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он	H	H	C(CH ₃) ₃	H
VMA–13–12	3-(2-Изопропилокси-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он	H	H	OCH(CH ₃) ₂	H
VMA–13–13	2-Метил-3-(2-фенил-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он	CH ₃	H	C ₆ H ₅	H
VMA–13–14	3-[2-[(4,6-Диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он	H	H	C ₆ H ₈ N ₃	H
VMA-13-03	3-(2-Бензилокси-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он	H	H	H	CH ₂ C ₆ H ₅

Все контрольные группы животных в качестве «плацебо» получали эквивалентный объем воды для инъекций. Препаратом сравнения выступал метилурацил – лекарственный иммуотропный препарат, являющийся производным пиримидина, вводимый в средней терапевтической дозе 25 мг/кг. Изучаемые субстанции смешивали с водой для инъекций и вводили интраперитонеально в подвздошную область живота в дозе 1/10 от Мг на фоне воздействия циклофосфида (ЦФА), однократное введение которого приводит к угнетению всех звеньев иммуногенеза, при этом не оказывая общетоксического воздействия. Степень выраженности иммунокорригирующего эффекта выясняли с помощью оценки органомерических показателей тимуса и селезенки (табл. 2).

В ходе эксперимента установлено, что статистически значимое увеличение количества спленоцитов по сравнению с контрольной группой с индуцированной иммунодепрессией вызывают соединения с лабораторными шифрами VMA–13–01 (в 1,8 раза), VMA–13–02 (в 2,5 раза), VMA–13–03 (в 2,8 раза), VMA–13–04 (в 4 раза), VMA–13–11 (в 1,4 раза); на количество тимоцитов наиболее выраженное влияние

¹Хиназолиновые производные предоставлены кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета. Они синтезированы под руководством заведующего кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, доктора химических наук, профессора Озерова Александра Александровича, за что выражаем искреннюю благодарность.

оказывают VMA–13–01 (в 2,3 раза), VMA–13–03 (в 3,3 раза), VMA–13–04 (в 2 раза), VMA–13–13 и VMA–13–14 (в 2,5 раза).

Таблица 2 – Влияние хиназолиновых производных на массу и клеточность селезенки и тимуса на фоне введения ЦФА

Экспериментальные группы (n = 10), шифр изучаемых соединений	Масса селезенки (M ± m; мг)	Количество спленоцитов (M ± m; × 10 ⁶)	Масса тимуса (M ± m; мг)	Количество тимоцитов (M ± m; × 10 ⁵)
Контроль I (вода/инъекций)	141,10 ± 7,09	46,69 ± 3,68	57,00 ± 6,39	20,59 ± 3,60
Контроль II (ЦФА) (100 мг/кг)	115,58 ± 6,39*	10,10 ± 0,38*	53,00 ± 3,79	8,79 ± 2,78*
VMA–13–01 (21 мг/кг)	128,40 ± 3,82	18,10 ± 1,09* [#]	46,09 ± 1,91	20,00 ± 2,89 [#]
VMA–13–02 (26 мг/кг)	134,00 ± 6,32	24,50 ± 1,00* [#]	42,61 ± 3,10	13,60 ± 1,20
VMA–13–03 (31 мг/кг)	126,68 ± 2,78*	27,79 ± 2,40* [#]	36,69 ± 3,20	28,77 ± 2,79 [#]
VMA–13–04 (34 мг/кг)	113,00 ± 2,19*	41,30 ± 3,87* [#]	45,00 ± 1,78	17,20 ± 1,09 [#]
VMA–13–06 (39 мг/кг)	105,88 ± 7,00*	10,28 ± 0,78*	72,39 ± 9,12	16,61 ± 3,61
VMA–13–11 (24 мг/кг)	113,69 ± 6,39*	14,79 ± 0,50* [#]	72,40 ± 15,68	10,28 ± 2,69
VMA–13–12 (24 мг/кг)	96,78 ± 7,30*	10,68 ± 0,40*	57,19 ± 4,71	12,10 ± 0,92
VMA–13–13 (27 мг/кг)	134,28 ± 4,81	15,00 ± 2,08*	44,89 ± 1,41	21,59 ± 1,40 [#]
VMA–13–14 (36 мг/кг)	115,58 ± 11,11	10,00 ± 0,67*	62,30 ± 3,50	22,79 ± 4,87 [#]
Метилурацил (25 мг/кг)	118,00 ± 3,78*	29,50 ± 1,69* [#]	46,50 ± 1,61	22,18 ± 1,59 [#]

Примечание: * и [#] – p < 0,05 – степень достоверности относительно контроля I и контроля II

Анализ полученных результатов показал, что наиболее выраженные статистически значимые изменения в селезенке и тимусе на фоне индуцированной иммунодепрессии, сопоставимые с изменениями при применении метилурацила, наблюдаются при введении субстанций 3-(2-Бензилокси-2-оксоэтил)хиназолин-4(3H)-он (VMA–13–03) и 3-[2-(1-Нафтил)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он (VMA–13–04), имеющих в структуре бензильный и α-нафтильный радикалы. В этой же главе приведены результаты исследований дозозависимости иммуномоторного эффекта наиболее активных соединений, а именно – VMA–13–03 и VMA–13–04 в условиях экспериментальной иммунодепрессии. Для соединения VMA–13–03 использовали дозы 15,5; 31; 62 и 124 мг/кг; для VMA–13–04 – 17; 34; 68 и 134 мг/кг. Дозы субстанций выбраны исходя из расчета 1/10 от M_r с последующим их двукратным уменьшением и увеличением. Оценку дозозависимости иммуномоторных свойств VMA–13–03 (рис. 1) и VMA–13–04 (рис. 2) проводили на основании органомерического анализа массы и клеточности иммунных органов, а также постановки РГЗТ и РПГА. Соединения VMA–13–03 и VMA–13–04 оказывали дозозависимое иммуномоторное действие, наиболее выраженное в дозе 31 и 34 мг/кг соответственно, проявляющееся в увеличении количества спленоцитов в 2 (p < 0,01) и в 1,9 (p < 0,01) раза, тимоцитов – в 2 (p < 0,001) и в 1,8 (p < 0,01) раза соответственно, а также в повышении индекса РГЗТ в 2,3 (p < 0,001) и в 2,5 раза (p < 0,05), титра антител – в 4,3 (p < 0,001) и 4 (p < 0,001) раза соответственно.

