

СПОСОБЫ ТЕСТИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ И АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ФАРМПРЕПАРАТОВ И БИОДОБАВОК IN VITRO

¹Ременякина Е.И., ¹Панасенкова Ю.С., ¹Павлюченко И.И., ¹Басов А.А.

¹ ГБОУ ВПО "Кубанский Государственный медицинский университет" Минздрава России", г.Краснодар. Россия (350063, Краснодар, ул. Седина,4), e-mail: vochka@rambler.ru

Проведен анализ антиоксидантной активности "Гепарина", "Клексана", "Эутирокса", "Тирозола", "Йодомарина", "Берлитиона", "Глутатион Формулы", исследование проводилось в различных дозировках для оценки выраженности их возможного дозозависимого эффекта. Для этих целей таблетированные препараты разводились до известной концентрации в дистиллированной воде. Инъекционные препараты брались в соизмеримых дозировках, относительно их разовой дозы при использовании в практике. Антирадикальную активность препаратов оценивали по степени ингибирования люминол-зависимой H₂O₂-индуцированной хемилюминесценции на основе модифицированной методики [Басов А.А., и соавт., 2006; Павлюченко И.И., Басов А.А., Федосов С.Р., 2006]. Полученные результаты выражали в виде площади хемилюминесценции (ПХЛ) и максимума вспышки (МВХЛ) хемилюминесценции (в % к контролю, которым являлся забуференный рабочий раствор с люминолом). Изучение антиокислительного потенциала препаратов проводили с помощью амперометрического метода на основе модифицированной методики Яшина А.Я. [Басов А.А. и соавт. 2006]. Полученные результаты находили по калибровочному графику и выражали в стандартных единицах, (мг/л аскорбиновой кислоты). Проведенными исследованиями установлено, что антиокислительная емкость у препаратов составила: Гепарин = 0,935 мг/л vit C, Клексан = 0,744 мг/л vit C, Тирозол = 0,897 мг/л vit C, Эутрокс = 0,697 мг/л vit C, Йодомарин = 1,922 мг/л vit C, что значительно уступает антиокислительной емкости тиолсодержащих препаратов: Глутатион формулы (7,681 мг/л vit) и Берлитиона (22,846 мг/л vit). При изучении дозозависимых эффектов установили, что Тирозол и Йодомарин не обладали достоверной дозозависимой способностью влиять на показатели антиокислительной емкости тест-систем in vitro, в то время как у Эутирокса отмечен дозозависимый эффект. Наиболее существенная способность повышать антиокислительную емкость в зависимости от дозировки установлена для Эутирокса в концентрациях 0,167-1,002 мг/мл (прирост составил +130,7%), что может указывать на наличие легко диссоциирующих групп, способных выступать в роли доноров восстановительных эквивалентов. При изучении антирадикальной активности установлено, что показатели Гепарина достоверно не отличаются от контрольных параметров тест-систем, а Клексан даже повышает МВХЛ на 92,3%, что может быть связано с его меньшей способностью связывать ионы металлов переменной степени окисления (например, ионы железа), или его участием в разрушении пероксида водорода. Йодомарин не обладал достоверным антирадикальным дозозависимым эффектом. При оценке антирадикальной активности Эутирокса установлено, что последний проявляет дозозависимый эффект в концентрациях 0,167-1,002 мг/мл (прирост составил +31,5%)

Ключевые слова: антиоксидантная активность, перекисное окисление липидов, люминол-зависимая H₂O₂-индуцированная хемилюминесценция, антиокислительный потенциал

WAY TO TEST THE ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL PROPERTIES OF PHARMACEUTICALS AND DIETARY SUPPLEMENTS IN VITRO

¹Remenyakina E.I., ¹Panasenkova Y.S., ¹Pavlyuchenko I.I., ¹Basov A.A.

