

DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1445>

# Противовоспалительная активность противоаллергического препарата 7-[4-(4-бензгидрилпиперазинил-1)бутил]-3-метилксантина сукцината (теоритин)

© И.С. Гушин<sup>1</sup>, К.Л. Крышень<sup>2</sup>, А.Б. Бондаренко<sup>2</sup><sup>1</sup> Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> Научно-производственное объединение «Дом фармации», Ленинградская область, пос. Кузьмолковский, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**ОБОСНОВАНИЕ.** Многие антагонисты  $H_1$ -рецепторов помимо противогистаминного действия подавляют аллергическое воспаление за счёт угнетения образования и секреции провоспалительных цитокинов. Новый противоаллергический препарат бензгидрилпиперазинилбутилметилксантина сукцинат (теоритин), имеющий сопоставимую с известными  $H_1$ -антигистаминными препаратами 2-го поколения противогистаминную активность, превосходит их по способности подавлять аллергическую воспалительную реакцию, что позволяет допустить наличие у этого препарата дополнительных противовоспалительных свойств, связанных с угнетением образования провоспалительных цитокинов.

**ЦЕЛЬ** — определить в культуре клеток влияние теоритина на индуцированное высвобождение провоспалительных цитокинов — интерлейкинов (ИЛ) 6, 8 и фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ) — в сравнении с действием обратного агониста  $H_1$ -рецепторов цетиризина и известного ингибитора воспаления глюкокортикоида дексаметазона.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Использовали клетки U937, подвергнутые дифференцировке в сторону макрофагоподобных клеток. Цитотоксичность использованных субстанций оценивали в метилтетразолиевом тесте в разные сроки инкубации (до 24 ч). Стимуляцию клеток осуществляли липополисахаридом (ЛПС). Тестируемые соединения (теоритин и цетиризин) испытывали в концентрациях от 0,001 до 100 мкМ, дексаметазона — 10 мкМ при добавлении к клеткам за 1 ч до (профилактическое действие) или через 1 ч после (лечебное действие) внесения ЛПС. Определение ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$  в надосадочных жидкостях проводили иммуноферментным методом.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Для цетиризина и теоритина показано отсутствие цитотоксического действия в пределах испытанных концентраций и временных интервалов. Дексаметазон подавлял образование ИЛ-6 и ФНО $\alpha$  до исходного уровня, а ИЛ-8 — на 50–60% в обоих режимах введения. Теоритин приводил к достоверному, зависимому от концентрации снижению ЛПС-индуцированной продукции ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$ , а в концентрации 100 мкМ действие теоритина было сравнимо с действием дексаметазона в концентрации 10 мкМ. Профилактическая схема испытаний теоритина была более эффективной в подавлении ЛПС-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов, чем лечебная. Описанное действие теоритина на ЛПС-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов превышало таковое у препарата сравнения цетиризина.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Новое противоаллергическое средство теоритин помимо противогистаминного действия тормозит ЛПС-индуцированное образование провоспалительных цитокинов, что может иметь клиническое значение в подавлении аллергического воспаления.

**Ключевые слова:** аллергия; противоаллергические препараты, противовоспалительные средства; теоритин; цетиризин; теобромин; клетки U937; интерлейкин-6; интерлейкин-8; фактор некроза опухоли альфа

**Для цитирования:** Гушин И.С., Крышень К.Л., Бондаренко А.Б. Противовоспалительная активность противоаллергического препарата 7-[4-(4-бензгидрилпиперазинил-1)бутил]-3-метилксантина сукцината (теоритин) // *Российский аллергологический журнал*. 2021. Т. 18. № 2. С. 20–31. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1445>

# Anti-inflammatory activity of the antiallergic drug 7-[4-(4-benzhydrylpiperazinyl-1)butyl]-3-methylxanthine succinate (theoritin)

© I.S. Gushchin<sup>1</sup>, K.L. Kryshen<sup>2</sup>, A.B. Bondarenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Research Center — Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Scientific and Production Association “Home of Pharmacy”, Leningrad region, Kuzmolovsky village, Russian Federation

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Many antagonists of histamine (H<sub>1</sub>) receptor, in addition to antihistamine action, suppress allergic inflammation by inhibiting the formation and secretion of proinflammatory cytokines. The new antiallergic drug benzhydrylpiperazinyl butylmethylxanthine succinate (theoritin), which has an antihistamine activity comparable to the known second generation H<sub>1</sub>-antihistamines, surpasses them in the ability to suppress the allergic inflammatory reaction, which allows this drug to have additional anti-inflammatory properties associated with the inhibition of the formation of proinflammatory cytokines.

**AIM:** This study aimed to determine the effect of theoritin on the induced release of proinflammatory cytokines interleukin (IL)-6, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in cell culture in comparison with the action of the inverse agonist of H<sub>1</sub> receptor cetirizine and a known inflammation inhibitor glucocorticosteroid dexamethasone.

**MATERIALS AND METHODS:** U937 cells differentiated toward macrophage-like cells were used. Cytotoxicity of the substances used was assessed in the methyltetrazolium test at different incubation times (up to 24 h). Cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS). The tested compounds (theoritin and cetirizine) were evaluated at concentrations from 0.001 to 100  $\mu$ M and dexamethasone at 10  $\mu$ M was tested when added to cells 1 h before (prophylactic effect) or 1 h after (therapeutic effect) the addition of LPS. The presence of IL-6, IL-8, and TNF $\alpha$  in the supernatants was determined by enzyme immunoassay.

**RESULTS:** For cetirizine and theoritin, no cytotoxic action was found in the tested concentrations and time points. Dexamethasone inhibited the formation of IL-6 and TNF $\alpha$  to the initial level and IL-8 to 50%–60%. Theoritin led to a significant concentration-dependent decrease in the LPS-induced production of IL-6, IL-8, and TNF $\alpha$ , and at a concentration of 100  $\mu$ M, the effect of theoritin was comparable with that of dexamethasone at a concentration of 10  $\mu$ M. The “prophylactic” test scheme for theoritin was more effective in suppressing LPS-induced production of proinflammatory cytokines than the “curative” one. The described effect of theoritin on LPS-induced production of proinflammatory cytokines exceeded that of the reference drug cetirizine.

**CONCLUSION:** In addition to its antihistaminic action, theoritin, a new antiallergic agent, inhibits LPS-induced production of proinflammatory cytokines, which may be of clinical importance in suppressing allergic inflammation.

**Keywords:** allergy; antiallergic drugs; anti-inflammatory drugs; theoritin; cetirizine; theobromine; U937 cells; interleukin-6; interleukin-8; tumor necrosis factor- $\alpha$

**For citation:** Gushchin IS, Kryshen KL, Bondarenko AB. Anti-inflammatory activity of the antiallergic drug 7-[4-(4-benzhydrylpiperazinyl-1) butyl]-3-methylxanthine succinate (theoritin). *Russian Journal of Allergy*. 2021;18(2):20–31. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1445>

Статья поступила 12.04.2021  
Received: 12.04.2021

Принята к печати 12.05.2021  
Accepted: 12.05.2021

Опубликована 25.05.2021  
Published: 25.05.2021

## Обоснование

Вопрос о целесообразности создания полифункциональных противоаллергических фармакологических средств возник после того, как стало очевидным, что вызванная аллергеном реакция клеток-мишеней (в первую очередь тучных клеток и базофилов) не является результатом их повреждения, а представляет собою процесс активации

функции клеток, приводящий к секреции медиаторов аллергии [1, 2]. Отсюда следовало, что перспективным способом фармакологического контроля аллергической реакции является совмещение антагонистического действия по отношению к медиаторам аллергии с торможением функции клеток-мишеней с целью подавления секреции медиаторов. В процессе реализации такого подхода были получены соединения, представляющие

собою модификации ксантинового ядра фармакоформными группами соединений, обладающих свойствами обратных агонистов (противогистаминное действие) [3], в частности с использованием оригинальных хинуклидиновых производных, созданных группой М.Д. Машковского [4]. Такие модифицированные структуры сочетали противогистаминное действие на уровне рецептора с торможением вызванной аллергеном секреции этого медиатора из тучных клеток крыс и базофилов человека [3], т.е. обладали полифункциональным противоаллергическим действием. При фармакологическом изучении  $H_1$ -антигистаминных препаратов оказалось, что большинство из них проявляют дополнительное противовоспалительное действие за счёт подавления образования и секреции провоспалительных цитокинов, т.е. имеют полифункциональную противоаллергическую активность, а определение таких свойств у новых противогистаминных препаратов стало широко используемым подходом [5, 6].