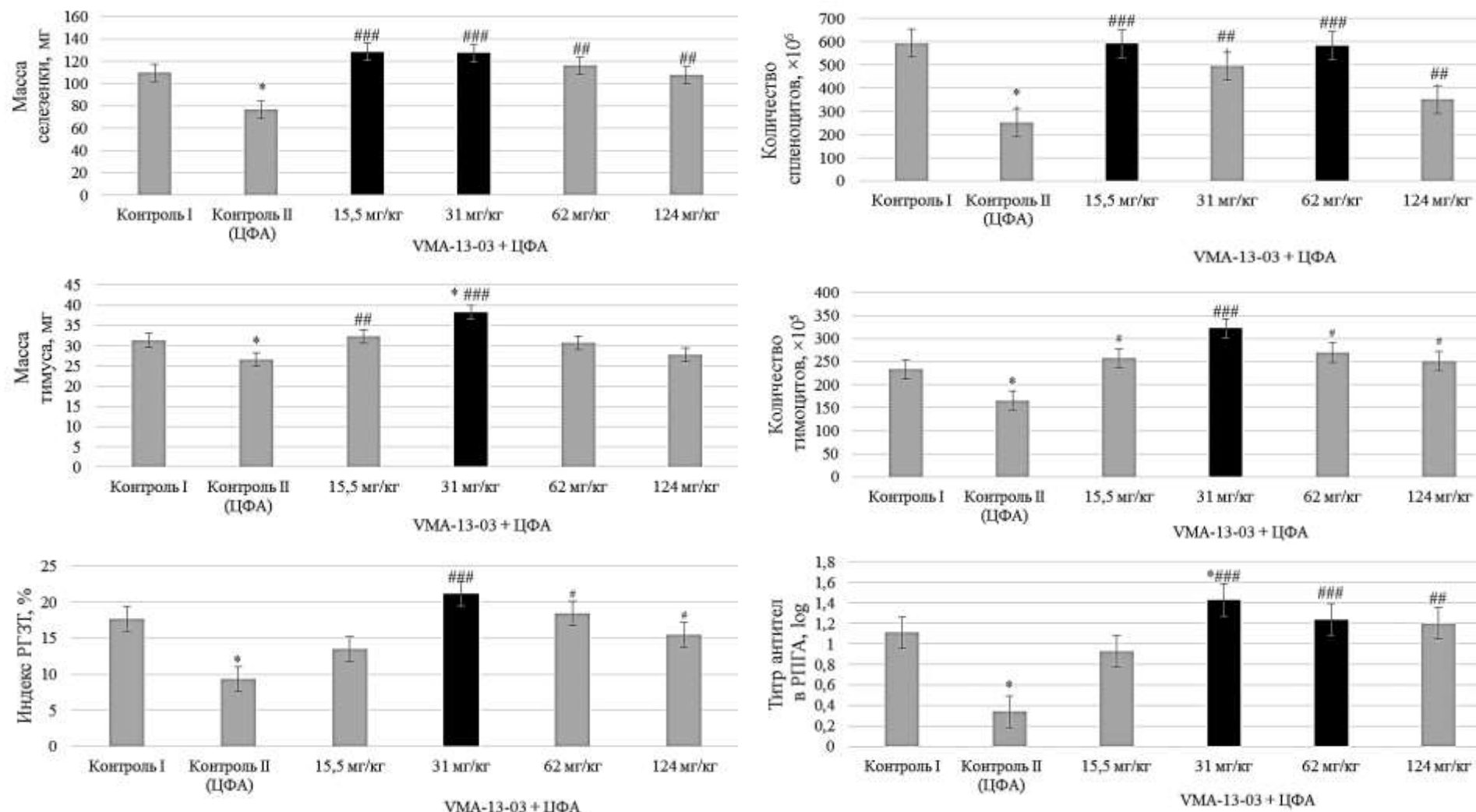


Рисунок 1 – Дозозависимые изменения массы и количества клеток тимуса и селезенки, показателей иммунных реакций на фоне введения VMA–13–03 в условиях циклофосфамидной иммуносупрессии.

Примечание: здесь и на рис. 2: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + вода; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + ЦФА

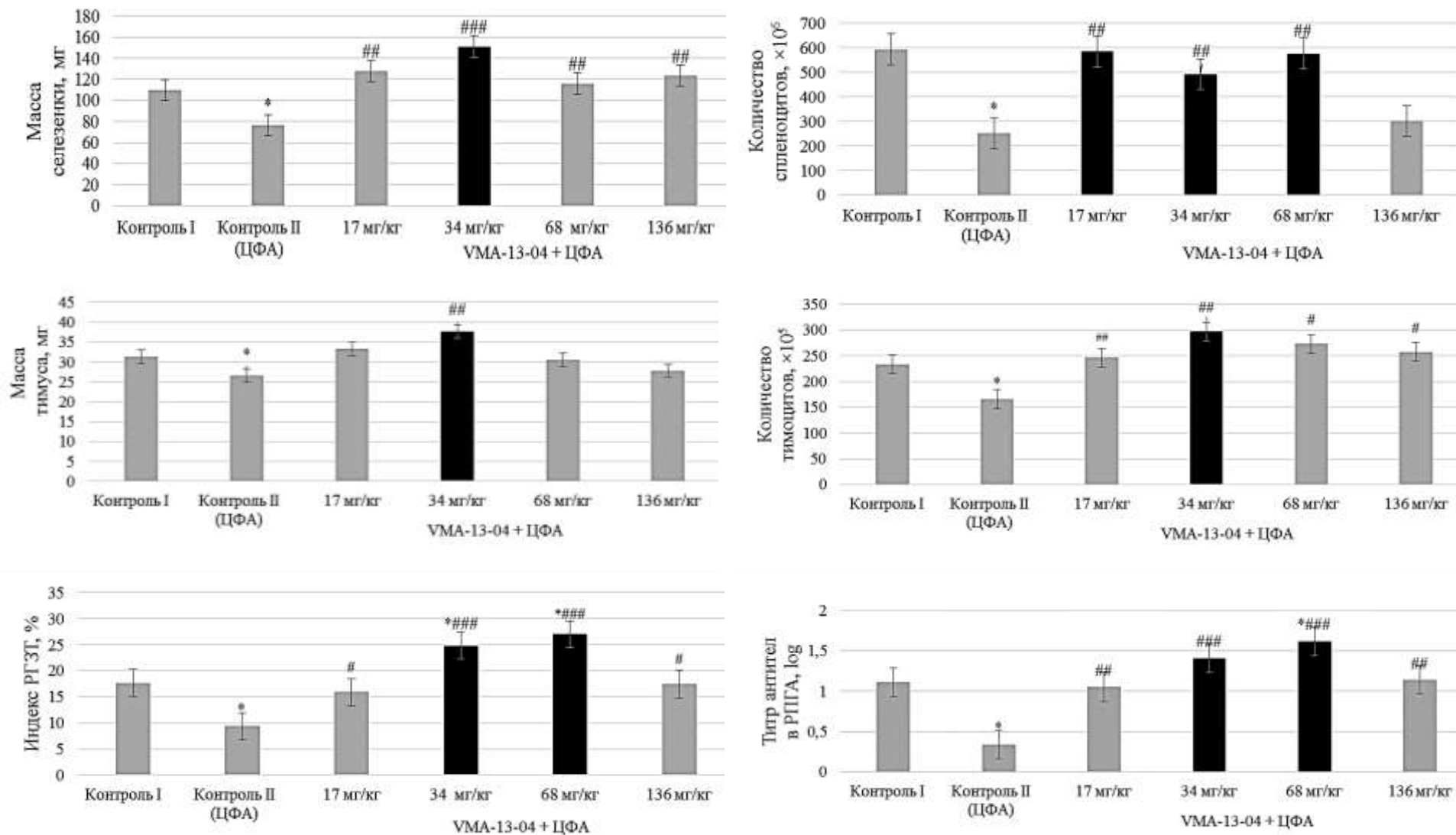


Рисунок 2 – Дозозависимые изменения массы и количества клеток тимуса и селезенки, показателей иммунных реакций на фоне введения VMA–13–04 в условиях циклофосамидной иммуносупрессии

