

УДК 615.849.19

©Коллектив авторов

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В ПЕРЕВЯЗОЧНОМ МАТЕРИАЛЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАН

*Г.И. Клебанов¹, О.Б. Любичкий¹, С.Е. Ильина¹, Е.О. Медушева²,
В.В. Рыльцев², В.Н. Филатов²*

¹Кафедра биофизики Российского государственного медицинского университета,
117997, г. Москва, ул. Островитянова д.1;
тел.: (495) 434-11-74; эл. почта: gik@rsmu.ru;

²Научно-исследовательский институт текстильных материалов, Москва

Исследовали антиоксидантную активность трёх ингибиторов свободнорадикальных реакций (СРР): диэтона, мексидола и трипсина, применяемых в составе перевязочного материала для лечения ран. Для этого использовали гетерогенную модельную систему окисления, представляющую собой суспензию многослойных липосом, сформированных из суммарной фракции фосфолипидов желтка куриных яиц. Инициацию СРР перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран липосом осуществляли путём введения в систему ионов двухвалентного железа, а измерение скорости СРР – методом кумарин-активированной хемилюминесценции (ХЛ).

В процессе исследования было обнаружено, что антиоксидантная активность (АОА) индивидуальных ингибиторов ПОЛ, использованных в данной работе, проявлялась в перехвате водных и гидрофобных свободных радикалов и хелатировании (окислении) ионов двухвалентного железа. По своей способности к перехвату радикалов исследованные ингибиторы ПОЛ выстроились по убыванию в следующий ряд: диэтон > трипсин > мексидол. Вместе с тем, у мексидола была выявлена ранее неизвестная способность к взаимодействию с Fe^{2+} , за счёт чего происходила элиминация катализатора СРР, ионов двухвалентного железа в системе.

При исследовании АОА ингибиторов СРР в составе двухкомпонентной смеси, состоящей из диэтона и мексидола, наблюдали эффект полифункциональности: диэтон за счёт перехвата пероксильных радикалов липида увеличивал длительность латентного периода хемилюминограммы, мексидол, взаимодействуя с Fe^{2+} , уменьшал величину этого параметра, т.е. маскировал действие диэтона. При исследовании АОА двухкомпонентной смеси, состоящей из мексидола и трипсина, также наблюдали эффект полифункциональности.

При исследовании АОА двухкомпонентной смеси, состоящей из трипсина и диэтона наблюдали эффект синергизма действия ингибиторов.

Все выявленные антиоксидантные свойства исследованных ингибиторов СРР нашли своё отражение и в составе трёхкомпонентной смеси.

Таким образом, диэтон, мексидол и трипсин обладают высокой АОА, что позволяет их использовать в составе перевязочного материала, применяемого для лечения ран.

Ключевые слова: антиоксиданты, антиоксидантная активность, пероксидное окисление липидов, заживление ран, хемилюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ. Возникновение и развитие большого количества различных воспалительных заболеваний человека и животных проходит в условиях формирования т.н. окислительного стресса [1], что выражается в значительной активации свободнорадикальных реакций (СРР). Для характеристики этих патологических состояний в литературе был введён термин “свободнорадикальные патологии” [2]. Активация свободнорадикальных реакций характерная для подобных заболеваний является результатом:

а) увеличения продукции радикалов-инициаторов, в основном активных форм кислорода (АФК) [3] и появления пула каталитически активных ионов металлов переменной валентности, $\text{Fe}^{2+/3+}$ и $\text{Cu}^{1+/2+}$ [4];

б) ослабления активности сбалансированной эндогенной системы антиоксидантной защиты [5, 6].

Преобладающее образование радикалов-инициаторов приводит к запуску вторичных СРР, субстратами которых могут быть липиды клеточных мембран и липопротеинов плазмы крови, белки и нуклеиновые кислоты. Свободнорадикальная атака этих субстратов приводит к их повреждению и, как следствие, к нарушению их нормального функционирования и в итоге к гибели клеток [7].

С этой точки зрения процесс заживления ран в полной мере можно отнести к “свободнорадикальным патологиям”. Хорошо известно, что после возникновения раны процесс её заживления проходит через три хорошо контролируемые стадии: воспаление, грануляция и ремоделирование [6, 8]. Стадия воспаления раневого процесса характеризуется существенным нарушением микроциркуляции крови, что приводит к гипоксии в области раневого дефекта, а также мощным хемотаксисом и активацией фагоцитов. Эти факторы активируют механизмы, ответственные за продукцию АФК: нарушение транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий, активацию системы ксантин-ксантиноксидаза, формирование “кислородного взрыва” фагоцитов и др. [3]. Одновременно в клетках раневого очага и во всём организме отмечается существенное снижение активности антиоксидантной системы [5, 6, 9]. Таким образом, на стадии воспаления отмечается гиперпродукция радикалов-инициаторов, способных запускать вторичные свободнорадикальные реакции, приводящие к ингибированию механизмов, ответственных за последующие стадии раневого процесса: грануляцию и ремоделирование, т.е. задерживает время заживления ран. Эта ситуация является патогенетическим обоснованием для применения экзогенных антиоксидантов и их смесей с целью нормализации раневого процесса как в клинике, так и в эксперименте путём аппликации антиоксидантных препаратов на поверхность ран [10-13].

Эффективность действия антиоксидантов в заживлении ран (продолгование эффекта, уменьшение концентрации препаратов) значительно возрастает, если их предварительно ввести в состав перевязочного материала [14, 15]. Так возникли раневые повязки, содержащие различные антиоксиданты, протеолитические ферменты, в частности, трипсин, и бактерицидные препараты. В качестве индивидуальных ингибиторов свободнорадикальных реакций, вводимых в состав перевязочного материала, использовали: флавоноиды, диэтон, мексидол, витамин Е, карнозин и др. по отдельности и в виде их смесей [16]. Наиболее яркое лечебное действие на параметры заживления ран было отмечено для повязок, содержащих трипсин, мексидол и диэтон [16]. Однако в литературе отсутствуют какие-либо указания на механизм антиоксидантного действия и активность используемых антиоксидантных препаратов. Особенно это важно в том случае, когда используемый антиоксидантный препарат представляет собой смесь индивидуальных ингибиторов СРР, в составе которой могут проявляться эффекты синергизма и полифункциональности [17].

Для оценки механизма и антиоксидантной активности индивидуальных ингибиторов СРР и их смесей используют модельные системы окисления [18], в состав которых входит по крайней мере два компонента: один – для производства определённого сорта радикалов, а второй – для их перехвата и определения скорости их образования. Для оценки образующихся в модельной системе радикалов обычно используют методы спектрофотометрии, люминесценции и, в частности, хемилюминесцентный анализ [18].