В последующем были выполнены расширенные исследования Р.Г. Глушковым и соавт. [7, 8] с целью подбора оптимальных условий синтеза модификаций ксантинового ядра соединениями с  $H_1$ -антигистаминной активностью, отвечающих запросам клинической медицины. Так, в результате модификации ксантинового ядра бензгидрилпиперазиноалкильным фрагментом, являющимся основной частью структуры современных высокоэффективных обратных агонистов  $H_1$ -рецепторов (в частности, цетиризина), было получено длительно действующее и малотоксичное соединение 7-[4-(4-бензгидрилпиперазинил-1)бутил]-3-метилксантина сукцинат (теоритин), обладавшее сопоставимым с действием препарата сравнения (цетиризин) противогистаминным эффектом, но превышавшее способность цетиризина подавлять кожную аллергическую реакцию [7, 8]. Последнее могло указывать на усиление противоаллергического действия теоритина за счёт ксантинового ядра, обуславливающего дополнительный противовоспалительный эффект, что в свою очередь обосновывало определение способности теоритина влиять на образование и высвобождение провоспалительных цитокинов, участвующих в организации аллергического воспалительного ответа.

**Цель.** В настоящей работе исследовано влияние теоритина в сопоставлении с действием препарата сравнения (цетиризин) и стандартного противовоспалительного агента дексаметазона на индуцированное липополисахаридом (ЛПС) в условиях культивирования клеток образование и высвобождение ключевых провоспалительных цитокинов — интерлейкинов (ИЛ) 6, 8 и фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ).

## Материал и методы

В работе использованы субстанции следующих препаратов: теоритин (Теоритин® МФ — бензгидрилпиперазинилбутилметилксантина сукцинат, ЗАО «Обнинская химико-фармацевтическая компания», Россия) [7], цетиризин дигидрохлорид (BLD Pharamatech Ltd., США) и дексаметазон (Elfa Laboratories, Индия).

**Клетки.** Использовали суспензионную культуру клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937 [9]. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 (ООО «Биолот», Россия), содержащей 10% сыворотки плода коровы (HyClone, США), 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Пересев клеток производили раз в 3–4 дня при достижении плотности свыше 2 млн кл./мл путём разведения клеточной суспензии свежей питательной средой в соотношении 1:10.

**Дифференцировка клеток.** Дифференцировку клеток U937 в макрофаги проводили в культуральных флаконах для адгезионных клеток площадью 75 см<sup>2</sup> (Nunc, США) с использованием форбол-12-мирикат-13-ацетата (ФМА) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 35 нг/мл. В течение первых 24 ч клетки инкубировали в питательной среде с добавлением ФМА для перехода клеток из суспензионной формы в адгезионную. После этого проводили отмывку от не прикрепившихся к пластику клеток и продолжали культивирование в питательной среде с добавлением ФМА ещё 24 ч, после чего клетки с культуральных флаконов рассеивали в лунки планшетов для проведения дальнейших экспериментов.

**Изучение цитотоксического действия теоритина и цетиризина на клетки линии U937.** Цитотоксичность субстанций оценивали с использованием метилтетразолиевого теста (МТТ-тест) через 3; 6; 12 и 24 ч после добавления субстанций к дифференцированным клеткам U-937. МТТ-тест позволяет количественно оценить способность митохондриальных НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз живых клеток превращать бледно-жёлтый 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) (Sigma-Aldrich, США) в фиолетовые кристаллы формазана [10]. В лунки 96-луночных планшетов (Nunc, США), содержащих по 10<sup>5</sup> клеток, вносили десятикратные разведения субстанций (теоритина и цетиризина) с созданием конечных концентраций в диапазоне от 100 до 0,00001 мкМ (каждую концентрацию субстанций исследовали в 6 повторях). Планшеты инкубировали в течение 1; 4; 10 и 22 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После этого в лунки добавляли по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в питательной среде) и инкуби-

ровали дополнительно 2 ч. Затем лунки освобождали от супернатантов, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ООО «Биолот», Россия) и измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны поглощения 550 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США). Жизнеспособность клеток в присутствии испытуемых веществ выражали в процентах, используя формулу:

$$\frac{(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%}{\text{где ОП — оптическая плотность.}}$$

**Оценка способности теоритина и цетиризина влиять на индуцированную ЛПС продукцию цитокинов дифференцированными клетками U937.** Противовоспалительное действие исследуемых субстанций оценивали по изменению количества продуцируемых провоспалительных цитокинов при использовании двух схем внесения препаратов — профилактической и лечебной. В лунки 24-луночных планшетов, содержащих  $10^6$  дифференцированных клеток U-937 в 800 мкл питательной среды, вносили по 100 мкл десятикратных разведений исследуемых субстанций с созданием конечных концентраций от 100 до 0,001 мкМ по двум схемам: профилактической — за 1 ч до добавления ЛПС *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США) и лечебной — через 1 ч после добавления ЛПС. ЛПС в объёме 100 мкл добавляли в лунку с созданием конечной концентрации 10 мкг/мл. Отрицательным контролем служили дифференцированные клетки, к которым не добавляли ЛПС и исследуемые субстанции; контролем индукции провоспалительных цитокинов являлись клетки, к которым добавляли ЛПС; в качестве контроля противовоспалительного действия использовали дексаметазон (Elfa Laboratories, Индия) в конечной концентрации 10 мкМ. Каждая схема применения субстанций препаратов была воспроизведена в 4 повторях. По истечении 6-часовой инкубации клеток после внесения ЛПС культуральную жидкость отбирали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующего количественного определения продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО $\alpha$  методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов (АО «Вектор-Бест», Новосибирск).