Проанализировав результаты изучения органомерических показателей, а также общих иммунофармакологических тестов, выявили, что наиболее выраженное иммуномодулирующее действие изучаемые хиназолиновые производные оказывали в дозах 1/10 Мг.

В данной главе представлены и результаты изучения иммуотропного действия хиназолиновых производных VMA-13-03 и VMA-13-04 относительно индукции экспериментальной иммунодепрессии на массу и количество клеток иммунокомпетентных органов, а также индекс ГЗТ и титр антител в РПГА. Субстанция VMA-13-03 при профилактическом и терапевтическом введении способствовала статистически значимому нарастанию массы иммунных органов и количества их клеток, а также показателей общих иммунофармакологических реакций (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние субстанции VMA-13-03 на иммунологические показатели при введении в разные сроки относительно индукции экспериментальной иммунодепрессии

Показатель	Контроль I (вода для инъекций)	Контроль II (ЦФА)	VMA-13-03 (до введения ЦФА)	VMA-13-03 (после введения ЦФА)
Масса селезенки ($M \pm m$; мг)	129,62 $\pm$ 12,10	93,12 $\pm$ 3,78*	113,70 $\pm$ 7,56 [#]	116,10 $\pm$ 6,15 [#]
Кол-во спленоцитов ($M \pm m$; $\times 10^6$)	685,50 $\pm$ 97,74	255,25 $\pm$ 18,14*	361,40 $\pm$ 12,00 ^{*,#}	543,20 $\pm$ 72,25 [#]
Масса тимуса ($M \pm m$; мг)	32,25 $\pm$ 0,97	26,50 $\pm$ 0,97*	39,30 $\pm$ 1,08 ^{###}	33,30 $\pm$ 1,40 ^{###}
Кол-во тимоцитов ($M \pm m$; $\times 10^5$)	307,87 $\pm$ 23,98	200,50 $\pm$ 26,57*	297,60 $\pm$ 23,15 ^{###}	286,70 $\pm$ 14,56 [#]
Индекс ГЗТ, %	17,27 $\pm$ 3,45	10,10 $\pm$ 1,82*	14,60 $\pm$ 1,26 [#]	25,00 $\pm$ 2,75 ^{###}
Титр антител в РПГА, log	1,125 $\pm$ 0,06	0,375 $\pm$ 0,09*	0,90 $\pm$ 0,09 ^{##}	1,26 $\pm$ 0,03 ^{###}

Примечание: здесь и в табл. 4: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + вода; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + ЦФА

Почти идентичные изменения изучаемых показателей наблюдались при введении хиназолинового производного с шифром VMA-13-04 (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние субстанции VMA-13-04 на иммунологические показатели при введении в разные сроки относительно индукции экспериментальной иммунодепрессии

Показатель	Контроль I (вода для инъекций)	Контроль II (ЦФА)	VMA-13-04 (до введения ЦФА)	VMA-13-04 (после введения ЦФА)
Масса селезенки ($M \pm m$; мг)	129,62 $\pm$ 12,10	93,12 $\pm$ 3,78*	107,10 $\pm$ 7,88	121,60 $\pm$ 5,50 ^{##}
Кол-во спленоцитов ($M \pm m$; $\times 10^6$)	685,50 $\pm$ 97,74	255,25 $\pm$ 18,14*	314,20 $\pm$ 37,80*	546,00 $\pm$ 87,25 [#]
Масса тимуса ($M \pm m$; мг)	32,25 $\pm$ 0,97	26,50 $\pm$ 0,97*	32,90 $\pm$ 1,94 [#]	35,90 $\pm$ 1,94 ^{##}
Кол-во тимоцитов ($M \pm m$; $\times 10^5$)	307,87 $\pm$ 23,98	200,50 $\pm$ 26,57*	265,40 $\pm$ 42,55 [#]	277,60 $\pm$ 33,69
Индекс ГЗТ, %	17,27 $\pm$ 3,45	10,10 $\pm$ 1,82*	14,00 $\pm$ 1,85 [#]	18,71 $\pm$ 2,80 ^{##}
Титр антител в РПГА, log	1,125 $\pm$ 0,06	0,375 $\pm$ 0,09*	1,11 $\pm$ 0,12 ^{###}	1,50 $\pm$ 0,16 ^{###}

Соединения VMA–13–03 и VMA–13–04 при введении их до индукции иммуносупрессии способствовали повышению количества спленоцитов в 1,4 ($p < 0,01$) и 1,2 ($p < 0,05$) раза, тимоцитов – в 1,5 ($p < 0,01$) и в 1,3 ($p < 0,05$) раза, а также увеличению титра антител в 2,4 ($p < 0,05$) и в 3 ($p < 0,001$) раза соответственно, индекса РГЗТ – в 1,4 ($p < 0,05$) раза. При введении VMA–13–03 и VMA–13–04 после индукции иммуносупрессии наблюдалось увеличение количества спленоцитов в 2 ($p < 0,05$) раза, тимоцитов – в 1,5 ($p < 0,01$) и в 1,4 ($p < 0,05$) раза, а также увеличение титра антител в 2,4 ($p < 0,05$) и в 4 ($p < 0,001$) раза, индекса РГЗТ в 1,5 ($p < 0,05$) и 1,8 ($p < 0,01$) раза соответственно.

Таким образом, изучаемые хиназолиновые производные оказывали комбинированное лечебно-профилактическое иммунотропное действие, способствующее устранению развивающихся нарушений в условиях экспериментальной иммунодепрессии.

Четвертая глава посвящена изучению иммунотропных свойств хиназолиновых производных в условиях экспериментального моделирования состояния гиперреактивности иммунной системы, сформированного внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС) в дозе 100 мкг/кг. Иммунотропные характеристики исследуемых субстанций и препарата сравнения (метилурацил) оценивали с помощью изучения массы и количества ядродержащих клеток иммунных органов (табл. 5), а также проведения стандартных иммунофармакологических тестов в виде РГЗТ и РПГА (табл. 6).