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, Sedina street.,4), e-mail: vochka@rambler.ru

We have done the analysis of the antioxidant activity of "Heparin", "Clexane", "Eutiroks", "Tyrosol", "Yodomarin", "Lipoic acid", "Glutathione Formula," the study was conducted in different dosages to assess the severity of a possible dose-response relationship. For this purpose tablets are diluted to a known concentration in distilled water. Injections were taken at comparable doses, relative to their single dose when used in practice. Antiradical activity of the drugs was assessed by the inhibition of luminol-dependent H₂O₂-induced chemiluminescence based on a modified technique [Basov, AA, et al., 2006; Pavlyuchenko II, Basov, AA, SR Fedosov, 2006]. The results are expressed as the area of chemiluminescence (PHL) and the maximum flash (MVHL) chemiluminescence (% of controls, which are buffered working solution with luminol). The study of the antioxidant potential of drugs was carried out using amperometric method based on a modification of the Yashin AJ [Basov AA et al. 2006]. These results are from the calibration graph and expressed in standard units (mg / L ascorbic acid). Research evidence that antioxidant capacity of drugs were: Heparin = 0.935 mg / l vit C, Clexane = 0.744 mg / l vit C, Tyrosol = 0.897 mg / l vit C, Eutroks = 0.697 mg / l vit C, Yodomarin = 1.922 mg / vit C,

which is much inferior antioxidant capacity of thiol drugs: Glutathione formula (7.681 mg / 1 vit) and Lipoic acid (22.846 mg / vit). Tyrosol and Yodomarin lacked reliable dose-dependent ability to influence performance antioxidant capacity test systems in vitro, while Eutiroks marked dose-dependent effect. The most significant ability to raise antioxidant capacity depending on the dosage is set for Eutiroks concentrations 0,167-1,002 mg / ml (an increase of 130.7%), which may indicate the presence of easily dissociating groups that can act as a donor of reducing equivalents. In the study of antiradical activity found that rates of Heparin was not significantly different from the control parameters of test systems and Clexane MVHL even increases by 92.3%, which may be due to its less capable of binding metal ions of variable oxidation state (for example, iron ions) or his involvement in the destruction of hydrogen peroxide. Yodomarin possessed significant antiradical dose-dependent effect. In assessing the antiradical activity Eutiroks found that the latter showed a dose-dependent effect in concentrations 0,167-1,002 mg / ml (an increase of 31.5%).

Key words: antioxidant activity, lipid peroxidation, luminol-dependent H₂O₂-induced chemiluminescence, the antioxidant potential

Введение

Интенсификация процессов свободнорадикального окисления (СРО) в организме человека при различных физиологических и патологических состояниях способствует развитию реакций и процессов, в целом имеющих общую картину, независимо от причин, их вызвавших, но, тем не менее, при этом принципиально отличающихся по выраженности проявлений и вовлеченности в процесс того или иного звена системы про-/антиоксиданты [Halliwell B. and Gutteridge, 1999]. Основным ответом организма на оксидативную нагрузку является состояние, характеризующееся как окислительный стресс (ОС), сопровождающийся избыточным образованием активных форм кислорода (АФК), интенсификацией процессов свободнорадикального окисления и перекисного окисления биомолекул. Одним из факторов провоцирующих развитие ОС является гипоксия. Развитие ОС характерно для многих болезней, в том числе и таких как ХОБЛ [Муравлева Л.И. и соавт., 2012, Rahman I., 2003, 2005] гипо- и гипертиреоз [Некрасова Т.А., 2011, Ром-бугославская Е.С., Сомосова Е.В. Venditti P.M., De Leo T., Di Meo S, 2002].

Лекарственные препараты, используемы при лечении пациентов с явлениями ОС могут прямо или косвенно влиять на показатели системы про-/антиоксиданты и, как следствие, нивелировать или провоцировать его проявления. При этом известно, что многие лекарственные средства в зависимости от химической структуры или используемой дозы могут оказывать как анти-, так и прооксидантный эффект [Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И., 2003], что необходимо учитывать при их назначении. Антиоксидантную активность тестируемых веществ трудно измерить по отношению к свободным радикалам непосредственно in vivo, поэтому возможные антиоксидантные свойства проще оценивать степенью их окисления in vitro в модельных тест-системах.

