

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 615.015.44:615.272:577.15

БИЗУНОК
Наталья Анатольевна

**ФАРМАКОЛОГИЯ КЛЕТОЧНОЙ ГЕНЕРАЦИИ
АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА, АССОЦИИРОВАННОЙ
С АКТИВНОСТЬЮ NOX2-НАД(Ф)Н-ОКСИДАЗ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Минск 2013

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный консультант: **Дубовик Борис Валентинович**,
доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармакологии УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Питкевич Эдуард Сергеевич**,
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой лечебной физкультуры и спортивной медицины УО «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

Титов Леонид Петрович,
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Черенкевич Сергей Николаевич,
доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, заведующий кафедрой биофизики УО «Белорусский государственный университет»

Оппонирующая организация: УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 11 декабря в 12⁰⁰ на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.10 при УО «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: rector@bsmu.by, тел. (017) 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «1» ноября 2013 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент

А.П. Шепелькевич

КРАТКОЕ ВВЕДЕНИЕ

НАД(Ф)Н-оксидазы (Nox) – суперсемейство ферментов, обеспечивающих генерацию активных форм кислорода (АФК) в клетках животных и растительных организмов. Главной функцией этих АФК является обеспечение быстрой локальной внутри и межклеточной регуляции и коммуникации (Hoidal J.R., 2001; Jones, D.P., 2008), однако при избыточной продукции они индуцируют развитие ряда тяжелых патологических процессов, включая хронические артриты, ишемическо-реперфузионные повреждения миокарда, мозга и печени, болезни Альцгеймера и Паркинсона, неоплазии печени и толстой кишки, хронические обструктивные заболевания легких, ретинопатии (Bedard K., Krause K.-H., 2007; Bauersachs J., Widder J.D., 2008; Mythri R.V. et al., 2011; Shaerzadeh F. et al., 2011). Сочетание высочайшей биологической значимости и агрессивности АФК делает необходимым их качественный и количественный контроль. Однако, несмотря на эволюционно сформированную многоуровневую антиоксидантную защиту живых организмов, такой контроль при многих условиях не устойчив к повреждению. По этой причине изыскание способов надежного управления активностью НАДФН-оксидаз, а также средств коррекции эффектов самих АФК является плодотворным научным направлением, интерес к которому в мировом научном сообществе непрерывно возрастает (Черенкевич С.Н. и соавт., 2006–2012, Guzik T.J., Harrison D.G., 2006; Drummond G.R. et al., 2011; Takacs I. et al., 2012; Schramm A. et al., 2012).

Настоящее исследование посвящено изысканию подходов к фармакологическому управлению генерацией АФК, ассоциированной с активностью Nox2-НАДФН-оксидазы (Nox2, E.C. 1.6.3.1). Выбор обусловлен, прежде всего, тем обстоятельством, что Nox2 имеет чрезвычайно широкую тканевую экспрессию, а её гиперактивность инициирует ряд вышеназванных патологических процессов. С другой стороны, эта изоформа Nox относится к числу наиболее изученных, что создает фундамент разработки лекарственных средств, регулирующих её активность. Настоящая работа является первым систематическим исследованием этой проблемы, концепция которой включает не только поиск эффективных корректоров Nox2-зависимой генерации АФК среди антиоксидантов разных химических групп и широкого арсенала модуляторов клеточных функций, но также разработку способов диагностики высокой эффективности и избирательности действия биологически активных соединений в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, изучение закономерностей их индивидуального и комбинированного действия, изыскание синергических комбинаций для эффективного практического приложения этих фундаментальных знаний.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь диссертации с крупными научными программами и темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности Республики Беларусь на период 2006–2010 гг. и 2011–2015 гг. по разделу «Медицина и фармация»: «Приоритетные макротехнологии: лечение и профилактика заболеваний, производство фармацевтических субстанций, лекарственных форм и препаратов», «Новые методы диагностики, профилактики и лечения заболеваний человека».

Диссертация выполнена в рамках заданий подпрограммы «Аминокислоты» Государственной научно-технической программы «Новые лекарственные средства», утвержденной Комитетом по науке и технологиям при Совете Министров Республики Беларусь № 93 от 10 июля 2003 г., ГР № 20033393: 02.15 «Разработать комплексный препарат «Лейаргунал» на основе аминокислот для коррекции нарушений специфического и неспецифического иммунитета и освоить его производство на РУП «Гродненский завод медицинских препаратов», 02.12 «Разработать на основе композиции аминокислот противоастеническое средство «Гексаминат» и освоить его производство на РУП «Гродненский завод медицинских препаратов», 02.10 «Разработать ангиопротекторный и антиагрегантный препарат на основе L-аргинина и освоить его производство на Гродненском заводе медицинских препаратов», 02.11 «Разработать противовоспалительное и анальгетическое средство «Ацепрол» на основе производных L-пролина и освоить его производство на Гродненском заводе медицинских препаратов», 02.13 «Разработать препарат для коррекции психосоматических нарушений «Амигектон» и освоить его производство на РУП «Гродненский завод медицинских препаратов», 02.09 «Разработать антиатеросклеротический препарат «Атерамин» и освоить его производство на РУП «Гродненский завод медицинских препаратов», 02.14 «Разработать препарат метаболической терапии «Аргилактам» для коррекции постишемических нарушений и освоить его производство на РУП «Гродненский завод медицинских препаратов», а также задания «Психонейрофармакологические и молекулярно-биологические основы изыскания средств защиты мозга» (01.01.2006–30.06.2008 гг., ГР № 2006478) Государственной комплексной программы фундаментальных, ориентированных фундаментальных и прикладных исследований (ГКПФОИ) «Современные клеточные и молекулярно-генетические технологии в здравоохранении: новые подходы регуляции, коррекции (реабилитации) и профилактики патологических состояний человека» на 2006–2010 гг. и научной темы «Фармакология оксидантного стресса и зависимых патологических процессов» (01.01.2007–31.12.2011 гг., ГР № 20071042). Тема диссертации включена в утвержденный

план научно-исследовательской работы кафедры фармакологии УО БГМУ на 2006–2010 гг.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является разработка средств управления клеточной генерацией активных форм кислорода (АФК), ассоциированной с активностью фермента Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы (Е.С. 1.6.3.1), на основе индивидуальных химических соединений (фармакологических агентов) и их синергических комбинаций. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить высокоэффективные ингибиторы совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК в ряду соединений, принадлежащих к химическим классам структурных аналогов α -токоферола и кумарина, производных дифенола и пирокатехина, бензойной и коричной кислот, установить структурные детерминанты и оптимальные условия проявления их антиоксидантной активности на макрофагальной модели.

2. Изучить характер и дозовые закономерности действия оригинальных индукторов макрофагальной генерации АФК – 4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ола и 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилина как потенциальных средств управления редокс-зависимыми патологическими процессами.

3. Изучить взаимодействия биогенных антиоксидантов α -токоферола, аскорбата, мелатонина и транс(t)-ресвератрола на модели совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах, установить синергические комбинации и дозовые закономерности их действия.

4. Изучить характер действия на совокупную и Nox2-зависимую генерацию АФК в макрофагах клеточных модуляторов разного фармакодинамического профиля, включая агонисты и антагонисты 7-TMS рецепторов, модуляторы внутриклеточного сигналинга, структуры и функции цитоскелета, проводимости катионных каналов, метаболитные соединения, аминокислоты и их производные; установить факторы, определяющие дозовые закономерности действия ингибиторов Nox2-зависимой генерации АФК.

5. Изучить взаимодействия ингибиторов совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК в составе комбинаций, включающих вышеназванные модуляторы клеточной активности, а также их сочетания с антиоксидантами и аминокислотами, установить синергические комбинации и дозовые закономерности их действия.

6. Провести отбор индивидуальных соединений и комбинаций по критериям высокой эффективности и избирательности к Nox2-зависимой генерации АФК для разработки на их основе лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний, ассоциированных с оксидантным стрессом.

7. Проанализировать количественные закономерности действия модуляторов Nox2-зависимой клеточной генерации АФК и их комбинаций с позиций

плейотропизма и разработать подходы к экстраполяции их клеточных эффектов на условия *in vivo*.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования были резидентные перитонеальные макрофаги крыс, индивидуальные соединения разных химических (фармакологических) классов и их комбинации; предметом исследования – процессы генерации АФК в макрофагах, ассоциированные с активностью фермента Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы (Е.С. 1.6.3.1).

Положения, выносимые на защиту

1. Ингибиторная активность антиоксидантов, принадлежащих к химическим классам производных α -токоферола и кумарина, дифенола и пирокатехина, бензойной и коричной кислот в отношении Nox2-зависимой генерации АФК определяется наличием в структуре молекулы гидроксильных и карбонильных групп, их положением в ароматическом ядре, пространственными и внутримолекулярными взаимодействиями с иными функциональными группами, а также химическим составом межклеточной среды. Соединения, обладающие селективностью действия в отношении кислород- и углерод-центрированных радикалов, реализуют различные паттерны плейотропности.

2. Производное бензоксатиола – 4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ол и производное фениланилина – 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилин в биологически приемлемых концентрациях являются высокоэффективными индукторами респираторного взрыва макрофагов и могут быть использованы для управления редокс-зависимыми процессами *in vivo*.

3. Взаимодействия биогенных антиоксидантов α -токоферола, аскорбата, мелатонина и t-ресвератрола как ингибиторов Nox2-ассоциированной генерации АФК определяются составом комбинаций и количественным соотношением компонентов. В случае их синергизма, зависимо от концентрации, комбинации демонстрируют паттерны амплифицирующей плейотропности (t-ресвератрол/мелатонин – 1/1...1/100) или параллельной симбатной плейотропности (аскорбат/мелатонин/t-ресвератрол – 1000/100/1).

4. Фармакодинамическое действие клеточных модуляторов генерации АФК определяется не только их афинностью к специфическим мишеням, но и плейотропностью, которая реализуется в трёх паттернах – параллельной плейотропности, элиминирующей плейотропности, амплифицирующей плейотропности, отражающих различный тропизм соединений к процессам, ассоциированным с активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы, с одной стороны, и альтернативным механизмам клеточной продукции оксидантов – с другой.

5. Паттерны плейотропности, присущие различным классам ингибиторов Nox2-зависимой генерации АФК, отражают детерминированность эффекта несколькими взаимодействующими механизмами: паттерн амплифицирующей

плейотропности формируется при зависимом от концентрации синергизме этих механизмов, паттерн элиминирующей плейотропности – при их антагонизме, паттерн параллельной плейотропности отражает отсутствие внутренних взаимодействий или зависимости этих взаимодействий от концентрации.