Целью настоящей работы было исследование механизма антиоксидантного действия диэтона, мексидола и трипсина и их смесей, вводимых в состав перевязочного материала, с помощью хемилюминесцентной модельной системы окисления суспензии фосфолипидных липосом, индуцированного ионами двухвалентного железа.

МЕТОДИКА. В работе использовали: 2,3,5,6-1Н,4Н-тетрагидро-9-(2,-бензоимидазолил)хинолизино-(9,9a,1-gh) кумарин (С-525) (“НИОПИК”, Россия); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (хч), трис-(оксиметил)-аминометан (ч) (“Реахим”, Россия); KCl (хч), метанол (хч), хлороформ (хч), ацетон (осч), гексан (чда) (“Химмед”, Россия); 2,6-диметил-3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидропиридин (диэтон) (НИИ органической химии, Латвия), мексидол (ООО “Фармасофт”, Россия), трипсин (“Самсон”, Россия). Растворители перед употреблением подвергали перегонке.

Антиоксидантные свойства мексидола, диэтона и трипсина изучали с помощью гетерогенной системы, суспензии модельных мембран липосом в трис- HCl буфере [19].

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

Процедуру приготовления многослойных фосфолипидных липосом выполняли по методу Bangham и соавт. [21]. Для этого необходимое количество хлороформ-метанольного раствора фосфолипидов помещали в круглодонную колбу и упаривали растворитель на вакуумном роторном испарителе. Сухую липидную плёнку смывали со стенок колбы определенным объемом трис- HCl буфера (20 мМ трис-(оксиметил)-аминометан, pH 7,4). С целью формирования липосом, более однородных по своему размеру, полученную липосомальную суспензию подвергали криолитической обработке путем трехкратного замораживания-оттаивания. Перед использованием суспензию липосом выдерживали не менее 1 часа при 37°C.

Хемилюминесцентные измерения проводили с помощью хемилюминометра ХЛМ-3 (“Бикап”, Россия). Измерение Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции суспензии липосом проводили следующим образом. Реакционная среда общим объёмом 5 мл содержала 0,05 мл суспензии липосом с концентрацией по фосфолипиду 0,4 мг/мл в 20 мМ трис- HCl буфере, pH 7,4. Для активации свечения в систему вводили спиртовой раствор С-525 до конечной концентрации 0,5 мкМ. Инициирование липидной пероксидации осуществляли введением раствора FeSO_4 до конечной концентрации 7 мкМ, после чего в течение 10-30 мин измеряли кинетику хемилюминесценции, которую регистрировали и обрабатывали с помощью интерфейса MacLab/2e (ADInstruments, Австралия), связанного с компьютером Macintosh LCII.

Измерение спектров поглощения проводили на спектрофотометре Specord UV-VIS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для оценки антиоксидантной активности диэтона, мексидола и трипсина использовали модельную систему на основе суспензии многослойных липосом, сформированных в трис- HCl буфере, инициацию перекисного окисления липидов в которых осуществляли раствором сернокислого железа, а детекцию индукции СРР – методом активированной производным кумарина хемилюминесценции [19]. Липосомы представляли собой модель клеточных мембран, и их можно отнести к так называемым структурированным липидам.

Хорошо известно, что введение в систему структурированных липидов (мембраны, липопротеины) ионов двухвалентного железа вызывает развитие характерной кинетики хемилюминесценции, на которой можно выделить несколько стадий: быстрая вспышка, латентный период и медленное свечение [22].

Ранее в работах Ю.А. Владимирова и А.И. Арчакова [22] было показано, что интенсивность быстрой вспышки (h) при определённых условиях пропорциональна концентрации так называемых предсуществующих липидных гидроперекисей, которые образовались в системе по ряду причин до введения Fe^{2+} . Длительность латентного периода (t) зависит от времени достижения “критической” концентрации ионов двухвалентного железа в системе, которое в свою очередь определяется вкладом веществ, влияющих на окисление и/или элиминацию (хелатирование) Fe^{2+} . Амплитуда (H) или светосумма медленного свечения определяется скоростью свободнорадикальных реакций, протекающих в гидрофобной фазе мембран и способностью ингибиторов к перехвату липидных радикалов.

Одним из компонентов комплексного антиоксидантного препарата, применяемого для лечения ран в составе перевязочного материала является диэтон [14, 15]. Диэтон – гидрофобное соединение, плохо растворимое в воде и хорошо растворимое в гидрофобных растворителях: этаноле, хлороформе, диметилсульфоксиде. Структурная формула диэтона представлена на рисунке 1. В открытой печати отсутствуют какие-либо сведения об антиокислительной активности диэтона.

На рисунке 1 представлены результаты исследования влияния диэтона на кинетику Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции суспензии липосом. Было обнаружено, что введение в модельную систему диэтона приводит к уменьшению амплитуды медленного свечения и увеличению длительности латентного периода хемилюминесценции модельной системы.

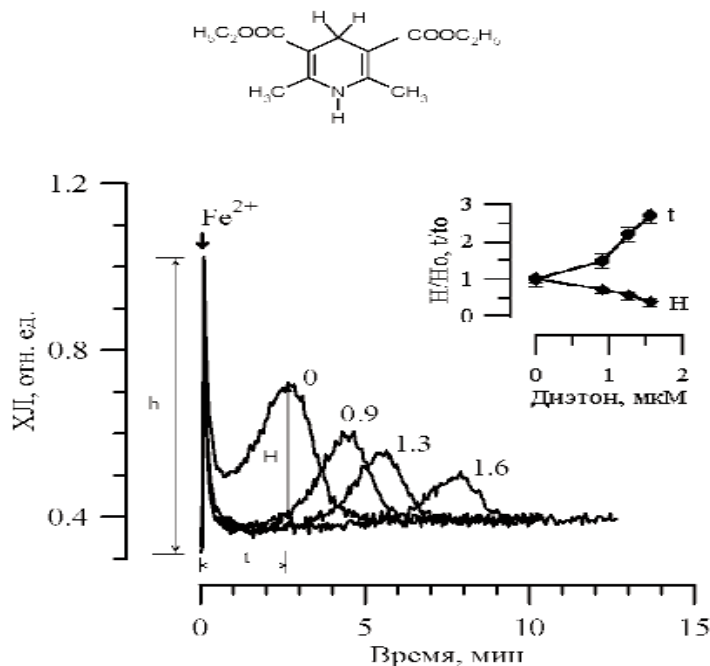


Рисунок 1.

Кинетика ХЛ, сопровождающей окисление фосфолипидных липосом, индуцированное ионами двухвалентного железа, в присутствии диэтона. Цифры у кривых – концентрация диэтона (мкМ).

