

© Коллектив авторов
УДК 615.849.19

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 3-ОКСИПИРИДИНА: МЕКСИДОЛА, ЭМОКСИПИНА И ПРОКСИПИНА

Г.И. КЛЕБАНОВ¹, О.Б. ЛЮБИЦКИЙ¹, О.В. ВАСИЛЬЕВА¹, Ю.В. КЛИМОВ², О.Б.
ПЕНЗУЛАЕВА², А.С. ТЕПЛЯШИН², М.П. ТОЛСТЫХ³, В.К. ПРОМОРЕНКО⁴, Ю.А.
ВЛАДИМИРОВ¹

¹Кафедра биофизики Российского государственного медицинского университета, 117869, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел. (095) 434-11-74, эл. почта: klebanov@fbm.msu.ru;

²Государственный научный центр лазерной медицины МЗ РФ;

³Московский медико-стоматологический университет;

⁴ТОО "Наука-центр"

С помощью трех хемилюминесцентных модельных систем окисления: системы Fe²⁺-индуцированного окисления суспензии фосфолипидных липосом, системы окисления водного раствора люминола, индуцированного смесью гемоглобина и пероксида водорода, и системы окисления водного раствора люминола, индуцированного 2,2'-азо-бис(2-метилпропионамидин) дигидрохлоридом, изучали антиоксидантную активность и механизм антиоксидантного действия трех производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина. Обнаружено, что исследованные аналоги 3-оксипиридина обладают способностью:

а) к взаимодействию с каталитически активными ионами двухвалентного железа, приводящее к элиминации ионов Fe²⁺ из модельной системы;

б) перехвату активных форм кислорода и/или радикалов люминола, образующихся в модельных системах.

По активности исследуемые аналоги 3-оксипиридина могут быть выстроены в следующий ряд: мексидол > эмоксипин > проксипин. Обнаруженные особенности антиоксидантного действия производных 3-оксипиридина могут лежать в основе их известных клинических эффектов.

Ключевые слова: производные 3-оксипиридина, антиоксиданты, антиоксидантная активность, активные формы кислорода, пероксидное окисление липидов, хемилюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ. Хорошо известно, что возникновение и развитие широкого круга воспалительных заболеваний сопровождается активацией свободнорадикальных реакций (СРР) перекисного окисления липидов (ПОЛ), инактивации белков и нуклеиновых кислот [1].

Стационарный уровень СРР пероксидации липидов клеточных мембран и липопротеинов плазмы крови определяется вкладом нескольких основных стадий процесса:

1) стадией инициации, которая определяется продукцией радикалов-инициаторов, в основном активных форм кислорода (АФК) [2];

2) уровнем активности сбалансированной системы эндогенной антиоксидантной защиты [3].

Увеличение продукции АФК, появление пула каталитически активных ионов Fe²⁺ и падение активности эндогенной системы ингибиторов СРР обуславливает наблюдаемую при различных патологических состояниях активацию СРР пероксидации липидов клеточных мембран и липопротеинов [4]. Это является патогенетическим обоснованием для использования в клинике различных природных или синтетических ингибиторов СРР в качестве препаратов антиоксидантной терапии. Так, в клинической практике уже нашли свое применение а-токоферол, каротеноиды, флавоноиды, пробукол и др. В

подавляющем большинстве случаев используемые в клинике ингибиторы - это гидрофобные соединения, способные к взаимодействию с радикалами, локализованными в основном в гидрофобной зоне мембран и липопротеинов. С другой стороны, первая острая фаза воспалительных заболеваний проходит в условиях гиперпродукции радикалов-инициаторов (АФК), локализованных в водной фазе, где наибольшей эффективностью могли бы обладать гидрофильные перехватчики АФК и вещества, оказывающие влияние на концентрацию ионов двухвалентного железа (хелаторы и окислители). Клиническая практика испытывает дефицит в арсенале подобных водорастворимых ингибиторов СРР.

В последнее время проводится широкий поиск и тестирование свойств и активности различных новых ингибиторов СРР и их смесей. Примером таких антиоксидантов (АО) являются производные 3-оксипиридина [5], которые нашли широкое применение в клинической практике. Вместе с тем, механизм антиоксидантного действия производных 3-оксипиридина, определяющий, по мнению многих авторов, их клинические эффекты изучен явно недостаточно. Основным подходом для изучения механизма действия подобных агентов является использование различных модельных систем окисления [6], позволяющих определить эффективность перехвата тем или иным ингибитором СРР какого-либо определенного радикала.

Целью настоящей работы было изучение активности и механизма антиоксидантного действия производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина с помощью нескольких различных модельных систем окисления.

МЕТОДИКА. В работе использовали: 2,3,5,6-1Н,4Н-тетрагидро-9-(2,-бензоимидазоллил) хинолизино-(9,9а,1-gh) кумарин (С-525) ("НИОПИК", Россия), люминол (ЛМ) ("Serva", Германия), гемоглобин (Нв) ("Sigma", США), тролокс ("Serva", Германия), 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (АБАП) ("Aldrich", США), мексидол, эмоксипин и проксипин (ТОО "Наука-центр" Россия).

Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина изучали с помощью трех хемилюминесцентных модельных систем окисления: гомогенной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола (Нв-Н₂O₂-ЛМ) [6], гомогенной системы, представляющей собой раствор азосоединения 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорида и люминола (АБАП-ЛМ) [7], а также гетерогенной системы - суспензии модельных мембран липосом [8].