6. Высоким тропизмом к Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах и мощным синергическим или аддитивным потенциалом обладают комбинации t-ресвератрола, мелатонина и L-аргинина (1/100/1000...1/10/1000 в диапазоне 10^{-5} М/ 10^{-4} – 10^{-3} М/ 10^{-3} – 10^{-2} М), ацетил-L-карнитина и таурина (1/10...10/1 в диапазоне 10^{-3} М/ 10^{-4} – 10^{-2} М); таурина и L-аргинина (1/10 в диапазоне 10^{-3} – 10^{-2} М/ 10^{-2} М), N-ацетил-L-пролина и АТФ (1/1...10/1 в диапазоне 10^{-3} М/ 10^{-4} – 10^{-3} М); N-ацетил-L-пролина и ацетилсалициловой кислоты или мелоксикама (10/1 в диапазоне 10^{-4} – 10^{-3} М/ 10^{-5} – 10^{-4} М); инозина и L-аргинина (1/1 в диапазоне 10^{-3} М/ 10^{-3} М); инозина, салициловой кислоты и L-аргинина (10/1/10...1/1/10 в диапазоне 10^{-4} – 10^{-3} М/ 10^{-4} М/ 10^{-3} М); L-аргинина и ацетилсалициловой кислоты (10/1 в диапазоне 10^{-4} – 10^{-2} М/ 10^{-5} – 10^{-3} М), послужившие основой для разработки новых лекарственных средств, внедренных в медицинскую практику.

7. На основе полученных результатов разработана теория плейотропного действия биологически активных соединений (лекарственных средств), которая раскрывает неизвестные ранее детерминанты зависимости «доза (концентрация) – эффект», позволяющие объяснить различия в активности и эффективности соединений, обладающих идентичным фармакодинамическим профилем, а также вариабельность биологического ответа в различных условиях их действия. Практическое приложение теории плейотропности позволяет осуществлять отбор индивидуальных соединений и комбинаций по критериям высокого тропизма к модифицируемой компоненте сложного процесса и устойчивости фармакологического эффекта.

Личный вклад соискателя

Выбор направления и общей методологии исследований определен соискателем совместно с научным консультантом д-ром мед. наук, проф. Б.В. Дубовиком (личный вклад – 70%). Автором самостоятельно сформулированы цель и задачи исследования, разработаны методические подходы, выполнены все эксперименты и статистический анализ их результатов, сформулированы научные положения, обобщения и выводы, разработана теория плейотропного действия лекарственных средств, написаны все разделы диссертации (личный вклад – 100%). Научные публикации написаны соискателем лично при консультативном участии соавторов (личный вклад – 90%).

Апробация результатов диссертации

Результаты работы докладывались на 7-м съезде фармацевтов Республики Беларусь «Фармация XXI века» (Витебск, 22 октября 2004 г.), Международной Пироговской студенческой научной конференции (Москва, 2006 г.), Республи-

канской научной конференции «Молекулярная медицина и биохимическая фармакология» (Гродно, 28–29 июня 2007 г.), Международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 2–3 ноября 2010 г.), Международной научно-практической конференции «Экспериментальная и клиническая фармакология» (Гродно, 29–30 сентября 2011 г.), Международной научно-практической конференции «Analytical methods to study oxidative damage, antioxidants and drugs» (Республика Польша, Белосток, 10–13 ноября 2011 г.), научных сессиях БГМУ (2008–2013 гг.), Международной научной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» (Минск, 17–18 мая 2013 г.).

Опубликованность результатов

Основные результаты диссертационной работы изложены в 52 публикациях, включая 30 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Республики Беларусь, 3 статьи в рецензируемых сборниках научных трудов, 12 тезисов докладов на международных и республиканских научных конференциях, 7 патентов на изобретение. Без соавторов опубликовано 15 работ. На статьи, соответствующие п.18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, приходится 18,5 авторских листов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы по теме исследования, описания использованных методов и материалов, девяти глав, содержащих оригинальные результаты исследований, заключения и библиографического списка, включающего 483 использованных источника (36 стр.) и 52 работы соискателя (6 стр.). Диссертация изложена на 365 страницах машинописного текста, включая 99 таблиц и 77 рисунков (173 стр.), содержит 19 приложений (92 стр.) в виде отдельной книги.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе диссертации обобщены литературные данные, характеризующие современные представления о структуре и физиологических функциях НАД(Ф)Н-оксидаз, освещается их тканевая экспрессия и участие в развитии патологических процессов, излагается парадигма исследования, включая описание экспериментальной модели и её свойств, обоснование основных направлений исследования в сопоставлении с работами других авторов и актуализацией решаемых задач.

Во второй главе (материалы и методы исследования) дана характеристика объектам исследования и экспериментальным моделям, перечислены реагенты и материалы, использованные для выполнения работы. Моделью для изучения Nox2-зависимой генерации АФК являлись резидентные перитонеальные мак-

рофаги крыс. В работе представлены результаты испытания 135 индивидуальных соединений и 80 комбинаторных сочетаний, перечень которых содержится в Приложении А рукописи диссертации. Влияние испытуемых соединений и комбинаций на совокупную и Nox2-зависимую генерацию АФК в макрофагах изучали отдельно, методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в экспериментах *in vitro* при регистрации фотоэмиссии на люминометре LKB Wallac-1251-002 (Швеция-Финляндия). В качестве индуктора респираторного взрыва использовали опсонизированный зимозан (OZ), время преинкубации испытуемых соединений с макрофагами составляло 10 мин, время регистрации ХЛ – 40 мин. Совокупное (общее) количество генерируемых клетками АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC ХЛ), мВ/10⁶ клеток. Показатель, отражающий вклад Nox2-зависимого пула в совокупную клеточную продукцию АФК, обозначался как DAUC ХЛ, мВ/10⁶ клеток и рассчитывался как разность между общей площадью под кривой ХЛ (AUC ХЛ) и той её частью, которая обусловлена генерацией АФК вне активации Nox2 (обеспечивается работой других ферментов). Показатели ХЛ проб, содержавших изучаемые соединения, выражали в % к значениям контрольных проб. Эффект каждого модулятора (комбинации) воспроизводили от 3 до 8 раз.

Модулирующий потенциал отдельных антиоксидантов изучали в условиях, приближенных к *in vivo*, которые моделировали внесением макрофагов в гомологичную сыворотку крови, а также в бесклеточной системе на модели пероксид-индуцированной ХЛ сыворотки крови крупного рогатого скота (Шестаков В.А., 1978).

Статистическую обработку первичных результатов внутри серии проводили с использованием парного t-критерия, межсерийные сравнения выполняли по t-критерию Стьюдента. Во всех случаях различия считали достоверными при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$). Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации (IC₁₆–IC₈₄) методом линейной регрессии с использованием ППП «Statistica 6.1» и интерактивного алгоритма в оболочке «Microsoft Office Excel 2003 и 2010», разработанного для анализа взаимодействия компонентов комбинаций по методу комбинаторного индекса (CI) Chou–Talalay (Chou Т-С., 1976–2006). В общем виде уравнение комбинаторного индекса имеет вид:

$$CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j}, \quad (1)$$

где (D)_j – доза (концентрация) агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении;

$(D_x)_j$ – доза (концентрация) агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении;

n – количество компонентов в комбинации.

Оценка степени синергизма и антагонизма по Chou–Talalay сводится к следующему: $CI < 0,1$ – очень сильный синергизм; $0,1–0,3$ – сильный синергизм; $0,3–0,7$ – синергизм; $0,7–0,85$ – умеренный синергизм; $0,85–0,90$ – слабый синергизм; $0,90–1,10$ – аддитивный эффект; $1,10–1,20$ – слабый антагонизм; $1,20–1,45$ – умеренный антагонизм; $1,45–3,3$ – антагонизм; $3,3–10,0$ – сильный антагонизм; > 10 – очень сильный антагонизм.

Другим показателем рациональности комбинации является индекс снижения дозы (DRI), который показывает во сколько раз можно снизить дозу каждого вещества в комбинации для получения эффекта, сравнимого с эффектом каждого вещества в отдельности, и рассчитывается по формуле:

$$DRI_j = \frac{(D_x)_j}{(D)_j}. \quad (2)$$

Анализ паттернов плейотропности выполнялся на основе коэффициентов относительной активности (плейотропной активности) (K_{16-84}), которые рассчитывались по формуле:

$$K_x = \frac{IC_{xAUC}}{IC_{xDAUC}}. \quad (3)$$

IC_x рассчитывался по уравнению медианного эффекта (Chou T-C., 1976):

$$IC_x = IC_{50} [f_x / (1 - f_x)]^{1/m}, \quad (4)$$

где K_x – значение коэффициента плейотропной активности на x уровне эффекта;

IC_{xAUC} – ингибирующая концентрация соединения в отношении совокупной генерации АФК на x уровне эффекта;

IC_{xDAUC} – ингибирующая концентрация соединения в отношении Nox2-зависимой генерации АФК на x уровне эффекта;

f_x – измененная доля от максимального эффекта;

m – коэффициент наклона зависимости «концентрация – эффект».

Так, если вклад Nox2 прирастал симбатно увеличению концентрации модулятора, формировался паттерн **амплифицирующей (синергической) плейотропности**. Этому паттерну соответствовал экспоненциальный прирост K_{16-84} по мере нарастания эффекта биологически активного соединения. Напротив, если вклад Nox2 в генерацию клеткой АФК уменьшался по мере увеличения концентрации модулятора, формировался паттерн **элиминирующей (антагони-**

стической) плейотропности. Этому паттерну соответствовало экспоненциальное уменьшение K_{16-84} по мере прироста эффекта биологически активного соединения. В случае, когда вклад Nox2 в генерацию клеткой АФК оставался постоянным (составлял постоянную долю на каждом уровне эффекта), формировался *паттерн параллельной плейотропности*, которому соответствовало постоянство K_{16-84} во всем эффективном диапазоне. Последний паттерн можно разделить на три субварианта по признаку тропизма формирующих его механизмов к целевому эффектору (Nox2) и альтернативным эффекторам, в совокупности обеспечивающим клеточную продукцию АФК: паттерн параллельной симбатной плейотропности при $K_{16-84} > 1,0$; паттерн параллельной несимбатной плейотропности при $K_{16-84} < 1,0$; паттерн параллельной нейтральной плейотропности при $K_{16-84} \approx 1,0$.

В третьей главе изложены результаты изучения индивидуального действия антиоксидантов, принадлежащих к химическим классам структурных аналогов α -токоферола и кумарина, производных дифенола и пирокатехина, включая тиофенолы и аминафенолы, производных бензойной и коричной кислот (всего 87 индивидуальных соединений). Установлены особенности действия соединений, объединенных структурной общностью в химические группы, выявлены наиболее активные ингибиторы Nox2-зависимой генерации АФК. Установлены общие (межгрупповые) закономерности действия и структурные детерминанты антиоксидантной активности соединений, а также основные паттерны плейотропности, реализуемые антиоксидантами в отношении Nox2-зависимой генерации АФК. Сущность этих результатов сводится к следующему.