Стрелкой показан момент введения ионов Fe^{2+} . Реакционная среда общим объёмом 5 мл содержала: липосомы (0,4 мг/мл по фосфолипидам), $FeSO_4$ (7 мкМ), C-525 (0,5 мкМ), ДМСО (10 мкл). По оси абсцисс – время (мин). По оси ординат – интенсивность ХЛ (отн. ед.).

На врезке представлено влияние диэтона на параметры хемилюминесценции. По оси абсцисс – концентрация диэтона (мкМ). По оси ординат – изменение амплитуды медленной вспышки ХЛ (H) и изменение латентного периода (t) относительно контрольных значений (без диэтона, H_0 и t_0).

Вверху представлена структурная формула диэтона.

Ранее уже указывалось, что длительность латентного периода хемилуминограммы суспензии липосом в значительной степени определяется концентрацией в системе Fe^{2+} . Сразу же после введения раствора FeSO_4 в суспензию липосом и окончания быстрой вспышки хемилуминесценции, за время которой концентрация Fe^{2+} уменьшается незначительно, избыток ионов двухвалентного железа за счёт взаимодействия с пероксильными радикалами субстрата окисления, ненасыщенными жирными кислотами, вызывает тушение хемилуминесценции, что проявляется в формировании латентного периода хемилуминограммы. На протяжении латентного периода за счёт окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} или хелатирования Fe^{2+} происходит уменьшение стационарной концентрации катализатора (Fe^{2+}). При достижении определённой т.н. “критической” концентрации ионов двухвалентного железа в системе способность Fe^{2+} к перехвату пероксильных радикалов липида ($\text{RO}_2\cdot$) исчезает и восстанавливается каталитическая функция Fe^{2+} , латентный период хемилуминесценции заканчивается и начинается развитие медленного свечения.

В связи с этим длительность латентного периода хемилуминограммы может определяться вкладом веществ, влияющих на концентрацию Fe^{2+} . К числу подобных факторов следует отнести хелаторы (комплексообразователи) и вещества, воздействующие на состояние ионов железа: окислители и восстановители. Хорошо известно, что ЭДТА, фосфаты, десферал – это вещества, хелатирующие ионы Fe^{2+} , образующие с этими ионами более или менее прочные комплексы. Входящие в них ионы Fe^{2+} не обладают каталитической активностью. Такие вещества, введённые в систему, будут уменьшать длительность латентного периода. Таким же влиянием будут обладать окислители Fe^{2+} в Fe^{3+} . Так действует на величину латентного периода и церулоплазмин – плазменный белок, обладающий ферриоксидазной активностью [23]. И, наоборот, восстановители (например, аскорбат, восстанавливающий Fe^{3+} в Fe^{2+}), осуществляющие регенерацию катализатора, будут увеличивать длительность латентного периода хемилуминограммы суспензии липосом [24].

Вместе с тем, следует упомянуть и о способности некоторых антиоксидантов влиять на длительность латентного периода. Дело в том, что спонтанное окисление двухвалентного железа, введённого в суспензию липосом без каких-либо добавок, на протяжении латентного периода хемилуминограммы происходит в реакциях Fe^{2+} с кислородом и пероксильными радикалами ненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов [22]. В присутствии перехватчиков этих радикалов доля $\text{RO}_2\cdot$ радикалов, взаимодействующих с Fe^{2+} уменьшается, что уменьшает скорость реакций окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} и, следовательно будет увеличиваться время латентного периода. Иными словами, в присутствии антиоксиданта на фоне уменьшения интенсивности медленного свечения может происходить увеличение длительности латентного периода хемилуминограммы.

На рисунке 1 (врезка) приведены результаты титрования суспензии липосом диэтоном. Видно, что вплоть до концентрации 0,9 мкМ диэтон не оказывает сколько-нибудь существенного влияния на величины измеряемых хемилуминесцентных параметров. Дальнейшее увеличение концентрации в интервале от 0,9 до 1,3 мкМ приводит к значительному тушению амплитуды медленного свечения хемилуминограммы и увеличению длительности латентного периода. Это говорит о том, что основной механизм антиоксидантного действия диэтона состоит в перехвате и элиминации гидрофобных пероксильных радикалов липидов.

Следующей задачей работы было определение антиокислительной активности используемых ингибиторов свободнорадикальных реакций в составе двойных смесей. Из литературы известно что в составе смеси индивидуальные антиоксиданты могут проявлять несколько эффектов: синергизм действия, аддитивность и полифункциональность. Так, было показано, что аскорбат в смеси с α -токоферолом, обладает способностью к регенерации токоферил-радикалов, образующихся в реакции α -токоферола с пероксильными радикалами и тем самым

проявляет себя как синергетик [24]. С другой стороны, ингибиторы СРР в составе смеси могут действовать независимо друг от друга, т.е. обладать свойством аддитивности. Наконец, ингибирование СРР, в частности, липидной пероксидации может идти по нескольким механизмам: перехват водных свободных радикалов-инициаторов, перехват свободных радикалов, локализованных в гидрофобной липидной фазе мембран и липопротеинов и элиминация ионов-катализаторов СРР. Если компоненты антиоксидантной смеси могут ингибировать процесс перекисного окисления липидов независимо по нескольким механизмам, то такая смесь ингибиторов СРР будет обладать свойством полифункциональности.

Ранее нами было показано, что производные оксипиридина, такие как мексидол, эмоксипин, проксипин [17], способны ингибировать СРР. Обнаруженный антиоксидантный эффект был связан, по-видимому, с уменьшением под действием этих веществ каталитически активных ионов двухвалентного железа. Поэтому, если действие диэтона (перехватывание пероксильных радикалов) дополнить действием мексидола (элиминация из системы ионы Fe^{2+}), то это будет смесь, обладающая свойствами полифункциональности.

Действительно, при введении в суспензию липосом смеси, состоящей из диэтона и мексидола был обнаружен такой эффект. Из рисунка 2 видно, что мексидол, введённый в систему в концентрации 1 мМ, уменьшал почти вдвое интенсивность медленного свечения хемилюминограммы. Диэтон (1,56 мкМ) наряду с уменьшением амплитуды медленной вспышки значительно увеличивал длительность латентного периода. При совместном добавлении диэтона и мексидола в модельную систему было обнаружено, что величина латентного периода уменьшилась примерно в 2 раза (для диэтона латентный период составлял примерно 10 мин, в смеси с мексидолом - 5 мин). Иными словами, диэтон как перехватчик пероксильных радикалов липида уменьшал скорость окисления ионов Fe^{2+} в реакции взаимодействия с RO_2^{\cdot} радикалами и тем самым увеличивал длительность латентного периода, а мексидол за счёт взаимодействия с ионами двухвалентного железа (хелатирования и возможно их окисления), сокращал длительность латентного периода.

