

УДК 541.49:535.379.001
© Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

В.А. Косолапов¹, А.А. Спасов¹, В.А. Анисимова²

¹ Волгоградская государственная медицинская академия,
400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, д.1, тел. (8442) 97-15-34,
факс: (8442) 36-41-74; эл. почта: farm@interdacom.ru;

² НИИ физической и органической химии РГМУ, Ростов-на-Дону

С использованием трех хемилюминесцентных методов: системы аутоокисления люминола, Fe²⁺-индуцированной хемилюминесценции липидов и люцигенин-зависимой хемилюминесценции с генерацией супероксидного радикала в системе ксантин-ксантиноксидаза, изучалась антиоксидантная и антирадикальная активность нового антиоксидантного церебропротекторного средства эноксифол (производное имидазо-бензимидазола) в сравнении с антиоксидантом мексидолом.

Установлено, что эноксифол в большей степени, чем мексидол проявляет антирадикальные свойства, подавляя образование радикалов люминола, ингибируя образование супероксидного анион-радикала, и антиоксидантные свойства, уменьшая Fe²⁺-индуцированную хемилюминесценцию липидов куриного желтка.

Выявленные свойства эноксифола влиять на процессы хемилюминесценции подтверждают результаты, полученные ранее с помощью непрямых методов изучения свободно-радикальных процессов *in vitro* и *in vivo* (снижение образования продуктов ПОЛ, активация антиоксидантных ферментов) и могут лежать в основе его фармакологических эффектов.

Ключевые слова: производные бензимидазола, антиоксиданты, антиоксидантная активность, антирадикальная активность, активные формы кислорода, перекисное окисление липидов, хемилюминесценция

ВВЕДЕНИЕ. Интерес к проблеме свободнорадикального окисления обуславливает разнообразие методов изучения антиоксидантной и антирадикальной активности новых химических соединений. Изучение как самих механизмов перекисного окисления, так и механизмов действия естественных и экзогенных антиоксидантов ведется по двум направлениям - *in vitro* и *in vivo*. Методы *in vitro* могут быть фермент-независимыми (аскорбат-зависимое ПОЛ) [1, 2] и фермент-зависимыми (NADPH-зависимое ПОЛ) [3, 4]. Однако эти методы способны оценивать эффективность антиоксидантных веществ лишь по ингибированию образования конечных продуктов свободнорадикальных реакций, что значительно снижает их информативность.

В настоящее время для оценки интенсивности свободнорадикальных реакций применяются прямые методы обнаружения радикалов, такие как электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) и хемилюминесценция (ХЛ). Их высокая эффективность связана с тем, что время жизни радикалов чрезвычайно мало, а использование прямых методов регистрации позволяет оценивать

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В АНАЛИЗЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

интенсивность реакций по мере их протекания [5]. Наибольшую распространенность получили хемилюминесцентные методы, что связано с доступностью оборудования, возможностью определения основных кинетических параметров реакций, достаточно высокой чувствительностью.

Для определения интенсивности образования свободных форм кислорода методами хемилюминесценции часто используют вещества, повышающие квантовый выход и увеличивающие свечение. Наиболее часто с этой целью используют люминол и люцигенин [6, 7]. В большом количестве исследований за последние 10 лет было показано, что оба вещества измеряют один тип свободных радикалов – супероксидный анион-радикал [8, 9]. Однако появляется все больше сведений о том, что люминол не совсем подходит для измерения образования супероксида, особенно в биологических образцах, т.к. он может сам по себе генерировать его в присутствии любого одновалентного окислителя [10] и, таким образом, может быть измерено только окисление люминола. Хемилюминесценция люцигенина, так же как люминола, включает реакцию супероксида с радикальной формой люминесцента. Однако в этом случае, в отличие от реакции с люминолом, протекающей по механизму одноэлектронного окисления, в случае с люцигенином реакция протекает по пути восстановления. Присутствие супероксидного радикала в системе является обязательным, и восстановленная форма люцигенина уже не способна реагировать с супероксидом. Поэтому многие авторы считают, что именно люцигенин наиболее чувствителен к присутствию супероксидного радикала в биологических системах [11, 12].

Исследования антиоксидантных веществ на кафедре фармакологии ВолГМА позволили выявить перспективное вещество эноксифол, относящееся к группе конденсированных производных бензимидазола, не уступающее по антиоксидантной активности *in vitro* препаратам дибунол, α -токоферол и пробукол [13].