Активность *структурных аналогов α -токоферола*, несущих атом серы в хромановом фрагменте молекулы и не имеющих фитильной цепи, в целом не превышает активности прототипа ($IC_{50\ AUC} = 8,7$ мкМ; $IC_{50\ DAUC} = 6,1$ мкМ). Производные α -токоферола, содержащие доступный для взаимодействия гидроксил, – 5,7,8-триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантин-6-ол (соединение С7), 2,5,7,8-тетраметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантин-6-ол (соединение С8), 2-(гидроксиметил)-5,7,8-триметил-2,3-дигидро-1,4-бензоксантин-6-ол (соединение С9) – потенциальные «ловушки» кислород-центрированных радикалов – более активны в отношении Nox2-зависимой генерации АФК ($IC_{50} = 5,1$ мкМ; 1,9 мкМ; 0,8 мкМ, соответственно). В отношении совокупной генерации АФК более активны ингибиторы углерод-центрированных радикалов – 6-метокси-1,4-бензоксантин-2(3H)-он (соединение С2, $IC_{50} = 37,0$ мкМ) и 5-метокси-4,6,7-триметил-1,3-бензоксатиол-2-он (соединение С16, $IC_{50} = 5,7$ мкМ).

Производные бензойной и коричной кислот в целом уступают по активности соответствующим альдегидам, как в отношении совокупной, так и Nox2-зависимой генерации АФК. При этом активность и кислот, и альдегидов в отношении Nox2-ассоциированного пула АФК зависит от количества реакционно

способных гидроксильных групп и их расположения в молекуле, активность сильно снижается при появлении метоксильных заместителей у соседнего по отношению к несущему гидроксил атому бензольного кольца. Бензойная кислота ($IC_{50} = 3,89$ мкМ) превосходит коричную кислоту ($IC_{50} = 45,7$ мкМ) по антиоксидантной активности в отношении макрофагальной генерации АФК, тогда как гидроксильные и метоксильные производные бензойной кислоты в целом уступают аналогичным производным коричной кислоты по отношению к Nox2-зависимой части совокупного пула АФК. Это можно объяснить появлением в молекуле последних цепи сопряжения с участием винилового фрагмента, повышающей реакционную способность гидроксильных групп, за счет которых антиоксиданты нейтрализуют кислород-центрированные радикалы, в избытке генерируемые при активации Nox2. Транс(t)-ресвератрол ($IC_{50} = 1,8$ мкМ) и куркумин ($IC_{50} = 87,1$ нМ) обладают мощным антиоксидантным потенциалом в отношении Nox2-зависимой генерации АФК; близкой к t-ресвератролу активностью обладали: в ряду альдегидов – протокатехоловый альдегид (соединение R3, $IC_{50} = 1,5$ мкМ), 2,3-дигидроксибензальдегид (соединение R16, $IC_{50} = 1,3$ мкМ), сиреневый альдегид (соединение R5, $IC_{50} = 4,4$ мкМ), коричный альдегид (соединение R13, $IC_{50} = 7,9$ мкМ); в ряду кислот – кофейная кислота (соединение R11, $IC_{50} = 4,6$ мкМ), в ряду спиртов – ванилиновый спирт (соединение R8, $IC_{50} = 2,7$ мкМ).

Изучение *стерически затрудненных производных фенола, мета- и парадифенола и пирокатехина* показало, что антиоксидантное действие этих соединений зависит от количества и взаиморасположения в молекулах свободных гидроксильных групп и экранирующих заместителей. При этом эффект заместителей различается для фенолов и пирокатехинов. В ряду производных фенола наиболее активными оказались соединения, содержащие гидроксилы в пара-положении (1,4-дигидроксибензол (соединение O1, $IC_{50} = 0,37$ мкМ)), перемещение одного из гидроксильных групп в мета-положение (резорцин (соединение RC, $IC_{50} = 10,0$ мкМ)) или его замещение метоксильной группой (4-метоксифенол (соединение O3, $IC_{50} = 3,1$ мкМ)) приводило к снижению активности, появление в молекулах соединений O1 и RC двух трет-бутильных заместителей в орто-положении по отношению к гидроксилам (2,5-ди-трет-бутилгидрохинон (соединение O6) и 4,6-ди-трет-бутилрезорцин (соединение O8)), соответственно полностью лишало эти производные антиоксидантного потенциала. В ряду производных пирокатехина эффект трет-бутильных групп был иным – появление дополнительного трет-бутильного радикала в молекуле 4-трет-бутилпирокатехина (соединение O9, $IC_{50} = 0,65$ мкМ), сопоставимого по активности с соединением O1, увеличивало активность производного (3,5-ди-трет-бутилпирокатехин (соединение O11, $IC_{50} = 3,50$ нМ)) на 3 порядка величин, не изменяя максимальной эффективности, тогда как введение дополнительной гидроксильной группы

в молекулу соединения O11 приводило к полной утрате антиоксидантных свойств его производным (1,2,3-тригидрокси-4,6-ди-трет-бутилбензол (соединение O13)). Анализ пар «фенол – хинон» показывает, что хиноны зачастую не уступают в активности фенолам, а в отдельных случаях превосходят их (пары 1,4-дигидроксибензол (соединение O1, $IC_{50} = 0,37$ мкМ) – 1,4-бензохинон (соединение O2, $IC_{50} = 0,18$ мкМ); 1,4-дигидрокси-2,3,5-триметилбензол (соединение O4, $IC_{50} = 8,7$ мкМ) — 2,3,5-триметил-1,4-бензохинон (соединение O5, $IC_{50} = 7,6$ мкМ); 4-трет-бутилпирокатехин (соединение O9, $IC_{50} = 0,65$ мкМ) – 4-трет-бутил-1,2-бензохинон (соединение O10, $IC_{50} = 38,9$ нМ). В этой связи соединения, способные к быстрым гомолитическим трансформациям «фенол – хинон» *in vivo*, представляются наиболее перспективными для разработки антиоксидантов широкого спектра действия. Настоящие результаты согласуются с результатами изучения сравнительной антиоксидантной эффективности хинонов и дифенолов на модели радиационно индуцированной свободнорадикальной фрагментации глицирофосфолипидов (Юркова И.Л. и соавт., 2002–2010).

Антиоксидантные свойства *серосодержащих производных фенола* определяются количеством и местоположением заместителей в бензольном кольце молекулы. Большинство изученных производных уступает прототипу (3,5-ди-трет-бутилпирокатехину (соединение O11, $IC_{50} = 3,50$ нМ)) по антиоксидантной активности. На модели макрофагальной генерации АФК показано, что наиболее эффективным является 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин (соединение S7, $IC_{50} = 3,39$ нМ), который способен эффективно нейтрализовать кислород-центрированные и углерод-центрированные радикалы в химических тестах.

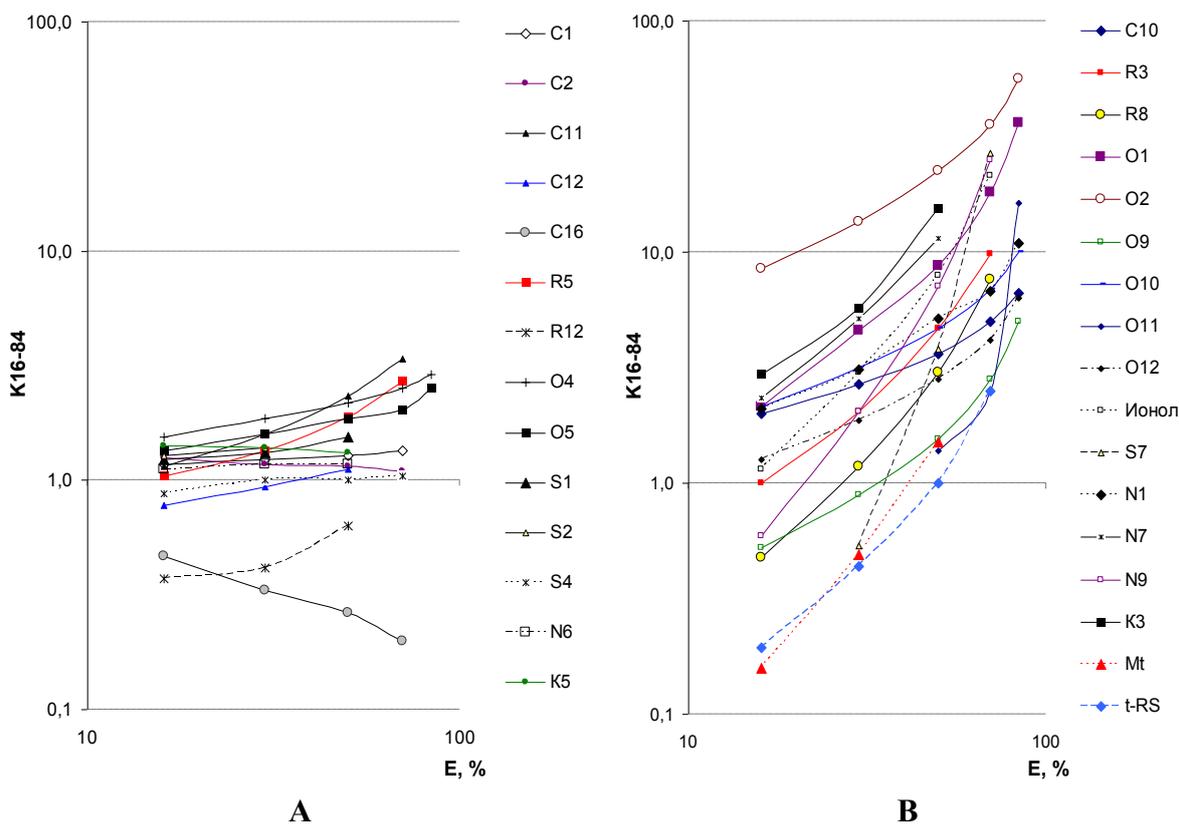
Антиоксидантные свойства *аминофенолов* на модели макрофагальной генерации АФК определяются характером аминоксодержащих заместителей в орто-положении к фенольному гидроксилу. Соединениями-лидерами на модели фагоцитарной генерации АФК оказались 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенол (соединение N1, $IC_{50} = 0,1$ мкМ), N-(2-метокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) диметиламин (соединение N9, $IC_{50} = 2,57$ мкМ) и 2-анилино-4,6-ди-трет-бутилфенол (соединение N7, $IC_{50} = 0,3$ мкМ), которые превосходили в активности соединения-прототипы этой группы – мелатонин ($IC_{50} = 0,2$ мМ) и метилэтилпиридинол ($IC_{50} > 0,2$ мМ).

Антиоксидантная активность *производных кумарина* в отношении Nox2-зависимой генерации АФК положительно коррелирует с количеством свободных гидроксильных групп в молекуле, метоксильная группа в орто-положении по отношению к гидроксилу снижает антиоксидантную активность. Кумарин (соединение K1, $IC_{50} = 11,7$ мкМ) и вербенон (соединение K5, $IC_{50} = 36,3$ мкМ), различающиеся структурно, не имеющие гидроксильных групп, но несущие карбонильную группу и потенциально способные к взаимодействию с углерод-

центрированными молекулами, демонстрируют сходную антиоксидантную активность во всем диапазоне эффективных концентраций.