Для формирования суспензии многослойных липосом использовали общую фракцию фосфолипидов желтка яиц. Экстракцию общих фосфолипидов проводили по методу Folch и соавт. [9]. Один объем желтка яиц гомогенизировали в течение 30 мин в 20 объемах хлороформ-метанольной смеси (2:1 по объему), гомогенат фильтровали через обезжиренный бумажный фильтр для отделения агрегировавшего белка. Полученный липидный экстракт промывали добавлением к нему 1/3 общего объема 0,74% водного раствора КСl. После отстаивания в течение 12 час при 0-4С верхнюю водно-метанольную фазу тщательно удаляли, нижнюю фазу переливали в круглодонную колбу и выпаривали с помощью роторного испарителя. Сухую липидную пленку смывали 3-4 мл гексана и добавляли 20-кратное количество охлажденного ацетона. При этом фосфолипиды выпадали в осадок в виде белых хлопьев. Преципитацию фосфолипидов ацетоном проводили 5 раз. Полученные фосфолипиды растворяли в хлороформ-метанольной смеси. Концентрацию фосфолипидов определяли гравитометрически.

Процедуру приготовления многослойных фосфолипидных липосом выполняли по методу Bangham и соавт. [10]. Для этого необходимое количество хлороформ-метанольного раствора фосфолипидов помещали в круглодонную колбу и упаривали растворитель на вакуумном роторном испарителе. Сухую липидную пленку смывали со стенок колбы определенным объемом 20 мМ трис-НСl буфера, рН 7,4. С целью формирования липосом более однородных по своему размеру, полученную липосомальную суспензию подвергали криолитической обработке путем трехкратного замораживания-оттаивания. Перед использованием суспензия липосом выдерживалась не менее 1 часа при 37С.

Хемилюминесцентные измерения проводили с помощью хемилумино-метра ХЛМ-3 ("Бикап", Россия). Кинетику хемилюминесценции (ХЛ) регистрировали и обрабатывали с помощью интерфейса MacLab/2e (ADInstruments, Австралия), связанного с компьютером Macintosh LC II.

Измерение Fe²⁺-индуцированной ХЛ суспензии липосом проводили следующим образом. Реакционная среда общим объемом 5 мл содержала 0,1 мл суспензии липосом с концентрацией по фосфолипиду 0,4 мг/мл в 20 мМ трис-НСl буфере, рН 7,4. Для активации свечения в систему вводили спиртовой раствор

C-525 до конечной концентрации 1 мкМ. Инициирование липидной пероксидации осуществляли введением раствора FeSO₄ до конечной концентрации 7 мкМ, после чего в течение 10-30 мин измеряли кинетику хемиллюминесценции.

Для измерения ХЛ, сопровождающей окисление ЛМ в системе Нв-H₂O₂-ЛМ, в кювету хемиллюминометра последовательно добавляли фосфатный буфер (50 мМ КН₂РO₄, 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4) до конечного объема 5 мл, 0,3 мкМ Нв, 10 мкМ ЛМ и определенный объем исследуемого объекта. Инициирование окисления ЛМ осуществляли введением 52 мкМ пероксида водорода. Исследуемые вещества добавляли перед введением H₂O₂.

Кроме двух выше указанных модельных систем антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина изучали с помощью модельной системы окисления ЛМ, инициированного пероксильными радикалами (RO₂*), генерирующимися с постоянной скоростью, зависящей от температуры, водорастворимым азосоединением АБАП [7, 11]. Среда инкубации объемом 5 мл содержала: 5 мМ АБАП и 10 мкМ ЛМ в фосфатном буфере (50 мМ КН₂РO₄, 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4). Измерение ХЛ проводили следующим образом. В среду инкубации, содержащей ЛМ в фосфатном буфере при постоянном перемешивании и температуре 37С вводили АБАП и измеряли контрольную хемиллюминограмму. Далее измерялись кинетики ХЛ в присутствии исследуемых веществ, которые добавляли в среду инкубации перед вводом АБАП.

Полученные данные представлены в виде значений средней величины +/- стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В первой серии экспериментов антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина изучали с помощью модельной системы на основе суспензии многослойных липосом, сформированных в трис-НСl буфере, инициацию перекисного окисления липидов в которых осуществляли раствором сернокислого железа, а детектирование индукции СРР - методом активированной производным кумарина С-525 хемиллюминесценции [12].

Хорошо известно, что введение в систему структурированных липидов (мембраны, липопротеины) ионов двухвалентного железа вызывает развитие характерной кинетики хемиллюминесценции, на которой можно выделить несколько стадий: быстрая вспышка, латентный период и медленное свечение (рис. 1).

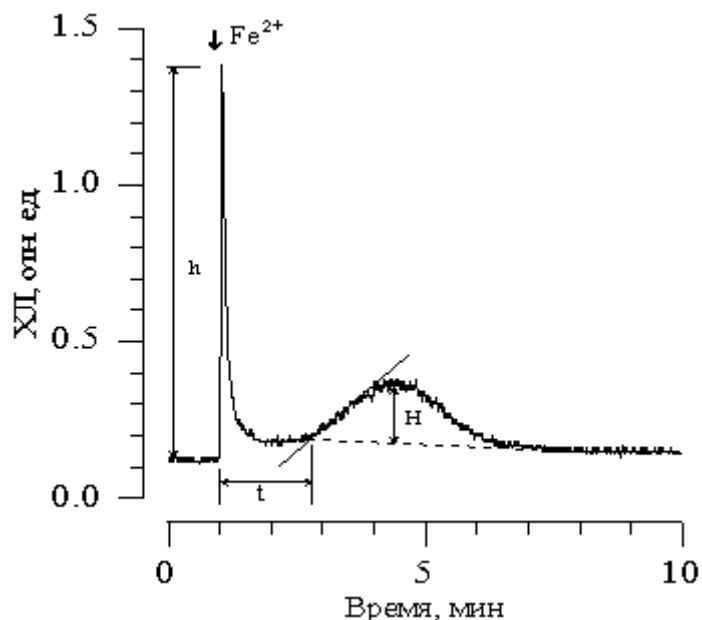


Рисунок 1.

