

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Аляев Ю. Г.* Урология: учеб. для студ. мед. вузов. — М.: МИА., 2005. — 638 с.
2. *Бондаренко С. Г.* Дифференцированный подход к выбору способа малоинвазивной хирургической коррекции гидронефроза : автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Волгоград, 2007. — 22с.
3. *Карпенко В. С.* // Урология. — 2002. — № 3. — С. 43—46.
4. *Лопаткин Н. А.* Урология: учебник для вузов. 6-е изд. испр. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 519 с.

5. *Лопаткин Н. А.* Избранные лекции по урологии / Под ред. Н. А. Лопаткина, А. Г. Мартова. — М.: ООО «МИА», 2008. — 576 с.

## Контактная информация

**Асфандияров Фаик Растямович** — кандидат медицинских наук, доцент кафедры урологии с курсом нефрологии Астраханской государственной медицинской академии, e-mail: drfa@rambler.ru

УДК 615.281.8:612.017.1

## ИММУНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНИНА

**П. П. Несмиянов**

*Кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ВолГМУ*

В работе исследованы иммуномодулирующие свойства новых производных аденина, синтезированных в Волгоградском научном центре РАМН. Установлено, что вещества VMA-03-01, VMA-01-21, VMA-99-56 обладают стимулирующим влиянием на функции фагоцитов; усиливают либо ослабляют в зависимости от концентрации экспрессию CD69 и CD25 на активированных лимфоцитах, то есть влияют как на раннюю, так и на позднюю фазы активации лимфоцитов. В экспериментах *in vivo* показано, что вещества VMA-03-01 и VMA-01-21 способны ингибировать продукцию специфических антител.

*Ключевые слова:* иммуномодуляторы, иммунитет, фагоцитоз, производные аденина.

## IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF NEW ADENINE DERIVATIVES

**P. P. Nesmiyanov**

Five compounds (VMA-03-01, VMA-01-21, VMA-99-56, VMA-99-82, VMA-00-29) were evaluated for their *in vitro* and *in vivo* immune-modulating effects. VMA-03-01, VMA-01-21, VMA-99-56 have been shown to increase phagocytosis and microbicidal activity in human neutrophils, thus affecting innate immunity. All compounds affect early and late stages of T cell activation, which is shown by measurement of CD69+ and CD25+ T cells. In the rat model, compounds VMA-03-01 and VMA-01-21 inhibit specific antibody production.

*Key words:* immune modulation, immunity, phagocytosis, adenine derivatives.

В современной фармакологии разработка противовирусных средств является актуальной задачей, поскольку показано, что в патогенетической и этиологической основе многих заболеваний лежат именно вирусные инфекции [1, 7]. Среди них немаловажное место занимают вирусы семейства герпесвирусов и ретровирусные инфекции (ВИЧ-1, ВИЧ-2). Нередко протекающие в скрытой форме, инфекции *Herpesviridae* угрожают жизни иммунокомпрометированных пациентов, например, в посттрансплантационном периоде, при воздействии иммуносупрессивной терапии [2, 3, 6, 8, 9]. Клиническое течение ВИЧ-инфекции приводит к развитию иммунодефицитного состояния, последствиями которого является сопутствующая симптоматика, приводящая в итоге к летальному исходу [12]. В настоящее время применяется несколько групп препаратов, воздействующих на различные стадии жизненного цикла вирусов [4, 5]. Стабильно развиваются и применяются препараты на основе производных азо-

тистых оснований, механизм действия которых основан на блокировании воспроизводства вирусных ДНК и РНК [4, 5]. Однако выработка лекарственной устойчивости у вируса и некоторые побочные эффекты осложняют применение этих средств. Поэтому разработка противовирусных средств этой группы представляется перспективной.