Целью настоящей работы явилось изучение активности и механизма действия нового антиоксидантного вещества эноксифол в различных модельных системах, сопровождающихся хемилюминесценцией, в сравнении с антиоксидантом мексидолом.

МЕТОДИКА. В работе использовали люминол (ЛМ) (“Serva”, Германия), люцигенин (ЛГ) (“Fluka”, Швейцария), ксантин и ксантиноксидаза (“Sigma”, США), сульфат железа (ЧДА, Украина), субстанция эноксифола (НИИ ФОХ РГУ, Россия), мексидол (ВНИЦ БАВ, Россия).

Антиоксидантные свойства веществ изучали с помощью трех хемилюминесцентных модельных систем: системы аутоокисления люминола, состоящей из люминола, цитрата натрия и железа [14], системы, содержащей липиды куриного желтка [15] и систему с генерацией супероксидного радикала в системе ксантин-ксантиноксидаза в присутствии люцигенина [16].

Хемилюминесценцию измеряли на хемилюминометре “Хемилюминометр-003” (Уфа, Россия), связанного интерфейсом с компьютером IBM Pentium-133.

При измерении Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции липидов реакционная смесь общим объемом 20 мл содержала липиды, полученные из куриного желтка, содержащего липопротеиновые комплексы, сходные с липидами крови. Желток гомогенизировали в фосфатном буфере (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl , pH 7,45) в соотношении 1:1. Содержание белка определяли с помощью кумасси синего и доводили до 1 мг на мл дальнейшим разведением. Инициирование перекисного окисления липидов осуществляли введением раствора $FeSO_4$ (конечная концентрация 2,5 мМ) при интенсивном перемешивании и при температуре 37°C, после чего в течение 10-20 мин измеряли кинетику хемилюминесценции.

Для измерения ХЛ, сопровождающей аутоокисление люминола, в кювету хемилюминометра добавляли фосфатный буфер (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl , pH 7,45), содержащий люминол (1 мкМ) и цитрат натрия (5 мМ) в конечном объеме 20 мл. Инициирование ХЛ осуществляли введением раствора $FeSO_4$ (конечная

концентрация 2,5 мМ) при интенсивном перемешивании, после чего в течение 5 мин измеряли кинетику хемилюминесценции.

Для определения люцигенин-зависимой хемилюминесценции вызывали генерацию супероксидного радикала внесением 0,25 мл ксантиноксидазы (0,25 U/ml) в пробу, содержащую 10 мл фосфатного буфера pH 7,45 (содержащего люцигенин 5 мкМ) и 0,5 мл 1 мМ ксантина. Кинетику хемилюминесценции оценивали в течение 5 мин при интенсивном перемешивании и при температуре 37°C.

Статистическую обработку проводили с использованием парного t-критерия Стьюдента в программе Statistika 5.0, ИК₅₀ рассчитывали методом регрессионных уравнений в программе Microsoft Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В первой серии опытов изучали способность веществ в широком диапазоне концентраций ингибировать люминол-зависимую хемилюминесценцию. Инициацию процесса осуществляли раствором сернокислого железа. Известно, что люминол мало применим при определении супероксида в живых клетках по двум причинам: 1) возможность аутоокисления; 2) низкий квантовый выход при нейтральном pH [10]. Однако аутоокисление люминола может использоваться в модельных системах *in vitro* в присутствии железа и цитрата.

В кинетике протекания реакции аутоокисления люминола можно выделить несколько стадий: фоновое свечение, быстрая вспышка, латентный период и медленное свечение (рис. 1). Как известно, такая кинетика реакции, в первую очередь, описана для окисления липидов [17, 18].

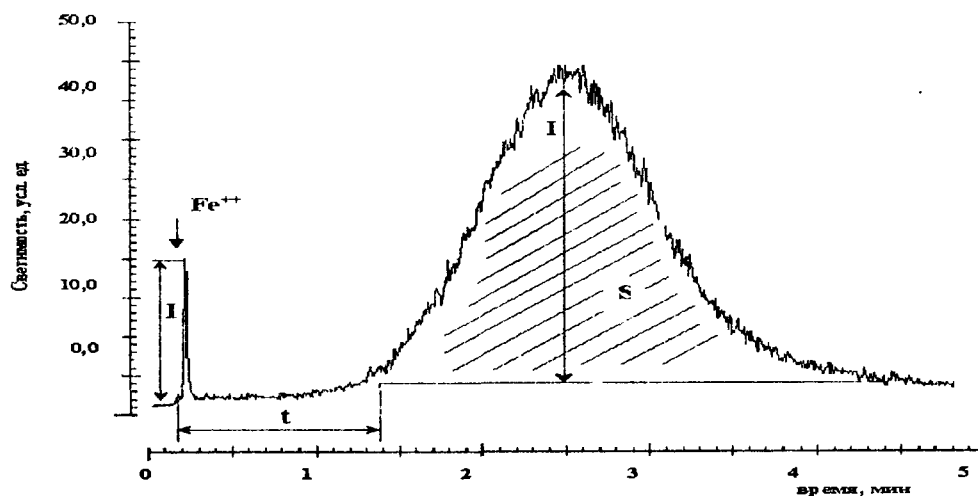


Рисунок 1.