Кинетика Fe²⁺-индуцированной хемиллюминесценции суспензии фосфолипидных липосом. Стрелкой показан момент добавления ионов Fe²⁺. По оси абсцисс - время (мин). По оси ординат - интенсивность ХЛ (отн. ед.). Состав реакционной среды: липосомы (0,4 мг/мл), С-525 (1 мкМ), Fe²⁺ (7 мкМ) в трис-НСl буфере, рН 7,4. Н - интенсивность медленного свечения, h - интенсивность быстрой вспышки хемиллюминесценции, t - длительность латентного периода хемиллюминограммы.

Ранее в работах Ю.А. Владимирова [13] было показано, что интенсивность быстрой вспышки ХЛ (h) при

определенных условиях пропорциональна концентрации т.н. предсуществующих гидроперекисей (ROOH), которые образовались в системе по ряду причин до введения Fe^{2+} . Длительность латентного периода (t) зависит от времени достижения т.н. "критической" концентрации ионов двухвалентного железа в системе, которое в свою очередь определяется вкладом веществ, влияющих на окисление и/или элиминацию (хелатирование) Fe^{2+} . Интенсивность (H) или светосумма медленного свечения определяется скоростью СРР, протекающих в гидрофобной фазе мембран или липопротеинов, и способностью ингибиторов к перехвату липидных радикалов [13].

На рис. 2 представлены кинетические кривые развития Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции суспензии липосом без и в присутствии мексидола, эмоксипина и проксипина. Видно, что введение в суспензию липосом мексидола приводило к уменьшению длительности латентного периода и тушению медленного свечения липосом. Титрование модельной системы мексидолом показало (табл.), что увеличение концентрации мексидола более 0,8 мМ приводило к полному тушению медленного свечения и исчезновению латентного периода на хемилюминограмме. В случае эмоксипина увеличение концентрации ингибитора в среде также приводило к уменьшению длительности латентного периода и тушению медленного свечения. Причем, при концентрации 0,8 мМ амплитуда медленного свечения снижалась почти в два раза по отношению к контролю, а увеличение концентрации эмоксипина в суспензии липосом приводило к дозо-зависимому тушению медленного свечения и уменьшению длительности латентного периода. Наблюдаемый эффект проксипин-индуцированного увеличения интенсивности медленного свечения (при концентрации проксипина 1,6 мМ) может быть следствием мембранотропного действия этого производного, приводящего к разупорядочиванию структуры бислоя липосом [5], сходного с действием детергентов на структурированность и уровень перекисного окисления липидов липосом [14].