Одним из способов определения общей антиоксидантной активности различных веществ является амперометрический метод [Яшин А.И., 2008]. Данный способ основан на измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода, находящегося под определенным

потенциалом. Известно, что амперометрический способ анализа обладает рядом преимуществ: низким пределом обнаружения, высокой селективностью, малым объемом ячейки (0,1-5 мкл), простотой обслуживания.

Другим способом определения антирадикальной или прооксидантной активности тестируемых веществ является хемилюминесцентный анализ (ХЛ). Методы ХЛ анализа позволяют регистрировать интенсивность процессов свободнорадикального окисления (СРО) как непосредственно в крови (спонтанная биохемилюминесценция), так и в тест-системах с использованием различных активаторов ХЛ, таких, например, как люминол. Учитывая уникальное сочетание ценности получаемой с помощью ХЛ методов информации с простотой, доступностью, минимальными затратами времени и средств, безопасностью и необременительностью анализа эти методы имеют все большее распространение [Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А., 1999; Rost M., Karge E., Klingler W., 1998; Shen H.M., Yang C.F., Ong C.N., 1999].

Цель исследования

Изучить антиоксидантную и антирадикальную активность лекарственных средств используемых при лечении ХОБЛ и дисфункции щитовидной железы: Гепарин, Клексан, Эутирокс, Йодомарин, Тирозол в сравнении с тиолсодержащими антиоксидантами: Глутатион (Глутатион формула) и липоевая кислота (Берлитион).

Материалы и методы

Изучение антиоксидантной активности Эутирокса, Йодомарина и Тирозола проводилось в различных дозировках для оценки выраженности их возможного дозозависимого эффекта. Для этих целей таблетированные препараты разводились до известной концентрации в дистиллированной воде. Инъекционные препараты брались в соизмеримых дозировках, относительно их разовой дозы при использовании в практике.

Антирадикальную активность препаратов оценивали по степени ингибирования люминол-зависимой H_2O_2 -индуцированной хемилюминесценции на основе модифицированной методики [Басов А.А., и соавт., 2006; Павлюченко И.И., Басов А.А., Федосов С.Р., 2006]. Полученные результаты выражали в виде площади хемилюминесценции (ПХЛ) и максимума вспышки (МВХЛ) хемилюминесценции (в % к контролю, которым являлся забуференный рабочий раствор с люминолом).

Изучение антиокислительного потенциала препаратов проводили с помощью амперометрического метода на основе модифицированной методики Яшина А.Я. [Басов А.А. и соавт. 2006]. Полученные результаты находили по калибровочному графику и выражали в стандартных единицах, (мг/л аскорбиновой кислоты).

Результаты исследования

Проведенными исследованиями установлено, что антиокислительная емкость у препаратов составила: Гепарин = 0,935 мг/л vit C, Клексан = 0,744 мг/л vit C, Тирозол = 0,897 мг/л vit C, Эутирокс = 0,697 мг/л vit C, Йодомарин = 1,922 мг/л vit C, что значительно уступает антиокислительной емкости тиолсодержащих препаратов: Глутатион формулы (7,681 мг/л vit) и Берлитиона (22,846 мг/л vit). При изучении дозозависимых эффектов установили, что Тирозол и Йодомарин не обладали достоверной дозозависимой способностью влиять на показатели антиокислительной емкости тест-систем *in vitro*, в то время как у эутирокса отмечен дозозависимый эффект. Наиболее существенная способность повышать антиокислительную емкость в зависимости от дозировки установлена для Эутирокса в концентрациях 0,167-1,002 мг/мл (прирост составил +130,7%), что может указывать на наличие легко диссоциирующих групп, способных выступать в роли доноров восстановительных эквивалентов.

