

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ВЕДУЩЕЕ ВЫСШЕЕ УЧЕБНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 615.275-02:543.272.1-018.53

Бизунок Наталья Анатольевна

**ФАРМАКОЛОГИЯ ФАГОЦИТАРНОЙ ГЕНЕРАЦИИ
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Минск 2003

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Избыточное накопление активных форм кислорода (АФК) в тканях с нарушением их структурно-функциональной организации носит название оксидантного стресса. Важная роль данного явления в патологии общепризнанна, а механизмы деструктивных эффектов АФК широко изучаются. Нет сегодня сомнений и в том, что генерация оксидантов и модификация «редокс-состояния» клеток – не только патологический, но и физиологически значимый процесс, с которым связаны ауторегуляторные механизмы поддержания клеточного и тканевого гомеостаза. Поэтому результирующие эффекты оксидантов, генерируемых в живых системах, зависят от многих локальных условий и химической природы АФК (Волин М.С. и др., 1998; Коган А.Х., 1999; Зозуля Ю.А. и др., 2000; Borregaard N., 1988; Kostra P., 1995; Nielson C.P. e.a., 1998; Babior B.M., 1999; Gallin. J. e.a., 1999).

Если ранее считалось, что АФК возникают в организме либо спонтанно, либо под влиянием экзогенных факторов, то сегодня важным источником оксидантов признаны ферментативные реакции их образования. Одним из важнейших фермент-зависимых процессов генерации АФК является респираторный взрыв фагоцитов – эволюционно сложившийся механизм активной клеточной продукции АФК, осуществляющийся с участием мультикомпонентного НАДФН·Н⁺-оксидазного комплекса плазматической мембраны. Респираторный взрыв считается одним из основных способов защиты от чужеродных агентов (Маянский А.Н. и др., 1987; Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R., 1992; Bjerrum O.W., 1993) и вместе с тем рассматривается как одна из причин повреждения биоструктур при воспалении, ишемии-реперфузии, опухолевом росте и других патологических состояниях (Fantone J.C., 1982; Wachtfogel Y. e.a., 1986; Rubin E., Farber J.L., 1994; Маеда Х., Акаике Т., 1998; Скулачев В.П., 1999).

Хотя проблема фармакологического управления оксидантным гомеостазом организма является актуальной для медицины, она до сих пор не имеет достаточно эффективных решений, как на системном уровне, так и на уровне фагоцитарного звена генерации АФК, являющегося важным компонентом оксидативного стресса. Известны многие разрозненные исследования о действии ряда биологически активных агентов на фагоцитарную генерацию АФК и попытки коррекции этого процесса при патологических состояниях (Meyrick R.H., 1986; Nielson C.P., 1987; Andrew Sustiel M. e.a., 1989; Kovacs I.B., Yamazaki M. e.a., 1989; Costa Rosa L.F., 1992; Laursen A.L. e.a., 1995; Kopprasch S. e.a., 1997; Thannickal V.G., 2000; Griendling K.K. e.a., 2000). Однако указанные исследования, основанные на разных методологических подходах, не дают системного представления об общих принципах и сравнительной эффективности методов фармакологической модификации НАДФН·Н⁺-зависимых механизмов генерации АФК.

Настоящая работа посвящена изысканию подходов к управлению фагоцитарной НАДФН·Н⁺-зависимой генерацией АФК средствами современной

фармакологии на основе модуляции различных цитофизиологических процессов и механизмов химической передачи сигналов.

Связь диссертации с крупными научными программами и темами. Диссертация выполнена в рамках задания ГКНТ РБ 04.12 «Разработать на АО «Белмедпрепараты» адаптогенные и иммунокорректорные лекарственные препараты на основе женьшеня белорусской культивации» (1998-2001) ГНТП «Лекарственные средства», № гос. регистрации 19981064; задания ГКНТ РБ 04.11 «Разработать и освоить на АО «Белмедпрепараты» выпуск кардиотропного препарата на основе сердечных гликозидов» (1998-2002) ГНТП «Лекарственные средства», № гос. регистрации 19981066; задания ГКНТ Ф-02 25/43-99 «Создать универсальные ингибиторы свободнорадикальных процессов – основу для разработки новых лекарственных препаратов» (1998-2000), № гос. регистрации 19991404.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось изыскание фармакологических подходов к управлению процессами фагоцитарной генерации АФК на основе средств, модулирующих сигнальные механизмы клеточной активности, цитофизиологические процессы и оксидантное состояние клеток. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать эффективность агонистов и антагонистов мембранных рецепторов (моноаминергических, пуринергических, опиоидергических) в качестве модуляторов НАДФН·Н⁺-зависимой генерации АФК в макрофагах.
2. Экспериментально оценить возможность управления фагоцитарной генерацией АФК модуляторами уровня вторичных посредников (цАМФ, ионов кальция, ИТФ).
3. Изучить влияние на фагоцитарную генерацию АФК фармакологических агентов, модифицирующих различные цитофизиологические процессы – функцию цитоскелета, проводимость натриевых, калиевых и кальциевых ионных каналов, продукцию NO, синтез эйкозаноидов.
4. Изучить влияние антирадикальных агентов различной структуры (природных и синтетических) на продукцию АФК в клеточной системе *in vitro*.
5. Оценить эффекты фитоадаптогенов женьшеня, солодки и эхинацеи на фагоцитарную генерацию АФК при изолированном и комбинированном воздействии в экспериментах *in vitro* и *ex vivo*.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являлись изолированные перитонеальные макрофаги крыс, фармакологические средства и химические соединения различных классов. Предметом исследования являлись процессы спонтанной и индуцированной генерации АФК в суспензии макрофагов, инкубированных в присутствии фармакологических агентов.

Методология и методы проведенного исследования. Влияние испытуемых соединений на спонтанную и индуцированную генерацию АФК макрофагами изучено методом люминолзависимой хемилюминесценции в экспериментах *in vitro* при регистрации фотоэмиссии на люминометре LKB Wallac-1251 (Финляндия). В качестве индуктора оксидантного взрыва использован опсонизированный зимозан. Антиоксидантная активность соединений в бесклеточной биосистеме изучена на модели пероксид-индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови.

Научная новизна и значимость полученных результатов. В итоге исследований получена новая научная информация системного характера о фармакодинамическом действии на процессы фагоцитарной НАДФН·Н⁺-зависимой генерации АФК свыше 90 индивидуальных соединений и композиций веществ различных фармакологических и химических классов, включая агонисты и антагонисты мембранных рецепторов (адренергических, дофаминергических, серотонинергических, гистаминергических, опиоидных, пуринергических), модуляторы внутриклеточной концентрации вторичных посредников, блокаторы ионных каналов, ингибиторы генерации эйкозаноидов и функции цитоскелета, антирадикальные агенты различной природы.