Анализ совокупности полученных результатов позволил установить для производных фенола, дифенола и полифенолов, активных в отношении Nox_2 -зависимой генерации АФК, универсальные структурные детерминанты антиоксидантного действия, состоящие в следующем. Антиоксидантная активность зависит от количества и положения гидроксильных групп в бензольном кольце молекулы: наиболее активны соединения, содержащие гидроксил в пара-положении по отношению к функциональной группе. Антиоксидантный потенциал производных фенола и дифенола повышает введение дополнительных гидроксильных групп в состав заместителя и в бензольное кольцо молекулы. К снижению антиоксидантной активности ведут следующие структурные преобразования: появление в молекуле экранирующих заместителей в орто-положении по отношению к гидроксилу, введение электронодонорных заместителей (метильных групп) в ароматический фрагмент молекулы, появление серо- и азотсодержащих заместителей в бензольном кольце, а также замена карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$) на карбоксильную (COO^-). Антиоксидантная активность производных фенола и дифенола зависит от вероятности формирования водородных связей гидроксила с другими функциональными группами молекулы. В зависимости от силы водородной связи антиоксидантная активность как повышается, так и снижается вплоть до полной утраты. Появление сопряжения между гидроксильными, карбонильными и другими функциональными группами и ароматическим кольцом молекулы антиоксиданта может в зависимости от характера заместителей в бензольном кольце как повышать, так и снижать антиоксидантную активность соединения.

Учитывая, что в биосредах свободнорадикальные реакции, протекающие с участием углерод- и кислород-центрированных радикалов тесно связаны между собой, определенное биологическое преимущество имеют неселективные плеiotропные антиоксиданты, такие как природные соединения t-ресвератрол и мелатонин, а также соединения с переходной селективностью, такие как аналоги ди-трет-бутильных производных фенола (пары 4-трет-бутилпирокатехин (соединение O9) — 4-трет-бутил-1,2-бензохинон (соединение O10), и 3,5-ди-трет-бутилпирокатехин (соединение O11) — 3,5-ди-трет-бутил-1,2-бензохинон (соединение O12)). Исследование показало также, что для антиоксидантов, эффективно подавляющих Nox_2 -зависимую генерацию АФК, характерен паттерн амплифицирующей плеiotропности, а их активность должна оцениваться как интегральный показатель структурных детерминант и условий действия. Соединения, обладающие высокой тропностью к углерод-центрированным радикалам, реализуют паттерн параллельной плеiotропности (монотропности) (рисунки 1).



А – паттерн плейотропности, характерный для соединений, структурно тропных к углерод-центрированным радикалам, В – к кислород-центрированным радикалам, он же характерен для «унитропных» соединений – мелатонина (Mt), t-ресвератрола (t-Rs), фенол-хинольных пар O9-O10 и O11-O12. Координаты логарифмические

Рисунок 1 – Паттерны плейотропности производных фенола, дифенола и полифенолов в отношении Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах

В четвертой главе изложены результаты изучения комбинированного действия антиоксидантов. Испытание комбинаций α -токоферола с аскорбатом, а также аскорбата с мелатонином и t-ресвератролом свидетельствует о следующих аспектах их взаимодействия. Результат взаимодействия α -токоферола и аскорбата определяется, с одной стороны, характером комбинации – молярным сочетанием компонентов и их концентрацией, с другой – условиями действия: составом и прооксидантным профилем биосреды. На модели респираторного взрыва фагоцитов комбинация α -токоферола и аскорбата синергична при 10-кратном превалировании последнего ($CI_{50} = 0,80$), дальнейшее увеличение концентрации аскорбата (1/100) ведет к уменьшению синергизма ($CI_{50} = 0,82$) и появлению антагонизма при соотношении компонентов 1/1000 ($CI_{50} = 5,84$). Тенденция к уменьшению синергизма отмечается и при снижении концентрации компонентов в любом комбинаторном сочетании.

Изучение различных комбинаций t-ресвератрола, мелатонина и аскорбата позволило установить, что наиболее рациональной является комбинация двух плейотропных антиоксидантов – мелатонина и t-ресвератрола, которые проявля-

ют выраженный синергизм при равном содержании в среде или превалировании t-ресвератрола ($CI_{50} = 0,06-0,51$). Синергическое взаимодействие мелатонина и t-ресвератрола более устойчиво при вариациях молярных сочетаний и концентраций, чем взаимодействие каждого из них с аскорбатом ($CI_{50} = 0,42-1,37$). В трехкомпонентной комбинации аскорбат, t-ресвератрол и мелатонин (1000/1/100) взаимодействуют синергически в отношении Nox2-зависимой генерации АФК ($CI_{50} = 0,74-0,17$) и уступают двойной комбинации t-ресвератрола с мелатонином в отношении подавления совокупной продукции оксидантов, демонстрируя синергизм компонентов только в области высоких концентраций и при значительном молярном превалировании аскорбата и мелатонина ($CI_{30} = 1,15-4,56$; $CI_{70} = 0,16-0,73$). Таким образом, трехкомпонентная комбинация не имеет преимуществ перед комбинацией мелатонина и t-ресвератрола.

Проведенные исследования позволили трактовать вклад аскорбата в антиоксидантное действие комбинаций следующим образом. Аскорбат взаимодействует с ароматическими антиоксидантами различной структуры и липофильности при их комбинированном применении в среде, содержащей избыток АФК. Характер взаимодействия зависит от концентрации и соотношения компонентов комбинации. Как избыток, так и недостаток аскорбата по отношению к ароматическому компоненту ведет к снижению синергизма и проявлению прооксидантных свойств комбинации. Чем большим восстановительным потенциалом обладает ароматический компонент, тем большие концентрации аскорбата требуются для достижения синергизма комбинации. Вне зависимости от молярного соотношения компонентов в комбинации, при низких концентрациях превалирует антагонистический характер взаимодействия аскорбата с другими антиоксидантами, при высоких – синергический. Синергизм аскорбата и ароматического компонента более выражен в отношении продуктов активности Nox2 и носит насыщающий характер уже в диапазоне $E_{16}-E_{30}$. Это дает основание рассчитывать на реализацию антиоксидантного потенциала комбинации аскорбат/ароматическое соединение в отношении клеточной генерации АФК *in vivo*. Настоящие результаты согласуются с исследованиями Т.С. Морозкиной (1989–1999), показавшей аналогичные закономерности взаимодействия аскорбата с некоторыми ароматическими соединениями в иных модельных условиях.

Анализ паттернов плейотропности, выполненный для каждого молярного сочетания компонентов испытанных комбинаций, свидетельствует о том, что взаимодействие антиоксидантов, реализующих разные индивидуальные паттерны плейотропности в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, может вести к формированию разных паттернов при комбинированном действии, однако их вид определяется характером фармакодинамических взаимодействий. Комбинации, демонстрировавшие зависимый от концентрации синергизм компонентов, формируют два паттерна – паттерн параллельной симбатной плейо-

тропности (комбинация аскорбат/мелатонин/t-ресвератрол – 1000/100/1) и паттерн последовательной амплифицирующей плейотропности, как различные молярные сочетания мелатонина и t-ресвератрола. Исследование позволило отобрать наиболее рациональные комбинации для дальнейшего испытания и разработки лекарственных средств, эффективных с позиций управления Nox2-зависимой генерацией АФК.

В пятой главе изложены результаты индивидуального действия биологически активных соединений, различным образом модифицирующих клеточные функции. Способность макрофагов к генерации АФК по Nox2-зависимому механизму угнетается фармакологическими агентами и лекарственными средствами, повышающими внутриклеточный уровень цАМФ – β -адренергическими агонистами изопреналином ($IC_{50} = 12,9$ мкМ) и сальбутамолом ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = -23,3\%$), неизбирательными агонистами 5-HT₁₋₅ рецепторов серотонином ($IC_{50} = 33,9$ мкМ) и H₁₋₃ рецепторов гистамином ($EC_{max} = 100,0$ мкМ; $E_{max} = -21,7\%$), ингибиторами фосфодиэстераз (изобутил-метилксантином (ИБМК) – $IC_{50} = 2,57$ мкМ), препаратами цАМФ (дибутирил-цАМФ – $IC_{50} = 120,2$ мкМ); блокаторами Ca²⁺-каналов L-типа – нифедипином ($IC_{50} = 1,4$ мкМ) и верапамилом ($IC_{50} = 83,2$ мкМ), агонистами пуриновых рецепторов I-типа (аденозином – $EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = -24,0\%$, инозином – $EC_{max} = 1,0$ мМ; $E_{max} = -42,4\%$) и II-типа (АТФ – $IC_{50} = 288,4$ мкМ, АДФ – $IC_{50} = 95,5$ мкМ, АМФ – $IC_{50} = 120,2$ мкМ). Среди аминокислот и их производных ингибирующим действием обладают ацетилированные производные L-пролина – N-ацетил-4-гидрокси-L-пролин ($IC_{50} = 42,7$ мкМ), N-ацетил-L-пролин ($IC_{50} = 309,0$ мкМ), L-аргинин ($IC_{50} = 2,7$ мМ), таурин ($IC_{50} = 5,1$ мМ), L-триптофан при концентрациях > 10,0 мкМ, а также ацетил-L-карнитин ($IC_{50} = 120,2$ мкМ). Ингибируют Nox2-зависимую генерацию АФК также цитоактивные агенты различной структуры – блокаторы Na⁺-каналов (прокаин ($IC_{50} = 60,3$ мкМ), лидокаин ($IC_{50} = 33,1$ мкМ), бупивакаин ($IC_{50} > 170,0$ мкМ), хинидин, блокирующий также K⁺-каналы ($IC_{50} = 85,1$ мкМ), ингибитор Na⁺/K⁺ АТФ-азы строфантин ($IC_{50} = 8,3$ мкМ), блокатор внутриклеточного транспорта колхицин ($IC_{50} = 12,9$ мкМ), а также глюкокортикостероиды – преднизолон ($EC_{max} = 0,1$ мМ; $E_{max} = -37,2\%$) и дексаметазон ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = -28,1\%$).