Кинетика реакции Fe^{2+} -индуцированного окисления люминола. Стрелкой обозначен момент инициации процесса ионами Fe^{2+} .

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — интенсивность ХЛ, усл.ед; I_1 — интенсивность быстрой вспышки; t — длительность латентного периода; I_2 — интенсивность медленной вспышки; S — суммарная светимость, измеряемая площадью под кривой хемилюминограммы

Изучаемые вещества оказывали ингибирующее дозозависимое действие на образование радикалов люминола (табл. 1), однако у эноксифола активность проявлялась в диапазоне концентраций 1-10 мкМ, тогда как у мексидола — в диапазоне 10-100 мкМ. Необходимо отметить, что наименее информативным показателем в данной модели оказалась величина I_1 , которая была очень вариабельна как в контроле, так и в экспериментах с веществами, и для окончательных расчетов величин ИК₅₀ был выбран интегративный показатель суммарной светимости S . Также видно, что достоверно изменяется показатель I_2 (рис. 2А), изменения же латентного периода под влиянием изученных веществ не

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В АНАЛИЗЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

происходило. Необходимо отметить, что эноксифол ингибирует реакцию на 50% в концентрациях примерно в 40 раз меньших по сравнению с мексидолом (4,44 и 170,51 мкМ соответственно).

Таблица 1. Влияние эноксифола и мексидола на параметры люминол-зависимой хемилюминесценции.

Вещество	C, мкМ	S, отн.ед.	I ₂ , отн.ед.
Контроль	0,0	76,83±1,21	45,36±1,00
Эноксифол	1	62,93±2,12*	36,38±1,44*
	5	37,03±0,77*	21,09±0,45*
	10	24,59±1,47*	14,10±1,05*
Контроль	0,0	77,06±4,21	44,31±1,76
Мексидол	10	76,70±0,00	45,08±0,01
	50	61,52±0,87 ⁺	35,85±0,78 ⁺
	100	43,82±1,08*	25,27±0,66*

Примечание: C, мкМ - концентрация веществ, S- суммарная светимость, I₂ - амплитуда медленной вспышки; + - p<0,05 по отношению к контролю, * - p<0,001 по отношению к контролю.

Второй использованной моделью была система Fe²⁺-индуцированного окисления липидов. В данном случае кривая ХЛ также имела классический двухфазный характер (рис. 2Б), однако развитие фазы медленного свечения выходило на максимальный уровень только к десятой минуте, после чего отмечалось длительное плато, поэтому в качестве основного был выбран показатель I₂, на основании изменения которого проводились расчеты. Вероятно, такое длительное развитие медленной вспышки обусловлено отсутствием в системе люминола или других веществ, повышающих квантовый выход.

Изучаемые вещества также ингибировали реакцию как показано (табл. 2). Эноксифол оказывал максимальный эффект в концентрации 5 мкМ, уменьшая S и I₂ в среднем на 80,9 и 87,6%, тогда как мексидол наиболее выраженно уменьшал эти показатели в концентрации 500 мкМ, снижая их на 72,58 и 65,7%.

Для детализации механизма антирадикальной активности изучаемых веществ была выбрана система с генерацией супероксидного анион-радикала (O₂^{•-}). Выбор люцигенина в качестве люминофора был неслучаен. В литературе длительное время ведется дискуссия об правомочности использования люцигенина и люминола для индикации O₂^{•-} [11, 12, 19]. При этом большинство авторов [11, 12] склоняется к тому, что именно люцигенин является наиболее чувствительным маркером супероксида.

На рисунке 3 показана кривая ХЛ, возникающая при внесении ксантиноксидазы в систему, содержащую ксантин и люцигенин. После начала реакции внесением ксантиноксидазы практически сразу возникает свечение, достигающее пика на первой минуте и постепенно затухающее к пятой минуте измерения. Наиболее достоверно изменяющимся показателем была амплитуда вспышки.