Впервые в системных исследованиях на клеточном уровне экспериментально показано, что эффективное подавление процессов фагоцитарной генерации АФК достигается агентами, активирующими цАМФ-зависимую передачу сигнала, независимо от уровня их первичного фармакологического действия, а стимуляция этих процессов – агентами, активирующими ИТФ-зависимый каскад внутриклеточной сигнализации.

Установлено, что эффективными модуляторами фагоцитарной НАДФН·Н⁺-зависимой генерации АФК также являются агенты, нарушающие сократительную функцию цитоскелета (колхицин), ингибиторы ионной проводимости (блокаторы Na⁺-, K⁺- и Ca²⁺-каналов), средства, подавляющие синтез эйкозаноидов (ГК, НПВС). Направленность действия ряда агентов зависит от концентрации и может иметь как специфическую, так и неспецифическую природу, обусловленную структурой молекул.

Впервые показано, что ингибиторы свободнорадикальных реакций – дитретбутильные производные пирокатехина и фенола являются высокоэффективными антиоксидантами на клеточной модели, превосходящими по активности аскорбат, токоферол, мелатонин, ионол на 2-4 порядка величин. Также впервые установлено, что растительные адаптогены – женьшень, солодка и эхинацея – являются модуляторами фагоцитарной генерации АФК при изолированном и комбинированном применении *in vitro* и *ex vivo*.

Совокупность полученных результатов расширяет представления о фармакодинамическом действии различных групп лекарственных средств и научных подходах к управлению оксидантными процессами на клеточном уровне.

Практическая значимость полученных результатов. Результаты диссертационной работы использованы при разработке фитопрепаратов «Эхингин» и «Тримунал», внедренных в медицинскую практику, и являются частью медико-биологических исследований по разработке новых лекарственных средств в рамках ГНТП «Аминокислоты». Полученные результаты используются в учебном процессе на кафедре фармакологии БГМУ.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Фагоцитарную генерацию АФК модулируют фармакологические агенты, модифицирующие внутриклеточное содержание вторичных посредников передачи сигнала: подавляют продукцию оксидантов соединения, стимулирующие цАМФ-зависимый каскад (агонисты β -адренергических и гистаминовых рецепторов, ингибиторы фосфодиэстераз, структурные аналоги цАМФ), а также блокаторы медленных кальциевых каналов (нифедипин, верапамил); усиливают этот процесс агонисты α_1 -адренорецепторов (фенилефрин), активирующие каскад ИТФ.

2. Биологически активные соединения, модулирующие межклеточные взаимодействия или обладающие собственными антирадикальными свойствами (пурины, опиоиды, биогенные амины, аминокислоты, их синтетические аналоги и производные), проявляют как прооксидантную активность (в концентрациях 10^{-5} - 10^{-9} М), так и антиоксидантное действие (в концентрациях $>10^{-5}$ М) на модели клеточной генерации АФК.

3. Фармакологические агенты и лекарственные средства, нарушающие трансмембранный обмен ионов Na^+ и K^+ (местные анестетики, хинидин, ингибиторы мембранной Na^+/K^+ АТФ-азы), блокирующие процессы внутриклеточного движения (колхицин), модифицирующие продукцию эйкозаноидов (глюкокортикостероиды, высокие концентрации нестероидных ингибиторов циклооксигеназ) подавляют макрофагальную генерацию АФК; нестероидные ингибиторы циклооксигеназ в терапевтическом диапазоне концентраций (10^{-6} - 10^{-4} М) стимулируют этот процесс.

4. Ди-третбутильные производные фенола и пирокатехина превосходят по способности подавлять свободнорадикальные реакции на клеточной модели известные антиоксиданты (α -токоферол, аскорбат, мелатонин, ионол, эмоксипин) на 2-4 порядка величин и являются перспективными соединениями для разработки новых антиоксидантов.

5. Раздельное и сочетанное использование препаратов природных адаптогенов – перспективный способ направленной коррекции клеточной продукции АФК: экстракты из корня женьшеня, солодки и надземной части эхинацеи пурпурной угнетают генерацию АФК *in vitro*; в экспериментах *ex vivo* препараты женьшеня и эхинацеи при изолированном введении ингибируют, а в комбинации способны стимулировать продукцию АФК макрофагами.

Личный вклад соискателя. Все экспериментальные результаты, представленные в настоящей работе, получены лично автором. Тема работы и планы ее проведения предложены научным руководителем д.м.н., проф. Б.В. Дубовиком, который принимал участие в обсуждении результатов и их оформлении в виде публикаций. Научным консультантом д.х.н. проф. О.И. Шадыро предложены для исследования производные пирокатехина и фенола в качестве ингибиторов свободнорадикальных реакций.

Апробация результатов диссертации. Результаты работы докладывались на «Международной конференции молодых ученых», Гродно, 1998; Международных конференциях «Актуальные проблемы современной медицины», Минск, 1999, 2000, 2001; Международной научной конференции «Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника», Минск, 2001; Международной научно-практической конференции «Молодые ученые – медицине XXI века», Гродно, 2001; Международной научной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы», Минск, 2003.

Опубликованность результатов. Основные результаты диссертационной работы отражены в 16 публикациях, из них 8 статей в рецензируемых сборниках научных трудов, 7 тезисов докладов на международных и республиканских научных конференциях, 1 статья в «Белорусском медицинском журнале». Общее количество страниц опубликованных материалов – 46.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из общей характеристики работы, аналитического обзора литературы по теме, описания объектов и методов исследования, пяти глав оригинальных исследований, заключения и списка литературы, включающего 199 источников. Диссертация изложена на 70 страницах машинописного текста, исключая таблицы, рисунки, список использованных источников, приложение (всего 50 стр.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовано 580 рандомбредных крыс, поставляемых вивариумом экспериментально-биологической клиники БГМУ (г. Минск).