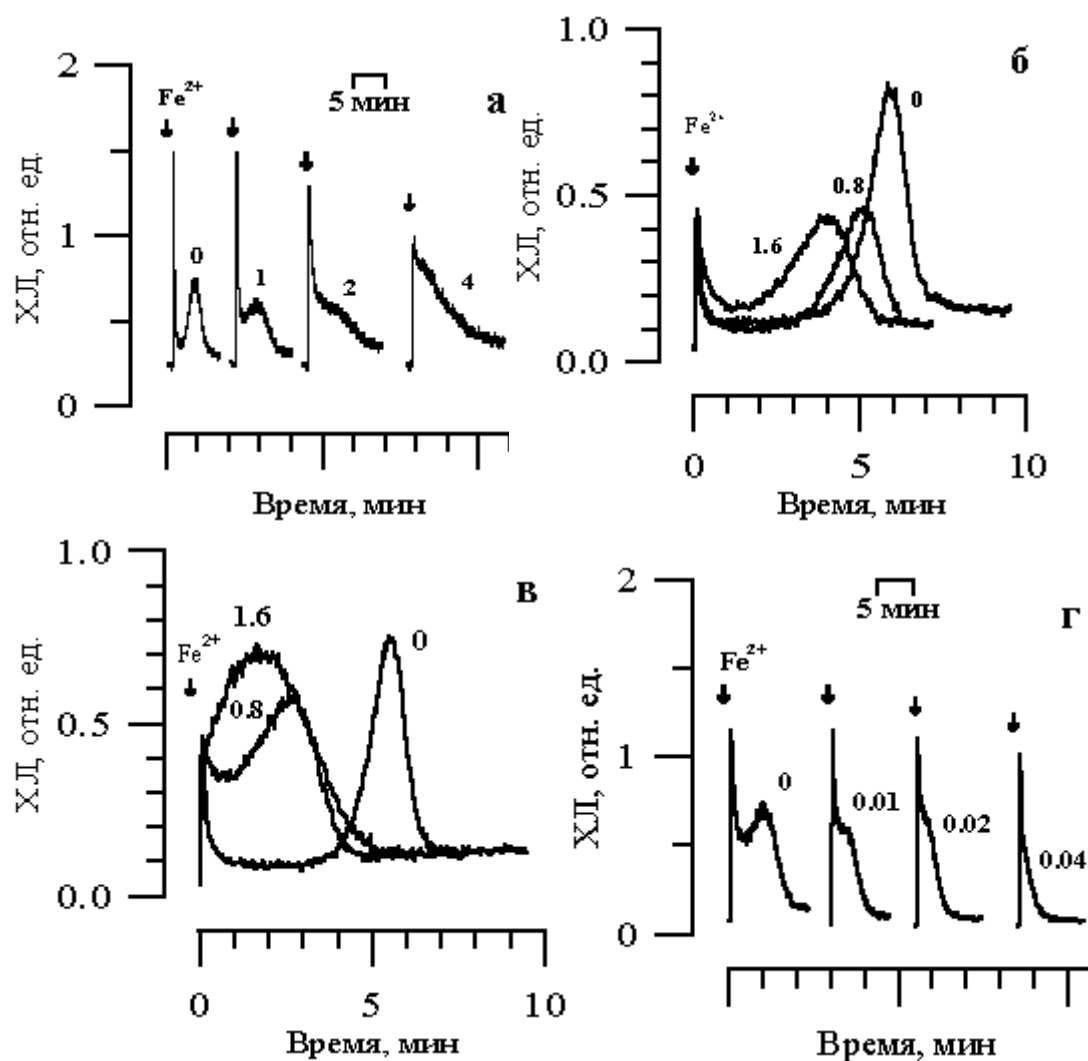


Рисунок 2.

Кинетика Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции суспензии фосфолипидных липосом в присутствии мексидола (а), эмоксипина (б) и проксипина (в), десферала (г), Цифры у кривых - концентрация вещества в мМ. Стрелкой показан момент добавления ионов Fe^{2+} . По оси абсцисс - время

(мин). По оси ординат - интенсивность ХЛ (отн. ед.). Состав реакционной среды как на рис. 1.

Таблица. Влияние мексидола, эмоксипина и проксипина на параметры Fe²⁺-индуцированной хемилюминесценции суспензии фосфолипидных липосом

Вещество	C, мМ	t / to	H / Ho
Контроль	0,0	1,00	1,00
Эмоксипин	0,8	0,90	0,60
	1,6	0,47	0,46
	2,4	0,26	0,41
	3,2	0,13	0,32
Проксипин	0,8	0,21	0,54
	1,6	0,00	0,92
	2,4	0,00	0,94
	3,2	0,00	0,96
Мексидол	1,0	0,80	0,83
	2,0	0,00	-
	4,0	0,00	-

Примечание: С (мМ) - концентрация вещества; t, H - латентный период и амплитуда медленной вспышки ХЛ в присутствии аналогов 3-оксипиридина; to, Ho - латентный период и амплитуда медленной вспышки ХЛ в контроле. Среднеквадратичное отклонение каждого из параметров не превышало 10%.

Сопоставление полученных результатов (табл.) позволяет предположить, что наиболее ярким эффектом действия производных 3-оксипиридина на параметры хемилюминесценции, сопровождающей ПОЛ мембран липосом, является изменение длительности латентного периода, которое определяется влиянием ингибиторов на концентрацию Fe²⁺ [13]. В качестве доказательства этого предположения на рис. 2 (г) приведены результаты действия на параметры хемилюминесценции суспензии липосом десферала - известного хелатора Fe²⁺. Видно, что как и в случае аналогов 3-оксипиридина, по мере увеличения концентрации десферала наблюдали пропорциональное уменьшение латентного периода хемилюминесценции при практически постоянной величине интенсивности медленного свечения.

Таким образом, результаты, полученные с использованием гетерогенной системы окисления структурированных липидов (суспензия мембран липосом), позволяют заключить, что исследуемые производные 3-оксипиридина обладают способностью окислять или хелатировать каталитически активные ионы двухвалентного железа и тем самым ингибировать СРР перекисного окисления липидов.

Второй модельной системой окисления, использованной в данной работе для изучения антиоксидантных свойств аналогов 3-оксипиридина, была хемилюминесцентная система, основанная на окислении люминола, индуцированном смесью гемоглобина и пероксида водорода (система Нв-Н₂O₂-ЛМ) [15]. На рис. 3 представлена кинетика ХЛ данной модельной системы. Видно, что примерно через 1 мин после добавления Н₂O₂ к реакционной среде, содержащей Нв и ЛМ развивалось свечение ХЛ, которое достигало максимальных значений на 3 минуте и далее постепенно уменьшалось. В отсутствии хотя бы одного из компонентов системы свечение не регистрировалось [15]. Максимальная интенсивность свечения (амплитуда ХЛ) и время от момента введения Н₂O₂ до начала развития свечения (латентный период) были выбраны в качестве измеряемых параметров.

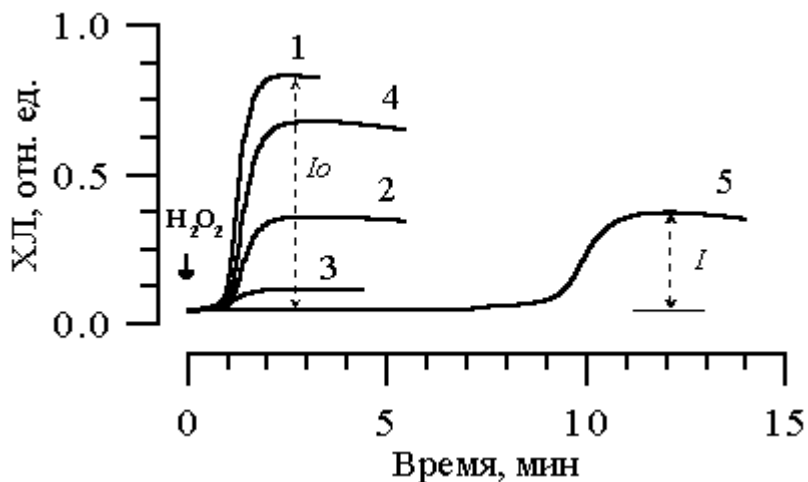


Рисунок 3.