**Статистическая обработка.** Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение от среднего. Для оценки данных с признаками нормального распределения применены t-критерий Стьюдента и однофакторный

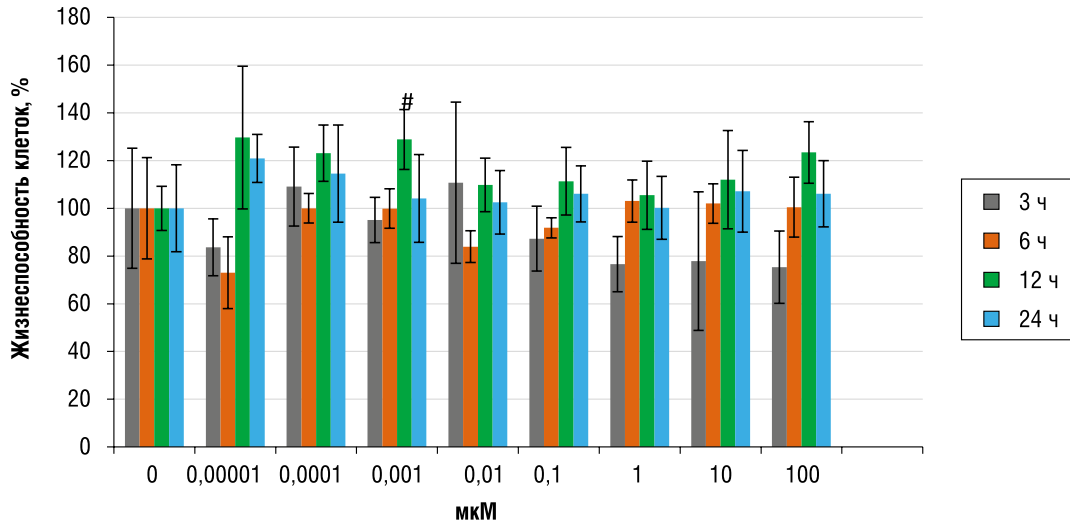
дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим межгрупповым сравнением (post hoc analysis) критерием Даннета. Для данных цитотоксичности тестируемых объектов, выраженных в процентном соотношении, был применён критерий Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением средних рангов (критерий Данна). EC50 (эффективность биологического действия на уровне 50%) вычисляли при помощи четырёх-параметрической аппроксимации графика зависимости процентного соотношения от концентрации теоритина. Статистический анализ выполняли с использованием лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, США). Различия считали статистически значимыми ( $p$ ) при уровне  $<0,05$ .

## Результаты

Цитотоксическое действие теоритина и цетиризина в конечных концентрациях от 100 до 0,00001 мкМ изучали на дифференцированных в макрофаги клетках линии U937 с использованием МТТ-теста при инкубации в течение 3; 6; 12 и 24 ч. Результаты оценки цитотоксического действия цетиризина и теоритина на дифференцированные клетки U937 представлены на рис. 1 и 2.

Анализ жизнеспособности клеток U937 по активности митохондриальных оксидоредуктаз показал отсутствие цитотоксического действия цетиризина в диапазоне конечных концентраций от 100 мкМ до 0,01 нМ при инкубации с клетками в течение 3; 6; 12 и 24 ч. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA показал наличие статистической значимости в сравнении с отрицательным контролем (0 мкМ) для концентрации 0,001 мкМ через 12 ч инкубации (см. рис. 1). Ввиду отсутствия концентрационной зависимости зафиксированное отличие не является клинически значимым.

Для теоритина также показано отсутствие цитотоксического эффекта в диапазоне конечных концентраций от 100 мкМ до 0,01 нМ в период от 3 до 24 ч инкубации с клетками. Кроме того, на рис. 2 видно, что теоритин вызывает усиление активности митохондриальных НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз и клеточного дыхания. В частности, статистически значимое увеличение жизнеспособности клеток показано через 6 ч для концентрации 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 и 100 мкМ (см. рис. 2), кроме того, усиление клеточного дыхания наблюдали через 3 ч для концентрации 10 мкМ, а также через 24 ч для концентрации 0,01 мкМ. На основании полученных данных для дальнейшего изучения противовоспалительного действия разведений исследуемых субстанций были выбраны 6 концентраций как для теоритина, так и для цетиризина — 100; 10; 1; 0,1; 0,01 и 0,001 мкМ.



**Рис. 1.** Результаты оценки цитотоксического действия цетиризина на дифференцированные в макрофаги клетки U937. По оси ординат: жизнеспособность клеток (оптическая плотность в процентах к контролю). По оси абсцисс: концентрация цетиризина.

Здесь и на рис. 2–5 приведены средние значения (M) ± стандартные отклонения (SD).

# Отличия статистически значимы в сравнении с контролем (0 мкМ), непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, множественные сравнения с помощью критерия Данна,  $p < 0,05, n=6$ .

**Fig. 1.** Results of evaluating the cytotoxic effect of cetirizine on U937 cells differentiated into macrophages.

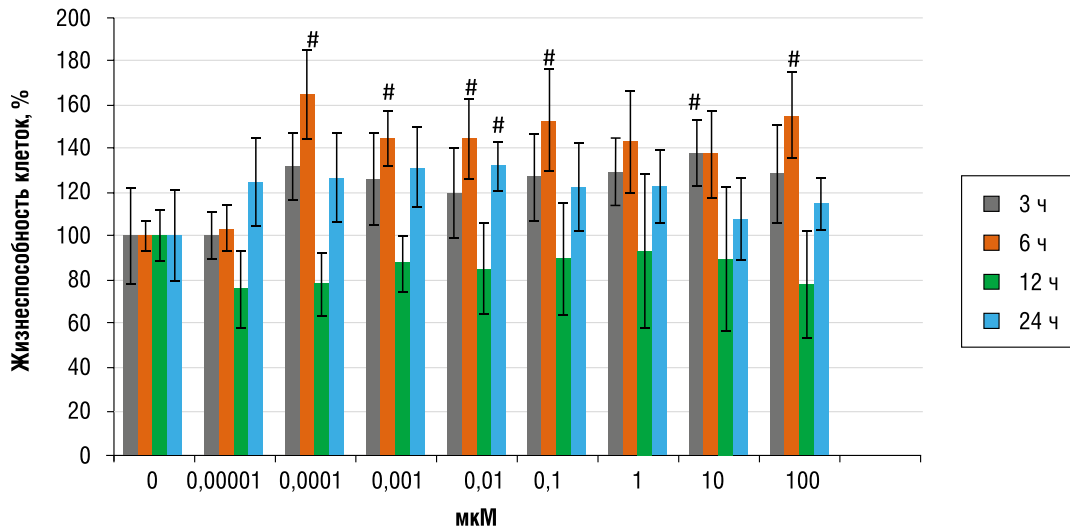
Y-axis: cell viability (optical density as a percentage of control). X-axis: cetirizine concentration in μM.

Hereinafter, the mean value (M) ± standard deviation (SD) are given.

# Differences are statistically significant in comparison with the control (0 μM), nonparametric Kruskal–Wallis test, multiple comparisons using Dunn’s test,  $p < 0.05, n=6$ .

Количественное определение изменения уровней ФНОα, ИЛ-6 и ИЛ-8 под действием исследуемых субстанций проводили иммуноферментным анализом через 6 ч после внесения к дифференциро-

ванным в макрофаги клеткам U-937 ЛПС в концентрации 10 мкг/мл. Внесение теоритина, цетиризина и в качестве контроля противовоспалительного действия дексаметазона в конечной концентрации



**Рис. 2.** Результаты оценки цитотоксического действия теоритина на дифференцированные в макрофаги клетки U937.

По оси ординат: жизнеспособность клеток (оптическая плотность в процентах к контролю). По оси абсцисс: концентрация теоритина.

# Отличия статистически значимы в сравнении с контролем (0 мкМ), непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, множественные сравнения с помощью критерия Данна,  $p < 0,05, n=6$ .

**Fig. 2.** Results of evaluating the cytotoxic effect of theophylline on U937 cells differentiated into macrophages.

Y-axis: cell viability (optical density as a percentage of control). X-axis: theophylline concentration in μM.