Ряд новых соединений — производных аденина синтезирован недавно в Волгоградском научном центре РАМН [10, 11]. Это производные аденина: VMA-99-56, VMA 99-82, VMA-03-01, VMA-01-21, VMA-00-29. Предполагается, что данные соединения обладают способностью ингибировать репликацию и обратную транскрипцию вирусных нуклеиновых кислот, что делает их перспективными в качестве противовирусных агентов. Кроме того, представляется актуальной оценка аналогов нуклеозидов как иммуномодулирующих средств, обладающих способностью регулировать функции компонентов иммунной системы в необходимом направлении —

с целью подавления либо с целью активизации иммунного ответа в ряде патологических состояний.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Теоретическое обоснование возможности применения новых производных аденина с противовирусной активностью в качестве иммуномодулирующих средств с предварительной оценкой влияния соединений на функциональную активность клеток иммунной системы.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуностропное влияние веществ было оценено *in vitro* в реакции бласттрансформации [13] в нашей модификации по количеству CD3+клеток, экспрессирующих маркеры ранней и поздней активации (CD69 и CD25 соответственно) после инкубации с веществами в присутствии митогена фитогемагглютинина (ФГА) в культуре человеческих лимфоцитов, полученных от здоровых доноров. Клеточную взвесь инкубировали с веществами в концентрациях 10 и 100 мкМ, после чего методом проточной цитофлюориметрии производили анализ количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25, CD69.

Оценку влияния соединений на функциональное состояние нейтрофилов проводили, определяя активность фагоцитоза в тесте поглощения дрожжевых частиц и тесте восстановления нитросинего тетразола (НСТ) в присутствии соединений. При этом использовались концентрации соединений 90, 180, 800 мкг/мл.

Для исследования использовали венозную кровь условно здоровых лиц возраста 25—45 лет, взятую в первой половине дня, натощак, до приема медикаментов и принятия лечебных процедур. В качестве антикоагулянта использовали гепарин, из расчета 35—45 ед. гепарина на 1 мл крови.

Оценку влияния веществ на гуморальный иммунный ответ проводили путем определения титров антител после внутрибрюшинной иммунизации крыс эритроцитами барана ( $5 \times 10^6$  эр. в 1 мл). Исследуе-

мые соединения вводили внутривенно ежедневно однократно в течение 5 дней (в дозе 40 мг/кг), начиная за 2 дня до иммунизации, с целью оценить влияние веществ на индуктивную фазу иммунного ответа.

Для определения титра антител использовали при иммунизации эритроцитами барана реакцию гемагглютинации. Она основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, склеивать (агглютинировать) эритроциты барана. Кровь для получения сыворотки забирала на 7-й и 14-й день после иммунизации крыс эритроцитами барана (максимум накопления антител в крови) [13].

Дифференциальный подсчет типов лейкоцитов в мазках периферической крови проводили после окраски по методу Романовского.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на IBM-совместимом персональном компьютере с использованием программ Microsoft Excel 2003, Statsoft Statistica 6.0, SPSS Statistics 17.0.

При сравнении групп для выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, а для непараметрических выборок — *U*-критерий Манна-Уитни. Оценка нормальности распределения проводилась на основании *W*-теста Шапиро-Уилка в совокупности с визуальной оценкой гистограмм распределения, полученных при помощи программы Statsoft Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все соединения обладали дозозависимым влиянием на функции нейтрофильных гранулоцитов. Вещества VMA-99-82, VMA-99-56, VMA-03-01, VMA-01-21, VMA-00-29 в концентрации 90 мкг/мл не влияли на фагоцитарную активность нейтрофилов. Значимые эффекты начинали проявляться при концентрации 180 мкг/мл (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние производных аденина на фагоцитарную активность нейтрофилов. Концентрация вещества в реакционной смеси 180 мкг/мл, *M* (*m*)**

