

УДК 616.153.915-074:616.12-005.4+616.379-008.64

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТЕСТИРОВАНИЯ
IN VITRO ПРО-/АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ
ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХОБЛ**

¹Панасенкова Ю.С., ¹Павлюченко И.И., ¹Ременякина Е.И.,
¹Охременко О.С., ²Макарова М.О.

¹ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет
Минздрава России», Краснодар;

²Балтийский федеральный университет имени Канта, Калининград, e-mail: vochka@rambler.ru

В статье изложены данные о возможных про- и антиоксидантных свойствах препаратов, используемых в пульмонологической практике в комплексной терапии ХОБЛ: АЦЦ, лазолван, гепарин, клексан в тест-системах *in vitro* и *ex vivo*. В настоящем исследовании антиоксидантной активности фармпрепаратов была использована люминол-зависимая H₂O₂-индуцированная хемиллюминесценция (ХЛ), которая проводилась на хемиллюминотестере ЛТ-1 производства НПО «Люмин» (г. Ростов-на-Дону) по авторской методике [7]. При исследовании антирадикальной и антиоксидантной активности фармпрепаратов проводилось определение следующих показателей ХЛ: максимума быстрой вспышки ХЛ (МВХЛ) в сравнении с эталоном ($h_{\text{хем}}$, %) и площади быстрой вспышки ХЛ (ПВХЛ) за 25 секунд в сравнении с эталоном ($S_{25\text{хем}}$, %). Одновременно с ХЛ использовался амперометрический метод определения общей антиоксидантной активности (АОА), заключающийся в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале и сравнении полученного сигнала, регистрируемого при помощи аппарата Яуза-ААА-01, с калибровочным стандартом, например, аскорбиновой кислотой, измеренного в тех же условиях [11]. На основании полученных результатов, с учетом данных литературы и стандартов лечения ХОБЛ можно сделать следующее заключение: при необходимости смены антикоагулянтов в терапии больных с ХОБЛ (переходе с гепарина на клексан) не требуется назначения дополнительных антиоксидантных средств в случае одновременного применения у них в качестве отхаркивающего средства АЦЦ, в то же время при использовании у них в качестве отхаркивающей терапии лазолвана целесообразно дополнительное применение в их комплексной терапии АО прямого действия. Длительное использование в качестве отхаркивающего средства лазолвана способно понижать антиокислительную емкость плазмы крови, поэтому целесообразна его периодическая замена с учетом клинической картины заболевания.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, перекисное окисление липидов, люминол-зависимая H₂O₂-индуцированная хемиллюминесценция, антиокислительный потенциал, ХОБЛ, лазолван, гепарин, АЦЦ

**THEORETICAL AND PRACTICAL PRO-/ANTIOXIDANT IMPORTANCE
IN VITRO TESTING OF SOME PROPERTIES OF DRUGS USED
IN THE TREATMENT OF COPD**

¹Panasenkova Y.S., ¹Pavluchenko I.I., ¹Remenyakina E.I.,
¹Ohremenko O.S., ²Makarova M.O.

¹Kuban State Medical University, Krasnodar;

²Baltic Federal University of Kant, Kaliningrad, e-mail: vochka@rambler.ru

The article presents data on the possible pro-and antioxidant properties of the drugs used in pulmonology practice in the treatment of COPD: ACC, Mucosolvan, heparin, Clexane in test systems *in vitro* and *ex vivo*. In this study, the antioxidant activity of pharmaceuticals was used luminol-dependent H₂O₂-induced chemiluminescence (CL), which was held on hemilyuminotestere LT-1 of the NGO «Lumina» (Rostov-on-Don), the authors' methodology [7]. In the study of the antiradical and antioxidant activity of pharmaceuticals we measured the following indicators CL: quick flash of maximum CL (MVHL) compared with the standard (h_{hem}%) and area quick flash CL (PVHL) for 25 seconds compared to the standard (S_{25hem}%). Along with the CL used amperometric method for the determination of antioxidant activity (AOA), which consists in measuring the electric current arising in the oxidation of the substance (or mixture of substances) on the surface of the working electrode at a certain capacity and then comparing the signal detected by the device Jauza-AAA-01 with a calibration standard, such as ascorbic acid, measured under the same conditions [11]. Based on these results, the literature data and standard medical management can make the following conclusion: the need to change the anticoagulant therapy in patients with COPD (switching from heparin to Clexane) does not require the appointment of additional antioxidants in the case of simultaneous use them as an expectorant ACC, at the same time using them as extraordinary Mucosolvan appropriate additional therapy used in the treatment of the direct action of antioxidants. Long-term use as an expectorant Mucosolvan can lower antioxidant capacity of blood plasma, so it is suitable periodic replacement with the clinical picture of the disease.