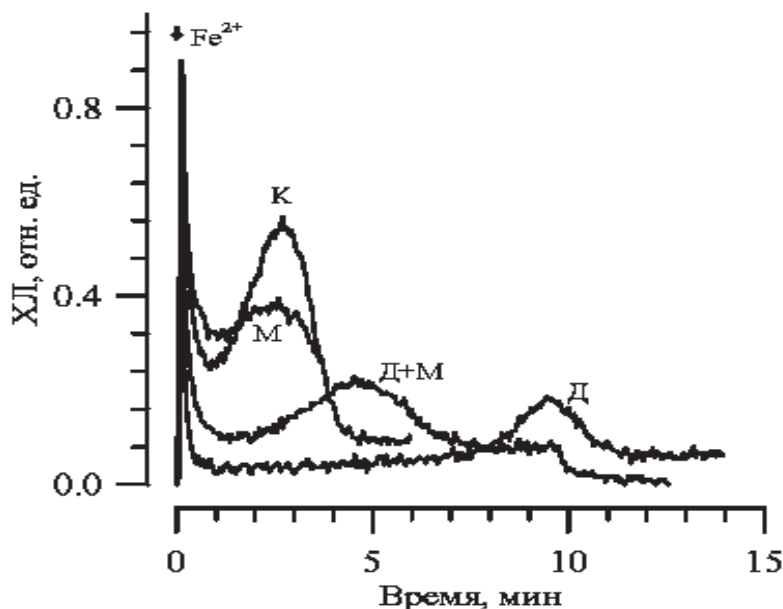


Рисунок 2.

Кинетика ХЛ, сопровождающей окисление фосфолипидных липосом, индуцированное ионами двухвалентного железа, без (К) и в присутствии 1,56 мкМ диэтона (Д), 1 мМ мексидола (М) и смеси диэтона и мексидола в тех же концентрациях (Д+М). Стрелкой показан момент введения ионов Fe^{2+} . Состав реакционной среды как на рис. 1. По оси абсцисс – время (мин). По оси ординат – интенсивность ХЛ (отн. ед.).

Для доказательства самого факта и возможного механизма взаимодействия мексидола с Fe^{2+} (хелатирование или окисление ионов железа) были измерены спектры поглощения мексидола без и в присутствии ионов двухвалентного железа (рис. 3а).

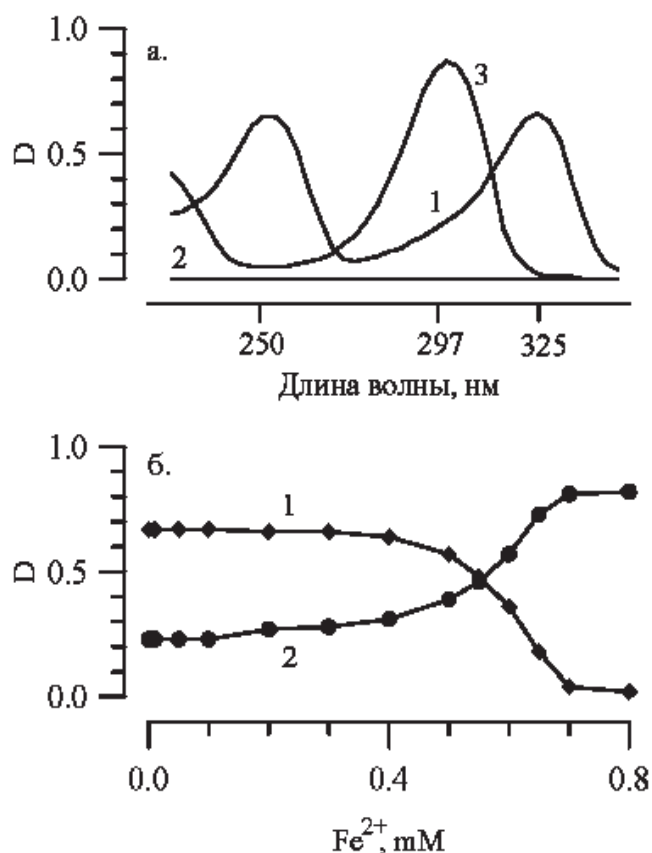


Рисунок 3.

- (а) Спектры поглощения мексидола (100 мкМ) (1), FeSO_4 (800 мкМ) (2) и их смеси (3) в 20 мМ трис-НСl буфере, pH 7,4. По оси абсцисс длина волны (нм). По оси ординат – оптическая плотность. Измерения проводились относительно трис-НСl буфера.
- (б) Влияние концентрации ионов двухвалентного железа на оптическую плотность раствора мексидол при длине волны 325 нм (1) и 297 нм (2). Состав реакционной среды: 100 мкМ мексидол в 20 мМ трис-НСl буфере, pH 7,4.

Было обнаружено, что раствор мексидола в трис-НСl буфере имеет характерный спектр поглощения в интервале длин волн 200-400 нм с двумя максимумами поглощения при длине волны 255 и 325 нм. При добавлении к мексидолу раствора FeSO_4 наблюдается существенное изменение спектра поглощения антиоксиданта, а именно: оптическая плотность в максимумах поглощения мексидола уменьшается и появляется концентрационно-зависимое увеличение оптической плотности при длине волны 295 нм, что свидетельствует об образовании продукта реакции мексидол- Fe^{2+} . Зависимость изменения оптической плотности раствора мексидола от концентрации добавленного Fe^{2+} представлена на рисунке 3б. Видно, что по мере увеличения концентрации Fe^{2+} в интервале значений 0-400 мкМ оптическая плотность при длине волны 325 нм (поглощение мексидола) и при длине волны 295 нм (поглощение продукта реакции мексидол- Fe^{2+}) не претерпевают сколько-нибудь значительных изменений, начиная с концентрации ионов железа 400 мкМ, обнаруживается уменьшение оптической плотности раствора при длине волны 255 нм и увеличение D_{295} . При дальнейшем увеличении концентрации Fe^{2+} , в интервале значений концентраций железа 400-700 мкМ происходит резкое изменение соответствующих оптических плотностей. D_{325} уменьшается с 0,7 практически до 0, а D_{295} увеличивается

с 0,3 до 0,8. Это означает, что мексидол способен взаимодействовать с ионами Fe^{2+} в химической реакции с образованием продуктов этой реакции, обладающих способностью поглощать ультрафиолетовое излучение при длине волны, отличной от максимума поглощения мексидола в оптимальном соотношении 1:7. При этом ионы Fe^{2+} , по-видимому, окисляются до Fe^{3+} . В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что в процессе этой реакции раствор приобретает бурую окраску, а при большой концентрации добавленного раствора FeSO_4 происходит выпадение бурого осадка.