Исследуемый параметр		VMA 99-82	VMA-99-56	VMA-03-01	VMA-01-21	VMA-00-29
Фагоцитарный показатель, %	Контроль	25,40(3,14)	25,40(3,14)	41,00(2,42)	41,00(2,42)	22,00(3,14)
	кДМСО	17,20(4,53)*	17,20(4,53)*	12,00(1,16)*	12,00(1,16)*	17,20(4,53)*
	Вещество	21,80(2,96)	23,40(3,27)**	29,00(3,39)**	28,00(0,93)**	22,40(3,74)
Количество поглощенных частиц, шт	Контроль	47,20(9,65)	47,20(9,65)	125,00(10,87)	125,00(10,87)	56,00(9,65)
	кДМСО	23,80(9,04)*	23,80(9,04)*	38,00(6,34)*	38,00(6,34)*	23,80(9,04)*
	Вещество	31,80(5,78)	46,60(6,63)**	112,00(11,61)**	113,00(1,32)**	33,60(9,32)
Фагоцитарное число	Контроль	1,89(0,28)	1,89(0,28)	3,05(0,10)	3,05(0,10)	1,89(0,28)
	кДМСО	1,36(0,19)*	1,36(0,19)*	3,13(0,32)	3,13(0,32)	1,36(0,19)*
	Вещество	1,42(0,11)	1,96(0,09)**	3,78(0,23)**	4,04(0,15)*, **	1,41(0,15)

\* Значимые отличия ( $p < 0,05$ ) по отношению к значению в контроле; \*\* значимые отличия по отношению к контролю с ДМСО ( $p < 0,05$ ).

В присутствии исследуемых веществ в концентрации 90 мкг/мл значимые отличия от контроля с диметилсульфоксидом (ДМСО) отсутствуют. ДМСО оказывает ингибирующее действие на фагоцитоз (снижая количество и активность фагоцитирующих клеток), перекрывая тем самым возможное стимулирующее действие соединений, возможно по этой причине выделить влияние соединений на фагоцитоз в этой концентрации представилось невозможным.

При исследовании соединений VMA-99-82, VMA-99-56, VMA-03-01, VMA-01-21, VMA-00-29 в концентрации 180 мкг/мл выяснилось, что в присутствии веществ параметры фагоцитоза перестают отличаться от контрольных значений (возвращаются к исходному уровню). Если в качестве интегрального показателя использовать фагоцитарное число (ФЧ), то выясняется, что VMA-99-56, VMA-03-01, VMA-01-21 имеют более выраженное влияние на процесс фагоцитоза. В концентрации 800 мкг/мл соединения проявляют еще больший эффект (табл. 2).

Таблица 2

### Влияние производных аденина на фагоцитарную активность нейтрофилов. Концентрация вещества в реакционной смеси 800 мкг/мл, M (m)

Исследуемый параметр		VMA 99-82	VMA-99-56	VMA-03-01	VMA-01-21	VMA-00-29
Фагоцитарный показатель, %	Контроль	35,80(1,59)	35,80(1,59)	44(2,48)	44(2,48)	37,00(1,59)
	кДМСО	28,00(1,00)*	28,00(1,00)*	28(1,25)*	28(1,25)*	28,00(1,00)*
	Вещество	33,40(1,03)**	36,20(1,20)**	41(1,72)*, **	41(0,68)*, **	39,00(1,95)**
Количество поглощенных частиц, шт	Контроль	46,00(6,26)	46,00(6,26)	103(3,06)	103(3,06)	56,00(6,26)
	кДМСО	22,30(3,71)*	22,30(3,71)*	79(4,66)*	79(4,66)*	25,00(3,71)*
	Вещество	33,50(12,68)	46,60(6,44)**	101(3,84)*, **	104(3,52)*, **	25,00(9,05)
Фагоцитарное число	Контроль	1,28(0,16)	1,28(0,16)	2,45(0,21)	2,45(0,21)	1,51(0,16)
	кДМСО	0,80(0,13)	0,80(0,13)	2,72(0,24)*	2,72(0,24)*	0,97(0,13)
	Вещество	1,00(0,17)	1,29(0,18)**	2,50(0,07)*	2,54(0,09)*	0,76(0,28)

\* Значимые отличия ( $p < 0,05$ ) по отношению к значению в контроле; \*\* значимые отличия по отношению к контролю с ДМСО ( $p < 0,05$ ).

*Влияние веществ на бактерицидную активность нейтрофилов в НСТ-тесте.* При исследовании влияния веществ на способность нейтрофилов восстанавливать нитросиний тетразолий были выявлены следующие закономерности. Показатели НСТ, как спонтанного, так и стимулированного, в присутствии ДМСО достоверно снижались. Исследуемые вещества VMA-03-01 и VMA-01-21 в концентрации 90—180 мкг/мл значимо стимулировали бактерицидную активность гранулоцитов (табл. 3).