Keywords: antioxidant activity, lipid peroxidation, luminol-dependent H₂O₂-induced chemiluminescence, antioxidant capacity, COPD, Mucosolvan, heparin, ACC

Термин «антиоксиданты», еще не так давно известный лишь сравнительно узкому кругу специалистов в области органической химии и химических технологий, в последнее время имеет непререкаемую популярность во всем мире. С антиоксидантами (АО) связывают надежды на укрепление здоровья, сохранение фигуры,

цвета и эластичности кожи, подвижности суставов, прочности сердечной мышцы, на избавление от многих болезней и даже на продление жизни. В настоящее время нашли широкое распространение, в том числе и благодаря активной рекламе, как природные, так и синтетические АО различной химической природы, которые можно подразделить на АО косвенного (опосредованного) действия и АО прямого (направленного) действия.

АО косвенного действия способны снижать интенсивность свободнорадикального окисления (СРО) только в биологических объектах (от клеточных органелл до целого организма), так как механизм их действия связан с влиянием на метаболические процессы, обеспечивающие баланс в системе про-/антиоксиданты в условиях целостного организма, в связи с чем их антиоксидантные свойства *in vitro* не могут реализовываться, так как разрываются метаболические пути. Механизмы их антиоксидантного действия *in vivo* различны: активация (реактивация) антиоксидантных ферментов; подавление в организме реакций, приводящих к образованию активных форм кислорода (АФК); сдвиг реакций СРО в сторону образования менее реакционноспособных соединений; селективная индукция генов, кодирующих белки антиоксидантной системы (АОС) и репарации повреждений; нормализация обмена веществ и т.д. Нормализация тех или иных обменных процессов в организме способствует поддержанию гомеостаза, в условиях которого скорость протекания реакций СРО поддерживается на физиологическом уровне. Таким образом, любое вещество, нормализующее метаболические процессы в организме, способно на уровне организма проявить «антиоксидантный» эффект [1].

АО прямого действия оказывают непосредственное антирадикальное действие, которое можно проследить *in vitro*, используя специальные тест-системы. Большую часть используемых лекарственных препаратов с антиоксидантным действием составляют вещества прямого действия. В медицинской и фармацевтической практике наиболее перспективными являются разработка и использование средств с направленной и установленной в определенных единицах АОА. Первичный скрининг антиоксидантных средств можно эффективно проводить *in vitro* с использованием относительно простых тест-систем, которые разработаны и широко используются в лабораторной практике [2, 3, 4, 5]. Этот подход оправдан тем, что эффектив-

ность АО прямого действия мало зависит от функционального состояния метаболических систем организма. Использование тест-систем позволяет изучать АОА различных фармпрепаратов и БАД в связи с невозможностью в большинстве случаев, достоверного мониторинга их антиоксидантных свойств в биологических средах *in vivo*.

Особенности антиоксидантного действия веществ определяются в первую очередь их химической природой, что необходимо учитывать при разработке новых эффективных антиоксидантных препаратов и БАД. Общепринятой классификации АО прямого действия до настоящего времени не разработано, хотя существует несколько методических подходов, используемых для решения этой задачи. Один из таких подходов основывается на классификации АО по их растворимости в водной и липидной фазе, что позволяет выделить две группы АО: гидрофильные (например, аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, цистеин и др.), липофильные (например, токоферолы, ретинол и др.), амфифильные (убихинол, липоевая кислота, тиронины, серосодержащие и циклические аминокислоты и др.) [6]. Эта классификация позволяет оценить, в каких (липидных или водных) компартментах организма преимущественно будет концентрироваться и соответственно эффективно действовать то или иное вещество и на какие субстраты СРО они могут воздействовать. Однако эта классификация не позволяет группировать АО по механизму их действия.