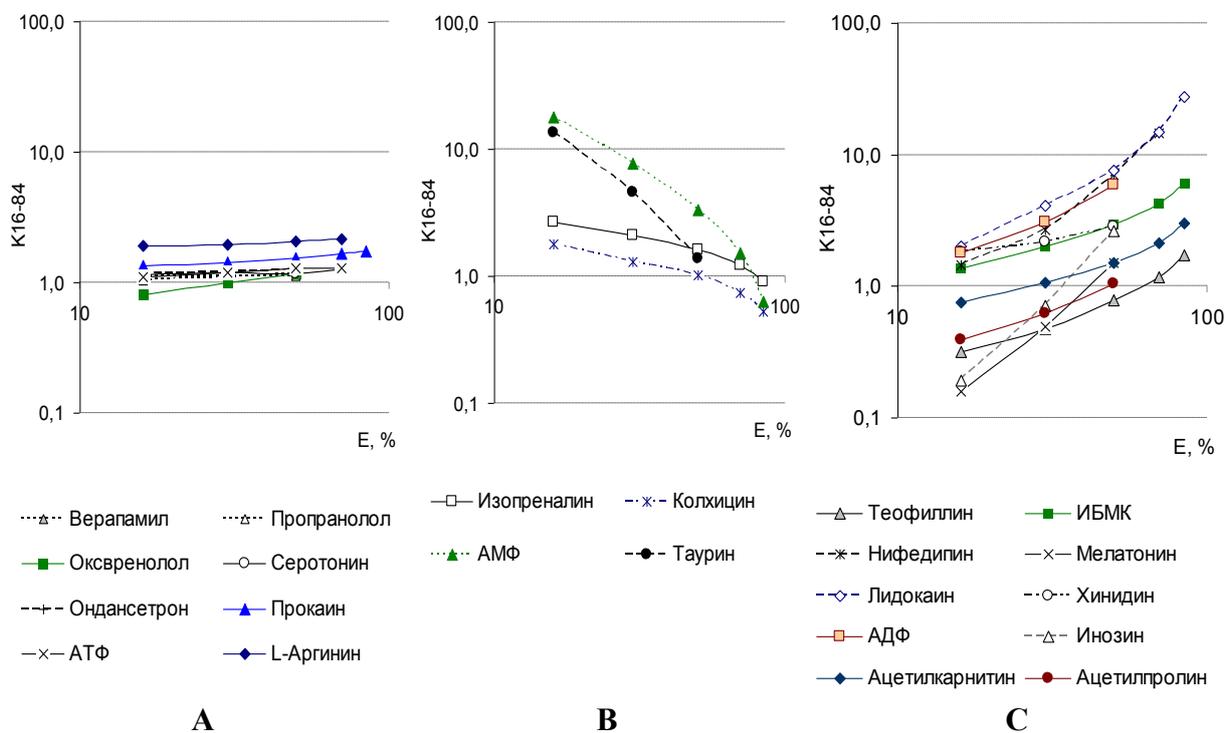
Макрофагальную генерацию АФК усиливают на величину от 40 до 250% агонисты 7-TMS рецепторов, преимущественно ассоциированных с PIP₃-зависимыми каскадами внутриклеточной передачи сигнала: α_1 -адренергический агонист фенилэфрин ($EC_{max} = 1,0$ мкМ; $E_{max} = +48,8\%$), неизбирательный агонист адренергических рецепторов эпинефрин ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = +86,5\%$), неизбирательный агонист D₁₋₅ рецепторов дофамин ($EC_{max} = 1,0$ нМ; $E_{max} = +115,7\%$). Среди аминокислот и их производных стимулирующим действием обладают селенит L-аргинина ($EC_{max} = 1,0$ мМ; $E_{max} = +147,1\%$) и L-триптофан

($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = +57,9\%$). Стимулирующим действием в терапевтических диапазонах концентраций обладают ингибиторы циклооксигеназ (ЦОГ): кислота ацетилсалициловая (АСК – $EC_{max} = 1,0$ мМ; $E_{max} = +29,6\%$), диклофенак ($EC_{max} = 1,0$ мкМ; $E_{max} = +29,0\%$), мелоксикам ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = +31,0\%$), целекоксиб ($EC_{max} = 10,0$ мкМ; $E_{max} = +105,1\%$).

Раздельный анализ активности испытанных биомодуляторов в отношении совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК позволил выявить важные закономерности их действия. Действие большинства соединений, являющихся прямыми ингибиторами активности ферментных каскадов, ионных токов или функций цитоскелета, в целом соответствует современным представлениям о механизмах активации Nox2 макрофагов при FcR-зависимом фагоцитозе (García-García E., 2002). Что касается агонистов 7-TMS рецепторов, то исследование не позволило установить устойчивой взаимосвязи между сопряжением рецептора с определенным типом G-р и его эффектом в отношении Nox2-зависимой генерации АФК. В совокупности с современными представлениями о природе действия агонистов 7-TMS рецепторов такие результаты позволяют подвергать сомнению устоявшиеся представления о фармакодинамике известных лекарственных средств этого ряда и искать новые подходы к анализу их биологического действия. Одним из таких подходов является развитие представлений о плейотропной природе действия биологически активных соединений (лекарственных средств), рассматриваемых ниже и в главе 11 рукописи диссертации. Несмотря на то, что плейотропность является имманентным свойством всех биологически активных соединений, обеспечивающим формирование их индивидуального биомодулирующего потенциала и дозовых закономерностей действия, оно не учитывается в современной экспериментальной фармакологии и медицине как существенное, что отражается в упрощенных представлениях об их биологическом (фармакологическом) действии и в дальнейшем ведет к недостаточно эффективному использованию на практике.

Анализ ингибирующего действия биологически активных соединений с позиции плейотропности позволил по характеру формируемых паттернов разделить их на три группы. Первую группу сформировали соединения, демонстрировавшие паттерн параллельной плейотропности – антагонисты β -адренергических (пропранолол, сотатол, окспренолол, метопролол) и серотониновых (ондансетрон) рецепторов, блокаторы натриевых каналов (прокаин, бупивакаин), верапамил, АТФ, серотонин и L-аргинин. Кроме того, этот паттерн присущ соединениям, реализующим в настоящей модели прямое антирадикальное (монотропное) действие (см. главу 3). Вторую группу сформировали колхицин, таурин, изопреналин и АМФ. Действию этих соединений в отношении Nox2-зависимой генерации АФК сопутствовал паттерн элиминирующей плейотропности. К соединениям третьей группы, формирующим паттерн амплифициру-

ющей плеiotропности, относятся нифедипин, хинидин, инозин, АДФ, мелатонин, N-ацетил-L-пролин и N-ацетил-гидрокси-L-пролин, ацетил-L-карнитин, а также t-ресвератрол, обладающий помимо антиоксидантного, прямым ингибирующим действием в отношении Nox2 (рисунок 2).



А – параллельная плеiotропность; В – последовательная несимбатная элиминирующая (антагонистическая) плеiotропность; С – последовательная симбатная амплифицирующая (синергическая) плеiotропность

Рисунок 2 – Паттерны плеiotропности некоторых биологически активных соединений в отношении Nox2-ассоциированной генерации АФК

Настоящие результаты имеют фундаментальное значение, поскольку расширяют современные представления об арсенале и характере действия модуляторов клеточной генерации АФК. Вместе с тем они позволяют избирать соединения, обладающие высоким ингибирующим тропизмом к Nox2-ассоциированной генерации АФК, представляющие интерес с позиций разработки лекарственных средств для лечения редокс-ассоциированных патологических процессов.

В шестой главе представлены результаты изучения комбинированного действия высокоэффективных ингибиторов Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах. Анализ комбинированного действия наиболее активных ингибиторов макрофагальной генерации АФК разного типа действия – изопреналина, ИБМК, нифедипина, колхицина и t-ресвератрола показал, что блокатор медленных кальциевых токов нифедипин и агонист β-адренергических рецепторов изопреналин обладают фармакодинамическим антагонизмом ($CI_{50} = 20,48-2,32$)

при молярных сочетаниях 1/1...1/10 в отношении совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК. Аналогичный результат взаимодействия компонентов обнаружили комбинации нифедипина и колхицина ($CI_{50} = 9,53-2,49$) при тех же молярных соотношениях. Взаимодействие ИБМК с изопреналином (10/1...1/10) и нифедипином (10/1), напротив, носило синергический характер и в отношении совокупной ($CI_{50} = 0,80-0,65$ и $CI_{50} = 0,61-0,39$ соответственно), и в отношении Nox2-зависимой генерации АФК ($CI_{50} = 0,84-0,45$ и $CI_{50} = 0,66$ соответственно). В отношении Nox2-зависимой генерации АФК взаимодействия ИБМК и ингибитора сборки Nox2 t-ресвератрола с изопреналином и нифедипином зависели от комбинаторного сочетания и концентраций. В области низких концентраций доминировало аддитивное взаимодействие ($CI_{30} = 1,15-0,98$), в области высоких – синергизм ($CI_{70} = 0,78-0,67$) при эквимолярном (1/1) сочетании компонентов. Фармакодинамические взаимодействия пуринов на модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах при молярных комбинаторных сочетаниях АТФ-1/АДФ-10, АМФ-1/АДФ-1, АМФ-10/АТФ-1 и АМФ-10/АТФ-1/АДФ-10 соответствуют критериям антагонизма на уровне $E_{16}-E_{30}$ ($CI_{16-30} = 6,67-1,11$) и синергизма на уровне $E_{50}-E_{84}$ ($CI_{50-84} = 0,75-0,14$).

Анализ паттернов плейотропности в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, выполненный для испытанных комбинаций, свидетельствует о том, что характер паттернов определяется природой фармакодинамических взаимодействий компонентов комбинации. Комбинации, синергизм компонентов которых нарастал по мере увеличения их концентраций, вне зависимости от индивидуальных паттернов компонентов реализуют два вида плейотропности – амплифицирующую плейотропность и параллельную симбатную плейотропность. Напротив, комбинации, в которых по мере увеличения концентрации нарастал антагонизм компонентов (даже при исходном синергизме на уровне $E_{16}-E_{30}$), формируют паттерн элиминирующей плейотропности. Паттерн параллельной плейотропности могут демонстрировать как синергические, так и антагонистические комбинации. Эти результаты позволяют не только установить паттерны плейотропности, присущие испытанным комбинациям биологически активных соединений, но и раскрыть природу индивидуальных паттернов плейотропности. Настоящее исследование также показало, что предсказать результат фармакодинамических взаимодействий плейотропных соединений на основе анализа зависимостей эффекта от дозы (концентрации), паттернов плейотропности или их известных механизмов действия практически невозможно. Его можно оценить лишь при экспериментальном изучении комбинаций с использованием современной методологии комбинаторной фармакологии. С позиций экспериментальной фармакологии анализ паттернов плейотропности и расчет фармакодинамических взаимодействий являются взаимодополняющими подходами при изыскании комбинаций, обладающих высокой селективностью

и синергизмом компонентов в отношении целевого эффекта, например, такого как Nox2-зависимая генерация АФК.