При увеличении концентрации веществ до 800 мкг/мл обнаружено, что все вещества нивелируют эффекты ДМСО, заключающиеся в подавлении бактерицидной активности нейтрофилов, а в присутствии веществ VMA-03-01, VMA-01-21 показатели спонтанной активности даже превышают таковые в контрольных пробах (табл.4).

Таблица 3

### Влияние производных аденина на бактерицидную активность нейтрофилов. Концентрация вещества в реакционной смеси 180 мкг/мл, M (m), %

Исследуемый параметр		VMA-03-01	VMA-01-21
Спонтанная активность	Контроль	33(1,19)	33(1,19)
	кДМСО	24(0,50)*	24(0,50)*
	Вещество	33(1,51)**	30(1,82)*, **
Стимулированная активность	Контроль	36,5(1,14)	36,5(1,14)
	кДМСО	29(1,08)*	29(1,08)*
	Вещество	38,5(1,29)**	35(1,96)**

\* Значимые отличия ( $p < 0,05$ ) по отношению к значению в контроле; \*\* значимые отличия по отношению к контролю с ДМСО ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4

### Влияние производных аденина на бактерицидную активность нейтрофилов. Концентрация вещества в реакционной смеси 800 мкг/мл, M (m), %

Исследуемый параметр		VMA 99-82	VMA-99-56	VMA-03-01	VMA-01-21	VMA-00-29
Спонтанная активность	Контроль	38(1,24)	38(1,24)	30,5(0,87)	30,5(0,87)	38(1,24)
	кДМСО	31(1,21)*	31(1,21)*	26(0,79)*	26(0,79)*	31(1,21)*
	Вещество	39(0,73)**	39(0,86)**	37,5(1,14)*, **	34,5(0,56)*, **	34(1,28)
Стимулированная активность	Контроль	39(1,21)	39(1,21)	33(1,25)	33(1,25)	39(1,21)
	кДМСО	34(0,71)*	34(0,71)*	27,5(0,84)*	27,5(0,84)*	34(0,71)*
	Вещество	42(1,18)**	41(1,44)**	39,5(1,73)*, **	37,5(1,37)*, **	37(0,66)**

\* Значимые отличия ( $p < 0,05$ ) по отношению к значению в контроле; \*\* значимые отличия по отношению к контролю с ДМСО ( $p < 0,05$ ).

**Влияние веществ на процессы активации Т-лимфоцитов.** В концентрации 10 мкМ все соединения, кроме VMA-00-29, способствуют увеличению экспрессии CD69 при стимуляции ФГА. VMA-00-29 увеличивал экспрессию CD25 как при стимуляции, так и без стимуляции ФГА, в то время как остальные соединения не изменяли, либо уменьшали (VMA-99-56) экспрессию CD25. В отсутствие ФГА имеет тенденцию к увеличению экспрессия CD69 под действием VMA-03-01, VMA-01-21 (рис. 1).

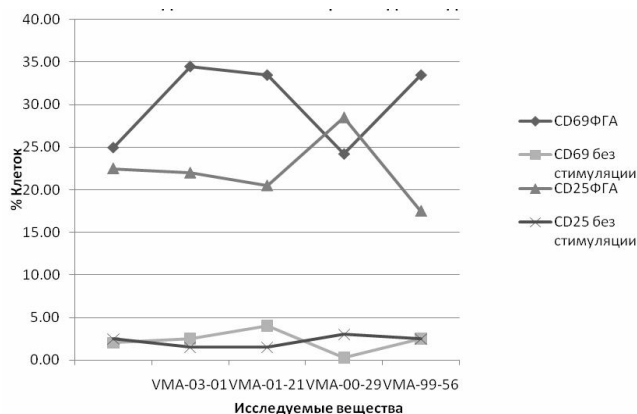


Рис. 1. Экспрессия маркеров активации Т-клетками под действием ФГА и производных аденина с веществами в концентрации 10 мкМ