Другим методическим подходом при разработке классификации АО является деление по направленности их действия на конкретные вещества прооксидантной природы (АФК, нерадикальные инициаторы СРО, радикалы – промежуточные продукты СРО и т.д.). Эта классификация, по мнению автора [1], не всегда пригодна для использования в целях поиска новых антиоксидантных веществ, поскольку не учитывает химической структуры соединений и, следовательно, при скрининге АО с определенным химическим строением не позволяет аргументированно предсказывать наличие у них антиоксидантных свойств и прогнозировать их эффективность.

Учет связи между химической структурой и мишенями действия АО является, на наш взгляд, необходимой предпосылкой для целенаправленного поиска новых АО с определенными мишенями действия и заранее заданными свойствами для наиболее эффективного лечения конкретных заболеваний, ключевую роль в развитии

которых играют те или иные звенья СРО. При этом очень важными являются данные по сравнительному исследованию АОА не только АО направленного действия, но и медикаментозных средств, которые могут тем или иным образом сдвигать баланс в системе про-/антиоксиданты при их использовании в клинической практике при заболеваниях, которые предопределяют наличие оксидативного напряжения или окислительного стресса в организме пациента (заболевания дыхательной, сердечно-сосудистой, эндокринной и иммунной систем и др. «свободно-радикальные» патологии).

Наиболее оправданными для изучения АО *in vitro* являются биофизические методики с индукцией свободнорадикальных процессов и хемилюминесцентной регистрацией или фотометрическим определением промежуточных и/или конечных продуктов реакции в тест-системе, содержащей тестируемое вещество.

Целью настоящего исследования явилось изучение про-/антиоксидантных свойств лекарственных препаратов, используемых в пульмонологической практике в комплексной терапии ХОБЛ: АЦЦ, лазолван, гепарин, клексан в тест системах *in vitro* и *ex vivo*.

Материалы и методы исследования

В настоящем исследовании для решения поставленной цели использовалась люминол-зависимая H_2O_2 -индуцированная хемилюминесценция (ХЛ) которая проводилась на хемилюминотестере ЛТ-1 производства НПО «Люмин» (г. Ростов-на-Дону) по авторской методике [7]. Изучение динамики процесса ХЛ [10] производилось с помощью аппаратно-программного комплекса [7] с программным обеспечением [7], позволяющим оцифровывать аналоговый сигнал с выхода хемилюминотестера ЛТ-1. Данный способ позволяет проводить определение максимальной амплитуды вспышки ХЛ (МВХЛ), площади затухания вспышки ХЛ (ПВХЛ). В качестве эталона используется реакционная смесь без биологического образца, содержащая активатор СРО – люминол. Антиоксидантные или прооксидантные свойства исследуемых растворов определяются как процент ингибирования или активации индуцированных реакций СРО с участием люминола. При этом МВХЛ отражает наличие прямых антиоксидантных веществ в исследуемом образце, а ПВХЛ указывает на общий антиоксидантный потенциал системы.

Определение модулирующего влияния на антиоксидантный потенциал биологических жидкостей исследуемых лекарственных средств производили в тест-системах с кровью *ex vivo* после инкубации растворов тестируемых препаратов с кровью или плазмой крови пациентов, страдающих ХОБЛ. После инкубации с плазмой определенного фармпрепарата или комбинации фармпрепаратов определялись вышеописанные показатели ХЛ системы.

Исследование влияния тестируемых фармпрепаратов на индуцированные процессы СРО проводили в авторских тест-системах, оценивая их антиперекисный потенциал на основании степени ингибирования процессов перекисного окисления, предварительно индуцированных путем внесения в тест-систему Fe^{2+} и перекиси водорода [4]. Антиокислительную активность выражали в убихиноновых единицах, т.е. относительно показателей убихинона в аналогичных условиях ($Q-EД = 13 \cdot 10^{-5}$ мг/мл vitQ).

Одновременно с ХЛ анализом использовался амперометрический метод определения АОА, заключающийся в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале и сравнении полученного сигнала, регистрируемого при помощи аппарата Яуза-ААА-01, с калибровочным стандартом, например, аскорбиновой кислотой, измеренного в тех же условиях [11].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований получены данные, которые свидетельствуют о том, что антиоксидантные свойства присущи только конкретным веществам с определенной химической структурой, в частности, содержащий аминокислоту цистеин со свободной SH-группой. Лазолван практически не проявляет *in vitro* своих антиоксидантных свойств – не снижает МВХЛ и лишь незначительно способен уменьшать ПВХЛ (на 37,5%), в то время как АЦЦ содержащие препараты *in vitro* практически полностью гасит МВХЛ и ПВХЛ. При комбинировании *in vitro* лазолвана и клексана их антиоксидантные свойства в комплексе снижаются (процент ингибирования ПВХЛ – 23,5%, МВХЛ не ингибируется), в то время как гепарин практически не влияет на эффекты лазолвана или несколько повышает ингибирующую способность в отношении СРО (процент ингибирования ПВХЛ – 47,8%). При комбинировании *in vitro* АЦЦ с гепарином и клексаном их антиоксидантные свойства практически не уменьшаются (процент ингибирования МВХЛ $\approx 98\%$ и ПВХЛ до 100%).