В седьмой главе представлены результаты изучения взаимодействий редокс-модулирующих аминокислот L-аргинина и таурина с биогенными антиоксидантами t-ресвератролом и мелатонином. На модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах взаимодействие t-ресвератрола с L-аргинином (соотношения 1/100 и 1/1000) соответствует критериям антагонизма ($CI_{50} = 2,68-2,31$), с мелатонином (соотношения 1/1...1/100) – синергизма ($CI_{50} = 0,51-0,06$), с таурином (соотношение 1/100) – аддитивности ($CI_{50} = 0,91$). Трехкомпонентная комбинация t-ресвератрола, мелатонина и L-аргинина (в соотношениях 1/1000/100...1/1000/10) демонстрирует тем больший синергизм ($CI_{50} = 0,51-0,66$) в отношении Nox2-зависимой генерации АФК, чем больше мелатонина содержится. Результат взаимодействия таурина с L-аргинином и t-ресвератролом зависит от молярного соотношения компонентов и их концентраций и колеблется от аддитивности ($CI_{50} = 1,12$ для соотношения 100/100/1), до антагонизма ($CI_{50} = 9,08$ для соотношения 100/1000/1). Комбинация ацетил-L-карнитина и таурина в молярных соотношениях 1/10...10/1 ингибирует Nox2-зависимую генерацию АФК в макрофагах, демонстрируя синергизм компонентов ($CI_{50} = 0,34-0,48$). При любых молярных соотношениях компонентов комбинация обладает значительным дозовым резервом по таурину ($DRI_{50} = 13,8-867,9$), обеспечивающим высокую устойчивость её фармакологического эффекта. Полученные результаты раскрывают высокий фармакодинамический потенциал комбинаций клеточных редокс-модуляторов.

Восьмая глава посвящена изучению N-ацетил-L-пролина – нового противовоспалительного средства, обладающего выраженным ингибирующим действием в отношении Nox2-зависимой клеточной продукции АФК при индивидуальном воздействии ($IC_{50} = 3,51$ мкМ). В комбинации с иными клеточными модуляторами N-ацетил-L-пролин демонстрирует синергизм в комбинациях с АТФ ($CI_{50} = 0,77-0,09$ в соотношениях 1/1...10/1) и антагонизм в комбинациях с нифедипином ($CI_{50} = 3,53-5,46$ в соотношениях 1/1...10/1) и колхицином ($CI_{50} = 3,83-4,08$ в соотношениях 1/1...10/1). При этом N-ацетил-L-пролин не изменяет индивидуальных паттернов плейотропности, присущих нифедипину и колхицину в отношении Nox2-зависимой генерации АФК. При 10-кратном превалировании над ингибиторами ЦОГ (АСК и мелоксикамом) N-ацетил-L-пролин нивелирует их стимулирующее действие на генерацию АФК, ассоциированную с активностью Nox2, что может быть использовано в клинической практике для усиления анальгезирующего и противовоспалительного действия этих соединений.

В девятой главе содержатся результаты изучения различных комбинаций инозина, L-аргинина и АСК. Комбинация инозина с L-аргинином в молярном

соотношении 1/1 обладает выраженным стимулирующим действием на Nox2-зависимую генерацию АФК в биологически приемлемом диапазоне концентраций ($E_{\max} = +97\%$; $EC_{\max} = 1,0$ мМ), что явилось основанием для разработки лекарственного средства иммуностимулирующего типа действия.

Результаты испытания комбинации L-аргинина и АСК на клеточной модели свидетельствуют о том, что при 5–10-кратном превалировании L-аргинин полностью подавляет стимулирующее действие АСК на Nox2-зависимую продукцию АФК в макрофагах ($E = -13,6 - -60,7\%$; $EC_{100,0/10,0-10,0/1,0}$ мкМ). Этим механизмом можно объяснить большой кардиопротекторный эффект комбинации АСК и L-аргинина при сосудистых катастрофах в сравнении с индивидуальным действием прототипов, что было положено в основу разработки нового кардиопротекторного средства.

Трехкомпонентные комбинации на основе инозина, салициловой кислоты и L-аргинина демонстрируют сильный синергизм компонентов ($CI_{50} = 0,12-0,09$) и обладают сильным ингибирующим действием на Nox2-зависимую макрофагальную продукцию АФК ($E_{\max} = 46,1-53,5\%$) в широком диапазоне концентраций (0,1–1,0 мМ) и комбинаторных соотношений (10/1/10...1/1/10). Дальнейшие исследования показали, что сочетания инозина, L-аргинина и салицилатов перспективны для разработки вазо- и кардиопротекторных средств.

Анализ результатов настоящего исследования, а также данных других авторов свидетельствует о том, что фармакодинамический профиль аминокислот сложнее, чем это представлялось ранее, а его молекулярные механизмы пока не раскрыты. Испытанные в настоящем исследовании аминокислоты и их производные обладали разными индивидуальными паттернами плеiotропности в отношении Nox2-зависимого процесса: таурин демонстрировал паттерн элиминирующей плеiotропности, N-ацетил-L-пролин – паттерн амплифицирующей плеiotропности, L-аргинин – паттерн параллельной симбатной плеiotропности. Установленный характер действия аминокислот наряду с их плеiotропной природой свидетельствует о том, что аминокислоты можно с успехом использовать для избирательной модификации целевого компонента такого сложного биологического процесса, как Nox2-зависимая генерация АФК. С другой стороны, когда речь идет о таком управлении, плеiotропность действия детерминирует зависимость эффекта от концентрации (дозы) аминокислот, а также диапазон эффективных концентраций. Она же определяет характер совместного (комбинированного) действия аминокислот и иных биологических модуляторов. С позиций экспериментальной фармакологии плеiotропность позволяет добиваться разных фармакологических эффектов комбинаторными сочетаниями одной и той же аминокислоты с биологически активными соединениями разного типа действия. Комбинации позволяют при этом усилить целевой эффект за счет фармакодинамического синергизма или ослабить его за счет фар-

макодинамического антагонизма, чем достигается формирование сложного фармакодинамического профиля комбинированных аминокислотных средств. Настоящее исследование позволило установить рациональные и иррациональные сочетания аминокислот и их производных между собой и с другими эффективными модуляторами Nox2-зависимой генерации АФК, а также установить отдельные механизмы действия аминокислотных средств комбинированного состава и обосновать рекомендации по медицинскому применению препаратов, разработанных на их основе и предназначенных для лечения патологических состояний, ассоциированных с гиперактивностью Nox2, таких как воспаление (на основе N-ацетил-L-пролина), ишемические и реперфузионные повреждения миокарда (на основе комбинации L-аргинина с салицилатами), прогрессирующий атеросклероз (на основе комбинации L-аргинина и таурина), иммунодефицитные состояния (на основе комбинации L-аргинина и инозина).

В десятой главе изложены результаты изучения индукторов респираторного взрыва фагоцитов, обнаруженных среди экранированных производных бензоксатиола и фениланилина – (4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ола (соединения S13) и 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилина (соединения N10)). По максимальной эффективности соединения S13 и N10 превосходят прототип (OZ) в 4-5 раз по критерию AUC ХЛ, и в 8–12 раз по критерию I_{\max} ХЛ. Механизмы индукции респираторного взрыва макрофагов для соединений S13 и N10 различаются, что подтверждается их различным влиянием на кинетику процесса, а также различным потенциалом сенситизации макрофагов к эффектам цитокинов. Настоящие результаты раскрывают новые аспекты биологического действия пространственно защищенных фенолов и представляют интерес с позиции разработки новых иммуностимуляторов.

В одиннадцатой главе изложена *теория плейотропного действия биологически активных соединений*, разработанная автором на основе синтеза результатов исследования, представленных в настоящей работе, с современными достижениями в области молекулярной и комбинаторной фармакологии, биохимии, рецепторологии и синергетики, сущность которой сводится к следующему.

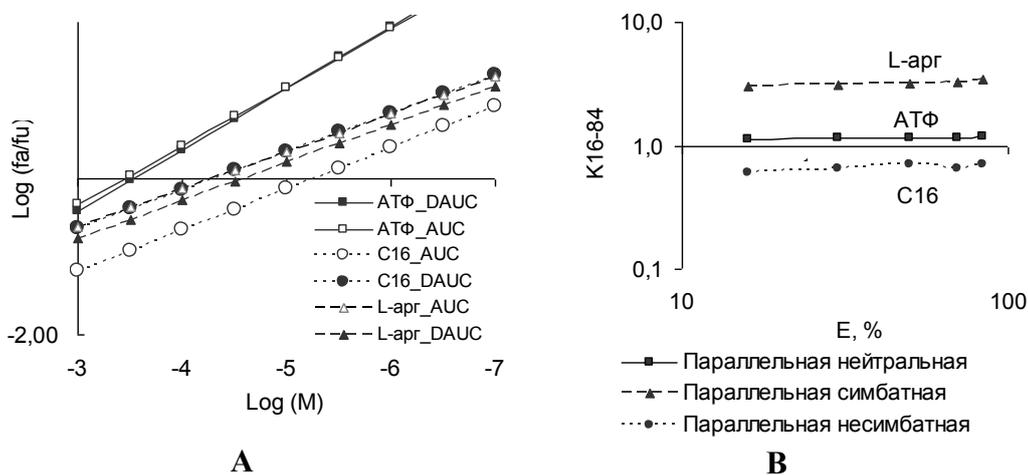
Под *плейотропностью* понимается способность биологически активного соединения (лекарственного средства) реализовывать более одного механизма действия при индукции определенного биологического (фармакологического) эффекта, в реализации которого вклад отдельных механизмов непостоянен (вариантен) по мере увеличения силы воздействия (концентрации модулятора), что формирует специфический паттерн биологического ответа (паттерн плейотропности). Плейотропность является имманентным свойством биологически активных соединений, вызывающих конкретный эффект *in vivo* или в релевантных системах, вне этих условий плейотропности не существует. Разные эффек-

ты биологически активного соединения обеспечиваются разными паттернами плейотропности.

Плейотропная активность понимается как вариантная или инвариантная доля целевой составляющей в совокупном биологическом эффекте, определяемая одновременной или последовательной инициацией различных молекулярных механизмов её формирующих (включая динамическое изменение реактивности биосистемы) по мере увеличения дозы (концентрации) модулятора. Плейотропная активность является при этом характеристикой не эффектора (биологически активного соединения), а его эффекта в биологической системе. Плейотропная активность может быть представлена в виде коэффициента K_x , вычисляемого для каждого уровня эффекта в интервале E_{16} – E_{84} (K_{16} – K_{84}) или в виде тангенса угла наклона прямой плейотропной активности (паттерна плейотропности) при представлении результатов в полулогарифмических координатах ($\text{Log}(K_x)$ – E_x).

Результаты исследований дают основание выделить три основных паттерна плейотропности.