Установлено, что эноксифол дозозависимо подавлял интенсивность образование супероксида (табл. 3), и ИК₅₀ для него составила 0,96 мкМ (табл. 4). Мексидол оказывал очень слабое влияние на ход реакции только в высоких

концентрациях, и расчетный показатель ИК₅₀ для него составил 167,56 мкМ.

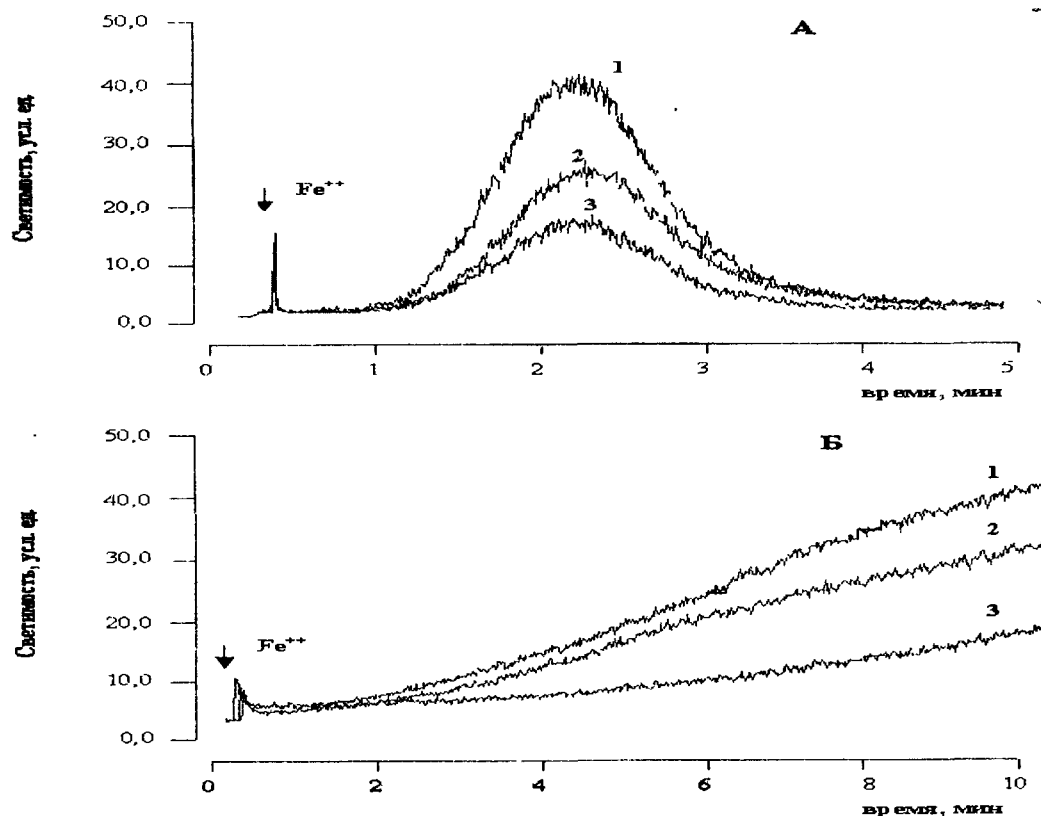


Рисунок 2.

Влияние зноксифола и мексидола на параметры Fe^{2+} -индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции (А) и хемилиминесценции липидов куриного желтка (Б)

Стрелкой обозначен момент инициации процесса ионами Fe^{2+} .

Цифры у кривых - контроль (1), мексидол 100 мкМ (2), зноксифол 1 мкМ (3);
по оси абсцисс - время, мин; по оси ординат - интенсивность ХЛ, усл.ед.

Сравнивая величины ИК₅₀ зноксифола на двух моделях радикальных реакций (люминол-зависимой и люцигенин-зависимой ХЛ), можно отметить, что чувствительность последней почти на порядок выше.

Таким образом, проведенные исследования антиоксидантной активности конденсированного производного бензимидазола зноксифола на моделях ХЛ с использованием люминола и люцигенина показали, что люцигенин является более специфическим маркером по отношению к супероксидному анион-радикалу, однако для его использования необходимо создавать модельную систему с генерацией супероксида, например ксантин-ксантиноксидаза. Необходимо отметить, что ряд авторов считает, что люцигенин наиболее чувствителен к присутствию супероксидного радикала в биологических системах [11]. Вместе с тем использование люминола возможно без создания дополнительных систем, поскольку люминол способен подвергаться аутоокислению, и в этом случае сам становится источником радикалов.