Таким образом, обнаружено ранее неизвестное свойство мексидола, как ингибитора СРР – его способность к взаимодействию с Fe^{2+} , - приводящее к окислению Fe^{2+} в Fe^{3+} , уменьшению пула каталитически активных ионов двухвалентного железа в системе и, как следствие, к ингибированию свободнорадикального перекисного окисления липидов.

Комплексный препарат, который включается в перевязочный материал для ускорения заживления ран [14], кроме антиоксидантов (мексидола и диэтона) содержал ещё и трипсин. Назначение этого компонента в комплексном препарате состояло, по мнению авторов, в протеолитической деградации некротического материала раны для улучшения очистки раневого дефекта. С другой стороны, известно что некоторые белки, например, альбумин, казеин, лактоферин и др., могут быть ингибиторами СРР как за счёт взаимодействия со свободными радикалами, так и по причине хелатирования ионов - катализаторов свободнорадикальной перекисидации липидов [22].

В связи с этим было интересно выяснить способен ли трипсин оказывать какое-либо влияние на хемилюминесцентные параметры суспензии липосом. Введение трипсина вызывало увеличение длительности латентного периода и тушение амплитуды медленного свечения (рис. 4). Иными словами, трипсин ингибирует перекисное окисление липидов мембран липосом аналогично таким гидрофобным перехватчикам свободных радикалов как α -токоферол, ликопин [19] и диэтон.

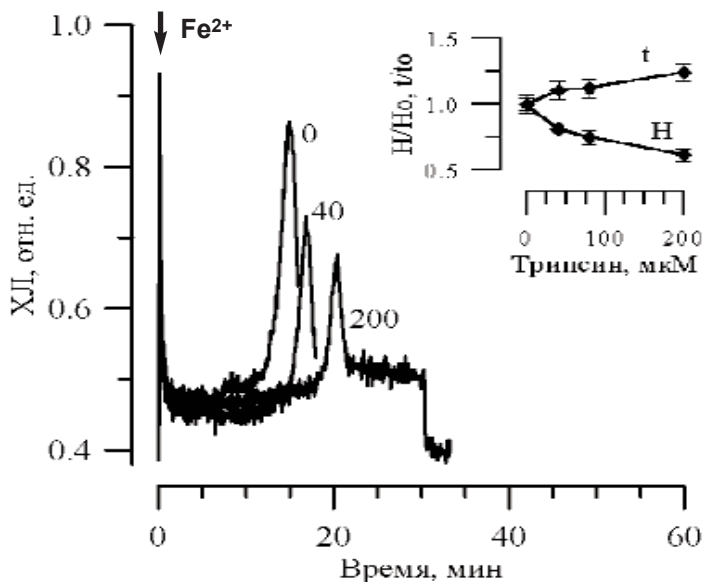


Рисунок 4.

Кинетика ХЛ, сопровождающей окисление фосфолипидных липосом, индуцированное ионами двухвалентного железа, в присутствии трипсина. Цифры у кривых – концентрация трипсина (мкМ). Стрелкой показан момент введения ионов Fe^{2+} . Реакционная среда общим объёмом 5 мл содержала: липосомы (0,4 мг/мл по фосфолипидам), FeSO_4 (7 мкМ), С-525 (0,5 мкМ). По оси абсцисс – время (мин). По оси ординат – интенсивность ХЛ (отн. ед.).

На врезке представлено влияние трипсина на параметры хемилюминесценции. По оси абсцисс – концентрация трипсина (мкМ). По оси ординат изменение амплитуды медленной вспышки ХЛ (H) и изменение латентного периода (t) относительно контрольных значений (без трипсина, H_0 и t_0).

При исследовании действия смеси мексидола и трипсина на хемилюминесцентные параметры суспензии липосом было обнаружено, что (рис. 5) трипсин, взятый в концентрации 200 мкМ, увеличивал длительность латентного периода хемилюминограммы и уменьшал амплитуду медленного свечения суспензии липосом примерно в два раза. Мексидол в концентрации 1 мМ также уменьшал интенсивность хемилюминесценции, но в противоположность трипсину уменьшал величину латентного периода. При введении в модельную систему смеси, содержащей трипсин и мексидол в тех же концентрациях, наблюдали увеличение длительности латентного периода, величина которой составила около 70% по отношению к величине латентного периода при действии только трипсина. То есть, при действии трипсина и мексидола в составе двухкомпонентной смеси наблюдается эффект полифункциональности: трипсин за счёт своей антиоксидантной активности увеличивает длительность латентного периода хемилюминограммы, а мексидол за счёт взаимодействия с ионами двухвалентного железа маскировал влияние трипсина на латентный период.

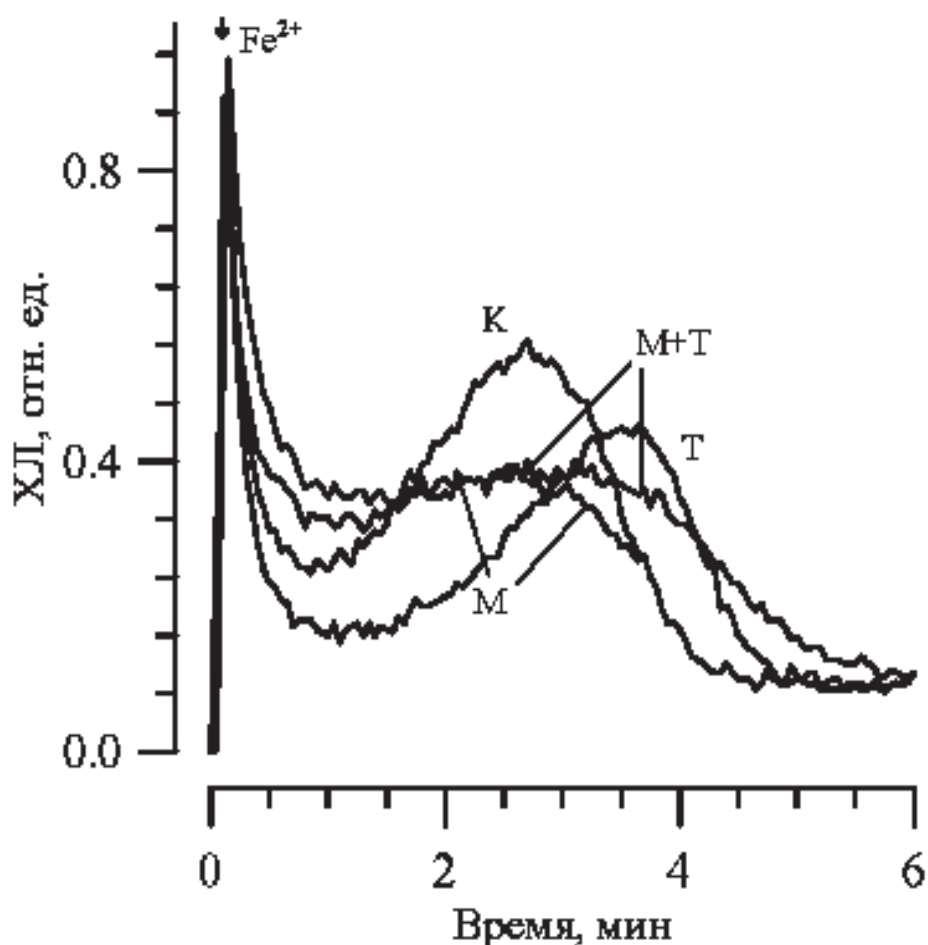


Рисунок 5.