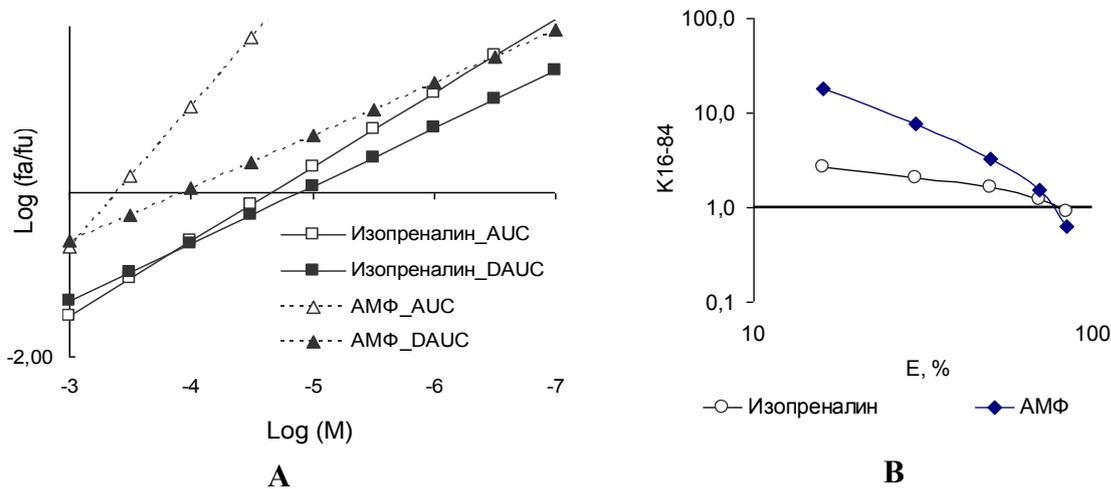
Первый паттерн – *паттерн «параллельной плейотропности»* отличает постоянство плейотропной активности биологически активного соединения во всем диапазоне эффективных концентраций. Он предполагает параллельное включение механизмов действия биологически активного соединения и механизмов реактивности биосистемы с сохранением этого постоянства во всем эффективном диапазоне (рисунок 3). Этот паттерн могут формировать также соединения, плейотропность которых не удастся выявить в предложенных условиях и потому они представляются «монотропными».



А – зависимость «концентрация – эффект» для соединений, демонстрирующих разные субварианты паттерна параллельной плейотропности. Координаты Хилла;
 В – субварианты паттерна параллельной плейотропности на примере АТФ (нейтральная), L-аргинина (симбатная), соединения С16 (несимбатная). Координаты логарифмические

Рисунок 3 – Характер зависимости «концентрация – эффект» для АТФ, L-аргинина и соединения С16 (слева) и соответствующие им субварианты паттерна параллельной плейотропности (справа)

Второй паттерн «*последовательная несимбатная (элиминирующая или антагонистическая) плейотропность*» отличает несимбатное приросту эффективности экспоненциальное снижение плейотропной активности биологически активного соединения. Этот паттерн формируется последовательным включением молекулярных механизмов действия биологически активного соединения по мере прироста его концентрации, взаимодействующих друг с другом по принципу антагонизма (рисунок 4).

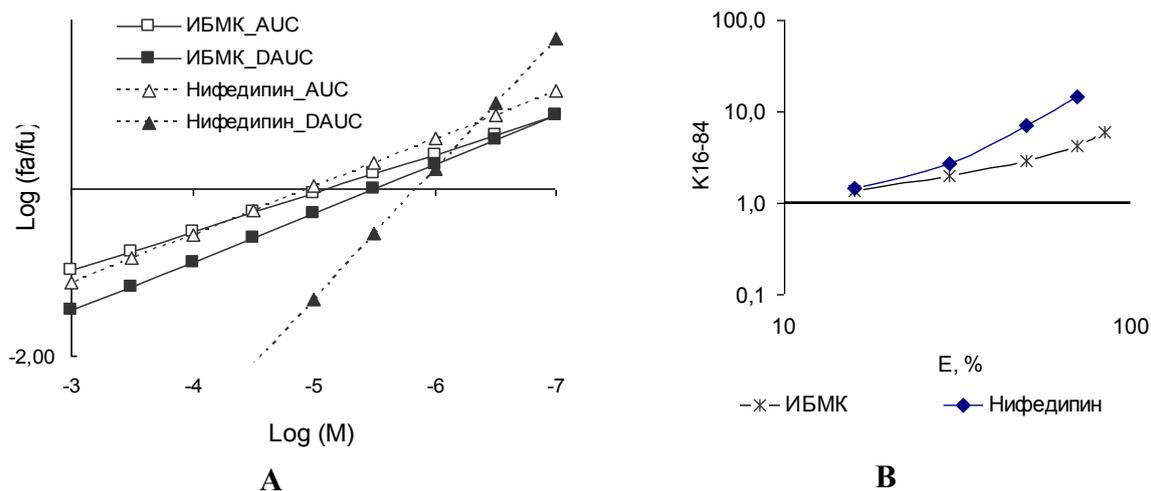


А – зависимость «концентрация-эффект» для изопреналина и АМФ. Координаты Хилла;
 В – паттерн последовательной несимбатной (элиминирующей, антагонистической) плейотропности на примере изопреналина и АМФ. Координаты логарифмические

Рисунок 4 – Характер зависимости «концентрация – эффект» для изопреналина и АМФ (слева) и соответствующий паттерн последовательной несимбатной элиминирующей (антагонистической) плейотропности (справа)

Третий паттерн – «*последовательная симбатная амплифицирующая (синергическая) плейотропность*» характеризуется симбатным приросту эффективности экспоненциальным увеличением плейотропной активности биологически активного соединения. Условием формирования этого паттерна является последовательное, зависимое от концентрации включение молекулярных механизмов действия биологически активного соединения, взаимодействующих друг с другом по принципу синергизма (рисунок 5).

Вышеизложенные представления о природе паттернов плейотропности подтверждаются результатами экспериментов по изучению комбинаций биологически активных соединений, выполненных с использованием практических приложений теории комбинаторного индекса Chou-Talalay.

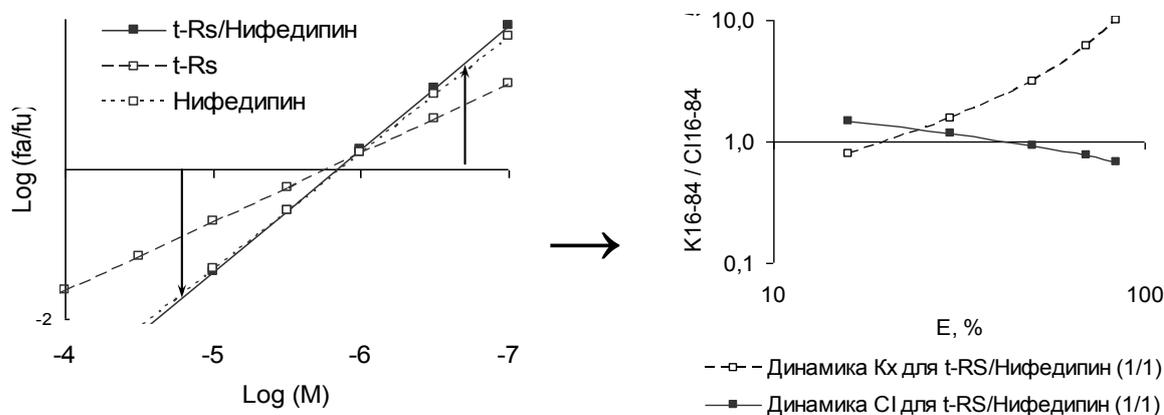


А – зависимость «концентрация – эффект» для ИБМК и нифедипина. Координаты Хилла;
 В – паттерн последовательной симбатной амплифицирующей (синергической) плеiotропности на примере ИБМК и нифедипина. Координаты логарифмические

Рисунок 5 – Характер зависимости «концентрация – эффект» для изобутил-метилксантина (ИБМК) и нифедипина (слева) и соответствующий паттерн последовательной симбатной амплифицирующей (синергической) плеiotропности (справа)

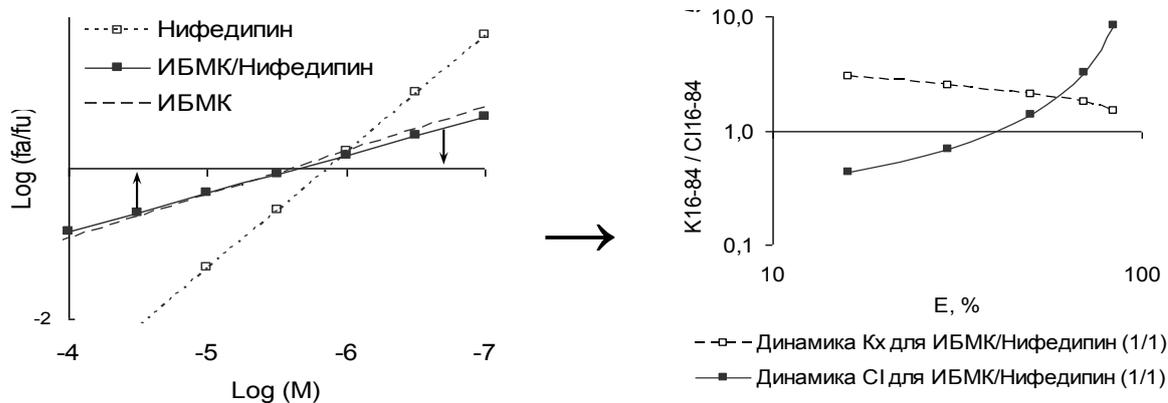
Изучение около сотни различных комбинаторных сочетаний биологически активных соединений и анализ паттернов плеiotропности в отношении их ингибирующего действия на Nox2-ассоциированную генерацию АФК позволили установить следующее. Чем большее количество перекрестных механизмов действия обеспечивает эффект комбинации, тем сильнее отличаются паттерны комбинаций от паттернов прототипов. При этом предсказать паттерн комбинации по паттерну прототипов не возможно, как не возможно заранее предсказать и результат их фармакодинамических взаимодействий. Однако на основе сопоставления паттернов комбинаций и характера взаимодействия их компонентов, можно доказать природу индивидуальных паттернов плеiotропности. Если абстрагироваться от абсолютных значений комбинаторного индекса (CI) и связанной с этим трактовки результата взаимодействия и учитывать как основной признак динамику изменения CI по мере прироста эффекта (и концентрации) биологически активного соединения, то обнаруженные закономерности должны выглядеть следующим образом. При условии синергизма компонентов в отношении изучаемого процесса комбинация должна формировать паттерн последовательной амплифицирующей (синергической) плеiotропности, при антагонизме компонентов – паттерн последовательной элиминирующей (антагонистической) плеiotропности. Результаты экспериментов полностью соответствовали этому тезису. Комбинации, синергизм компонентов которых нарастал по мере увеличения их концентраций, вне зависимости от паттернов прототипов реализовали

два паттерна плеiotропности – амплифицирующую плеiotропность и параллельную симбатную плеiotропность. Напротив, комбинации, в которых по мере увеличения концентрации нарастал антагонизм компонентов (даже при исходном синергизме на уровне $E_{16}-E_{30}$), формировали паттерн элиминирующей плеiotропности. Пример комбинаций первого и второго типа показан на рисунке 6.