Представляется целесообразным при изучении антирадикальных свойств новых химических веществ использование сразу нескольких маркеров образования свободных радикалов при изучении хемилюминесценции.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В АНАЛИЗЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Таблица 2. Влияние эноксифола и мексидола на параметры Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции липидов.

Вещество	C, мкМ	S, отн.ед.	I ₂ , отн.ед.
Контроль	0,0	215,44±6,38	46,17±0,97
Эноксифол	0,5	200,88±0,02 ⁺	43,55±1,0 ⁺
	1	156,86±5,43 ⁺	36,61±0,58*
	2	87,93±7,379 ⁺	15,12±4,35 ⁺
	5	41,39±3,53 ⁺	5,70±0,76
Контроль	0,0	198,65±15,65	36,74±1,41
Мексидол	50	150,93±16,10	32,07±2,86
	250	97,79±0,44*	21,56±0,45 ⁺
	500	54,45±1,61*	12,57±0,55 ⁺

Примечание: C, мкМ - концентрация веществ, S - суммарная светимость, I₂ - амплитуда медленной вспышки; + - $p < 0,05$ по отношению к контролю, * - $p < 0,001$ по отношению к контролю.

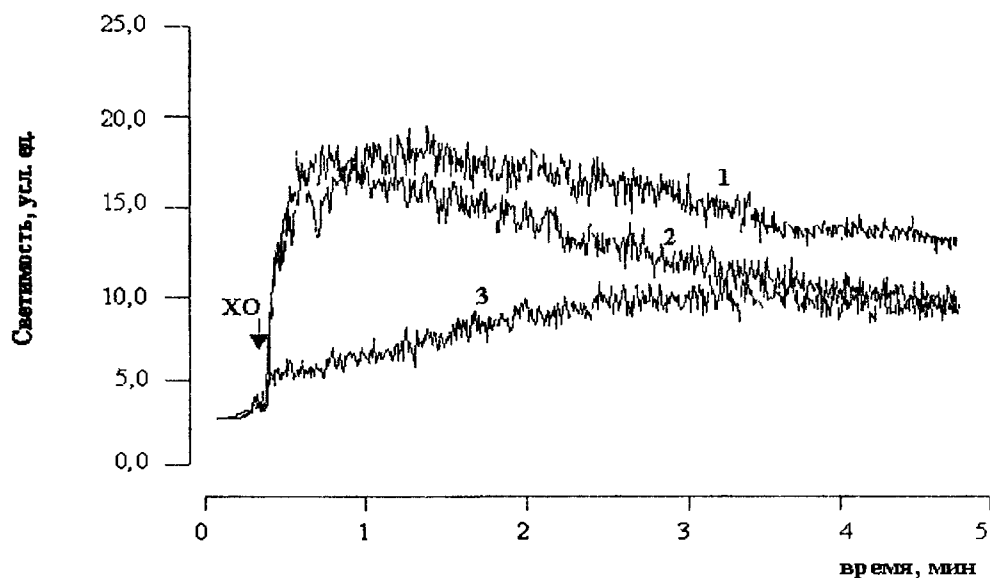


Рисунок 3.

Влияние эноксифола и мексидола на люцигенин-зависимую ХЛ
Стрелкой обозначен момент инициации процесса ксантиноксидазой (ХО)
Цифры у кривых - контроль (1), мексидол 100 мкМ (2), эноксифол 1 мкМ (3);
по оси абсцисс - время, мин; по оси ординат - интенсивность ХЛ, усл. ед.

Таблица 3. Влияние эноксифола и мексидола на параметры люцигенинзависимой хемилюминесценции

Вещество	C, мкМ	S, отн.ед.	I, отн.ед.
Контроль	0,0	61,62±3,80	15,75±1,06
Эноксифол	0,5	42,15±9,20	11,45±2,60
	1	26,79±2,98*	6,96±0,90*
	5	8,44±0,40*	2,75±0,23*
Контроль	0,0	80,81±7,33	20,70±1,68
Мексидол	10	93,32±0,00	21,17±0,00
	50	57,72±1,93	17,95±0,19
	500	22,99±1,56 ⁺	5,77±0,34 ⁺

Примечание: C, мкМ - концентрация веществ, S - суммарная светимость, I - максимальная амплитуда вспышки ХЛ, ⁺ - p<0,05 по отношению к контролю, * - p<0,001 по отношению к

Таблица 4. Величины ИК₅₀ изученных препаратов, мкМ (R2).