Кинетика хемилюминесценции системы Нв-Н₂О₂-ЛМ без (1) и в присутствии 10 мкМ мексидола (2), 100 мкМ проксипина (3), 100 мкМ эмоксипина (4) и 4 мкМ аскорбата (5). По оси абсцисс - время (мин). По оси ординат - интенсивность ХЛ (отн. ед.). Состав реакционной среды: люминол (10 мкМ), гемоглобин (0,3 мкМ), пероксид водорода (52 мкМ) в 50 мМ КН₂РО₄ - 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4. Стрелкой показан момент времени введения пероксида водорода.

Схема реакций, протекающих в системе Нв-Н₂О₂-ЛМ, еще далека от полного понимания, однако на основании некоторых данных литературы она была представлена следующим образом [15].

Инициатором окисления в данной модельной системе предположительно являются феррил-радикалы Нв или гидроксильные радикалы, образующиеся при взаимодействии гемоглобина и пероксида водорода. Окисление ЛМ сопровождается образованием радикала ЛМ и в конечном итоге приводит к образованию возбужденного продукта окисления, который переходит в основное состояние с высвечиванием кванта света ХЛ. Количество выделившихся квантов света ХЛ пропорционально количеству образовавшегося конечного продукта окисления и следовательно является мерой степени окисленности ЛМ. Добавление в данную модельную систему веществ, способных препятствовать окислению ЛМ (антиоксидантов), будет приводить к уменьшению количества квантов света ХЛ. Измерив кинетику интенсивности ХЛ в системе Нв-Н₂О₂-ЛМ без и в присутствии данного вещества, можно таким образом исследовать антиоксидантные свойства этого вещества [15].

На рис. 3 представлены результаты исследования влияния мексидола, эмоксипина, проксипина, а также аскорбата на параметры хемилюминесценции модельной системы Нв-Н₂О₂-ЛМ. Видно, что все исследованные аналоги 3-оксипиридина тушат ХЛ модельной системы. С другой стороны, в отличие от аскорбата производные 3-оксипиридина оказались неспособными оказывать сколько-нибудь существенное влияние на длительность латентного периода.

Ранее, при разработке данной модельной системы было показано, что разные ингибиторы СРР по-разному влияют на параметры хемилюминограммы. Так, было показано [15], что введение в модельную систему α-токоферола, урата, и восстановленного глутатиона приводило к увеличению длительности латентного периода хемилюминограммы, в то время как плазменные белки (церулоплазмин, альбумин и трансферрин) вызывали дозо-зависимое тушение ХЛ. В самом общем случае тушение хемилюминесценции модельной системы Нв-Н₂О₂-ЛМ в присутствии ингибиторов СРР может быть следствием двух причин:

- взаимодействием исследуемых веществ с радикалами образующимися в модельной системе и приводящими к свободнорадикальному окислению люминола;
- безызлучательной дезактивации возбужденного состояния люминола [15].

Для выяснения механизма тушения ХЛ модельной системы исследуемыми веществами была изучена их способность тушить фотолюминесценцию люминола, которая определяется реализацией возбужденного состояния люминола. Было обнаружено, что вещества, взятые в концентрациях, вызывающих 50% тушение ХЛ модельной системы Нв-Н₂О₂-ЛМ, практически не влияли на интенсивность фотолюминесценции люминола. Это означает, что уменьшение интенсивности ХЛ в присутствии белковых ингибиторов СРР обусловлено не за счет уменьшения квантового выхода реализации энергии

возбужденного состояния люминола, а скорее всего за счет взаимодействия ингибиторов с радикалами, образующимися в модельной системе. Это приводит к уменьшению количества возбужденных продуктов люминола и как следствие, к уменьшению амплитуды ХЛ.

Следовательно, можно предположить, что тушение ХЛ модельной системы обусловлено взаимодействием ингибиторов не столько с радикалами-инициаторами, которые образуются при запуске реакций модельной системы [6, 15], сколько с радикалами, образующимися в последующих реакциях окисления люминола. В качестве одного из них следует назвать супероксидный анион-радикал (O_2^*), который является промежуточным продуктом в реакции свободнорадикального окисления люминола [15]. Одним из аргументов в пользу такого предположения является тот факт, что введение в модельную систему СОД, вызывало уменьшение амплитуды ХЛ без существенного изменения длительности латентного периода. В этой связи можно предположить, что мексидол, эмоксипин и проксипин, водорастворимые антиоксиданты, которые тушат ХЛ модельной системы, способны к перехвату O_2^* и тем самым ингибируют инициацию СРР перекисного окисления липидов *in vivo* [15].

Для количественной оценки способности производных 3-оксипиридина взаимодействовать с радикалами, локализованными в водной фазе модельной системы Нв-Н₂O₂-ЛМ, результаты тушения ХЛ пересчитывали в координатах уравнения Штерн-Фольмера [15]:

$$I_0 / I = 1 + K_i * C \quad (1),$$

где: I_0 и I - амплитуда ХЛ модельной системы без и в присутствии ингибитора; K_i - константа тушения ХЛ, условно равная степени перехвата ингибитором радикалов, образующихся в модельной системе; C - молярная концентрация ингибитора.