Изучены стандартизированные субстанции фармакологических агентов (ФА) и биологически активных соединений (БАС): адренергические агонисты (эпинефрин, норэпинефрин, изопреналин, сальбутамол, фенилефрин, клонидин); адренергические антагонисты (пропранолол, окспренолол, соталол,

метопролол, атенолол); биогенные амины (дофамин, гистамин, серотонин, мелатонин); пуринергические агонисты (аденозин и его фосфорилированные производные – АТФ, АДФ, АМФ; инозин); метилксантины (теофиллин, изобутил-метил-ксантин), синтетические опиоидергические агенты (морфин, кодеин, налбуфин, трамадол, налоксон); циклические АМФ, ГМФ и их дибутирильные производные; ингибиторы кальциевых каналов (верапамил, нифедипин); ингибиторы трансмембранного обмена ионов Na^+ и K^+ (хинидин, лидокаин, бупивакаин, прокаин); ингибиторы Na^+/K^+ АТФ-азы (оубаин, буфатин); ингибиторы цитоскелета (колхицин); аминокислоты и их производные (L-аргинин, аргинина селенит натрия, 4-гидрокси-L-пролин, N-ацетил-L-пролин, N-ацетил-4-гидрокси-L-пролин, L-глицин, L-лизин, L-триптофан, таурин); ингибиторы воспаления стероидной (преднизолон, дексаметазон) и нестероидной (ацетилсалициловая кислота, диклофенак, целекоксиб) структуры; высокомолекулярные соединения (гепарин); антиоксиданты «классические» (аскорбиновая кислота; α -токоферол, ионол, эмоксипин) и новые ди-третбутильные производные фенола (BO02-BO14, BS01-BS12, BN01-BN09); фитопрепараты из корня женьшеня, солодки и надземной части эхинацеи пурпурной. Большинство указанных субстанций произведено фирмами «Sigma» (Германия); «Serva» (США); «Merck» (Швейцария); «Roanal» (Венгерская республика); аминокислоты и их производные получены в Институте физико-органической химии НАН РБ; новые ди-третбутильные производные фенола синтезированы на кафедре химии и химической технологии БГУ; фитопрепараты и буфатин поставлялись для испытаний Научно-фармацевтическим центром ОАО «Белмедпрепараты» (г. Минск).

Изучение эффектов соединений разных классов на фагоцитарную генерацию АФК in vitro

Перитонеальные макрофаги получали от белых беспородных крыс промыванием брюшной полости средой Хенкса с гепарином. Клетки осаждали и ресуспендировали в свежей среде Хенкса без индикатора. Полученная суспензия содержала не менее 90 % жизнеспособных МФ.

Клеточную генерацию АФК оценивали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) на люминометре LKB Wallak-1251 (Финляндия). Респираторный взрыв фагоцитов индуцировали опсонизированным зимозаном (ОЗ) после преинкубации МФ с изучаемыми агентами в течение 10 мин. Индуцированную (ИХЛ) и спонтанную (СХЛ) хемилюминесценцию МФ изучали параллельно. Пробы на ИХЛ содержали: МФ (10^6), люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ М), изучаемый агент (10^{-2} - 10^{-10} М), ОЗ ($5 \cdot 10^7$ частиц). В пробу на СХЛ ОЗ не вносили. ХЛ регистрировали при 37°C в течение 30-40 минут в дискретном режиме с интервалом 2-3 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и пиковому значению ХЛ (мВ/ 10^6 клеток). Показатели ХЛ

опытных проб выражали в % к параллельно регистрируемым контрольным значениям.

При изучении модулирующего влияния компонентов биосреды на антиоксидантную активность исследуемых соединений, эффекты оценивали на модели генерации АФК макрофагами, помещенными в гомологичную 100% сыворотку крови.

Изучение эффектов женьшеня и эхинацеи на макрофагальную продукцию АФК ex vivo

Эксперименты проведены на 70 крысах-самках массой 150-200 г. Животным в течение 7-ми дней назначали: женьшень (стандартизованный порошок сухого корня) в дозах 10; 30; 50; 100 мг/кг/сутки, эхинацею (препарат «Эстифан») в дозах 30; 100; 300 мг/кг/сутки, комбинацию препаратов, содержащую женьшень (50 мг/кг) и эхинацею (100 мг/кг) в одной смеси. Фитопрепараты вводили в желудок в виде суспензии на 1% крахмальном геле, который также назначали в качестве плацебо контрольной группе.

Перитонеальные МФ изолировали адгезией на пластике, монослой отмывали и снимали силиконовой резинкой, ресуспендировали в среде Хенкса без индикатора. Индуцированную и спонтанную генерацию АФК исследовали одновременно на идентичной суспензии клеток в 3-4 повторностях. При исследовании ИХЛ каждая проба содержала МФ, люминол, опсонизированный зимозан; СХЛ изучали в отсутствие индуктора. Респираторный взрыв оценивали по абсолютному приросту ИХЛ (мВ/10⁶ клеток) и скорости нарастания фотоэмиссии (мВ/мин/10⁶ клеток) до достижения пика свечения.

Оценка антиоксидантной активности соединений на модели пероксид-индуцированной хемилюминесценции (ПХЛ) сыворотки

После добавления к сыворотке 10⁻⁴ М перекиси водорода в присутствии люминола возникает быстрая вспышка хемилюминесценции, переходящая в стационарное свечение (Шерстнев, 1978). Количество АФК в модельной системе оценивали по максимальному значению быстрой вспышки (мВ) и площади под кривой ХЛ за 5-10 минутный интервал после внесения H₂O₂. Показатели ХЛ проб, содержащих испытуемые соединения, выражали в % к параллельно регистрируемому контролю.

Статистическая обработка результатов. Для оценки статистической достоверности результатов использовали параметрические и непараметрические методы анализа. Различия считали достоверными при вероятности безошибочного прогноза более 95% (p<0,05). Эффективные ингибирующие концентрации соединений в диапазоне (IC₁₆-IC₈₄) рассчитывали методом регрессионного анализа с использованием пакета программ «STATISTIKA».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффекты модуляторов межклеточной и внутриклеточной сигнализации

Модуляторы внутриклеточного уровня цАМФ. Установлено, что добавление в инкубационную среду агентов, повышающих внутриклеточное содержание цАМФ: препаратов цАМФ, ингибиторов фосфодиэстеразы теофиллина и изобутил-метил-ксантина, агонистов гистаминовых (гистамина) и β -адренергических (изопреналина, сальбутамола) рецепторов ингибирует индуцированную и спонтанную генерацию АФК в макрофагах (табл. 1).

При изучении β -адреноблолирующих агентов установлено, что только соединения, обладающие внутренней симпатомиметической (окспренолол) активностью или стабилизирующие клеточные мембраны (пропранолол) подавляют продукцию АФК; β -адренолитики, лишенные указанных свойств (соталол, метопролол), не изменяют или стимулируют (атенолол) макрофагальную генерацию оксидантов.

Предварительное внесение высокоселективного β -блокатора соталола снимает ингибирующие эффекты β -агонистов на клеточную генерацию АФК.