Препарат	Люминол- зависимая ХЛ	Fe ²⁺ -индуцированная ХЛ липидов	Люцигенин- зависимая ХЛ
Мексидол	170,51 (0,98)	192,05 (0,91)	167,56 (0,98)
Эноксифол	4,44 (0,99)	1,81 (0,98)	0,96 (0,97)

ЛИТЕРАТУРА

1. Ланкин В.З., Гуревич С.М., Буракова Е.Б. (1975) Труды московского общества испытателей природы, М., 52, 73-78.
2. Прайор У. (1979) Свободные радикалы в биологии, М., Мир.
3. Slater T.F., Sawyer B.C., (1971) Biochem. J., 123, 823-828.
4. Кубатиев А.А., Андреев С.В. (1981) Метаболизм миокарда. М., Медицина, с. 251-262.
5. Владимиров Ю.А. (1999) Эфферентная терапия, 4, 18 - 27.
6. Faulkner K., Fridovich I. (1993) Free Radic. Biol. Med., 15, 447-451.
7. Tarpey M.M., White R., Suarez E., Richardson G., Radi R., Freeman B.A. (1999) Circ. Res., 84, 1203-1211.
8. Rembish S.J., Trush M.A. (1994) Free Radic. Biol. Med., 17, 117-126.
9. Rost M., Karge E., Klinger W. (1998) J. Biolumin. Chemilumin., 13, 355-363.
10. Merenyi G., Lind J.S., Eriksen T.E. (1990) J. Biolumin. Chemilumin., 5, 53-56.
11. Li Y., Zhu H., Kuppusamy P., Roubaud V., Zweier J.L., Trush M.A. (1998) J. Biol. Chem., 273, 2015-2023.
12. Afanas'ev I.B., Ostrachovitch E.A., Korkina L.G. (1999) Arch. Biochem. Biophys., 366, 267-274.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В АНАЛИЗЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

13. *Островский О.В., Косолапов В.А., Спасов А.А., Анисимова В.А.* (1997) Вестник Волгоградской медицинской академии № 3: Сб. науч. трудов, **52**, 36-39.
14. *Семесько С.Г., Фархутдинов Р.Р.* (2002) Клин. лаб. диаг., №5, 33-34.
15. *Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А.* (1995) Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине, Уфа.
16. *Günaydin B., Demiryurek A.T.* (2001) Eur. J. Anaesthesiol., **18**, 816-822.
17. *Владимиров, Ю.А., Арчаков А.И.* (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука.
18. *Клебанов Г.И., Любичкий О.Б., Васильева О.В., Климов Ю.В., Пензулаева О.Б., Тепляшин А.С., Толстых М.П., Проморенко В.К., Владимиров Ю.А.* (2001) Вопр. мед. химии. **47**, 288-300.
19. *Liochev S.I., Fridovich I.* (1998) Free Radic. Biol. Med., **25**, 926-928.

Поступила: 31. 01. 2003 г.

STUDY OF ANTIRADICAL ACTIVITY OF NEW COMPOUNDS BY CHEMILUMINESCENCE

V.A. Kosolapov¹, A.A. Spasov¹, V.A. Anisimova²

¹ Volgograd State Medical Academy, Pavshikh Bortsov Sq., 1, Volgograd, 400131 Russia; tel (8442) 971534, fax: (8442) 364174, e-mail: farm@interdacom.ru;

² Research Institute of Physics and Organic Chemistry, Rostov-on-Don State Medical University

Antioxidative and antiradical properties of a new antioxidant cerebroprotective drug, enoxifol (benzimidazole derivative), were compared with mexidol by means of three chemiluminescent techniques: luminol autooxidation system, Fe²⁺-induced lipid chemiluminescence and lucigenin-induced chemiluminescence with superoxide generation by xanthine-xanthine oxidase system.

Enoxifol exhibited higher antiradical activity than mexidol. This was shown by suppression of luminol radicals and superoxide anion-radical generation. Antioxidant properties of enoxifol were also demonstrated by decreasing of Fe²⁺-induced lipid chemiluminescence.

The recognized properties of enoxifol influencing chemiluminescent processes confirm the results, obtained earlier by means of indirect methods of free radical processes study *in vitro* and *in vivo* (decrease of LPO products, activation of antioxidant enzymes), also can underline its pharmacological effects.

Key words: benzimidazole derivatives, antioxidant drugs, antioxidative activity, antiradical activity, reactive oxygen species, lipid peroxidation, chemiluminescence.