Кинетика ХЛ, сопровождающей окисление фосфолипидных липосом, индуцированное ионами двухвалентного железа, без (K) и в присутствии 1 мМ мексидола (M), 200 мкМ трипсина (T) и смеси мексидола и трипсина в тех же концентрациях (M+T). Стрелкой показан момент введения ионов Fe^{2+} . Состав реакционной среды как на рис. 4. По оси абсцисс – время (мин). По оси ординат – интенсивность ХЛ (отн. ед.).

Таким образом, в составе двухкомпонентной смесей мексидол-трипсин, мексидол-диэтон наблюдали эффект полифункциональности действия использованных ингибиторов СРР.

АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

При использовании двухкомпонентной смеси, состоящей из трипсина и диэтона (рис. 6), наблюдали эффект синергизма. Так, если величина латентного периода хемилюминограммы суспензии липосом при введении трипсина в концентрации 200 мкМ составила чуть более 3-5 мин, а длительность латентного периода хемилюминесценции модельной системы в присутствии 1,56 мкМ диэтона – около 9,5 мин, то совместное действие двух ингибиторов свободнорадикальных реакций увеличило длительность латентного периода до 17 мин. То есть совместное действие трипсина и диэтона значительно перекрывает аддитивное влияние этих двух ингибиторов. Механизм синергического действия трипсина и диэтона по влиянию на величину латентного периода не ясен и потребуются дополнительные исследования для его изучения.

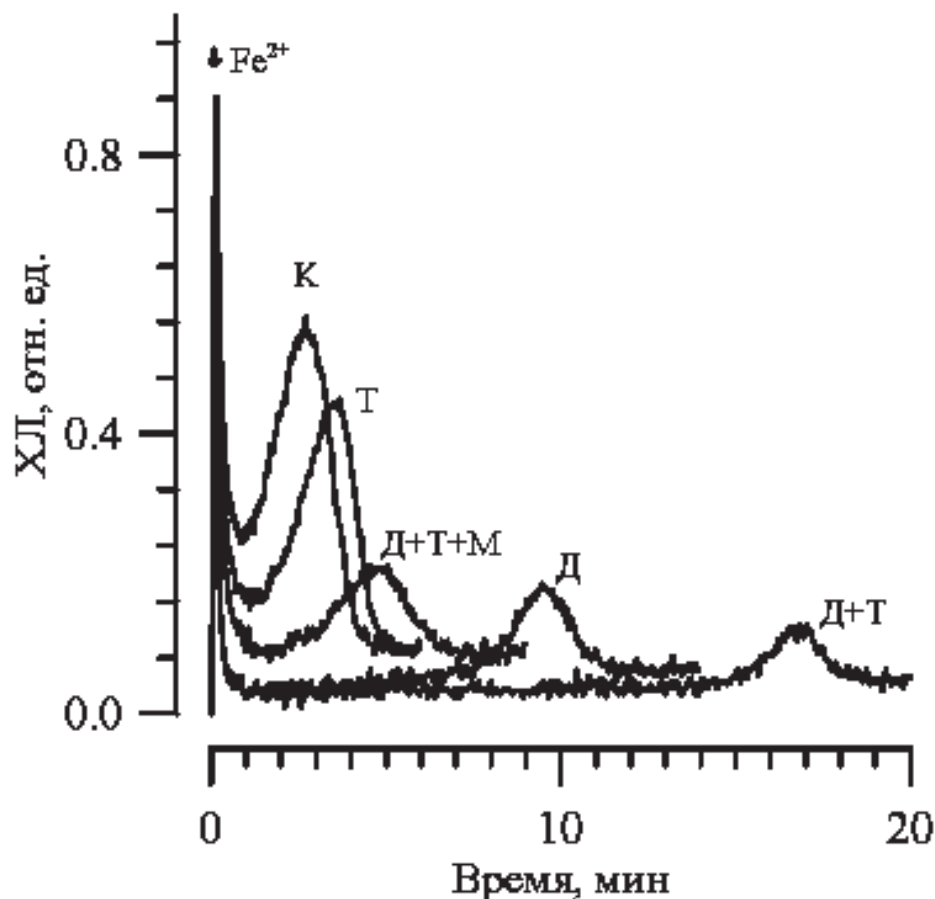


Рисунок 6.

Кинетика ХЛ, сопровождающей окисление фосфолипидных липосом, индуцированное ионами двухвалентного железа, без (К) и в присутствии 1,56 мкМ диэтона (Д), 200 мкМ трипсина (Т), смеси диэтона (1,56 мкМ) и трипсина (200 мкМ) (Д+Т) и смеси диэтона (1,56 мкМ), трипсина (200 мкМ) и мексидола (1 мМ) (Д+Т+М). Стрелкой показан момент введения ионов Fe^{2+} . Состав реакционной среды как на рис. 1. По оси абсцисс – время (мин).

По оси ординат – интенсивность ХЛ (отн. ед.).

Все выявленные антиоксидантные свойства исследованных ингибиторов СРР нашли своё отражение и в составе трёхкомпонентной смеси. На рисунке 6 представлены результаты влияния смеси диэтона, мексидола и трипсина на ХЛ суспензии фосфолипидных липосом. Видно, что латентный период для тройной смеси (около 5 мин) меньше, чем аналогичные значения для диэтона и смеси диэтона с трипсином (10 и 17 минут соответственно). То есть как и в случае смесей диэтон-мексидол и трипсин-мексидол, мексидол маскировал действие остальных антиоксидантов за счёт его взаимодействия с ионами двухвалентного железа.

Подводя итог анализу полученных результатов, можно заключить, что вещества мексидол, диэтон и трипсин, введенные в состав перевязочных материалов, за счёт полифункциональности и аддитивности действия являются эффективными ингибиторами свободнорадикальных реакций перекисного окисления липидов, что способствует ускорению заживления ран.