Таблица 1.¹

Ингибирующая активность модуляторов аденилатциклазного механизма передачи сигнала на модели макрофагальной генерации АФК

Агент	Мишени	IC ₃₀ , [M]	
		ИХЛ	СХЛ
Циклический АМФ	-	$>1,0 \cdot 10^{-4}$	$\sim 0,6 \cdot 10^{-4}$
Дибутирил цАМФ	-	$\sim 3,0 \cdot 10^{-5}$	NI
Теофиллин	(-) ФДЭ	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$
ИБМК	(-) ФДЭ	$0,7 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
Гистамин	(+) H ₁ H ₂ -P	$>1,0 \cdot 10^{-4}$	$>1,0 \cdot 10^{-4}$
Изопреналин	(+) $\beta_1\beta_2$ -AP	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
Сальбутамол	(+) β_2 -AP	$\sim 1,0 \cdot 10^{-4}$	$\sim 1,0 \cdot 10^{-8}$

Пурины. Специфический агонист пуриновых рецепторов I типа (П-I) аденозин ингибировал образование АФК в макрофагах. Качественно аналогично действовали агонисты пуриновых рецепторов второго типа (П-II) – АТФ, АДФ, АМФ (табл. 2), однако последний оказывал двойственное влияние на генерацию

¹ Примечание. ИБМК – изобутил-метил-ксантин; ФДЭ – фосфодиэстераза; AP – адренорецептор; P – рецептор; (+) – стимулирующий эффект; (-) – ингибирующий эффект. Здесь и далее IC₃₀, IC₅₀ – концентрации агентов, ингибирующие ХЛ МФ (по показателю АУС) на 30% и 50% соответственно при p<0,05; NI – ингибирующее влияние в исследованном диапазоне концентраций не обнаружено или недостоверно.

АФК, усиливая ХЛ макрофагов на 20-30% в концентрациях 10^{-7} - 10^{-6} М ($p < 0,05$) и подавлял ее в концентрациях 10^{-5} - 10^{-3} М.

Таблица 2.

Ингибирующая активность пуринергических агонистов на модели макрофагальной генерации АФК

Агент	Мишени	IC ₃₀ , [М]	
		ИХЛ	СХЛ
Аденозин ²	(+) П-I	$\sim 1,0 \cdot 10^{-5}$	$\sim 1,0 \cdot 10^{-6}$
АТФ	(+) П-II	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$
АДФ	(+) П-II	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
АМФ	(+) П-II	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$

Опиоиды. Установлено, что все исследованные синтетические опиоиды ингибировали спонтанную и индуцированную продукцию оксидантов в макрофагах (табл. 3).

Таблица 3.

Ингибирующая активность опиоидергических агентов на модели генерации АФК макрофагами

Агент	Мишени	IC ₃₀ , [М]	
		ИХЛ	СХЛ
Налбуфин	(+) κ-/(-) μ- P	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$
Морфин	(+) κ-, μ-, δ- P	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$
Кодеин	(+) κ-, μ-, δ- P	$1,2 \cdot 10^{-4}$	NI
Трамадол	(+) κ-, μ-, δ- P	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$
Налоксон	(-) μ, (κ-, δ-) P	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$0,8 \cdot 10^{-4}$

Ингибирующее действие большинства исследованных опиоидов проявлялось при концентрациях, превосходящих эффективные терапевтические (болеутоляющие) на 2-3 порядка, положительно коррелируя с числом свободных гидроксильных групп в молекуле. Так, налбуфин, несущий три ОН-группы, проявлял наиболее высокую антиоксидантную активность на клеточной модели; морфин и налоксон, содержащие по два гидроксила, умеренно ингибировали ХЛ, носители одного гидроксила – трамадол и кодеин – оказывали слабое влияние на генерацию АФК фагоцитами. Таким образом, ингибирующее действие исследованных опиоидов на клеточную генерацию АФК, вероятно, обусловлено их прямым антиоксидантным эффектом.

² Зависимость эффекта аденозина от концентрации нелинейна.

Модуляторы инозитолтрифосфатного (ИТФ) и кальциевого каскадов. Общеизвестно, что ИТФ и Ca^{2+} участвуют в реализации большинства специфических функций фагоцитов. Установлено, что антагонист ИТФ-рецепторов плазматической мембраны гепарин и ингибиторы медленных кальциевых каналов верапамил и нифедипин снижают спонтанную и индуцированную продукцию АФК фагоцитами (табл. 4). Напротив, агонист α_1 -адренорецепторов фенилефрин, реализующий свои эффекты посредством повышения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , усиливает индуцированную генерацию АФК макрофагами (на 50% по отношению к контролю в концентрации 10^{-6} М, $p < 0,05$), не изменяя при этом спонтанное образование АФК.

Таблица 4.

Ингибирующая активность модуляторов инозитолтрифосфатного и кальциевого механизмов передачи сигнала на клеточной модели генерации АФК

Агент	Мишени	IC ₃₀ , [М]	
		ИХЛ	СХЛ
Гепарин ³	(-) ИТФ-Р мембраны	2,4	66,0
Верапамил	(-) Ca^{2+} -каналы	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$
Нифедипин	(-) Ca^{2+} -каналы	$4,0 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$
Дофамин	(+) D-Р, β -АР	$0,6 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$
Серотонин	(+) 5-НТ-Р	$0,6 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$

При исследовании биогенных аминов дофамина и серотонина установлено, что оба агента при концентрациях порядка 10^{-10} - 10^{-8} М повышают спонтанную генерацию АФК в макрофагах. Поскольку стимулирующие эффекты дофамина (115% контроля при 10^{-10} - 10^{-9} М, $p < 0,01$) усиливаются блокадой β -адренергических рецепторов, вероятно, они обусловлены, как и эффекты α_1 -адренергических агонистов, индукцией каскада ИТФ. В высоких концентрациях дофамин и серотонин ингибировали спонтанную и индуцированную генерацию АФК (см. табл. 4); блокада β -адренорецепторов устраняла указанный эффект дофамина.

Таким образом, агенты, обладающие способностью активировать ИТФ и Ca^{2+} -зависимые механизмы передачи сигнала, стимулируют макрофагальную генерацию АФК, тогда как агенты, повышающие внутриклеточную концентрацию цАМФ, угнетают этот процесс.

Аминокислоты и их производные. Аминокислоты, обладающие собственными или опосредованными фармакодинамическими эффектами – аргинин, таурин, глицин, триптофан, производные пролина, представляют

³ Концентрации гепарина приведены в ЕД/мл.

собой перспективную группу соединений для поиска модуляторов клеточных функций. В экспериментах на клеточной модели установлена способность ингибировать генерацию АФК для 4-гидроксипролина, N-ацетилпролина, N-ацетил-4-гидроксипролина, аргинина и таурина; напротив, селенсодержащее производное аргинина, глицин и триптофан – стимулируют этот процесс (табл. 5). Модулирующее действие аминокислот и их производных может быть обусловлено как проявлением регуляторных эффектов аргинина и его производных, так и собственным антиоксидантным потенциалом, описанным для пролина и таурина.