При изучении антирадикальной активности установлено, что показатели Гепарина достоверно не отличаются от контрольных параметров тест-систем, а Клексан даже повышает МВХЛ на 92,3%, что может быть связано с его меньшей способностью связывать ионы металлов переменной степени окисления (например, ионы железа), или его участием в разрушении пероксид водорода. Йодомарин не обладал достоверным антирадикальным дозозависимым эффектом. При изучении Тирозола установлено, что проявляет незначительную способность снижать МВХЛ, но при этом у него не установлена достоверная антирадикальная активность по данным ПХЛ в концентрациях менее $6,6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, хотя был выявлен дозозависимый эффект, наиболее существенный в концентрациях $6,6-9,9 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, сопровождающийся приростом антирадикальной активности до +54,2% МВХЛ и +73,4% ПХЛ. При оценке антирадикальной активности Эутирокса установлено, что последний проявляет дозозависимый эффект в концентрациях 0,167-1,002 мг/мл (прирост составил +31,5%).

Заключение

Полученные результаты отражают низкий антиокислительный потенциал у изученных препаратов и отсутствие у них выраженного прямого антиоксидантного эффекта в сравнении с классическими антиоксидантными веществами тиолсодержащими средствами : Глутатион формула и Берлитион, что не исключает их возможного косвенного метаболического антиоксидантного эффекта связанного с нормализацией реологических свойств крови и коррекцией гормональных эффектов щитовидной железы. Это необходимо исследовать при их использовании в клинической практике.

При этом установлен интересный факт, что высокомолекулярный гепарин имеет некоторую антиоксидантную и антирадикальную активность, что нельзя сказать о низкомолекулярных гепаринах, которые могут выступать даже в роли активаторов СРО.

Также необходимо отметить эффективность примененных биофизических методов тестирования, что подтверждается полученными результатами и достаточной простотой проводимых исследований.

Список литературы

1. Басов А.А., Павлюченко И.И., Плаксин А.М., Федосов С.Р. Использование аналогово-цифрового преобразователя в составе системы сбора и обработки информации с хемилюминистером LT-1 // Вестник новых медицинских технологий. – 2003. – Т. 10, № 4. – С. 67-68.
2. Басов А.А., Федосов С.Р., Канус И.С., Еремина Т.В. Современные способы стандартизации антиоксидантных лекарственных средств и биологически активных добавок//Современные проблемы науки и образования. – 2006.- № 4. – Приложение № 1, с.149.
3. Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антидотов прямого действия // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2003. – Т. 66, № 4. – С.66-70.
4. Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Демидчик Л.А., Колесникова Е.А. Роль окислительного стресса в патогенезе хронической обструктивной болезни легких //Успехи естествознания. -2012. - № 9.- С.12-16.
5. Некрасова Т.А., Щербатюк Т.Г., Давыденко Д.В., Леденцова О.В., Стронгин Л.Г. Особенности перекисного окисления липидов и белков при аутоиммунном тиреоидите без и с минимальной тиреоидной дисфункцией//Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2011. - №4. – С.38.
6. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования в медицине // Свободные радикалы и болезни человека: материалы конференции. – Смоленск, 1999. - С.18-19.
7. Яшин А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2008. – Т. LI, № 2. – С.130-135;

8. Rahman I. Oxidative Stress, Chromatin Remodeling and Gene Transcription in Inflammation and Chronic Lung Diseases // Journal of Biochemistry and Molecular Biology. - 2003. - Vol. 36, № 1. - P. 95-109.
9. Rost M., Karge E., Klinger W. What do we measure with luminal- lucigenin-and penicillin-amplified chemiluminescence? Investigation with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite// J Biolumin Chemilumin. – 1998. – V.13. – №6. – P.355—363.
10. Shen H.M., Yang C.F., Ong C.N. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells// Int J Cancer. – 1999. – V.81. - №5. - P.820—828.

Рецензенты:

Каде Азамат Халидович, д.м.н., профессор, зав.кафедрой общей и клинической патофизиологии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г.Краснодар.

Сампиев Абдул Магаметович, д.фарм.н., профессор, зав.кафедрой фармации ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г.Краснодар.