При инкубации с кровью лазолван способен в некоторой степени активировать процессы СРО, которые усиливаются при его комбинировании с клексаном и в большей степени с гепарином, особенно в отношении МВХЛ (процент активации – от 93 до 163%). При инкубации с кровью АЦЦ сохраняет свои антиоксидантные свойства, при этом он способен нивелировать прооксидантные эффекты как гепарина, так и клексана практически в равной степени для МВХЛ и ПВХЛ (процент ингибирования – от 48 до 34,8%).

При анализе амперометрических данных получены аналогичные результаты по выраженности антиоксидантного эффекта, прежде всего у АЦЦ-содержащих препаратов. Общая АОА у АЦЦ составила в аскорбиновых единицах 11,8 мг/л вит С; у лазолвана – 5,5 мг/л вит С.

В модельных тест-системах с кровью лазолван практически не проявляет своих антиоксидантных свойств, в то время как АЦЦ превосходит лазолван по антиокислительному потенциалу более чем в 2 раза (на 113,6%), при этом АЦЦ способен как самостоятельно повышать после инкубации с кровью антиокислительную емкость плазмы, так и в комбинации с гепарином (на 15,7%).

При введении АЦЦ в модельные тест-системы с водно-спиртово-масляной смесью, в которой индуцированы внешними инициаторами (H_2O_2/Fe^{3+} и УФО/ Fe^{2+}) СРО процессы перекисного окисления липидов (прежде всего фосфолипидов и непредельных жирных кислот, содержащихся в растительном масле) отмечается существенный эффект торможения перекисного окисления, соответствующий 2,69 убихиноновым единицам при инициации СРО химическими факторами и 6,22 убихиноновым единицам при инициации СРО химическими и физическими факторами.

Выводы

На основании полученных результатов, с учетом данных литературы и стандартов лечения ХОБЛ можно сделать следующее заключение:

1. Препараты, содержащие цистеин, используемые при лечении ХОБЛ, проявляют свой прямой и модулирующий антиоксидантные эффекты, которые характеризуются повышением антиоксидантного потенциала крови и практически полным ингибированием процессов СРО в модельных тест-системах, что показано в экспериментах *in vitro*.

2. При необходимости смены антикоагулянтов в терапии больных с ХОБЛ (при переходе с гепарина на клексан) не требуется назначения дополнительных антиоксидантных средств в случае одновременного применения у них в качестве отхаркивающего средства АЦЦ, в то же время при использовании у них в качестве отхаркивающей терапии лазолвана целесообразно дополнительное применение в их комплексной терапии АО прямого действия, так как лазолван либо не проявляет антиоксидантных эффектов, либо может даже несколько инициировать процессы СРО на фоне антикоагулянтов.

3. Длительное использование в качестве отхаркивающего средства лазолвана способно понижать антиокислительную емкость плазмы крови, поэтому целесообразна его периодическая замена с учетом клинической картины заболевания (через 1–2 месяца) на АЦЦ, особенно у пациентов, получающих в качестве антикоагулянтов низкомолекулярные гепарины, в частности, клексан.