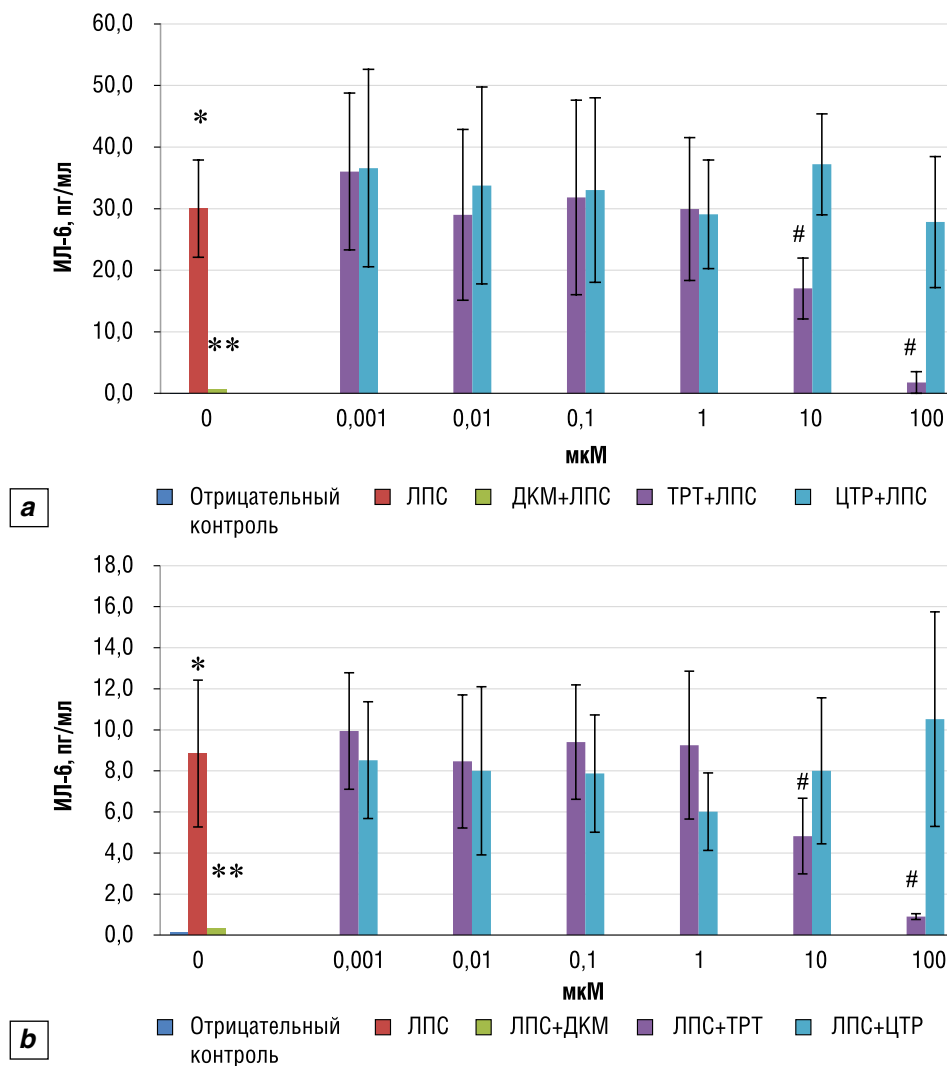
# Differences are statistically significant in comparison with the control (0 μM), nonparametric Kruskal–Wallis test, multiple comparisons using Dunn’s test,  $p < 0.05, n=6$ .

10 мкМ осуществляли по двум схемам — профилактической (за 1 ч до внесения ЛПС) и лечебной (через 1 ч после внесения ЛПС).

Внесение ЛПС в конечной концентрации 10 мкг/мл привело по совокупности двух экспериментов к синтезу и секреции всех оцениваемых провоспалительных цитокинов: через 6 ч инкубации

уровень ИЛ-6 составил от 10 до 30 пг/мл (рис. 3), ИЛ-8 — от 870 до 1060 пг/мл (рис. 4), ФНО $\alpha$  — от 200 до 300 пг/мл (рис. 5).

Препарат контроля противовоспалительного действия дексаметазон из группы глюкокортикоидов снижал выработку ИЛ-6 и ФНО $\alpha$  практически до фонового уровня, уровень ИЛ-8 — на 50–60%.



**Рис. 3.** Влияние исследуемых соединений на уровень ЛПС-индуцированной выработки ИЛ-6: *a* — тестируемые соединения добавляли за 1 ч до обработки клеток ЛПС; *b* — тестируемые соединения добавляли через 1 ч после обработки клеток ЛПС (ЛПС — 10 мкг/мл; ДКМ — 10 мкМ).

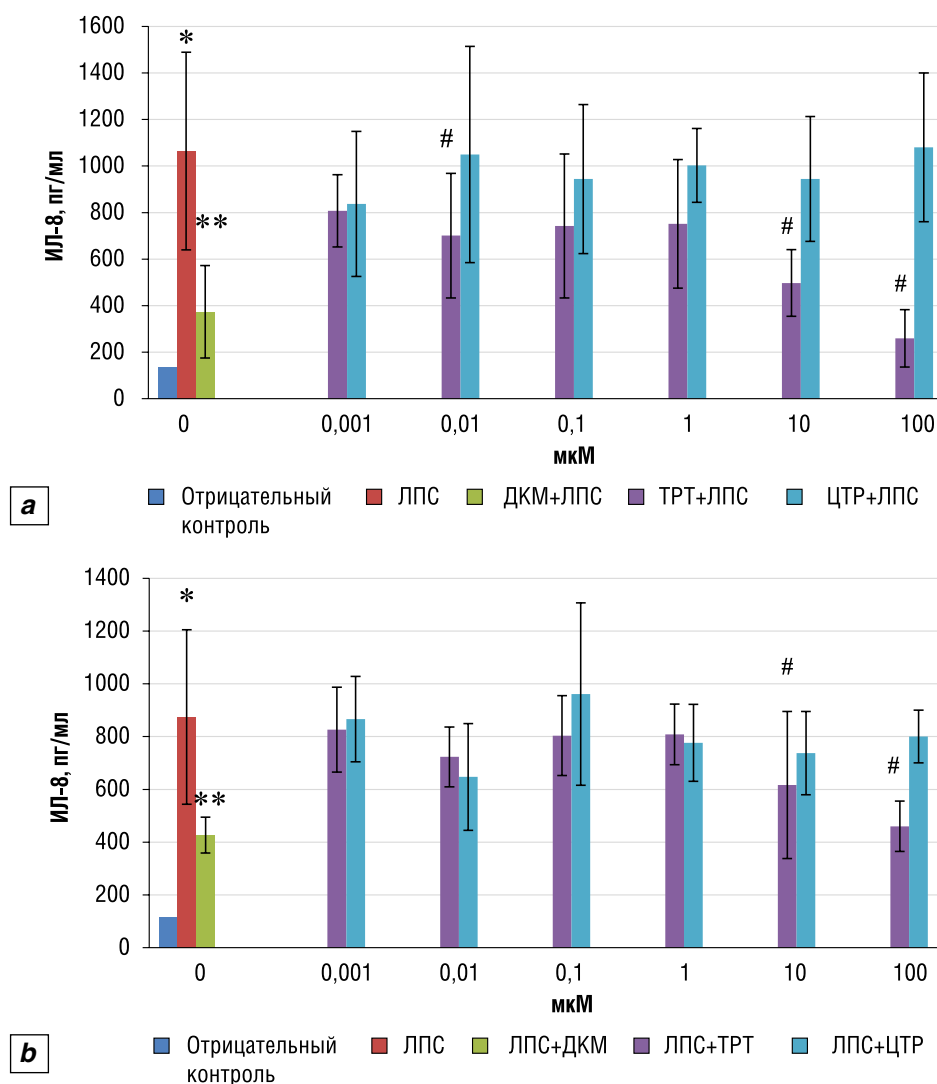
По оси ординат: концентрация ИЛ-6 в надосадочной жидкости. По оси абсцисс: концентрация добавляемых к клеткам испытуемых соединений (теоритина и цетиризина).