Данные пересчета и величины констант приведены на рис. 4 и врезке к нему. Видно, что мексидол и эмоксипин обладают примерно схожей антирадикальной активностью, значительно превышающей активность проксипина.

Вещество	K_i, M^{-1}
Мексидол	$140 * 10^3$
Эмоксипин	$45 * 10^3$
Проксипин	$0,39 * 10^3$

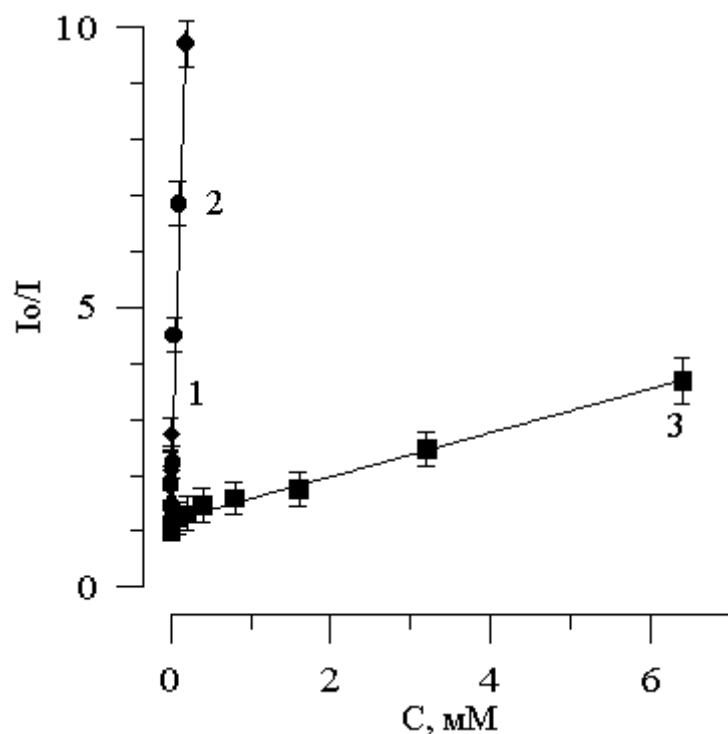


Рисунок 4.

Влияние мексидола (1), эмоксипина (2) и проксипина (3) на изменение амплитуды хемилюминесценции

в системе Нв-Н₂O₂-ЛМ. По оси ординат - I_0 / I , где: I_0 и I - амплитуда ХЛ без и в присутствии производных 3-оксипиридина. Состав реакционной среды как на рис. 3. На врезке показаны значения констант тушения хемилюминесценции модельной системы (см. объяснения в тексте).

В качестве третьей модельной системы для исследования антиоксидантных свойств производных 3-оксипиридина мы использовали водную гомогенную систему на основе АБАП, предложенную в 1987 г. Wayner и соавт. [7]. Принцип действия этой системы [6] состоит в том, что в водной среде при 37С АБАП претерпевает термоиндуцированную деградацию с образованием пероксильных радикалов (RO^*2), которые могут взаимодействовать с различными перехватчиками, предпочтительно водорастворимыми: люминолом, фикоэритрином, эмульсией линолевой кислоты и др. [7, 11]. Если в качестве такого перехватчика RO^*2 использовать люминол, то уровень термоиндуцированной продукции пероксильных радикалов АБАП можно зарегистрировать с помощью измерения ХЛ, что и было сделано в данной работе.

На рис. 5 представлена кинетика ХЛ данной модельной системы. Видно, что характер кривых имеет тот же вид, что и в системе Нв-Н₂O₂-ЛМ. Максимальная интенсивность свечения (амплитуда ХЛ) и время от момента введения АБАП до начала развития свечения (латентный период) были выбраны в качестве измеряемых параметров.

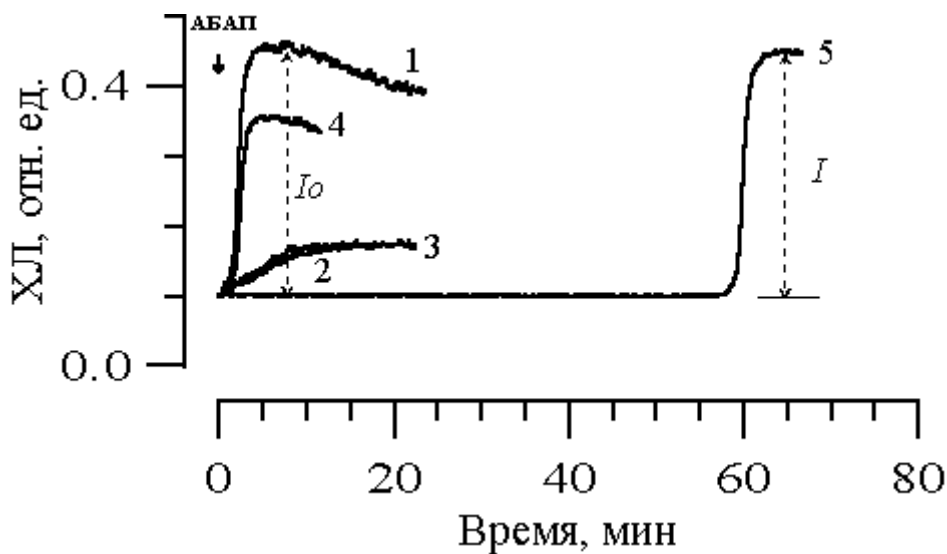


Рисунок 5.