Процесс заживления ран это многостадийный физиологический процесс, включающий сложную координированную систему регуляции с участием многих сигнальных молекул и различных типов клеток. Часть из них осуществляет элиминацию погибших клеток и их фрагментов, клеток бактерий и продуктов их жизнедеятельности. Другие – индуцируют восстановление ткани в раневом дефекте [8].

Заживление ран в разных тканях протекает в общих чертах одинаково и не зависит в принципе от характера повреждения. Этот процесс можно, хотя и несколько произвольно, разделить на 3 основные, часто перекрывающиеся стадии: воспаление, грануляции и ремоделирование [16]. Каждая из этих стадий характеризуется деятельностью особой популяции клеток [25].

В настоящее время установлено, что различные антиоксиданты оказывают положительное влияние на все три стадии раневого процесса [6].

Возникновение и развитие раневых дефектов относится к “свободнорадикальным патологиям”, характеризующимися активацией свободнорадикальных реакций. В качестве доказательства этого тезиса приводят две линии экспериментальных результатов.

1. Все способы увеличения продукции активных форм кислорода, таких как супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гипохлорит ($ClO^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) *in vitro* и *in vivo* приводят либо к образованию раневых очагов, либо к торможению их заживления [5, 26].

2. Применение экзогенных перехватчиков АФК и свободных радикалов в липидной фазе клеточных мембран, либо активация эндогенной антиоксидантной системы способствуют более быстрому и эффективному заживлению ран [10-13].

Стадия воспаления раневого процесса обычно проходит в условия гиперпродукции АФК и появления каталитически активных ионов Fe^{2+} [27]. Одновременно отмечается значительная инактивация сбалансированной эндогенной антиоксидантной системы [5, 6]. Всё это приводит к значительной активации вторичных свободнорадикальных реакций, субстратами которых являются липиды, белки и нуклеиновые кислоты. Перекисная деградация мембранных липидов, клеточных белков и нуклеиновых кислот является причиной формирования апоптоза и некроза в области раневого дефекта и в прилегающих тканях. Какие механизмы обеспечивают гиперпродукцию АФК на стадии воспаления раневого процесса? Первичное событие, которое возникает сразу же после образования раны – это изменения в сосудистом русле (вазоконстрикция) и коагуляция. Нарушение целостности сосудов сопряжено с выходом компонентов крови в окружающую ткань. Одним из последствий этого является активация агрегации тромбоцитов, которые в агрегированном состоянии закрывают дефекты в поражённых сосудах, т.е. тромбоциты выполняют роль тромбоцитарной пробки, действие которой усиливается полимеризацией фибрина [8]. Полимеризованный фибрин в ране действует в качестве подложки или своеобразной матрицы, по которой осуществляется миграция в рану лейкоцитов: вначале нейтрофилов, а затем и макрофагов. При этом за счёт формирования “кислородного взрыва” фагоцитов в ране продуцируется валовое количество АФК. Формирование ишемии с последующей реперфузией активирует другие системы продукции АФК: систему ксантин-ксантиноксидаза и нарушение транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий [3]. Гиперпродукция АФК, появление пула ионов Fe^{2+} инициирует вторичные СРР, которые вызывают поражение клеток в ране и тем самым тормозят смену стадий раневого процесса.

Вместе с тем, в последнее десятилетие в молекулярной и клеточной биологии произошли два события, изменившие наши представления о роли АФК

в регуляции ряда клеточных функций, имеющих прямое отношение к процессу заживления ран.

1. Было обнаружено, что образование АФК в цитоплазме ряда клеток: лейкоцитах, клетках эндотелия, фибробластах, кератиноцитах и др. в микромолярном диапазоне концентраций является первичной стадией запуска процесса синтеза ряда белков, цитокинов, факторов роста и пролиферации клеток [28, 29].

В качестве доказательства этого положения можно привести два экспериментальных факта. Во-первых, для регистрации образовавшихся АФК в цитоплазме клеток при стимуляции синтетических реакций был использован внутриклеточный флуоресцентный зонд, дихлорфлуоресцеин-диацетат (DCFH-DA), с помощью которого было показано, что стимуляция клеток факторами, запускающими синтез белков, сопровождается увеличением интенсивности люминесценции зонда в клетках, что свидетельствует о возрастании количества АФК в цитоплазме клеток [30, 31]. Во-вторых, при использовании различных перехватчиков свободных радикалов стимулированный синтез белков отменялся [32].

Таким образом, образование небольшого количества АФК в цитоплазме клеток может регулировать синтез большого количества биологически активных субстанций и, в частности, цитокинов и факторов роста. Однако, если в результате воздействия на клетки-мишени в цитоплазме клеток образуется большое количество АФК (миллимолярный диапазон концентраций), это вызывает ингибирование синтеза цитокинов, факторов роста, синтеза коллагена, пролиферации клеток, т.е. торможение смены стадий заживления ран и переход раны в состояние долго незаживающей.

2. Исследования последних лет показали, что заживление ран, равно как и репаративная регенерация некоторых органов и кровеносных сосудов, определяется вкладом скоординированных реакций различных клеток повреждённой ткани, которые в свою очередь регулируются цитокинами [25].

Цитокины – это полипептиды, синтезируемые различными клетками, в частности, лейкоцитами, кератиноцитами и др., обладающие большим набором свойств биологической активности [8]. Первыми были выделены вещества, которые вызывали пролиферацию клеток и поэтому они были названы факторами роста. Позже выяснилось, что подобные субстанции способны регулировать и другие важные функции клеток, как рост и дифференцировку, миграцию и хемотаксис, синтез белков и цитокинов, стимуляцию ангиогенеза и пролиферации клеток. Отсюда и возникло название цитокины. Цитокины участвуют в регуляции основных стадий раневого процесса, являясь продуктом активации свободнорадикального механизма их синтеза. Ранее уже указывалось, что нормальный запуск свободнорадикального механизма синтеза цитокина и пролиферации клеток возможен лишь при условии образования определённого уровня концентрации АФК. В случае же гиперпродукции радикалов-инициаторов синтез ингибируется. В связи с этим становится понятной роль антиоксидантов-перехватчиков большого количества АФК в клетках, понижения уровня их концентрации до нормального и запуска регуляторных механизмов раневого процесса.