Здесь и на рис. 4, 5: ЛПС — липополисахарид; ТРТ — теоритин; ЦТР — цетиризин; ДКМ — дексаметазон. \* Отличия статистически значимы в сравнении с фоновым уровнем (отрицательный контроль), t-критерий Стьюдента; \*\* отличия статистически значимы в сравнении с ЛПС, t-критерий Стьюдента (для дексаметазона); # отличия статистически значимы в сравнении с ЛПС, ANOVA post-hoc критерий Даннета,  $p < 0,05$ ,  $n=8$ .

**Fig. 3.** Influence of the studied compounds on the level of LPS-induced production of IL-6: *a* — test compounds were added 1 hour before treatment with LPS cells; *b* — test compounds were added 1 hour after treatment with LPS cells (LPS 10 μg/ml; dexamethasone 10 μM).

Y-axis: concentration of IL-6 (pg/ml) in the supernatant. X-axis: concentration of test compounds (theoritin and cetirizine) added to the cells in μM.

Here and in Fig. 4, 5: ЛПС — lipopolysaccharide; ТРТ — theoritin; ЦТР — cetirizine; ДКМ — dexamethasone. \* Differences are statistically significant in comparison with the background level (negative control), Student's t-test; \*\* differences are statistically significant in comparison with LPS, Student's t-test (for dexamethasone); # differences are statistically significant in comparison with LPS, ANOVA post-hoc Dunnett's test,  $p < 0,05$ ,  $n=8$ .



**Рис. 4.** Влияние исследуемых соединений на уровень ЛПС-индуцированной выработки ИЛ-8: *a* — тестируемые соединения добавляли за 1 ч до обработки клеток ЛПС; *b* — тестируемые соединения добавляли через 1 ч после обработки клеток ЛПС (ЛПС — 10 мкг/мл; ДКМ — 10 мкМ).

По оси ординат: концентрация ИЛ-8 в надосадочной жидкости.

По оси абсцисс: концентрация добавляемых к клеткам испытуемых соединений (теоритина и цетиризина).

**Fig. 4.** Influence of the studied compounds on the level of LPS-induced production of IL-8: *a* — test compounds were added 1 hour before treatment with LPS cells; *b* — test compounds were added 1 hour after treatment with LPS cells (LPS 10 µg/ml; dexamethasone 10 µM).

Y-axis: concentration of IL-8 (pg/ml) in the supernatant.

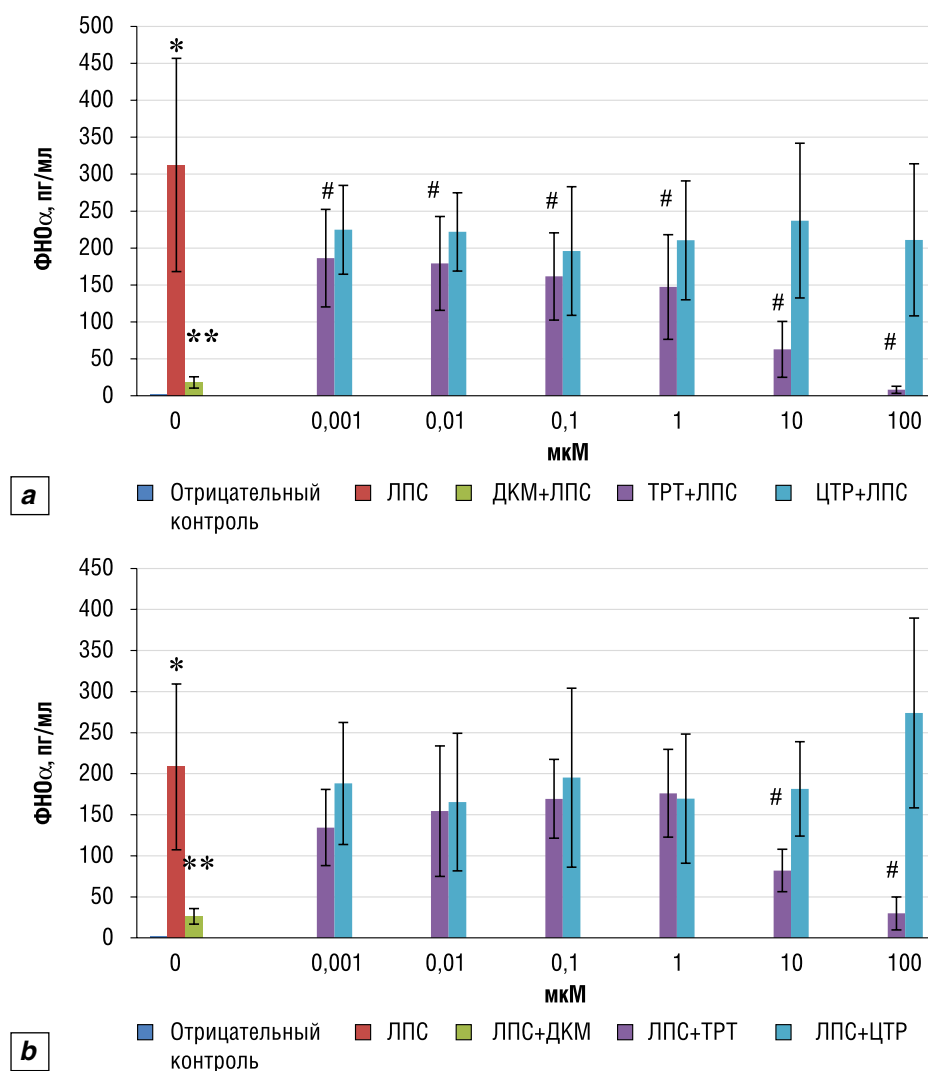
X-axis: concentration of test compounds (theoritin and cetirizine) added to the cells in µM.

Показано, что добавление цетиризина в диапазоне концентраций от 0,001 до 100 мкМ как по профилактической (за 1 ч до внесения индуктора), так и лечебной (через 1 ч после внесения ЛПС) схеме не приводило к существенному снижению уровня провоспалительных цитокинов, секретируемых дифференцированными клетками U937 (см. рис. 3–5). Тенденция к уменьшению образования цитокинов при испытании отдельных концентраций цетиризина не достигала статистической значимости.

Добавление в культуру клеток теоритина приводило к значимому снижению ЛПС-индуцированной продукции провоспалительных цитокинов

ИЛ-6 (см. рис. 3), ИЛ-8 (см. рис. 4) и ФНО $\alpha$  (см. рис. 5). На рис. 5 представлены результаты оценки влияния исследуемых субстанций на уровень ЛПС-индуцированной выработки ФНО $\alpha$ . В концентрации 100 мкМ эффект теоритина был сопоставим с действием глюкокортикоида дексаметазона в концентрации 10 мкМ.

Для каждого цитокина и схемы внесения теоритина с применением четырёхпараметрической аппроксимации графика зависимости процентного соотношения от концентрации теоритина с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, США) была вычислена



**Рис. 5.** Влияние исследуемых соединений на уровень ЛПС-индуцированной выработки ФНО $\alpha$ : *a* — тестируемые соединения добавляли за 1 ч до обработки клеток ЛПС; *b* — тестируемые соединения добавляли через 1 ч после обработки клеток ЛПС (ЛПС — 10 мкг/мл; ДКМ — 10 мкМ).

По оси ординат: концентрация ФНО $\alpha$  в надосадочной жидкости. По оси абсцисс: концентрация добавляемых к клеткам испытуемых соединений (теоритина и цетиризина).

**Fig. 5.** Influence of the studied compounds on the level of LPS-induced TNF $\alpha$  production: *a* — test compounds were added 1 hour before treatment with LPS cells; *b* — test compounds were added 1 hour after treatment with LPS cells (LPS 10  $\mu$ g/ml; dexamethasone 10  $\mu$ M).