Список литературы

1. Басов А.А. Современные способы стандартизации антиоксидантных лекарственных средств и биологически активных добавок / А.А. Басов, С.Р. Федосов, И.С. Канус [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 4, приложение № 1. – С. 149.
2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и АО // Вестник РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43–51.
3. Зайцев В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антидотов прямого действия / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И. Закревский // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66, № 4. – С. 66–70.
4. Котеров А.Н. Ингибирование металлотионеином Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов в липопротеинах яичного желтка // Биохимия. – 1997. – Т.62, Вып. 2. – С. 164–166.
5. Козлова З.Г., Цепалов В.Ф. Количественная оценка АО в биологически активных добавках с помощью модельной реакции иницированного окисления кумола // Свободные радикалы, АО и болезни человека: материалы конференции – Смоленск, 2001. – С. 9–10.
6. Павлюченко И.И. Способ диагностики антиокислительной активности лечебных и профилактических антиоксидантных средств / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, С.Р. Федосов: патент на изобретение № 2182706; заявление 15.01.2001; опубликовано 20.05.2002, Бюллетень № 14.
7. Павлюченко И.И. Окислительный стресс, его мониторинг и критерии оценки антиокислительной активности лекарственных препаратов и БАД: автореф. дис.... д-ра мед. наук. – Ростов-на-Дону, 2005. – 44 с.
8. Павлюченко И.И. Система лабораторной диагностики окислительного стресса / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, С.Р. Федосов: патент на полезную модель № 54787; заявление 19.01.2006; опубликовано. 27.07.2006, Бюллетень № 21.
9. Павлюченко И.И. Программа регистрации сигналов хемиллюминотестера ЛТ-1 / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, С.Р. Федосов: свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2006611562; заявление № 2006610783 от 16.03.2006.
10. Тихазе А.К., Ланкин В.З., Жарова Е.А., Колычева С.В. Триметазидин как антиоксидант непрямого действия // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 10. – С. 395–398.
11. Федосов С.Р. Способ повышения информативности прибора «Хемиллюминотестер ЛТ-1» / С.Р. Федосов, И.И. Павлюченко, А.А. Басов // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 4, приложение. № 1. – С. 27–28.

References

1. Basov A.A. Modern methods of standardization antioxidant drugs and biologically active additives A.A. Basov, S.R. Fedosov, I.S. Kanus [etc.] // Modern problems of science and education. 2006. № 4, the application number 1. pp. 149.
2. Vladimirov Yu. Free radicals and AO // Journal of Medical Sciences. 1998. № 7. pp. 43–51

3. Zaitsev V.G. The relationship between chemical structure and the target of the action as the basis for the classification of antidotes direct / V.G. Zaitsev, O.S. Ostrovsky, V.I. Zakrevskii // *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2003. Vol. 66, № 4. pp. 66–70.

4. Koterov A.N. Inhibition metallotioneinom Fe²⁺ + -induced lipid peroxidation in egg yolk lipoproteins // *Biochemistry*. 1997. Vol. 62, Issue 2. pp. 164–166.

5. Kozlov Z.G., Tsepalov V.F. Quantitative evaluation of AO in dietary supplements using a model reaction initiated oxidation of cumene // *Free radicals, AO and human disease: conference materials Smolensk*, 2001. pp. 9–10.

6. Pavlyuchenko I.I. The diagnostic method of antioxidant activity of antioxidant treatment and prevention tools / I.I. Pavlyuchenko, A.A. Basov, S.R. Fedosov: invention patent number 2182706, application 15.01.2001, published on 20.05.2002, the Bulletin number 14.

7. Pavlyuchenko I.I. Oxidative stress, monitoring, and evaluation criteria antioxidant activity of drugs and dietary supplements: the dissertation author's Doctor of Medicine. Rostov-on-Don, 2005. pp. 44.

8. II Pavlyuchenko The system of laboratory diagnosis of oxidative stress / II Pavlyuchenko, AA Basov, SR Fedosov: utility patent number 54787; statement 19.01.2006; published 2006, Bulletin n. 21.

9. Pavlyuchenko I.I. The registration program signals hemilyuminotestera LT-1 / I.I. Pavlyuchenko, A.A. Basov,

S.R. Fedosov: a certificate of official registration of the computer number 2006611562, application number 2006610783 from 16.03.2006.

10. Tihaze A.K., Lankin V.Z., Zharov E.A., Kolycheva S.V. Trimetazidine as an indirect antioxidant activity // *Бюл. экспериментальной biology and medicine*. 2000. Т. 130, no. 10. pp. 395–398.

11. Fedosov S.R. Way to improve the information content of the device «Hemilyuminotester LT-1» / S.R. Fedosov, I.I. Pavlyuchenko, A.A. Bass // *Modern problems of science and education*. 2006. № 4, annex. Number 1. pp. 27–28.

Рецензенты:

Колесникова Н.В., д.б.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики, ФПК ППС ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Краснодар;

Абушкевич В.Г., д.м.н, профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 19.12.2013.