Влияние антиоксидантов на профиль содержания АФК, динамику содержания регуляторных цитокинов, оксида азота и параметры свободнорадикального статуса в экссудате модельных ран у крыс будут предметом наших последующих публикаций.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Hensley K., Kart A., Robinson S., Gabitte P., Salsman S., Floyd R.A. (2000) Free Radic. Biol. Med., **28**, 1456-1462.
2. Harmann D. (1984) Age, **7**, 111-137.
3. Weiss J.L. (1984) Acta Physiol. Scand. Suppl., **548**, 9-57.
4. Владимиров Ю.А. (2000) Соросовский образовательный журнал, **6**, 13-19.

5. *Shukla A., Rasik A.M., Patnaik G.K.* (1997) *Free Radic. Res.*, **26**, 93-101.
6. *Mcdaniel D.H., Ash K., Lord J., Newman J., Zukowski M.* (1998) *Dermatol. Surg.*, **24**, 661-664.
7. *Vladimirov Yu.A.* (1986) In: *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases*. N-Y-London, Alan R. Liss Inc., pp. 141-195.
8. *Hart J.* (2002) *J. Wound Care*, **11**, 205-209.
9. *Royas A.I., Phillips T.J.* (1995) *Dermatol. Surg.*, **25**, 601-604.
10. *Sarsozen B., Durak K., Dincer G., Bilgen O.F.* (2002) *J. Int. Med. Res.*, **30**, 309-323.
11. *Hallberg C.K., Trocme S.D., Ansari N.H.* (1996) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **93**, 3-12.
12. *Galliano M., Torre V., Deodata B., Campo J.M., Colonna M., Sturiadle A., Squadrito F., Cavailari V., Cicinotta D., Altavilla B.M.* (2001) *Surgery*, **129**, 467-477.
13. *Altavilla D., Saitta A., Cucinotta D., Gallana D.M., Deuderta B., Colonna M., Torre V., Russo G., Sardelle A., Urna G., Campo G.M. Cavalaari V., Squadrito G., Squadriti F.* (2001) *Diabetes*, **50**, 667-674.
14. *Тостых Г.П.* (1995) Новые перевязочные материалы с антиоксидантной активностью в лечении гнойных ран. Автореф. дисс. к.м.н., М.
15. *Medousheva E.O., Filatov V.N., Ryltsev V.V.* (2002) *Int. Conference on Biocatalysis, Abstract 2002, Moscow*, p. 114.
16. *Назаренко Г.И., Сугурова И.Ю., Глянцев С.П.* (2002) Рана, повязка, больной. М., Медицина.
17. *Клебанов Г.И., Любичкий О.Б., Васильева О.В., Климов Ю.В., Пензулаева О.Б., Тепляшин А.С., Толстых М. П., Пономаренко В.К., Владимиров Ю.А.* (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 288-300.
18. *Клебанов Г.И. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Владимиров Ю.А.* (1999) *Вестн. РАМН*, №2, 15-22.
19. *Васильева О.В., Любичкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* (1998) *Биол. мембраны*, **15**, 177-183.
20. *Folch J., Lee S.M., Sloane-Stanley G.* (1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
21. *Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C.* (1965) *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252.
22. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* (1972). Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука.
23. *Winyard P., Lunec J., Bransford S., Blake D.* (1984) *Int. J. Biochem.*, **12**, 1273-1278.
24. *Васильева О.В., Любичкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* (2000) *Биол. мембраны*, **17**, 42-49.
25. *Клебанов Г.И., Толстых М.П., Климов Ю.В., Раджабов А.А.* (2001) *Биомедицинская электроника*, №2, 15-29.
26. *Senel O., Centincalle O., Ozbay G., Ahcioglu F., Bulan R.* (1997) *Annal. Plast. Surg.*, **39**, 516-523.
27. *Рагимов И.Р., Хохлов А.П., Мамедов Л.Н., Гаранина С.С.* (1992) *Вопр. мед. химии*, **38**, 25-26.
28. *Murell G.A.C., Francis M.J.O., Bromley L.* (1990) *Biochem J.*, **265**, 659-665.
29. *Los M., Droge W., Sticker K., Baeurle P.A., Schulze-Osthoff K.* (1995) *Eur. J. Immunol.*, **25**, 159-165.
30. *Vint Y.A.M., Foreman J.C. and Chain B.M.* (1994) *Eur. J. Immunol.*, **24**, 1961-1965.
31. *Klebanov G.I., Poltanov E.A.* (2003) *Laser Physics*, **13**, 1-14.
32. *Клебанов Г.И., Полтанов Е.А., Долгина Е.А., Никанкина Л.А., Анохина Е.Б., Ганковская Л.В., Крейнина М.В., Владимиров Ю.А.* (2002) *Биол. мембраны*, **19**, 391-402.

Поступила: 28. 04. 2003.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FREE-RADICAL REACTIONS INHIBITORS,
APPLIED TO THE DRESSING MATERIAL FOR WOUND HEALING

*G.I. Klebanov¹, O.B. Lyubitsky¹, S.E. Ilina¹, E.O. Medusheva²,
V.V. Riltsev², V.N. Filatov²*

¹Department of Biophysics of Russian State Medical University, Ostrovityanova ul., 1, Moscow, 117997 Russia; tel.: (495) 434-11-74; e-mail: gik@rsmu.ru;

²Research Institute of Textile Material, Moscow, Russia.

Antioxidant activity (AA) of inhibitors of free radical reactions (FRR) (dieton, mexidol, trypsin), applied to the dressing material for wound healing was studied. In our work we used a model system containing suspension of laminated liposome, formed from fraction of total chicken yolk phospholipids. Lipid peroxidation (LPO) of liposome membranes was initiated by addition of Fe^{2+} ions. The kinetics of FRR was followed by coumarine-enhanced chemiluminescence (CL).

It was found that AA of the inhibitors was determined by their ability to intercept aqueous and hydrofobic free radicals and chelate Fe^{2+} ions. Their ability to intercept radicals reduced in the following order: dieton > trypsin > mexidol. In addition we discovered unknown ability of mexidol to interact with Fe^{2+} , that resulted in elimination of FRR catalyst.

Investigating AA of the FRR inhibitors in the two-components mixture, consisting of dieton and mexidol, we observed the effect of multifunctionality: dieton, increased the duration of latent period of CL by intercepting lipid peroxy radicals, while mexidol, decreased its value by interacting with Fe^{2+} , i.e. mexidol masked the action of dieton. Investigating AA of two-components mixture, consisting of mexidol and trypsin, we observed the same effect of multifunctionality. In the two-component mixture, consisting of trypsin and dieton, the action of the inhibitors was found to be synergistic.

All antioxidant properties of these FRR inhibitors were also preserved in the three component mixture.

Hence, mixture components, dieton, mexidol and trypsin, possess high AA, that validates their use in dressing materials employed for wound healing.

Key words: antioxidant, antioxidant activity, lipid peroxidation, wound healing, scavenge, chemiluminescence.