Y-axis: TNF $\alpha$  concentration (pg/ml) in the supernatant. X-axis: concentration of test compounds (theoritin and cetirizine) added to the cells in  $\mu$ M.

EC<sub>50</sub> — концентрация на уровне 50% эффективности. EC<sub>50</sub> по совокупности подавления теоритином продукции трёх проанализированных цитокинов находилась в диапазоне от 5,93 до 12,82 мкМ. В отношении ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$  EC<sub>50</sub> составила порядка 12,82; 9,91; 5,93 при профилактической и 9,57; 7,04; 9,42 при лечебной схеме введения препарата.

Уровень ИЛ-6 при обеих схемах внесения снижался практически до исходного при добавлении теоритина в концентрации 100 мкМ.

При использовании профилактической схемы (за 1 ч до индукции секреции провоспалительного ци-

токина ИЛ-8) внесения теоритина в концентрации 100 мкМ уровень ИЛ-8 снижался приблизительно до 25% от исходного и приблизительно до 50% — при лечебной (через 1 ч после внесения ЛПС) (см. рис. 4).

Значимое ингибирование продукции цитокина ФНО $\alpha$  наблюдали при всех использованных концентрациях теоритина, начиная с минимальной (0,001 мкМ), при профилактической схеме внесения. В концентрации 100 мкМ уровень ФНО $\alpha$  снижался практически до нуля (см. рис. 5, *a*). При использовании схемы внесения через 1 ч после добавления к клеткам ЛПС статистически



значимые отличия наблюдались для концентраций 10 и 100 мкМ (см. рис. 5, b).

## Обсуждение

Выбор клеточной линии U937 в качестве объекта изучения действия теоритина на образование и секрецию провоспалительных цитокинов обусловлен несколькими обстоятельствами.

U937 представляет собою промоноцитарную клеточную линию миелоидного лейкоза человека, выделенную из гистиоцитарной лимфомы 37-летнего мужчины [11]. Промоноциты U937 дифференцируются в зрелые моноциты или макрофаги под воздействием ФМА, и эти дифференцированные макрофагальные клетки, способные продуцировать многие провоспалительные цитокины, включая ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8, были использованы для изучения функции мононуклеарных клеток человека при бронхиальной астме [12].

Исследования, выполняемые на этих клетках, имеют особую перспективность, объясняющуюся тем, что клетки U937 экспрессируют рецепторы гистамина (H<sub>1</sub>- и H<sub>2</sub>-типа), и экспрессия сохраняется на дифференцированных макрофагоподобных клетках [9]. Именно поэтому данная модель может оказаться полезной для выяснения роли гистамина — ключевого медиатора аллергии — в стимуляции и контроле продукции провоспалительных цитокинов.

Одним из наиболее активных индукторов образования и секреции провоспалительных цитокинов этими клетками является ЛПС [13], что позволяет оценивать в стандартных условиях действие различных веществ на продукцию провоспалительных цитокинов, опосредующих развитие и поддержание разных форм воспаления, в том числе и аллергического генеза.

В настоящем исследовании теоритин и препарат сравнения цетиризин были испытаны в широких пределах концентраций, не оказывавших цитотоксического действия на дифференцированные в макрофаги клетки U937. Показано, что при использовании профилактической (добавление препарата за 1 ч до стимуляции клеток ЛПС) схемы теоритин вызывал в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ зависимое от дозы угнетение секреции ИЛ-6, причём в концентрации 100 мкМ эффект был сопоставим с подавляющим действием дексаметазона (10 мкМ). Принципиально та же закономерность выявлялась при проведении испытаний по лечебной (добавление препарата через 1 ч после стимуляции клеток ЛПС) схеме.

Вызванное теоритином подавление секреции ИЛ-8 при испытании по профилактической схеме также было зависимым от дозы препарата в пределах концентраций от 1 до 100 мкМ. Действие теоритина в наивысшей использованной концентрации оказы-

валось сопоставимым с торможением высвобождения из клеток ИЛ-8, вызванным дексаметазоном.

При использовании лечебной схемы испытаний теоритин в концентрациях 10 и 100 мкМ угнетал продукцию ИЛ-8, вызванную ЛПС, приблизительно в той же степени, что и дексаметазон (10 мкМ).

Наиболее выраженное подавляющее действие теоритина проявлялось в отношении индуцированной ЛПС продукции ФНО $\alpha$  и было чётко зависимым от дозы препарата. Достоверное торможение образования ФНО $\alpha$  воспроизводилось всеми испытанными концентрациями вплоть до полной блокады индуцированной продукции цитокина в условиях опыта по профилактической схеме. Угнетающий эффект теоритина по отношению к продукции ФНО $\alpha$  воспроизводился и при выполнении лечебной схемы испытаний, но в несколько меньшей степени.

Таким образом, результаты исследования продемонстрировали достоверную и чётко зависимую от дозы теоритина способность тормозить вызванную ЛПС в дифференцированных макрофагоподобных клетках U937 продукцию и секрецию всех исследованных провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$ ), что может подтвердить и объяснить противовоспалительное действие препарата.

Цетиризин, в отличие от теоритина, не проявлял на использованной модели закономерного угнетающего действия на образование и высвобождение клетками провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$ ). Как видно из представленных выше данных, лишь при использовании отдельных концентраций цетиризина была заметна слабо-выраженная тенденция к некоторому угнетению образования и секреции цитокинов. В доступной литературе отсутствуют сведения о действии цетиризина на продукцию провоспалительных цитокинов в клетках U937. Однако исследования, выполненные на других клеточных моделях (культура эпителиальных клеток [6, 14, 15], незрелые дендритные клетки [16], клетки назальных полипов [17], тучные клетки [18]), продемонстрировали, что выраженность действия цетиризина зависит как от использованного клеточного объекта, так и вида стимуляции секреции цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и др.). При этом в ряде случаев не удавалось показать соответствия этого действия зависимости доза-ответ [16, 18], поэтому данные настоящего исследования, не свидетельствующие о существенной ингибирующей способности цетиризина по отношению к секреции цитокинов, могут быть связаны с видом использованных клеток и характером стимулятора. При этом следует обратить внимание на тот факт, что при отсутствии или снижении ингибирующего сигнала цетиризина теоритин проявляет тормозящее действие на секрецию провоспалительных цитокинов.

Выявленное ингибирующее действие теоритина на секрецию медиаторов воспаления может быть связано с наличием в его структуре ксантинового производного — теобромина. Теобромин, как и другие метилксантины, является известным ингибитором фосфодиэстеразы [19, 20], за счёт чего повышает внутриклеточное содержание 3',5'-циклического аденозинмонофосфата, который, как давно было установлено, тормозит секрецию медиаторов аллергического воспаления, в частности гистамина, медленно реагирующей субстанции анафилаксии, эозинофильного хемотаксического фактора анафилаксии [21]. В последующем были получены новые свидетельства противовоспалительного действия теобромина. Так, известно, что теобромин тормозит активность ядерного фермента поли(АДФ-рибоза) полимеразы-1 (PARP-1), активация которого участвует в реализации острых и хронических воспалительных процессов [22]. В культуре человеческих клеток линии 3T3-L1 теобромин тормозит продукцию и секрецию ФНО $\alpha$  и ИЛ-6, измеренных по содержанию мРНК и по белку [23]. Теобромин значительно снижал уровень провоспалительных цитокинов — моноцитарного хемотаксического фактора-1 и ИЛ-1 $\beta$  — в надосадочных жидкостях, полученных от взаимодействующих зрелых адипоцитов (линии SGBS) и макрофагоподобных клеток (линии U937), что было использовано в качестве модели воспалительного процесса *in vitro* [24].