Таблица 5.⁴

Влияние аминокислот и их производных на макрофагальную генерацию АФК

Агент	IC ₃₀ , [M]		СЭ ИХЛ		СЭ СХЛ	
	ИХЛ	СХЛ	C _{max}	E _{max}	C _{max}	E _{max}
ГП	1,0·10 ⁻³	NI	-	-	-	-
АЦП	3,0·10 ⁻⁵	1,0·10 ⁻⁴	-	-	-	-
АЦГП	1,6·10 ⁻⁵	0,8·10 ⁻⁴	-	-	-	-
Триптофан	1,2·10 ⁻³	3,5·10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	113,2±0,1*	10 ⁻⁵	157,9±3,4*
Таурин	NI	3,7·10 ⁻⁴	-	-	-	-
Аргинин	1,6·10 ⁻⁴	NI	-	-	-	-
АСН	NI	NI	10 ⁻³	302,4±65,6 TM	10 ⁻³	247,1±62,4 TM
Глицин	NI	NI	-	-	10 ⁻³	140,3±1,2*
Лизин	NI	NI	-	-	-	-

Эффекты модуляторов структуры и функции цитоскелета

Ферментный комплекс НАДФН·Н⁺-зависимой генерации оксидантов сопряжен с плазматической мембраной и цитоскелетом фагоцитов, поэтому модификация указанных структур может изменить интенсивность генерации АФК. Установлено, что стабилизаторы мембран – специфические блокаторы Na⁺- и K⁺-каналов (местноанестезирующие средства и хинидин), ингибиторы Na⁺/K⁺ АТФ-азы (оубаин, буфатин), а также колхицин – ингибитор внутриклеточного транспорта и двигательной активности фагоцитов – существенно подавляют спонтанную и индуцированную генерацию АФК (табл. 6).

⁴ Примечание. ГП – 4-гидрокси-L-пролин; АЦП – N-ацетил-L-пролин; АЦГП – N-ацетил-4-гидрокси-L-пролин; АСН – аргинин селенит натрия; СЭ – стимулирующий эффект; E_{max} – максимальный стимулирующий эффект (AUC, % к контролю; M±m; n=3), C_{max} – концентрация агента, при которой стимулирующий эффект максимален; * – p<0,05 по парному t-критерию; TM – p<0,05 по критерию Фишера.

Противовоспалительные агенты стероидной (ГК) и нестероидной структуры (НПВС) оказывали различное влияние на фагоцитарную генерацию АФК: если ГК (преднизолон, дексаметазон) подавляли респираторный взрыв фагоцитов, то действие НПВС (ацетилсалициловой кислоты, диклофенака, целекоксиба) включало фазу стимуляции спонтанной и индуцированной ХЛ макрофагов при терапевтических концентрациях и фазу ингибирования при высоких (см. табл. 6). Стимулирующее влияние НПВС – ингибиторов циклооксигеназ (ЦОГ) – может быть обусловлено конкурентной активацией липооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты. Образующиеся при этом нестабильные перекисные продукты обладают свойствами индукторов генерации АФК, и, возможно, способны непосредственно взаимодействовать с люминолом. Наиболее выраженным стимулирующим эффектом на клеточной модели обладал целекоксиб – селективный ингибитор ЦОГ-2 – фермента, ответственного за синтез провоспалительных простагландинов. Учитывая, что МФ экспрессируют в основном указанную изоформу ЦОГ, хемиллюминесцентный анализ действия потенциальных НПВС на макрофагальную генерацию АФК может стать дополнительным тестом для поиска высокоэффективных противовоспалительных агентов.

Таблица 6.⁵

Влияние некоторых модуляторов структуры цитоскелета и ингибиторов воспаления на макрофагальную генерацию АФК

Агент	Мишени	IC ₃₀ , [М]		СЭ ИХЛ	
		ИХЛ	СХЛ	C _{max}	E _{max}
Лидокаин	(-) Na ⁺ -каналы	0,6·10 ⁻⁴	3,0·10 ⁻⁵	-	-
Прокаин	То же	0,6·10 ⁻⁶	4,2·10 ⁻⁶	-	-
Бупивакаин	-"	3,0·10 ⁻⁴	4,0·10 ⁻⁶	-	-
Хинидин	(-) Na ⁺ , K ⁺ -каналы	5,5·10 ⁻⁵	5,4·10 ⁻⁶	-	-
Колхицин	Тубулин	4,6·10 ⁻⁷	0,7·10 ⁻⁵	-	-
Преднизолон	ФЛ A ₂ и др.	4,5·10 ⁻⁵	3,5·10 ⁻⁵	-	-
Дексаметазон	ФЛ A ₂ и др.	0,6·10 ⁻⁴	NI	-	-
АСК	(-) ЦОГ-1, ЦОГ-2	2,1·10 ⁻³	2,3·10 ⁻³	10 ⁻⁴	123,6±12,1 TM
Диклофенак	(-) ЦОГ-1, ЦОГ-2	5,0·10 ⁻⁵	2,6·10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	129,0±9,5 TM
Целекоксиб	(-) ЦОГ-2	4,2·10 ⁻⁵	3,4·10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	205,1±6,4 ^{**}

⁵ Примечание. ФЛ A₂ – фосфолипаза A₂; АСК – ацетилсалициловая кислота; СЭ – стимулирующий эффект; E_{max} – максимальный стимулирующий эффект (AUC, % к контролю; M±m; n=3); C_{max} – концентрация соединения, при которой регистрируется E_{max}; – p<0,01 по парному t-критерию, TM – p<0,05 по критерию Фишера.

Эффекты антиоксидантов

Установлено, что как «классические» антиоксиданты, используемые в медицине (α -токоферол, ионол, эмоксипин, аскорбат, мелатонин), так и новые ди-третбутильные производные фенола и пирокатехина (ТБФ) – активные ингибиторы свободнорадикальных реакций в модельных химических системах (О.И. Шадыро) – эффективно подавляют индуцированную и спонтанную генерацию АФК макрофагами (табл. 7).

Таблица 7.⁶

Действие «классических» антиоксидантов и наиболее активных производных ТБФ на ИХЛ макрофагов в буферном растворе

Агент	ИД, [М]	IC, [М]			
		16	30	50	84
α -Токоферол	10^{-10} - $2 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-8}$	$0,9 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$>2,0 \cdot 10^{-5}$
Ионол	10^{-9} - 10^{-4}	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$>1,0 \cdot 10^{-4}$
Аскорбат	10^{-9} - 10^{-4}	$>1,0 \cdot 10^{-4}$	-	-	-
Эмоксипин	10^{-9} - 10^{-4}	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$>1,0 \cdot 10^{-4}$	-	-
Мелатонин	10^{-9} - 10^{-4}	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$>1,0 \cdot 10^{-4}$
F2	10^{-7} - 10^{-4}	$0,9 \cdot 10^{-7}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$0,9 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
F3	10^{-9} - 10^{-4}	$<1,0 \cdot 10^{-9}$	$<1,0 \cdot 10^{-9}$	$2,0 \cdot 10^{-9}$	$2,4 \cdot 10^{-7}$
BS01	10^{-9} - 10^{-4}	$4,0 \cdot 10^{-8}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$0,6 \cdot 10^{-4}$	$>1,0 \cdot 10^{-4}$
BS05	10^{-9} - 10^{-4}	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$0,9 \cdot 10^{-5}$	$>1,0 \cdot 10^{-4}$
F54	10^{-10} - 10^{-4}	$<1,0 \cdot 10^{-10}$	$1,0 \cdot 10^{-10}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
BS09	10^{-9} - 10^{-4}	$2,4 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$0,9 \cdot 10^{-4}$
BN01	10^{-9} - 10^{-5}	$2,4 \cdot 10^{-8}$	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$0,6 \cdot 10^{-7}$	$5,0 \cdot 10^{-7}$
BN07	10^{-9} - 10^{-5}	$1,4 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$>1,0 \cdot 10^{-5}$