Кинетика хемилюминесценции системы АБАП-ЛМ, без (1) и в присутствии 200 мкМ мексидола (2), 200 мкМ эмоксипина (3), 200 мкМ проксипина (4), и 10 мкМ тролокса (5). По оси абсцисс - время (мин). По оси ординат - интенсивность ХЛ (отн. ед.). Состав реакционной среды: ЛМ (10 мкМ), АБАП (5 мМ) в 50 мМ КН₂РО₄ - 100 мкМ ЭДТА, рН 7,4.

В предыдущих работах модельную систему АБАП-ЛМ использовали для изучения антиоксидантных свойств таких перехватчиков свободных радикалов как тролокс (водорастворимый аналог α -токоферола), аскорбат, урат и др. [7, 11]. Было показано, что введение ингибиторов в модельную систему сопровождается увеличением длительности латентного периода хемилюминограммы и уменьшением амплитуды ХЛ [11]. Увеличение длительности латентного периода хемилюминесценции обусловлено перехватом антиоксидантом RO^*2 , их элиминацией из системы и, как следствие, отсутствием свечения ХЛ; как только заканчивается перехват радикалов свечение возгорается.

Длительность латентного периода определяется антирадикальной активностью перехватчика. С другой стороны, некоторые ингибиторы (тролокс, урат) оказались способны к уменьшению амплитуды ХЛ, что было связано со способностью данных ингибиторов к взаимодействию с образующимися при окислении люминола радикалами: активные формы кислорода и радикалы самого люминола [7, 11].

При использовании модельной системы АБАП-ЛМ было обнаружено, что введение в систему мексидола, эмоксипина и проксипина (рис. 5) сопровождается уменьшением амплитуды ХЛ при практически неизменной величине длительности латентного периода хемилюминограммы. Для сравнения на рис. 5 приведены результаты влияния на параметры хемилюминесценции модельной системы АБАП-ЛМ

водорастворимого аналога α -токоферола, тролокса. Видно, что в случае введения в систему тролокса происходит концентрационнозависимое увеличение длительности латентного периода.

Полученные результаты позволяют предположить, что как и в случае модельной системы Нв-Н₂O₂-ЛМ, производные 3-оксипиридина в модельной системе АБАП-ЛМ элиминируют вторичные радикалы, образующиеся в модельных системах, в числе которых может быть супероксидный анион-радикал.

Данные приведены на рис. 6. Видно, что антирадикальная активность мексидола и эмоксипина значительно превышала способность проксипина к элиминации вторичных радикалов, образующихся в водной фазе модельной системы АБАП-ЛМ.

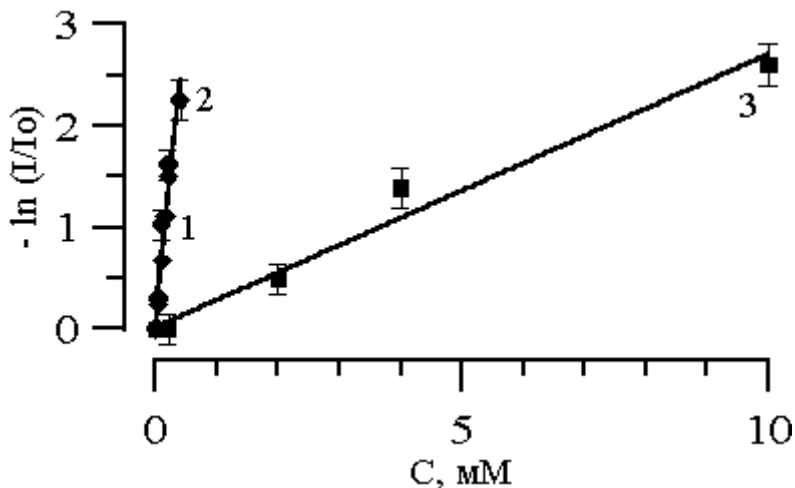


Рисунок 6.

Влияние различных концентраций мексидола (1), эмоксипина (2) и проксипина (3) на изменение интенсивности ХЛ в системе АБАП-ЛМ. По оси абсцисс - концентрация вещества (мМ). По оси ординат $-\ln(I/I_0)$, где: I_0 , I - амплитуда ХЛ без и в присутствии производных 3-оксипиридина. Состав реакционной среды как на рис. 5.

Для количественной оценки антирадикальной активности производных 3-оксипиридина результаты титрования модельной системы АБАП-ЛМ этими веществами пересчитывались по следующему уравнению:

$$\ln(I/I_0) = 1 + k * C \quad (2)$$

где I_0 и I - амплитуда ХЛ модельной системы без и в присутствии ингибитора; k - константа тушения ХЛ, условно равная степени перехвата ингибитором радикалов, образующихся в модельной системе; C - молярная концентрация ингибитора.

В последнее время производным 3-оксипиридина, как ингибиторам СРР, уделяется большое внимание как в клинике, так и в эксперименте [5, 16-19]. Однако, несмотря на широкое их применение в клинической практике, где их использование давало хороший лечебный эффект, механизм антиоксидантного действия этих соединений оставался не изученным.

Для изучения активности и механизма действия мексидола, эмоксипина и проксипина мы использовали несколько модельных систем окисления, различающихся как по структуре объекта (мембраны и гомогенный раствор), так и по способу генерации радикалов-инициаторов. Нами обнаружено, что антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина обусловлены двумя основными способностями этих веществ:

а) взаимодействием с ионами двухвалентного железа, направленным на уменьшение эффективной концентрации катализатора СРР за счет окисления ионов железа Fe^{2+} в Fe^{3+} , либо за счет хелатирования ионов Fe^{2+} . Причем, активность мексидола, эмоксипина и проксипина в этом отношении приближается к способности известного хелатора двухвалентных ионов железа десферала элиминировать Fe^{2+} из системы.