В концентрации 100 мкМ поведение веществ изменяется. VMA-03-01 и VMA-01-21 начинают проявлять ингибирующее действие на экспрессию CD25 и CD69, в то время как VMA-00-29 и VMA-99-56 стимулируют появление на клетках обоих маркеров активации при стимуляции ФГА. В отсутствие ФГА значимых эффектов не наблюдается (рис. 2)

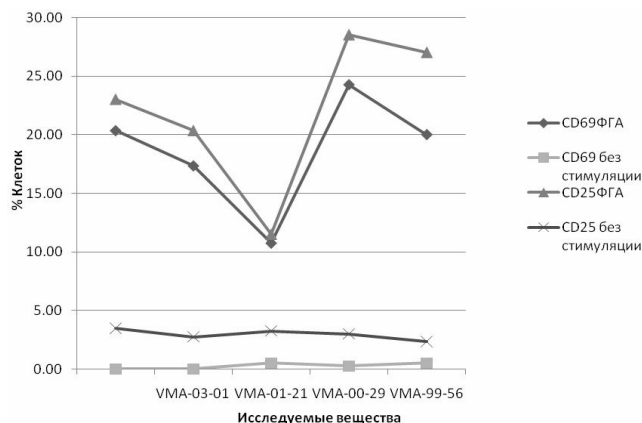


Рис. 2. Экспрессия маркеров активации Т-клетками под действием ФГА и производных аденина с веществами в концентрации 100 мкМ

Из вышеописанного следует, что производные аденина затрагивают как раннюю, так и позднюю фазы активации Т-лимфоцитов и направленность действия соединений меняется при изменении концентрации веществ. Полярность действия в зависимости

от концентрации наиболее характерна для VMA-03-01 и VMA-01-21.

**Влияние соединений на иммунный ответ *in vivo*.** На основании исследования свойств новых производных аденина для дальнейшего исследования выбраны соединения VMA-03-01 и VMA-01-21. Для этих веществ продемонстрировано их влияние на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа в ходе сенсibilизации эритроцитами барана.

Выяснено, что на 7-й день после иммунизации в группе крыс, которым вводили VMA-01-21 достоверно выше количество сегментоядерных нейтрофилов периферической крови (28 %), чем в группе крыс, которым вводили VMA-03-01 (14,5), на 14-й день различие сохранилось и составило 41 против 23 % ( $p < 0,05$ ).

Исследование уровня антител к эритроцитам барана в периферической крови крыс показало, что до иммунизации и на 7-й день после антител не обнаруживается, и только к 14-му дню исследования в сыворотке появлялись антитела. Оба соединения проявили ингибирующее действие в отношении синтеза антител у животных (табл. 5).

Таблица 5

### Титры антител к эритроцитам барана в контрольной и опытных группах животных Me (95 % Ди)

	Контроль	VMA-03-01	VMA-01-21
До иммунизации	0	0	0
7-й день исследования	0	0	0
14-й день исследования	1:87 (1:64–1:106)	1:53,4 (1:36–1:64)*	1:59,8 (1:38–1:67)*

\* Значимые отличия ( $p < 0,05$ ) по отношению к значению в контроле.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемые производные аденина обладают достаточно широким спектром иммуномодулирующей активности. Влияние на неспецифический иммунный ответ проявляется стимуляцией как поглотительной, так и бактерицидной функции нейтрофилов. Это свойство особенно важно при использовании веществ для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов. Кроме того, соединения затрагивают регуляторные функции клеток иммунной системы, влияя на процессы активации Т-лимфоцитов, причем направленность действия веществ в значительной мере зависит от их концентрации. Влияние соединений на гуморальный иммунитет выражается в их способности снижать синтез антигенспецифических антител *in vivo*. Наиболее перспективными соединениями для применения в качестве противовирусных средств, обладающих иммунотропными свойствами по результатам исследования, являются VMA-03-01 и VMA-01-21.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Appel G. // Cleveland clinic journal of medicine. — 2007. — Vol. 74, № 5. — P. 353—360.
2. Blair C. W., Emily A. B. // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. — 2008. — Vol. 3. — P. 76—86.
3. Boubenider S., Hiesse C., Marchand S., et al. // J. Nephrol. — 1999. — Vol. 12. — P. 24—29.
4. De Clercq E. // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. — 2001. — Vol. 297, № 1. — P. 1—10.
5. De Clercq E. // Nature Rev. Drug Discov. — 2002. — Vol. 1. — P. 13—25.
6. Hartmann A., Sagedal S., Hjelmesaeth J. // Transplantation. — 2006. — Vol. 82. — P. 15—17.
7. Merson M. H. // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 354. — P. 2414—2417.
8. Sageda S., Nordal K. P., Hartmann A., et al. // Am. J. Transplant. — 2002. — Vol. 2. — P. 850—856.
9. Toyoda M., Puliyaanda D., Amet N., et al. // Transplantation. — 2005. — Vol. 80. — P. 198—205.