Таким образом, данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что теоритин {7-[4-(4-бензгидрилпиперазинил-1)бутил]-3-метилксантина сукцинат}, проявляющий высокую H<sub>1</sub>-антигистаминную активность [7], обладает свойствами противовоспалительного агента, связанными, скорее всего, с включением в его структуру 3,7-диметилксантина (теобромина). Это, в свою очередь, подтверждает ранее высказанное мнение [3, 7] о возможности получения полифункционального противоаллергического фармакологического средства путём модификации противовоспалительной субстанции (производных ксантина) избирательным антагонистом H<sub>1</sub>-рецепторов (в данном случае бензгидрилпиперазиноалкильным фрагментом).

## Заключение

Итак, приведённый выше материал свидетельствует о том, что помимо противогистаминной активности, не уступающей антигистаминному действию цетиризина и других H<sub>1</sub>-антигистаминных препаратов 2-го поколения, новый противоаллергический препарат теоритин имеет дополнительный противовоспалительный потенциал, обусловленный подавлением продукции и секреции медиаторов воспаления — цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8, что обосновывает и объясняет широкие противоаллергические возможности препарата.

## Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Проведение исследования было финансировано АО «Валента Фармацевтика» в рамках комплекса поисковых научно-исследовательских работ.

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при подготовке рукописи.

**Funding source.** This study was funded by JSC “Valenta Pharmaceuticals” as part of a complex of exploratory research works.

The authors state that there is no funding for the preparation of the manuscript.

**Конфликт интересов.** И.С. Гушин выступал с лекцией на симпозиуме, поддержанном компанией «Валента Фарм». Авторы декларируют отсутствие иных явных или потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Competing interests.** I.S. Gushchin delivered a lecture at a symposium supported by “Valenta Pharm”. The authors have no other and apparent conflicts of interests to disclose in relation to this article.

**Вклад авторов.** К.Л. Крышень, А.Б. Бондаренко — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала; К.Л. Крышень, А.Б. Бондаренко, И.С. Гушин — анализ полученных данных; написание текста: И.С. Гушин — разделы «Обоснование», «Обсуждение», «Заключение»; К.Л. Крышень и А.Б. Бондаренко — разделы «Материал и методы», «Результаты»; И.С. Гушин — редактирование. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

**Authors' contribution.** K.L. Kryshen, A.B. Bondarenko — the concept and design of the study, collection and processing of material; K.L. Kryshen, A.B. Bondarenko, I.S. Gushchin — analysis of the obtained data; I.S. Gushchin, K.L. Kryshen, A.B. Bondarenko — text writing; I.S. Gushchin — editing. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gushchin I.S., Orlov S.M., Czju N.L. On the triggering mechanism of anaphylactic reactions in rat mast cells // *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1974. Vol. 2, N 2. P. 69–76.
2. Gushchin I.S., Uvnäs B. In vitro uptake of 5-hydroxytryptamine and dopamine by rat mast cells after exocytosis induced by antigen or compound 48/80 // *Acta Physiol Scand*. 1976. Vol. 98, N 2. P. 168–174. doi: 10.1111/j.1748-1716.1976.tb00236.x

3. Гущин И.С., Зебрев А.И., Читаева В.Г. и др. Полифункциональные антиаллергические соединения, сочетающие антигистаминную активность со стабилизацией тучных клеток и базофилов // Химико-фармацевтический журнал. 1987. Т. 21, № 11. С. 1313–1318.
4. Mashkovsky M.D., Yakhontov L.N., Kaminka M.E., Mikhлина E.E. Further developments in research on the chemistry and pharmacology of synthetic quinuclidine derivatives // *Prog Drug Res*. 1983. Vol. 27. P. 9–61. doi: 10.1007/978-3-0348-7115-0\_1
5. Leurs R., Church M.K., Tagliatalata M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects // *Clin Exp Allergy*. 2002. Vol. 32, N 4. P. 489–498. doi: 10.1046/j.0954-7894.2002.01314.x
6. Cheng KC, Hsu JY, Fu LS, et al. Influence of cetirizine and loratadine on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-8 release in A549 human airway epithelial cells stimulated with interleukin-1beta // *J Microbiol Immunol Infect*. 2006. Vol. 39, N 3. P. 206–211.
7. Глушков Р.Г., Южаков С.Д., Алексеев М.В. и др. Новая группа производных 1- и 7-[ω-(бензгидрил-1) алкил]-3-метилксантинов, обладающих противогистаминной активностью // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45, № 1. С. 3–13.
8. Глушков Р.Г., Южаков С.Д. Опыт создания новых лекарственных средств с использованием традиционных технологий // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45, № 9. С. 3–7.
9. Nebreda A.D., Zappia C.D., González A.R., et al. Involvement of histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptor inverse agonists in receptor's crossregulation // *Eur J Pharmacol*. 2019. Vol. 847. P. 42–52. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.01.026
10. Plumb J.A. Cell sensitivity assays: the MTT assay // *Methods Mol Med*. 2004. Vol. 88. P. 165–169. doi: 10.1385/1-59259-406-9:165
11. Sundström C., Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937) // *Int J Cancer*. 1976. Vol. 17, N 5. P. 565–577. doi: 10.1002/ijc.2910170504
12. Garrelds I.M., van Hal P.T., Haakmat R.C., et al. Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators Inflamm* // 1999. Vol. 8, N 4-5. P. 229–235. doi: 10.1080/09629359990397
13. Haque M.A., Jantan I., Harikrishnan H. Zerumbone suppresses the activation of inflammatory mediators in LPS-stimulated U937 macrophages through MyD88-dependent NF-κB/MAPK/PI3K-Akt signaling pathways // *Int Immunopharmacol*. 2018. Vol. 55. P. 312–322. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.001
14. Shih M.Y., Hsu J.Y., Weng Y.S., Fu L.S. Influence of cetirizine and levocetirizine on two cytokines secretion in human airway epithelial cells // *Allergy Asthma Proc*. 2008. Vol. 29, N 5. P. 480–485. doi: 10.2500/aap.2008.29.3156
15. Arnold R., Rihoux J., König W. Cetirizine counter-regulates interleukin-8 release from human epithelial cells (A549) // *Clin Exp Allergy*. 1999. Vol. 29, N 12. P. 1681–1691. doi: 10.1046/j.1365-2222.1999.00630.x
16. Ohtani T., Aiba S., Mizuashi M., et al. Evaluation of the efficacy of antihistamines using human monocyte-derived dendritic cells stimulated with histamine // *J Am Acad Dermatol*. 2003. Vol. 49, N 2. P. 234–242. doi: 10.1067/s0190-9622(03)01478-6
17. Küsters S., Schuligoi R., Hüttenbrink K.B., et al. Effects of antihistamines on leukotriene and cytokine release from dispersed nasal polyp cells // *Arzneimittelforschung*. 2002. Vol. 52, N 2. P. 97–102. doi: 10.1055/s-0031-1299863
18. Lippert U., Möller A., Welker P., et al. Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1- and H2-receptor antagonists // *Exp Dermatol*. 2000. Vol. 9, N 2. P. 118–124. doi: 10.1034/j.1600-0625.2000.009002118.x
19. Bender A.T., Beavo J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use // *Pharmacol Rev*. 2006. Vol. 58, N 3. P. 488–520. doi: 10.1124/pr.58.3.5
20. Yoneda M., Sugimoto N., Katakura M., et al. Theobromine up-regulates cerebral brain-derived neurotrophic factor and facilitates motor learning in mice // *J Nutr Biochem*. 2017. Vol. 39. P. 110–116. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.002
21. Kaliner M. Symposium on allergic lung disease. IV. Immunologic mechanisms for release of chemical mediators of anaphylaxis from human lung tissue // *Can Med Assoc J*. 1974. Vol. 110, N 4. P. 431 passim.
22. Geraets L., Moonen H.J., Wouters E.F., et al. Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations // *Biochem Pharmacol*. 2006. Vol. 72, N 7. P. 902–910. doi: 10.1016/j.bcp.2006.06.023
23. Jang Y.J., Koo H.J., Sohn E.H., et al. Theobromine inhibits differentiation of 3T3-L1 cells during the early stage of adipogenesis via AMPK and MAPK signaling pathways // *Food Funct*. 2015. Vol. 6, N 7. P. 2365–2374. doi: 10.1039/c5fo00397k
24. Fuggetta M.P., Zonfrillo M., Villivà C., et al. Inflammatory microenvironment and adipogenic differentiation in obesity: the inhibitory effect of theobromine in a model of human obesity in vitro // *Mediators Inflamm*. 2019. N 2019. P. 1515621. doi: 10.1155/2019/1515621