Таблица 5 – Влияние хиназолиновых производных на показатели массы и клеточности иммунокомпетентных органов при остром иммунном стрессе

Экспериментальные группы, шифр изучаемых соединений; n = 10	Масса селезенки, мг	Количество спленоцитов, $\times 10^6$	Масса тимуса, мг	Количество тимоцитов, $\times 10^5$
Контроль I (вода/инъекций)	151,50 $\pm$ 5,79	254,78 $\pm$ 12,89	30,30 $\pm$ 2,19	102,10 $\pm$ 4,78
Контроль II (ЛПС)	204,40 $\pm$ 4,19*	532,39 $\pm$ 22,58*	42,50 $\pm$ 2,38*	200,30 $\pm$ 12,89
VMA–13–03 + ЛПС	185,78 $\pm$ 10,39*#	400,00 $\pm$ 32,40**##	29,50 $\pm$ 1,29##	70,79 $\pm$ 5,60**###
VMA–13–04 + ЛПС	137,50 $\pm$ 6,69###	213,79 $\pm$ 0,29*###	29,28 $\pm$ 0,88##	83,30 $\pm$ 3,79*###
Метилурацил + ЛПС	195,89 $\pm$ 6,68##	433,79 $\pm$ 20,58*#	32,30 $\pm$ 2,09#	105,00 $\pm$ 4,48###

Примечание: здесь и в табл. 6: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + вода; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + ЛПС

Таблица 6 – Влияние хиназолиновых производных на индекс РГЗТ и титр антител в РПГА при остром иммунном стрессе

Экспериментальные группы, шифр изучаемых соединений; n = 10	Индекс РГЗТ, %	Титр антител в РПГА, log
Контроль I (вода д/инъекций)	17,07 $\pm$ 0,86	1,75 $\pm$ 0,09
Контроль II (ЛПС)	35,42 $\pm$ 2,45*	2,40 $\pm$ 0,06*
VMA–13–03 + ЛПС	15,84 $\pm$ 0,79###	2,10 $\pm$ 0,13
VMA–13–04 + ЛПС	14,86 $\pm$ 0,77###	1,65 $\pm$ 0,10###
Метилурацил + ЛПС	25,41 $\pm$ 1,50**##	2,15 $\pm$ 0,13

Соединение VMA–13–03 приводило к снижению количества спленоцитов и тимоцитов в 1,3 ($p < 0,01$) и в 1,6 ($p < 0,001$) раза; индекса РГЗТ и титра РПГА – в 2,2 ($p < 0,01$) и в 1,1 раза по сравнению с животными контрольной группы с активированным иммунитетом. Соединение VMA–13–04 вызывало уменьшение количества спленоцитов и тимоцитов в 1,6 ($p < 0,001$) и в 2,4 раза ($p < 0,001$); индекса РГЗТ и титра антител в 2,4 раза ($p < 0,001$) и 1,3 раза по сравнению с иммунострессированным контролем.

Таким образом, исследуемые хиназолиновые производные в условиях острого иммунного стресса приводят к коррекции пролиферативных процессов в иммунокомпетентных органах.

В пятой главе представлены результаты изучения влияния хиназолиновых производных на показатели белой крови в условиях экспериментальной иммунной депрессии и острого липополисахаридного иммунного стресса (рис. 3).

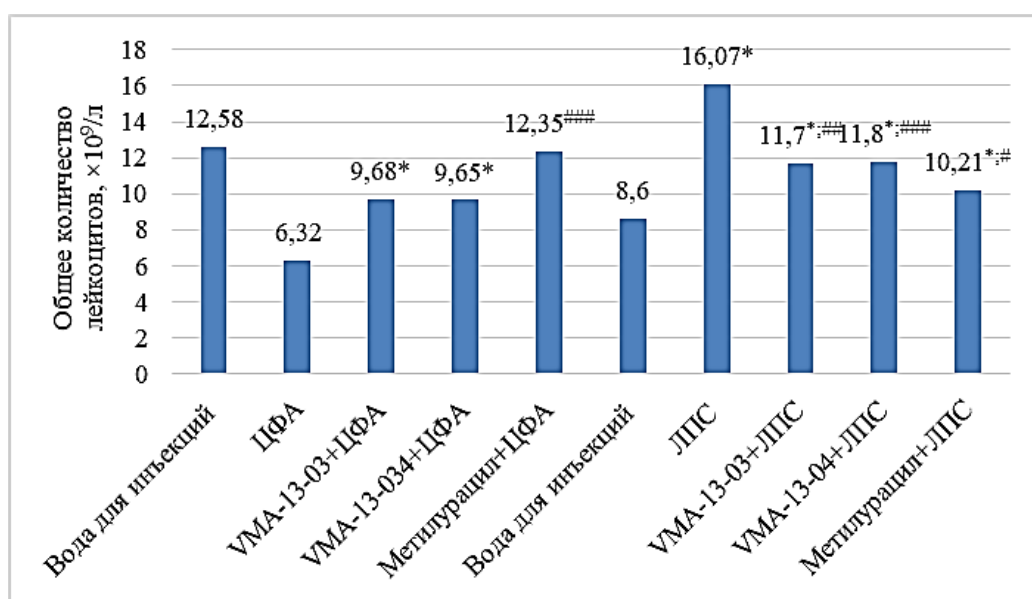


Рисунок 3 – Влияние хиназолиновых производных на общее количество лейкоцитов на фоне экспериментальной иммунодепрессии и острого иммунного стресса.

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + вода; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + ЦФА/ЛПС

Субстанция VMA–13–03 на фоне экспериментальной иммунодепрессии привела к повышению количества лейкоцитов на 53 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем II. Практически идентичные изменения наблюдались со стороны общего количества лейкоцитов при введении субстанции VMA–13–04 в условиях экспериментальной иммунодепрессии. В результате введения VMA–13–03 и VMA–13–04 наблюдались схожие изменения относительно ЛПС-контроля: отмечено снижение общего количества лейкоцитов практически на 30 %.

На фоне циклофосфамидной иммунодепрессии при введении VMA–13–03 по сравнению с ЦФА-контролем отмечено увеличение количества лимфоцитов в 1,3 раза ($p < 0,01$); снижение моноцитов – в 22 раза ($p < 0,05$); уменьшение процентного содержания палочкоядерных нейтрофилов – в 1,3 раза ($p < 0,01$); снижение сегментоядерных нейтрофилов – в 1,4 раза ($p < 0,01$), в результате чего был

отмечен сдвиг лейкоцитарной формулы вправо. Соединение VMA–13–04 в тех же условиях способствовало увеличению количества моноцитов на 11 % ($p > 0,05$) и лимфоцитов на 14 % ($p > 0,05$); увеличению процентного содержания палочкоядерных клеток – на 20 % ($p > 0,05$) и снижению сегментоядерных нейтрофилов – на 34 % ($p < 0,01$), в результате чего был отмечен сдвиг лейкоцитарной формулы влево.