10. Новиков М. С., Орлова Ю. А., Озеров А. А., Хартман Т., Букхайт Р. У. // Бюлл. волгоградского научного центра РАМН. — 2006. — Вып. 4. — С. 11—15.

11. Озеров А. А., Новиков М. С., Лобачев А. А., Гнатюк В. П., Букхайт Р. У. // Бюлл. Волгоградского научного центра РАМН. — 2004. — Вып. 1. — С. 26—28.

12. Покровский В. В. и др. Клиническая диагностика ВИЧ-инфекции. Практическое руководство. — М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. — 90 с.

13. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — 832 с.

## Контактная информация

**Несмиянов Павел Павлович** — ассистент кафедры иммунологии и аллергологии, аспирант кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии Волгоградского государственного медицинского университета, e-mail: pecatum@yandex.ru

УДК 615.281.8:612.017.1

## ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА «АНАФЕРОН» ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

**А. В. Стрыгин**

*Кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ВолГМУ*

В статье представлены данные о иммуномодулирующем действии препарата «Анаферон» на ВИЧ-инфицированных пациентов на разных стадиях развития заболевания в комплексном применении с антиретровирусной терапией и без нее. Отмечается выраженное иммуностимулирующее действие препарата на уровне интерлейкина-4 и Th2 иммунный ответ.

*Ключевые слова:* анаферон, ИНФ-гамма, ИЛ-4, ИЛ-2, субпопуляции лимфоцитов.

## IMMUNE MODULATING EFFECTS OF ANAFERON IN TREATMENT OF HIV-INFECTED PATIENTS

**A. V. Strygin**

Data on immune modulating effects of Anaferon in HIV-infected patients at different stages of disease progressing and different antiretroviral regimens are presented. Anaferon stimulates IL-4 synthesis and promotes Th2 response.

*Key words:* Anaferon, INF- $\gamma$ , IL-4, IL-2, lymphocyte subpopulations.

В настоящее время ВИЧ-инфекция во всем мире приобретает характер пандемии. До сих пор не найдено средств, позволяющих провести радикальное лечение ВИЧ-инфекции. Поэтому поиск новых лекарственных средств и разработка оптимальных схем лечения ВИЧ-инфицированных являются актуальной задачей. Эпидемиология ВИЧ-инфекции потерпела драматические изменения [6]. Путем подавления репликации ВИЧ антиретровирусная терапия (АРВТ) позволяет восстановить иммунную систему как в качественном, так и в количественном выражении [1, 2], снижая таким образом риск возникновения оппорту-

нистических инфекций и неоплазий [5, 3]. Снижена заболеваемость и смертность от 15 из 26 СПИД-ассоциированных заболеваний. Тем не менее, риск возникновения оппортунистических инфекций все равно остается значительным, особенно в течение первых месяцев лечения [4]. Частота случаев инфекции вирусом папилломы человека, вызывающей неоплазии, и вирусом гепатита С вовсе не изменилась после появления АРВТ [7]. Оппортунистические инфекции являются наиважнейшей причиной смертности среди ВИЧ-инфицированных больных, при том что проведение АРВТ порой затруднено вследствие непер-