На моделях фагоцитарной генерации АФК и пероксид-индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови установлены следующие особенности действия природных и синтетических антиоксидантов:

- ингибирующая активность липофильных антиоксидантов природного и синтетического происхождения на модели респираторного взрыва фагоцитов существенно превосходит активность гидрофильных соединений;

⁶ Примечание. ИД, М – исследованный диапазон концентраций в молях; ВО – кислородсодержащие ТБФ; BS – серусодержащие ТБФ; BN – азотсодержащие ТБФ; соединения (кроме эмоксипина и кислоты аскорбиновой) растворяли в ДМСО для получения 10^{-1} - 10^{-2} М, дальнейшие разведения готовили на бесцветной среде Хенкса, конечные концентрации детергента не изменяли ХЛ МФ. Приведены статистически достоверные данные регрессионного анализа ($p < 0,05$), при вероятности ошибки $>95\%$ данные не приводятся.

- ингибирующая активность большинства природных и синтетических антиоксидантов в отношении спонтанной генерации АФК фагоцитами ниже, чем в условиях респираторного взрыва, что, возможно, обусловлено изменением спектра генерируемых АФК при активации клетки;
- производные фенола и пирокатехина являются высокоэффективными ингибиторами свободнорадикальных реакций на модели респираторного взрыва фагоцитов; ряд из них по активности превосходит «классические» антиоксиданты более чем на 3-4 порядка величин (см. табл.7);
- среди изученных производных ТБФ наибольшей антиоксидантной активностью обладает 3,5-ди-третбутилпирокатехин (F3) ($IC_{50} \sim 10^{-9}$ М). Различные модификации структуры F3: изменение числа и взаимного расположения гидроксильных групп или экранирующих группировок, введение тиольных и амидных заместителей, как правило, приводят к снижению антиоксидантной активности соединений на модели клеточной генерации АФК (см. табл. 7.);
- антиоксидантная активность ТБФ на суспензии макрофагов, помещенных в гомологичную сыворотку крови, существенно снижается, а различия в активности отдельных ТБФ нивелируются. Антиоксидантная активность производных ТБФ, а также аскорбата и мелатонина на модели пероксид-индуцированной ХЛ сыворотки крови приближается к таковой на модели респираторного взрыва МФ в той же среде, что свидетельствует о существенном влиянии компонентов биосреды на эффекты антиоксидантов.

Эффекты растительных адаптогенов

С позиций поиска модуляторов оксидантного гомеостаза интересна способность женьшеня, солодки и эхинацеи оказывать иммуномодулирующее и цитопротекторное действие при оксидантных стрессах различной природы. При исследовании указанных фитоадаптогенов установлено, что экстракты эхинацеи и солодки ингибировали оксидантные процессы в макрофагах (концентрации >3 и 30 мг/л, соответственно), тогда как женьшень оказывал двойственное влияние: при низких и средних концентрациях ($1-10$ мг/л) усиливал индуцированную генерацию АФК на $10-20\%$, при высоких (>300 мг/л) – оказывал противоположное действие; на СХЛ женьшень существенно не влиял. Семидневное назначение препаратов женьшеня ($10; 30; 50; 100$ мг/кг) и эхинацеи ($30; 100; 300$ мг/кг) крысам с последующей оценкой АФК-генерирующей функции полученных от них МФ показало, что оба фитопрепарата при изолированном введении в высоких дозах (100 и 300 мг/кг, соответственно) угнетают способность клеток к продукции АФК, тогда как комбинация доз, не изменявших генерацию АФК (50 мг/кг женьшеня + 100 мг/кг эхинацеи), более чем вдвое (на 143% , $p < 0,05$) повышает эту способность.

Таким образом, фитопрепараты, в частности, женьшень, солодка и эхинацея, в зависимости от условий их применения, могут эффективно модулировать макрофагальную генерацию АФК в обоих направлениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Способность макрофагов к генерации АФК по НАДФН·Н⁺-зависимому механизму угнетается фармакологическими агентами и лекарственными средствами, действие которых реализуется с участием цАМФ (изопреналин, сальбутамол, гистамин, ингибиторы фосфодиэстераз, препараты цАМФ) [4, 9, 13].

2. Макрофагальная генерация АФК усиливается агонистами α_1 -адренорецепторов, дофамином, серотонином, действующими через ИТФ-зависимый каскад передачи сигнала, и угнетается блокаторами медленных кальциевых каналов – нифедипином и верапамилом [3, 4, 5, 9].

3. Агонисты пуриновых рецепторов I (аденозин) и II типа (АТФ, АДФ, АМФ) подавляют (10^{-5} - 10^{-3} М) или не изменяют ($<10^{-5}$ М) процессы макрофагальной генерации АФК, за исключением АМФ, стимулирующего клеточную продукцию оксидантов при концентрациях, близких к физиологическим (10^{-7} - 10^{-6} М) [14].

4. Опиоидергические агенты различной структуры и специфичности действия (морфин, кодеин, налбуфин, трамадол, налоксон) подавляют генерацию АФК в макрофагах симбатно числу гидроксильных групп в молекуле, что указывает на их прямое антиоксидантное действие [11].

5. Фармакодинамически активные аминокислоты и их производные модифицируют образование АФК в макрофагах. 4-Гидрокси-L-пролин, N-ацетил-L-пролин, N-ацетил-4-гидрокси-L-пролин, L-аргинин, таурин, L-триптофан при концентрациях $>10^{-5}$ М подавляют, аргинин селенит натрия в тех же и триптофан в более низких концентрациях (10^{-6} - 10^{-5} М) – стимулируют этот процесс [10].

6. Цитоактивные агенты различной структуры – местные анестетики и мембраностабилизаторы (прокаин, лидокаин, бупивакаин, хинидин), ингибиторы Na^+/K^+ АТФ-азы (оубаин, буметанид), колхицин (деполимеризатор тубулина), угнетающие мембранные функции и сократительную активность цитоскелета, обладают подавляющим влиянием на НАДФН·Н⁺-зависимую генерацию АФК в макрофагах *in vitro* [13].