На фоне острого иммунного стресса соединение VMA–13–03 привело к уменьшению количества моноцитов в 1,2 раза по отношению к иммуностресированному контролю; статистически значимому увеличению лейкоцитов лимфоцитарного ряда – в 1,4 раза ($p < 0,01$); уменьшению процентного содержания сегментоядерных клеток – в 2 раза ($p < 0,001$) и палочкоядерных нейтрофилов – в 1,4 раза, что свидетельствует о произошедшем сдвиге лейкоцитарной формулы вправо. Соединение VMA–13–04 способствовало увеличению количества моноцитов в 1,4 раза, лимфоцитов – 1,2 раза; снижению процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов – в 1,3 раза ($p < 0,01$) и повышению количества палочкоядерных нейтрофилов – в 1,5 раза, что свидетельствует о сдвиге лейкоцитарной формулы влево.

Таким образом, изучаемые субстанции проявляют иммунокорригирующее воздействие на показатели белой крови животных и процессов лейкопоэза на фоне как ЦФА-индуцированной иммуносупрессии, так и острого липополисахаридного иммунного стресса.

Известно, что иммунная патология вызывает изменение функциональной активности нейтрофилов, проявляющееся в виде как снижения, так и патологического усиления их фагоцитарной активности. Типичным проявлением снижения фагоцитоза является склонность к затяжному течению и хронизации заболеваний, что сопровождается часто повторяющимися грибковыми и бактериальными процессами, причиной которых становится не только патогенная, но и условно-патогенная флора. Патологическая активация фагоцитоза также является причиной развития серьезных заболеваний (склеродермия, ревматоидный артрит, системная красная волчанка и т.д.), в этиопатогенезе которых основная роль отводится аутоагрессии против здоровых тканей организма. В связи с этим изучение фагоцитарной активности нейтрофилов в условиях экспериментальных иммунодепрессии и иммунного стресса является актуальным и необходимым для детального изучения иммуотропной активности лекарственных препаратов.

Результаты изучения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови под воздействием хиназолиновых производных на фоне экспериментальной иммунодепрессии и острого иммунного стресса представлены в таблице 7.

Анализ результатов изучения влияния хиназолиновых производных на фагоцитарную активность нейтрофилов позволил выявить активацию интенсивности фагоцитоза в условиях ЦФА-иммунодепрессии: VMA–13–03 оказывало статистически значимое увеличение фагоцитов, фагоцитарного числа и абсолютного количества фагоцитирующих нейтрофилов в 1,6 ($p < 0,001$); 1,5 ($p < 0,001$) и 1,7 раза ($p < 0,05$); VMA–13–04 – в 1,3 ($p < 0,01$); 1,6 ($p < 0,001$) и 1,5 ($p < 0,05$) раза соответственно. В условиях острого иммунного стресса соединение

VMA–13–03 вызвало снижение всех перечисленных показателей: в 1,2 ($p < 0,01$); 1,3 ($p < 0,01$) и в 3 раза ($p < 0,001$) и VMA–13–04 – в 1,2 ($p < 0,05$); 1,4 ($p < 0,05$) и в 2,6 раза ($p < 0,001$) соответственно.

Таблица 7 – Влияние хиназолиновых производных на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови на фоне экспериментальной иммунодепрессии и острого иммунного стресса

Экспериментальная модель	Экспериментальные группы; n = 10	Фагоцитарный индекс, (%)	Фагоцитарное число	Кол-во активных нейтрофилов ($\times 10^9/\text{л}$)
Модель иммунодепрессии	Контроль I (вода д/ин.)	$75,38 \pm 1,62$	$13,5 \pm 0,56$	$2,14 \pm 0,20$
	Контроль II (ЦФА)	$47,88 \pm 1,62^{***}$	$7,33 \pm 0,27^*$	$0,91 \pm 0,10^{***}$
	VMA–13–03 + ЦФА	$78,50 \pm 1,19^{###}$	$10,81 \pm 0,40^{*,###}$	$1,55 \pm 0,27^{\#}$
	VMA–13–04 + ЦФА	$60,75 \pm 1,94^{*,\#}$	$11,70 \pm 0,62^{###}$	$1,33 \pm 0,14^{*,\#}$
	Метилурацил + ЦФА	$71,75 \pm 1,08^{###}$	$12,63 \pm 0,43^{###}$	$2,35 \pm 0,19^{###}$
Модель острого иммунного стресса	Контроль I (вода д/ин.)	$60,13 \pm 1,73$	$5,08 \pm 0,24$	$1,75 \pm 0,23$
	Контроль II (ЛПС)	$74,88 \pm 1,83^{***}$	$7,34 \pm 0,28^{***}$	$5,55 \pm 0,36^*$
	VMA–13–03 + ЛПС	$57,00 \pm 1,73^{\#}$	$4,84 \pm 0,36^{\#}$	$1,80 \pm 0,28^{\#}$
	VMA–13–04 + ЛПС	$58,63 \pm 1,51^{\#}$	$4,66 \pm 0,26^{###}$	$2,14 \pm 0,46^{###}$
	Метилурацил + ЛПС	$56,38 \pm 1,62^{###}$	$5,45 \pm 0,30^{\#}$	$1,58 \pm 0,11^{###}$

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + вода; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль + ЦФА/ЛПС

Таким образом, введение хиназолиновых производных вызвало иммунокорригирующее влияние на макрофагально-фагоцитарное звено иммунитета, проявляющееся в устранении явлений иммуносупрессии на фоне иммунодепрессии и гиперреактивности, возникших на фоне экспериментального липополисахаридного иммунного стресса.

Анализируя полученные результаты, можно предположить, что иммунотропная активность хиназолиновых производных реализуется за счет их сходства с эндогенными регуляторными пептидами, что приводит к активации внутриклеточных ферментных систем, а именно – аденилатциклазы с последующим накоплением цАМФ в клетке, и активации синтеза нуклеиновых кислот и стимуляции метаболических процессов, пролиферации и дифференцировки клеток. Наиболее отчетливо процесс проявляется в активно делящихся иммунокомпетентных клетках, что влечет за собой повышение функциональной активности различных классов лейкоцитов и стимуляции фагоцитоза. Кроме того, доказанное адренергическое влияние производных пиримидина обеспечивает активацию фагоцитирующих клеток, а также стимуляцию процессов антителообразования, что наиболее выражено в условиях иммунодепрессии.

Шестая глава данного исследования посвящена изучению противомикробной активности хиназолиновых производных VMA–13–03 и VMA–13–04 в отношении штаммов *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*. При определении чувствительности микроорганизмов к исследуемым субстанциям методом последовательных серийных разведений оценивали отсутствие роста, наличие характерного (ХР) и

нехарактерного (НХР) роста при 100 % засеваемости питательной среды. Препаратом сравнения выступала пипемидовая кислота – производное пиримидина с доказанной противомикробной активностью (табл. 9).