## REFERENCES

1. Gushchin IS, Orlov SM, Czju NL. On the triggering mechanism of anaphylactic reactions in rat mast cells. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1974;2(2):69–76.
2. Gushchin IS, Uvnäs B. In vitro uptake of 5-hydroxytryptamine and dopamine by rat mast cells after exocytosis induced by antigen or compound 48/80. *Acta Physiol Scand*. 1976;98(2):168–174. doi: 10.1111/j.1748-1716.1976.tb00236.x
3. Gushchin IS, Zebrev AI, Chitaeva VG, et al. Polyfunctional antiallergic compounds combining antihistamine activity with stabilization of mast cells and basophils. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1987;21(11):1313–1318. (In Russ).
4. Mashkovsky MD, Yakhontov LN, Kaminka ME, Mikhлина EE. Further developments in research on the chemistry and pharmacology of synthetic quinuclidine derivatives. *Prog Drug Res*. 1983;27:9–61. doi: 10.1007/978-3-0348-7115-0\_1
5. Leurs R, Church MK, Tagliatalata M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(4):489–498. doi: 10.1046/j.0954-7894.2002.01314.x
6. Cheng KC, Hsu JY, Fu LS, et al. Influence of cetirizine and loratadine on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-8 release in A549 human airway epi-

- thelial cells stimulated with interleukin-1beta. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006;39(3):206–211.
7. Glushkov RG, Yuzhakov SD, Alekseev MV, et al. New group of 1- and 7-[ $\omega$ -(benzhydryl) alkyl]-3-methylxanthine derivatives possessing antihistaminic properties. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2011;45(1):3–13. (In Russ).
  8. Glushkov RG, Yuzhakov SD. Experience in creating new drugs using traditional technologies. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2011;45(9):3–7. (In Russ).
  9. Nebreda AD, Zappia CD, González AR, et al. Involvement of histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> receptor inverse agonists in receptor's crossregulation. *Eur J Pharmacol.* 2019;847:42–52. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.01.026
  10. Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Med.* 2004;88:165–169. doi: 10.1385/1-59259-406-9:165
  11. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976;17(5):565–577. doi: 10.1002/ijc.2910170504
  12. Garrelts IM, van Hal PT, Haakmat RC, et al. Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators Inflamm.* 1999;8(4-5):229–235. doi: 10.1080/09629359990397
  13. Haque MA, Jantan I, Harikrishnan H. Zerumbone suppresses the activation of inflammatory mediators in LPS-stimulated U937 macrophages through MyD88-dependent NF- $\kappa$ B/MAPK/PI3K-Akt signaling pathways. *Int Immunopharmacol.* 2018;55:312–322. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.001
  14. Shih MY, Hsu JY, Weng YS, Fu LS. Influence of cetirizine and levocetirizine on two cytokines secretion in human airway epithelial cells. *Allergy Asthma Proc.* 2008;29(5):480–485. doi: 10.2500/aap.2008.29.3156
  15. Arnold R, Rihoux J, König W. Cetirizine counter-regulates interleukin-8 release from human epithelial cells (A549). *Clin Exp Allergy.* 1999;29(12):1681–1691. doi: 10.1046/j.1365-2222.1999.00630.x
  16. Ohtani T, Aiba S, Mizuashi M, et al. Evaluation of the efficacy of antihistamines using human monocyte-derived dendritic cells stimulated with histamine. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49(2):234–242. doi: 10.1067/s0190-9622(03)01478-6
  17. Küsters S, Schuligoi R, Hüttenbrink KB, et al. Effects of antihistamines on leukotriene and cytokine release from dispersed nasal polyp cells. *Arzneimittelforschung.* 2002;52(2):97–102. doi: 10.1055/s-0031-1299863
  18. Lippert U, Möller A, Welker P, et al. Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1- and H2-receptor antagonists. *Exp Dermatol.* 2000;9(2):118–124. doi: 10.1034/j.1600-0625.2000.009002118.x
  19. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):488–520. doi: 10.1124/pr.58.3.5
  20. Yoneda M, Sugimoto N, Katakura M, et al. Theobromine up-regulates cerebral brain-derived neurotrophic factor and facilitates motor learning in mice. *J Nutr Biochem.* 2017;39:110–116. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.002
  21. Kaliner M. Symposium on allergic lung disease. IV. Immunologic mechanisms for release of chemical mediators of anaphylaxis from human lung tissue. *Can Med Assoc J.* 1974;110(4):431.
  22. Geraets L, Moonen HJ, Wouters EF, et al. Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1 at physiological concentrations. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(7):902–910. doi: 10.1016/j.bcp.2006.06.023
  23. Jang YJ, Koo HJ, Sohn EH, et al. Theobromine inhibits differentiation of 3T3-L1 cells during the early stage of adipogenesis via AMPK and MAPK signaling pathways. *Food Funct.* 2015;6(7):2365–2374. doi: 10.1039/c5fo00397k
  24. Fuggetta MP, Zonfrillo M, Villivà C, et al. Inflammatory microenvironment and adipogenic differentiation in obesity: the inhibitory effect of theobromine in a model of human obesity in vitro. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:1515621. doi: 10.1155/2019/1515621

**ОБ АВТОРАХ**

Автор, ответственный за переписку:

**Гущин Игорь Сергеевич**, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; адрес: Россия, 15522, Москва, Каширское шоссе, д. 24; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4465-6509>; eLibrary SPIN: 1905-4758; e-mail: [igushchin@yandex.ru](mailto:igushchin@yandex.ru)

Соавторы:

**Крышень Кирилл Леонидович**, к.б.н.; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1451-7716>; eLibrary SPIN: 5650-2840; e-mail: [info@doclinika.ru](mailto:info@doclinika.ru)

**Бондаренко Андрей Борисович**;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8437-1313>; eLibrary SPIN: 3376-6819; e-mail: [info@doclinika.ru](mailto:info@doclinika.ru)

**AUTHORS' INFO**

Corresponding author:

**Igor S. Gushchin**, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding member of Russian Academy of Sciences; address: 24, Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russia; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4465-6509>; eLibrary SPIN: 1905-4758; e-mail: [igushchin@yandex.ru](mailto:igushchin@yandex.ru)

Co-authors:

**Kirill L. Kryshen**, Cand. Sci. (Biol.); ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1451-7716>; eLibrary SPIN: 5650-2840; e-mail: [info@doclinika.ru](mailto:info@doclinika.ru)

**Andrei B. Bondarenko**;

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8437-1313>; eLibrary SPIN: 3376-6819; e-mail: [info@doclinika.ru](mailto:info@doclinika.ru)