7. Противовоспалительные средства стероидной структуры преднизолон и дексаметазон ослабляют макрофагальную генерацию АФК; нестероидные ингибиторы циклооксигеназы (ацетилсалициловая кислота, диклофенак, целекоксиб) стимулируют этот процесс при терапевтических концентрациях (10^{-6} - 10^{-4} М) и ингибируют при более высоких ($>10^{-4}$ - 10^{-3} М) [12].

8. Ди-третбутильные производные фенола и пирокатехина эффективно подавляют генерацию АФК на клеточной модели, превосходя по активности на 2-4 порядка величин «классические» ингибиторы свободнорадикальных реакций (α -токоферол, аскорбат, ионол, эмоксипин, мелатонин) [7, 8, 16].

9. Экстракты из корня женьшеня, солодки и надземной части эхинацеи пурпурной обладают угнетающим влиянием на макрофагальную продукцию АФК в экспериментах *in vitro*. В экспериментах *ex vivo* при 7-ми дневном введении крысам, женьшень (10; 30; 50; 100 мг/кг) и эхинацея (30; 100; 300 мг/кг) в условиях раздельного применения угнетают, а при совместном (50+100 мг/кг, соответственно) способны стимулировать АФК-генерирующую функцию макрофагов [1, 2, 6, 15].

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бизунок Н.А. Влияние экстрактов женьшеня и эхинацеи на функцию фагоцитов // Актуальные проблемы современной медицины – 99: Материалы международной научной конференции студентов и молодых ученых / Минский гос. мед. инст-т. – Минск, 1999. – С. 14.

2. Бизунок Н.А. Влияние препаратов женьшеня, эхинацеи и их комбинации на респираторный взрыв фагоцитов // Труды молодых ученых: Сб. научн. работ / Минский гос. мед. инст-т. – Минск, 2000. – С. 61-63.

3. Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. Мелатонин и серотонин – модуляторы респираторного взрыва фагоцитов // Актуальные вопросы медицины и новые технологии медицинского образования: Материалы международной научно-практической конференции / Гомельский гос. мед. инст-т. – Мозырь, 2000. – Т. 1. – С. 69-71.

4. Бизунок Н.А. Влияние катехоламинов на оксидантный взрыв фагоцитов // Молодые ученые – медицине XXI века: Материалы международной научно-практической конференции / Гродненский гос. мед. инст-т. – Гродно, 2001. – С. 20-21.

5. Бизунок Н.А. Изучение роли ионов кальция в механизме генерации активных форм кислорода при фагоцитозе // Труды молодых ученых: Сб. научн. работ / Минский гос. мед. инст-т. – Минск, 2001. – С. 62-66.

6. Бизунок Н.А. Влияние фитоэкстрактов женьшеня, солодки и эхинацеи на окислительный метаболизм фагоцитов // Труды молодых ученых: Сб. научн. работ / Минский гос. мед. инст-т. – Минск, 2001. – С. 59-62.

7. Бизунок Н.А. Оценка эффективности антиоксидантов на модели клеточной генерации активных форм кислорода // Труды молодых ученых: Сб. научн. работ / Бел. гос. мед. унив-т. – Минск, 2001. – С. 22-24.

8. Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. Антиоксиданты фенольной природы эффективно модифицируют образование активных форм кислорода в биосистемах // Актуальные вопросы современной медицины: Материалы

юбилейной научной конференции, посвященной 80-летию БГМУ, в двух частях. Часть 1 / Под ред. С.Л. Кабака. – Мн.: БГМУ, – 2001. – С. 40-42.

9. Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. Оценка антиоксидантных и прооксидантных свойств адренергических средств на модели респираторного взрыва макрофагов // Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника: Тез. докл. международной научной конференции / ОАО «Белмедпрепараты». – Минск, 2001. – С. 12-13.

10. Бизунок Н.А., Волынец Б.А., Куваева Т.А., Дубовик Б.В. Влияние аминокислот на клеточно опосредованную генерацию активных форм кислорода // Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника: Тез. докл. международной научной конференции / ОАО «Белмедпрепараты». – Минск, 2001. – С. 11-12.

11. Бизунок Н.А. Модуляция фагоцитарной генерации активных форм кислорода опиоидергическими средствами // Труды молодых ученых: Сб. научн. работ / Бел. гос. мед. унив-т. – Минск, 2002. – С.20-22.

12. Бизунок Н.А. Влияние противовоспалительных средств на фагоцитарную генерацию оксидантов // Белорусский медицинский журнал. – 2002. – № 2. – С. 56-58.

13. Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. Влияние мембранотропных агентов на макрофагальную генерацию активных форм кислорода. // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Материалы международной конференции. / Отв. Ред. Е.Н. Смирнова. – Мн.: БГУ, 2003. – С. 144.

14. Бизунок Н.А., Дубовик Б.В. Синтетические и природные пурины – модуляторы макрофагальной генерации активных форм кислорода. // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Материалы международной конференции. / Отв. Ред. Е.Н. Смирнова. – Мн.: БГУ, 2003. – С. 145

15. Дубовик Б.В., Курченко А.С., Романовский Д.И., Наджарян А.В., Ефремова И.Н., Бизунок Н.А., Петров П.Т., Дунец Л.Н., Царенков В.М. Фармакология эхингина – комплексного препарата женьшеня и эхинацеи пурпурной // Фармация Беларуси на рубеже веков: Тез. докл. республиканской научно-практической конференции. – Минск, 2001. – С. 39-41.

16. Дубовик Б.В., Шадыро О.И., Кравченко Е.В., Полозов Г.И., Романовский Д.И., Михасько Т.А., Бизунок Н.А. Пространственно экранированные пирокатехины – потенциальные нейрозащитные средства // Фармация Беларуси на рубеже веков: Тез. докл. республиканской научно-практической конференции. – Минск, 2001. – С. 41-43.

Бізунок Наталля Анатольеўна**Фармакалогія фагацытарнай генерацыі актыўных форм кіслароду**

Ключавыя словы: рэспіраторны ўзрыў, фагацыты, макрафагі, актыўныя формы кіслароду (АФК), хемілюмінесцэнцыя, пурынергічныя агенты, опіюіды, адрэнергічныя агенты, біягенныя аміны, процізапаленчыя сродкі, амінакіслоты, мадулятары цытаархітэктонікі, антыаксіданты, фітаадаптагены.

Аб’ект даследвання: ізаляваныя перытанеяльныя макрафагі пацукоў, фармакалагічныя сродкі і хімічныя рэчывы розных класаў.

Прадмет даследвання: працэсы спантаннай і індукцыраванай генерацыі АФК у суспензійі макрафагаў, інкубіраваных у прысутнасці фармакалагічных агентаў.