Таблица 9 – Противомикробная активность хиназолиновых производных

Экспериментальные группы; разведения с различными концентрациями, мкг/мл	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Контроль положительный	++++	++++	++++	++++	++++
Пипемидовая кислота (128)	–	–	++	+++	++
VMA–13–03 (128)	+	++	++++ НХР	++	++++ НХР
VMA–13–03 (64)	++	++	++++ НХР	++	++++ НХР
VMA–13–03 (32)	++	++	++++	+++	++++ НХР
VMA–13–03 (16)	++	++	++++ НХР	+++	++++ НХР
VMA–13–03 (8)	+++	+++	++++ НХР	+++	++++ НХР
VMA–13–03 (4)	+++	+++	++++ НХР	++++ НХР	++++ НХР
VMA–13–03 (2)	++++	++++	++++ НХР	++++ НХР	++++ НХР
VMA–13–03 (1)	++++	++++	++++ НХР	++++ НХР	++++ НХР
VMA–13–03 (0,5)	++++	++++	++++ НХР	++++ НХР	++++ НХР
VMA–13–03 (0,25)	++++	++++	++++ НХР	++++ НХР	++++ НХР
VMA–13–04 (128)	++	++++	++++ НХР	+++ НХР	+++ НХР
VMA–13–04 (64)	++	++++	++++ НХР	+++ НХР	++++ НХР
VMA–13–04 (32)	++	++++	++++ НХР	+++ НХР	++++ НХР
VMA–13–04 (16)	++	++++	++++	+++	++++ НХР
VMA–13–04 (8)	++	++++	++++	+++	++++ НХР
VMA–13–04 (4)	++	++++	++++	++++	++++ НХР
VMA–13–04 (2)	+++	++++	++++	++++	++++ НХР
VMA–13–04 (1)	+++	++++	++++	++++	++++
VMA–13–04 (0,5)	++++	++++	++++ НХР	++++ НХР	++++
VMA–13–04 (0,25)	++++	++++	++++ НХР	++++ НХР	++++

Примечание: «-» – высоко активные разведения – отсутствие ХР; «+» активные разведения – наличие ХР менее 25 % при наличии ХР; «++» разведения средней активности – наличие ХР от 25 до 50 %; «+++» – малоактивные разведения – наличие ХР от 50 до 75 %; «++++» – неактивные разведения – наличие ХР более 75 %

Выявлена способность оказывать противомикробный эффект субстанции VMA–13–03 в разведениях в диапазоне от 128 до 16 мкг/мл на штаммы *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumonia* в разведениях 128 и 64 мкг/мл – на штаммы *Citrobacter freundii*. Соединение VMA–13–04 показало антимикробную активность только на *Staphylococcus aureus* в разведениях в диапазоне от 128 до 4 мкг/мл.

В таблице 10 представлены минимальные подавляющие концентрации (МПК) производных хиназолина в отношении *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* и *Citrobacter freundii*. Получены следующие результаты: субстанция VMA–13–03 оказывала бактерицидную активность в отношении *Staphylococcus*

aureus в концентрации 128 мкг/мл, бактериостатическую активность – в концентрации 16 мкг/мл; в отношении *Klebsiella pneumonia* и *Citrobacter freundii* – бактериостатическую активность в концентрациях 16 и 64 мкг/мл соответственно. Субстанция VMA–13–04 оказывала бактериостатическую активность в отношении *Staphylococcus aureus* в концентрации 4 мкг/мл.

Таблица 10 – Минимальные подавляющие концентрации производных хиназолина

Соединение	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Klebsiella pneumonia</i>		<i>Citrobacter freundii</i>	
	МПК ₅₀ , мкг/мл	МПК ₉₀₋₁₀₀ , мкг/мл	МПК ₅₀ , мкг/мл	МПК ₉₀₋₁₀₀ , мкг/мл	МПК ₅₀ , мкг/мл	МПК ₉₀₋₁₀₀ , мкг/мл
VMA–13–03	16	128	16	–	64	–
VMA–13–04	4	–	–	–	–	–

Примечание: МПК₅₀ – подавление роста микробной культуры относительного положительного контроля на 50 % (бактериостатическая активность); МПК₉₀₋₁₀₀ – подавление роста микробной культуры относительного положительного контроля на 90–100 % (бактерицидная активность)

Таким образом, производные хиназолина оказывают противомикробное действие: VMA–13–03 в отношении *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* и *Citrobacter freundii*; VMA–13–04 – в отношении *Staphylococcus aureus*.

Далее оценивали влияние хиназолиновых производных на формирование противомикробного иммунитета и увеличение выживаемости лабораторных животных на фоне экспериментальной генерализованной инфекции (табл. 11).

Таблица 11 – Влияние хиназолиновых производных на выживаемость животных в условиях экспериментальной генерализованной стафилококковой инфекции

Группы животных n = 10	Выживаемость (в %)							Гибель животных (в %)
	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки	6 сутки	7 сутки	
Контроль I	100	100	100	100	100	100	100	0
Контроль II	100	90	80	60	50	40	30	70
Цефтриаксон (50 мг/кг)	100	100	100	90	90	90	70	30
VMA–13–03 (31 мг/кг)	100	100	100	100	100	100	100	0
VMA–13–03 (62 мг/кг)	100	100	100	100	100	100	100	0
VMA–13–03 (124 г/кг)	100	100	100	100	90	80	80	20
VMA–13–04 (34 мг/кг)	100	100	100	100	100	100	100	0
VMA–13–04 (68 мг/кг)	100	100	100	100	100	100	100	0
VMA–13–04 (136 г/кг)	100	100	100	90	90	70	60	40

Животных разделили на несколько групп: первая группа (контроль I) – животные, получавшие эквивалентный объем воды для инъекций; вторая группа (контроль II) – инфицированные животные, не получавшие лечения; третья группа – инфицированные животные, получавшие внутривенно цефтриаксон в дозе 50 мг/кг. В связи с доказанной антибактериальной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов в качестве препарата сравнения был выбран Цефтриаксон. Опытные группы животных получали в течение 7 дней с первого дня заражения внутривенно субстанцию VMA–13–03 в дозах 31; 62 и 124 мг/кг и VMA–13–04 – в дозах 34; 68 и 136 мг/кг.

Субстанции VMA–13–03 в дозах 31 и 62 мг/кг, а VMA–13–04 в дозах 34 и 68 мг/кг существенно снижали летальность лабораторных животных и способствовали 100% выживаемости мышей; дозы 124 и 136 мг/кг привели к снижению летальности на 80 и 60 % соответственно. После выведения животных из эксперимента был определен индекс обсемененности внутренних органов и крови (табл. 12).