б) вторым свойством исследованных производных является их способность к взаимодействию с

водорастворимыми радикалами и возможно с O₂*.

Таким образом, в основе антиоксидантного действия производных 3-оксипиридина лежит их способность ингибировать стадию инициации СРР перекисного окисления липидов, во многом обусловленную образованием активных форм кислорода и появлением каталитически активных ионов железа. Это обстоятельство позволяет рекомендовать применение производных 3-оксипиридина как ингибиторов СРР в острый период воспалений, когда эффективность стадии инициации весьма велика. Особенно это актуально в случае использования водорастворимых ингибиторов СРР и в частности мексидола при лечении ран [20]. В этом случае аппликация производных 3-оксипиридина позволяет создать в очаге воспаления (в ране) необходимую концентрацию ингибитора, которая позволит снизить продукцию АФК, уменьшить концентрацию каталитически активных ионов железа и тем самым уменьшить действие гиперактивации СРР перекисного окисления липидов на последующие стадии заживления ран.

Исследование влияния производных 3-оксипиридина на динамику параметров СРР перекисного окисления липидов в ране и взаимосвязь с эффективностью заживления ран будет темой наших последующих публикаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vladimirov Yu.A. (1986) In: Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases. New York-London, Alan R. Liss Inc., pp. 141-195.
2. Weiss J.J. (1984) Acta Physiol. Scand., Suppl., 548. 9-57.
3. Davies K.J. (1995) Biochem. Soc. Symp., 61, 1-31.
4. Дубур Г.Я., Велене А.Х. (1981) В кн. Биомембраны. Структура. Функции. Медицинские аспекты. Рига, "Зинатне", с. 257-277.
5. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. (1995) Антиоксиданты в профилактике и терапии заболеваний ЦНС. М., Изд-во НИИ биомедицинской химии.
6. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Владимиров Ю.А. (1999) Вестник РАМН, №2, 15-22.
7. Wayner D.D.M., Burton G.W., Ingold K.U., Barclay L.R.C. and Locke S.J. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 924, 408-419.
8. Клебанов Г.И., Капитанов А.Б., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Жамбалова Б.А., Любицкий О.Б., Нестерова О.А., Васильева О.В., Попов И.Н., Левин Г., Владимиров Ю.А. (1998) Биол. мембраны, 15, 227-237.
9. Folch J., Lee S.M., Sloane-Stanley G. (1957) J. Biol. Chem., 226, 497-509.
10. Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965) J. Mol. Biol., 13, 238-252.
11. Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C., Castillo M.D. (1995) Free Radic. Biol. Med., 18, 153-158.
12. Васильева О.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1998) Биол. мембраны, 15, 177-183.
13. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука.
14. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Груне К., Владимиров Ю.А. (1988) Биол. мембраны, 5, 1072-1086.
15. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1997) Вопр. мед. химии. 43, 87-92.
16. Девяткин Г.А., Коваленко Э.Г., Смирнов Л.Д. (1993) Эксп. клин. фармакология, 56, 33-35.
17. Голиков А.П., Овчинников В.Л., Полумисков В.Ю., Давыдов Б.В., Карев В.А., Конорев Л.А., Шведова А.Н. (1990) Кардиология, 30, (№7), 50-53.
18. Еременко А.В., Авдулов Н.А., Ганкина Е.М., Смирнов Л.Д., Дюмаев К.М., Вальдман А.В. (1988) Бюлл. эксп. биол. и мед., 105, (№1), 38-40.
19. Чукаев С.Н. (1993) Оптимизация режимов коррекции антиоксидантного статуса организма при гипоксии с помощью мексидола и пробукола. Дисс. канд. наук. М.
20. Толстых П.И., Кривихин В.Т., Луцевич Э.В., Калинин М.Р., Доценко Н.М. (1998) Лазерное излучение и антиоксиданты в лечении гнойно-некротических процессов нижних конечностей у больных сахарным диабетом. М., Орбита-М.

Поступила 01.04.00

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ANALOGUES OF 3-OXYPYRIDINE: MEXIDOL, EMOXIPIN,

PROXIPIN

G.I. KLEBANOV, O.B. LYUBITSKY, O.V. VASILJEVA, Yu.A. KLIMOV, O.B. PENZULAEVA, A.S. TEPLYASHIN, M.P. TOLSTYH, V.K. PROMORENKO, Yu.A. VLADIMIROV
Department of Biophysic, Russian State Medical University, Ostrovityanova ul. 1, Moskow, 119869, Russia; E-mail: klebanov@fbm.msu.ru

Using three chemiluminescent model systems of oxidation (suspension of phospholipid liposomes, a geous solution of haemoglobin - hydrogen peroxide - luminol and a geous solution 2,2'-azo-bis-(2-methylpropionamide)dihydrochloride - luminol) the antioxidant activity and mechanism of antioxidant action of three 3-oxypyridine analogues: (mexidol, emoxipin and proxipin) were studied. These compounds were shown: a) to interact with catalitically active two valency iron ions (Fe^{2+}), that causes elimination of ions from the model system; b) to scavenge reactive oxygen species and/or luminol radicals produced in the model systems. Their activity reduced in the following order: mexidol > emoxipin > proxipin. The antioxidant activity of 3-oxypyridines may underline known clinical effects of these compounds.

Key words: 3-oxypyridine analogues, antioxidants, antioxidant activity, reactive oxygen species, lipid peroxidation, chemiluminescence