Мэта працы: пошук фармакалагічных падыходаў да кіравання працэсамі фагацытарнай генерацыі АФК на падставе выкарыстання сродкаў, мадулюючых сігнальныя механізмы клетачнай актыўнасці, цытафізіялагічныя працэсы і аксідантны стан клетак.

Метады даследвання: люмінолзалежная хемілюмінесцэнцыя фагацытаў, пераксід-індукцыраваная хемілюмінесцэнцыя сывараткі крыві.

У выніку даследвання атрымана новая навуковая інфармацыя сістэмнага кшталту аб фармакадынамічным уздзеянні на працэсы фагацытарнай НАДФН·Н⁺-залежнай генерацыі АФК больш за 90 індывідуальных рэчываў і іх спалучэнняў розных фармакалагічных і хімічных класаў. Упершыню ў сістэмных даследваннях на клетачным узроўні паказана, што фагацытарную генерацыю АФК памяньшаюць агенты, якія актывізуюць цАМФ-залежную перадачу сігнала, і стымулююць агенты, актывізуючыя кальцыевы каскад унутрыклетачнай сігналізацыі. Выяўлена, што мадулятарамі фагацытарнай генерацыі АФК з’яўляюцца агенты, парушаючыя скарачальную функцыю цыташкілета (калхіцын), інгібітары іоннай праводнасці (блакатары Na⁺-, K⁺- і Ca²⁺- каналаў), рэчывы, памяньшаючыя сінтэз эйказаноідаў (ГК, НПЗС). Упершыню паказана, што дитрэтбуцільныя спалучэнні піракатэхіна і фенола з’яўляюцца высокаэфектыўнымі антыаксідантамі на клетачнай мадэлі, больш актыўнымі, чым аскарбат, токаферол, мелатанін, іанол на 2-4 парадкі ў велічыню. Таксама ўпершыню выяўлена, што раслінныя адаптагены – жэньшэнь, салодка і эхінацэя – з’яўляюцца мадулятарамі фагацытарнай генерацыі АФК пры ізаляваным і сумесным скарыстанні *in vitro* і *ex vivo*.

Вобласць скарыстання: фармакалогія, клінічная фармакалогія, фізіялогія, паталогія, клетачная біялогія, імуналогія.

РЕЗЮМЕ**Бизунок Наталья Анатольевна****Фармакология фагоцитарной генерации активных форм кислорода**

Ключевые слова: респираторный взрыв, фагоциты, макрофаги, активные формы кислорода (АФК), хемилюминесценция, пуринергические агенты, опиоиды, адренергические агенты, биогенные амины, противовоспалительные агенты, аминокислоты, модуляторы цитоархитектоники, антиоксиданты, фитоэкстракты.

Объект исследования: изолированные перитонеальные макрофаги крыс, фармакологические средства и химические соединения различных классов.

Предмет исследования: процессы спонтанной и индуцированной генерации АФК в суспензии макрофагов, инкубированных в присутствии фармакологических агентов.

Цель работы: изыскание фармакологических подходов к управлению процессами фагоцитарной генерации АФК на основе средств, модулирующих сигнальные механизмы клеточной активности, цитофизиологические процессы и оксидантное состояние клеток.

Методы исследования: люминолзависимая хемилюминесценция фагоцитов, пероксид-индуцированная хемилюминесценция сыворотки крови.

В итоге исследований получена новая научная информация системного характера о фармакодинамическом действии на процессы фагоцитарной НАДФН·Н⁺-зависимой генерации АФК свыше 90 индивидуальных соединений и композиций веществ различных фармакологических и химических классов. Впервые в системных исследованиях на клеточном уровне показано, что подавление фагоцитарной генерации АФК достигается агентами, активирующими цАМФ-зависимую передачу сигнала, а стимуляция этих процессов – агентами, активирующими кальциевый каскад внутриклеточной сигнализации. Установлено, что модуляторами фагоцитарной генерации АФК являются агенты, нарушающие сократительную функцию цитоскелета (колхицин), ингибиторы ионной проводимости (блокаторы Na⁺-, K⁺- и Ca²⁺- каналов), средства, подавляющие синтез эйкозаноидов (ГК, НПВС). Впервые показано, что ди-третбутильные производные пирокатехина и фенола являются высокоэффективными антиоксидантами на клеточной модели, превосходящими по активности аскорбат, токоферол, мелатонин, ионол на 2-4 порядка величин. Также впервые установлено, что растительные адаптогены – женьшень, солодка и эхинацея – являются модуляторами фагоцитарной генерации АФК при изолированном и комбинированном применении *in vitro* и *ex vivo*.

Область применения: фармакология, клиническая фармакология, физиология, патология, клеточная биология, иммунология.

SUMMARY**Bizunok Natalia****Pharmacology of reactive oxygen species generation by phagocytes**

Key words: respiratory burst, phagocytes, macrophages, reactive oxygen species (ROS), chemiluminescence, purinergic agents, opioids, adrenergic agents, biogenic amines, anti-inflammatory agents, amino acids, modulators of cytostructure, antioxidants, phytoadaptogenes.

Object of studies: isolated rate peritoneal macrophages, different classes of pharmacological and chemical agents.

Subject of studies: spontaneous and induced generation of ROS by macrophages incubated with different pharmacological agents.

Study goal: to investigate main directions for pharmacology control of ROS generation by phagocytes on the bases of agents modulating cell signal transduction mechanisms, cytophysiological and oxidative cell stations.

Study methods: luminoldependent chemiluminescence of phagocytes, chemiluminescence of blood serum induced by hydrogen peroxide.

Results of study and their novelty: The results of research extend the idea about pharmacodynamic control of phagocyte NADPH-dependent ROS generation more then 90 species and compositions different pharmacological and chemical classes of agents. For the first time in system investigations on the cell model of ROS generation it was shown inhibition effect of agents wich increase the level of cAMP and stimulation effect of ones wich induce intracellular Ca^{2+} flux. It has been fixed modulating effect on the phagocyte ROS generation of agents destroying cell locomotion (colchicin), inhibiting ion transduction (blockers of Na^{+} -, K^{+} -, Ca^{2+} -canals) and decreasing of eicosanoides production (glucocorticosteroidal and nonsteroidal anti-inflammatory agents). For the first time on the cell-model of ROS generation it has been shown that novel ditert-butyl phenol and ditert-butyl pyrocatechol derivatives are more antioxidative potential then ascorbic acid, tocopherol, melatonin, ionol on 2-4 order of values. For the first time it has been established modulating potential of phytoadaptogens ginseng, glycerrisa and echinacea and their combination on ROS generation by phagocytes in vitro and ex vivo.

Area of application: pharmacology, clinical pharmacology, physiology, pathology, cell biology, immunology.