Таблица 12 – Влияние хиназолиновых производных на индекс обсемененности крови и внутренних органов в условиях экспериментальной генерализованной стафилококковой инфекции

Экспериментальные группы; n = 10	Печень	Селезенка	Кровь
Контроль I	0	0	0
Контроль II	1,0 ± 0,108***	1,0 ± 0,108***	1,0 ± 0,108***
Цефтриаксон (50 мг/кг)	0,04 ± 0,015***###	0,018 ± 0,014***###	0
VMA–13–03 (31 мг/кг)	0	0	0
VMA–13–03 (62 мг/кг)	0	0	0
VMA–13–03 (124 мг/кг)	0,031 ± 0,013*;###	0,015 ± 0,013###	0
VMA–13–04 (34 мг/кг)	0	0	0
VMA–13–04 (68 мг/кг)	0	0	0
VMA–13–04 (136 мг/кг)	0,055 ± 0,018**;###	0	0

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль I; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – по отношению к показателям группы контроль II

Индекс обсемененности крови, печени и селезенки при введении субстанции VMA–13–03 в дозах 31 и 62 мг/кг и VMA–13–04 в дозах 34 и 68 мг/кг соответствовал индексу группы неинфицированных животных; в дозе 124 и 136 мг/кг наблюдалось снижение индекса обсемененности в 32 раза ($p < 0,001$) и в 66 раз ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с инфицированной контрольной группой.

Таким образом, хиназолиновые производные VMA–13–03 и VMA–13–04 способствуют формированию противомикробного иммунитета и оказывают выраженное терапевтическое действие антибактериальной направленности в условиях экспериментальной генерализованной инфекции, вызванной внутрибрюшинным введением *Staphylococcus aureus*, сравнимое с препаратом сравнения – цефтриаксоном, что наиболее выражено в дозах 1/10 и 1/5 от Мг.

Принимая во внимание имеющиеся данные о противoinфекционной активности производных пиримидина, можно предположить, что противомикробный эффект хиназолиновых производных реализуется одним из двух способов: первый связан с нарушением синтеза нуклеиновых кислот из-за ингибирования ферментов, участвующих в синтезе фолиевой кислоты в бактериальной клетке; второй – с подавлением бактериальной ДНК-топоизомеразы II, устраняющей гиперспирализацию ДНК в обеих нитях, что приводит к деградации нуклеиновой кислоты и прекращению деления микробных клеток.

Седьмая глава диссертационной работы посвящена обсуждению полученных в ходе исследований результатов.

ВЫВОДЫ

1. В ряду девяти новых хиназолиновых производных, в условиях супрессии иммунной системы выявлены соединения с выраженным иммуностимулирующим действием, которое определили по способности восстанавливать клеточный состав тимуса и селезенки. Наиболее активными оказались: соединение VMA-13-03, содержащее сложноэфирный фрагмент, и соединение VMA-13-04, содержащее фрагмент ароматического кетона. Они оказывали дозозависимое иммуностропное действие, наиболее выраженное в дозе 31 и 34 мг/кг соответственно, проявляющееся в увеличении количества спленоцитов в 2 ($p < 0,01$) и в 1,9 ($p < 0,01$) раза, тимоцитов – в 2 ($p < 0,001$) и в 1,8 ($p < 0,01$) раза соответственно, а также в повышении индекса РГЗТ в 2,3 ($p < 0,001$) и в 2,5 раза ($p < 0,05$), титра антител – в 4,3 ($p < 0,001$) и 4 ($p < 0,001$) раза соответственно.

2. Соединения VMA-13-03 и VMA-13-04 при введении их до моделирования иммуносупрессии способствовали повышению количества спленоцитов в 1,4 ($p < 0,01$) и 1,2 ($p < 0,05$) раза, тимоцитов – в 1,5 ($p < 0,01$) и в 1,3 ($p < 0,05$) раза, а также увеличению титра антител в 2,4 ($p < 0,05$) и в 3 ($p < 0,001$) раза соответственно, индекса РГЗТ – в 1,4 ($p < 0,05$) раза. При введении VMA-13-03 и VMA-13-04 после индукции иммуносупрессии наблюдалось увеличение количества спленоцитов в 2 ($p < 0,05$) раза, тимоцитов – в 1,5 ($p < 0,01$) и в 1,4 ($p < 0,05$) раза, а также увеличение титра антител в 2,4 ($p < 0,05$) и в 4 ($p < 0,001$) раза, индекса РГЗТ – в 1,5 ($p < 0,05$) и 1,8 ($p < 0,01$) раза соответственно.

3. Введение соединения VMA-13-03 на фоне острого липополисахаридного иммунного стресса приводило к снижению количества спленоцитов и тимоцитов в 1,3 ($p < 0,01$) и в 1,6 ($p < 0,001$) раза; индекса РГЗТ и титра РПГА – в 2,2 ($p < 0,01$) и в 1,1 раза по сравнению с животными контрольной группы с активированным иммунитетом. Соединение VMA-13-04 вызывало уменьшение количества спленоцитов и тимоцитов в 1,6 ($p < 0,001$) и в 2,4 раза ($p < 0,001$); индекса РГЗТ и титра антител в 2,4 раза ($p < 0,001$) и 1,3 раза по сравнению с иммунострессированным контролем.

4. Соединение VMA-13-03 при введении вещества на фоне вызванной циклофосфамидом экспериментальной иммуносупрессии оказывало статистически значимое увеличение фагоцитов, фагоцитарного числа и абсолютного количества фагоцитирующих нейтрофилов в 1,6 ($p < 0,001$); 1,5 ($p < 0,001$) и 1,7 раза ($p < 0,05$), а под воздействием VMA-13-04 – в 1,3 ($p < 0,01$); 1,6 ($p < 0,001$) и 1,5 ($p < 0,05$) раза соответственно. В условиях острого иммунного стресса при применении хиназолиновых производных наблюдалось снижение всех перечисленных показателей относительно иммуностимулированного контроля: VMA-13-03 – в 1,2 ($p < 0,01$); 1,3 ($p < 0,01$) и в 3 раза ($p < 0,001$) и VMA-13-04 – в 1,2 ($p < 0,05$); 1,4 ($p < 0,05$) и в 2,6 раза ($p < 0,001$) соответственно. Это свидетельствует об их иммунокорригирующем действии.

5. Хиназолиновые производные оказывали противомикробный эффект, проявляющийся в подавлении роста штаммов микроорганизмов: VMA-13-03 в разведениях в диапазоне концентраций от 128 до 16 мкг/мл на штаммы *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumonia*, в разведениях 128 и 64 мкг/мл – на штаммы

Citrobacter freundii, в то время как VMA–13–04 – только на *Staphylococcus aureus* в разведениях в диапазоне концентраций от 128 до 4 мкг/мл.

6. Соединение VMA–13–03 в дозах 31 и 62 мг/кг на фоне генерализованной стафилококковой инфекции способствовало 100 % выживаемости животных; в дозе 124 мг/кг – снижению смертности на 80 % по сравнению с инфицированным контролем; индекс обсемененности крови, печени и селезенки при введении VMA–13–03 в дозах 31 и 62 мг/кг соответствовал индексу группы неинфицированных животных; в дозе 124 мг/кг наблюдалось снижение индекса обсемененности в 32 раза по сравнению с инфицированной контрольной группой, что свидетельствует о выраженном противoinфекционном действии субстанции.

7. Хиназолиновые производные являются перспективными соединениями для поиска и разработки на их основе новых эффективных иммуномодуляторов, а также противомикробных средств.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Выявленные в ходе проведенных исследований иммуотропная и противомикробная активность хиназолиновых производных определяет целесообразность их более глубокого и детального доклинического изучения с целью их использования в качестве основы для разработки современных эффективных препаратов, оказывающих выраженное иммунокорректирующее действие, а также средств, способствующих формированию противомикробного иммунитета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные

в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Самотруева, М. А. Фармакологическая активность производных пиримидинов / М. А. Самотруева, А. А. Цибизова, А. Л. Ясенявская, А. А. Озеров, И. Н. Тюренков // Астраханский медицинский журнал. – 2015. – Т. 10, № 1. – С. 12–29.
2. Самотруева, М. А. Синтез и иммуотропная активность карбонильных производных хиназолин-4(3h)-она / М. А. Самотруева, А. А. Цибизова, А. А. Озеров, С. А. Лужнова, Е. Г. Глухова, И. Н. Тюренков // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 6. – С. 12–14.
3. Самотруева, М. А. Нейроиммуноэндокринология : современные представления о молекулярных механизмах / М. А. Самотруева, А. Л. Ясенявская, А. А. Цибизова, О. А. Башкина, Х. М. Галимзянов, И. Н. Тюренков // Иммунология. – 2017. – Т. 38, № 1. – С. 49–59.
4. Тюренков, И. Н. Иммуотропные свойства карбонильного производного хиназолина / И. Н. Тюренков, А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, А. А. Озеров // Астраханский медицинский журнал. – 2017. – Т. 12, № 2. – С. 81–88.
5. Цибизова, А. А. Фармакологическая активность производных бензодиазина / А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, В. Б. Ковалев, И. Н. Тюренков // Астраханский медицинский журнал. – 2017. – Т. 12, № 4. – С. 27–43.

6. Цибизова, А. А. Оценка иммуностропной активности карбонильных производных хиназолина в условиях острого иммунного стресса / А. А. Цибизова, И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева, А. А. Озеров // Астраханский медицинский журнал. – 2018. – Т. 13, № 4. – С. 108–115.

Статьи, опубликованные в научных сборниках и журналах

1. Цибизова, А. А. Оценка иммуностропных свойств нового производного пиримидина / А. А. Цибизова, И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева, А. А. Озеров, Е. Г. Глухова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 11–1. – С. 71–72.

2. Цибизова, А. А. Изучение иммуностропного действия нового производного пиримидина VMA-13-04 в аспекте «доза-эффект» / А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, А. А. Озеров, Е. Г. Глухова, И. Н. Тюренков // Актуальные вопросы и перспективы развития медицины : сборник научных трудов по итогам Международной научно-практической конференции (Омск, 07 мая 2015 г. / под ред. А. Ф. Апухтина, В. В. Анищенко, В. А. Балязин и др.). – Омск : Инновационный центр развития образования и науки, 2015. – С. 118–121.

3. Цибизова, А. А. Изучение иммуностропного действия нового производного пиримидина в аспекте «доза-эффект» / А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков, А. А. Озеров, Е. Г. Глухова // Современная медицина : актуальные вопросы. – 2015. – № 46–47. – С. 86–93.

4. Цибизова, А. А. Изучение влияния нового производного пиримидина на пролиферативные процессы в иммунокомпетентных органах / А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков, А. А. Озеров, М. С. Новиков // Фармацевтическое образование, наука и практика : горизонты развития : мат-лы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ (Курск, 20–21 октября 2016 г.) / под ред. В. А. Лазаренко, И. Л. Дроздовой, И. В. Зубковой, О. О. Куриловой. – Курск: Курский государственный медицинский университет 2016. – С. 607–609.

5. Цибизова, А. А. Влияние нового карбонильного производного хиназолина на формирование иммунной реакции / А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, А. А. Озеров, И. Н. Тюренков // Инновации в здоровье нации : сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Санкт-Петербург, 09–10 ноября 2016 г.). – СПб. : Изд-во СПХФА, 2016. – С. 652–655.

6. Цибизова, А. А. Влияние нового производного пиримидина под лабораторным шифром «VMA-13-03» на формирование иммунных реакций / А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков, А. А. Озеров // Фармацевтические науки : от теории к практике : заочная научно-практическая конференция с международным участием (Астрахань, 25 ноября 2016 г.) / под ред. Х. М. Галимзянова, О. А. Башкиной, М. А. Самотруевой, Б. И. Кантемировой. – Астрахань : Изд-во Астраханского государственного медицинского университета, 2016. – С. 79–81.

7. Цибизова, А. А. Изучение иммуностропных свойств производного пиримидина VMA-13-03 в аспекте «время-эффект» / А. А. Цибизова // Приоритетные

задачи и стратегии развития медицины и фармакологии : сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции (Тольятти, 25 мая 2016 г.). – Тольятти : Федеральный центр науки и образования «Эвенсис», 2016. – С. 61–63.

8. Самотруева, М. А. Изучение иммуотропных свойств нового производного хиназолина в аспекте «время-эффект» / М. А. Самотруева, И. Н. Тюренков, А. А. Озеров, А. А. Цибизова // Актуальные аспекты экспериментальной и клинической фармакологии : от молекулы к лекарству : мат-лы III международной научно-практической конференции (Пятигорск, 16–17 ноября 2017 г.). – Пятигорск : Рекламно-информационное агентство на Кавминводах, 2017. – С. 57–59.

9. Цибизова, А. А. Влияние карбонильного производного хиназолина под лабораторным шифром VMA-13-03 на показатели белой крови / А. А. Цибизова, М. А. Самотруева, А. А. Озеров, И. Н. Тюренков // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сборник научных трудов / сост. : А. Н. Коренова, Е. Г. Санникова. – Ижевск : ООО «Принт», 2017. – С. 157–158.

10. Цибизова, А. А. Влияние карбонильного производного хиназолина VMA-13-03 на показатели массы и клеточности иммунокомпетентных органов при остром иммунном стрессе / А. А. Цибизова, А. А. Озеров, И. Н. Тюренков, М. А. Самотруева // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке : сборник тезисов Международной научно-практической конференции (Москва, 28 ноября 2018 г.). – М. : Российский университет дружбы народов, 2018. – С. 205–207.

Цибизова Александра Александровна

**ИММУНОТРОПНАЯ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ
АКТИВНОСТЬ ХИНАЗОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Подписано в печать _____ г.

Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.

Печать трафаретная. Печ. Л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ № 4729

Отпечатано в типографии издательства ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ
414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121