А

А – комбинации нифедипина и т-ресвератрола (1/1), компоненты которой демонстрируют зависимое от концентрации нарастание фармакодинамического синергизма, соответствует паттерн амплифицирующей (синергической) плеiotропности (правая часть, логарифмические координаты), при этом угол наклона зависимости «концентрация – эффект» для комбинации увеличивается по сравнению с компонентами (левая часть, координаты Хилла)



В

В – комбинации ИБМК и нифедипина (1/1), компоненты которой демонстрируют зависимое от концентрации нарастание фармакодинамического антагонизма, соответствует паттерн элиминирующей (антагонистической) плеiotропности (правая часть, логарифмические координаты), при этом угол наклона зависимости «концентрация – эффект» для комбинации уменьшается по отношению к отдельным компонентам (левая часть, координаты Хилла)

Рисунок 6 – Характер зависимости «концентрация – эффект» (в отношении $Nox2$ -ассоциированной генерации АФК), паттерны плеiotропности (K_{16-84}) и соответствующие им паттерны комбинаторного индекса (CI_{16-84}), присущие комбинациям биологически активных соединений, различающимся потенциалом фармакодинамических взаимодействий

В случае нарастания синергизма по мере увеличения концентрации компонентов зависимость «концентрация – эффект», рассчитанная в отношении Nox2-ассоциированного процесса генерации АФК для комбинации, демонстрировала увеличение угла наклона, в случае нарастания антагонизма – наблюдалась противоположная закономерность. Эти результаты чрезвычайно интересны с позиции трактовки угла наклона зависимости «доза (концентрация) – эффект» как такового. В общем случае в тест-системе, позволяющей оценивать действие эффектора в отношении целевого процесса, угол наклона зависимости «доза (концентрация) – эффект» для биологически активных соединений, демонстрирующих паттерн последовательной амплифицирующей (синергической) плеiotропности, больше, чем для соединений, демонстрирующих паттерн последовательной элиминирующей (антагонистической) плеiotропности.

Таким образом, гипотеза о природе паттернов плеiotропности, включая факторы, определяющие величину угла наклона зависимости «доза (концентрация) – эффект», получила экспериментальные подтверждения. Настоящие результаты показывают внутреннее единство теории Chou–Talalay и плеiotропной теории действия биологически активных соединений (лекарственных средств), а в приближении к частной проблеме, составляющей предмет исследования, – плеiotропной природы действия ингибиторов Nox2-зависимой генерации АФК. В этой связи оценку паттернов плеiotропности и анализ фармакодинамических взаимодействий можно рассматривать как два взаимодополняющих подхода при изыскании комбинаций, обладающих не только синергизмом компонентов в отношении эффектора, но и высоким тропизмом к процессам, им детерминированным.

Подводя итог вышеизложенному, теорию плеiotропного действия биологически активных соединений (лекарственных средств) можно сформулировать в следующих положениях.

1. Под **плеiotропностью** понимается способность биологически активного соединения (лекарственного средства) реализовывать более одного механизма действия при индукции определенного биологического (фармакологического) эффекта, в формировании которого вклад отдельных механизмов непостоянен (вариантен) по мере увеличения силы воздействия (концентрации, дозы) модулятора, что формирует специфический паттерн биологического ответа (паттерн плеiotропности).

2. В условиях релевантных *in vivo* лекарственные средства формируют **три паттерна плеiotропности**: параллельной, элиминирующей (антагонистической), амплифицирующей (синергической). Паттерн параллельной плеiotропности отражает постоянство плеiotропной активности лекарственного средства во всем диапазоне эффективных концентраций (EC_{16} – EC_{84}). Паттерн элиминирующей (антагонистической) плеiotропности отражает антибатное

приросту эффекта экспоненциальное снижение плеiotропной активности лекарственного средства. Паттерн амплифицирующей (синергической) плеiotропности отражает симбатное приросту эффекта экспоненциальное увеличение плеiotропной активности лекарственного средства.

3. Экспоненциальный характер паттернов плеiotропности отражает число взаимодействующих механизмов (n) и направленность их взаимодействия при формировании целевого эффекта лекарственного средства. Паттерн амплифицирующей плеiotропности отражает зависимый от концентрации (дозы) синергизм взаимодействующих механизмов при $n \geq 2$; паттерн элиминирующей плеiotропности – их антагонизм при $n \geq 2$; паттерн параллельной плеiotропности показывает отсутствие взаимодействующих механизмов ($n = 0$) или отсутствие зависимости их взаимодействия от концентрации (дозы) модулятора при $n = 1$.

4. Наклон зависимости «доза (концентрация) – эффект» является результирующей как взаимодействий между первичными механизмами действия лекарственного средства, так и механизмами вторичных индуцированных реакций в биосистеме. В отношении целевой компоненты сложного биологического отклика увеличение угла наклона этой зависимости коррелирует с паттерном амплифицирующей плеiotропности, а его уменьшение – с паттерном элиминирующей плеiotропности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты работы

Настоящая работа является первым систематическим исследованием по изысканию эффективных средств управления Nox2-зависимой генерацией АФК – ключевым патогенетическим звеном многих тяжелых заболеваний. Совокупность полученных результатов послужила основанием для разработки новой теории действия биологически активных соединений (лекарственных средств), формированию оригинальных подходов к управлению Nox2-зависимой генерацией АФК посредством индивидуальных химических соединений и их комбинаций, а также практической реализации этих фундаментальных изысканий в виде семи оригинальных лекарственных средств, внедренных в практическое здравоохранение и выпускаемых фарминдустрией Республики Беларусь.

В соответствии с логической структурой настоящей работы основные научные результаты можно представить в виде следующих положений.

1. Среди соединений, принадлежащих к химическим классам структурных аналогов α -токоферола и кумарина, производных дифенола и пирокатехина, включая тиофенолы и аминифенолы, производных бензойной и коричной кислот (87 наименований) впервые обнаружены эффективные ингибиторы свобод-

норадикальных реакций, притекающих с участием Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, представляющие интерес в качестве потенциальных иммуномодулирующих и антиоксидантных лекарственных средств, включая 3,5-ди-трет-бутилпирокатехин, 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин, 5-метокси-1,3-бензоксатиол-2-он, 2-анилино-4,6-ди-трет-бутилфенол. К общим структурным детерминантам, повышающим антиоксидантную активность испытанных соединений, относятся наличие гидроксильных групп в пара-положении по отношению к другим функциональным группам ароматического ядра, а также наличие в нем или в составе заместителей дополнительных гидроксильных групп. Напротив, введение экранирующих заместителей в орто-положение по отношению к гидроксилам, электронодонорных заместителей (метильных групп) и радикалов, содержащих азот (-N-) и серу (-S-), а также замена карбонильной группы (C=O) на карбоксильную (COO⁻) ведет к снижению антиоксидантной активности соединений на порядки величин. Впервые показано, что среди соединений, обладающих разной способностью к взаимодействию с углерод- и кислородцентрированными свободными радикалами, последние наиболее эффективны как средства управления Nox2-зависимой генерацией АФК, что подтверждается амплифицирующим паттерном плеiotропного действия этих соединений, обусловленным, помимо молекулярной структуры, химическим составом биосреды, в которой они функционируют [3, 9–13, 20, 23, 26, 28, 33, 35, 37, 40, 41, 49–52].

2. Впервые показано, что отдельные представители пространственно экранированных фенолов – производных бензоксатиола и фениланилина (4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ол и 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилин) – обладают альтернативными свойствами – стимулируют клеточную генерацию АФК, что открывает новые возможности их использования в иммунологии как реагентов и потенциальных лекарственных средств. Демонстрируя различия в кинетике действия, они превосходят прототип (опсонизированный зимозан) по эффективности (в 4–5 раз по интегральному выходу АФК и в 8–12 раз по ее пиковой продукции), а также имеют более широкие возможности практического приложения [24, 32, 33, 39, 43, 44, 46, 47].

3. Впервые установлено, что синергические комбинации известных антиоксидантов (α -токоферола, аскорбата, мелатонина, t-ресвератрола) способны обеспечивать достижение 10–100-кратного повышения антиоксидантного потенциала в отношении Nox2-зависимой генерации АФК. Главным условием достижения их высокого синергизма является индивидуальный количественный подбор сочетаний в парах или триплетях ингредиентов. К числу наиболее эффективных относятся синергические комбинации α -токоферола с аскорбатом в молярном соотношении 1/10 (10^{-8} – 10^{-4} М/ 10^{-6} – 10^{-3} М), t-ресвератрола с мелатонином при молярных соотношениях от 1/1 до 1/100 (10^{-7} – 10^{-4} М/ 10^{-7} – 10^{-3} М), а

также аскорбата с мелатонином и t-ресвератролом в молярном соотношении 1000/100/1 (10^{-5} – 10^{-3} М/ 10^{-6} – 10^{-4} М/ 10^{-7} – 10^{-5} М). Впервые показано, что комбинации природных антиоксидантов, демонстрирующие зависимый от концентрации синергизм компонентов, формируют два паттерна плеiotропности – параллельной (комбинация аскорбата с мелатонином и t-ресвератролом) и амплифицирующей (комбинация мелатонина с t-ресвератролом), что указывает на различную природу мишеней их модулирующего действия [14, 16, 42].

4. Впервые показано, что модуляторы клеточных функций, эффект которых опосредуется лиганд-рецепторными взаимодействиями – агонисты и антагонисты адренергических, пуриновых, серотониновых, дофаминовых рецепторов, блокаторы ионных каналов, внутриклеточного транспорта и внутриклеточного сигналинга (48 веществ) являются высокоактивными регуляторами Nox2-зависимой клеточной генерации АФК ингибирующего или стимулирующего типа действия. При этом впервые показано, что действие ингибиторов является плеiotропным и проявляется в различных паттернах зависимости эффекта от концентрации. *Амплифицирующий* паттерн характеризуется зависимым от концентрации экспоненциальным усилением ингибирования в отношении Nox2-ассоциированной компоненты клеточной генерации АФК с ростом концентрации агента и показан, в частности, для нифедипина, хинидина, инозина, АДФ, N-ацетил-L-пролина и N-ацетил-гидрокси-L-пролина, ацетил-L-карнитина. Паттерн *параллельной* плеiotропности отличает постоянство вклада Nox2-зависимой компоненты в зависимое от концентрации модулятора ингибирование клеточной продукции АФК, он характерен для антагонистов β -адренергических (пропранолола, соталола, окспренолола, метопролола) и серотониновых (ондансетрона) рецепторов, блокаторов натриевых каналов (прокаина, бупивакаина), верапамила, АТФ, серотонина и L-аргинина. Такие соединения, как колхицин, таурин, изопреналин и АМФ реализуют паттерн *элиминирующей* плеiotропности, которому соответствует экспоненциальное зависимое от концентрации ослабление ингибирования в отношении Nox2-ассоциированного процесса с ростом концентрации агента. Таким образом, впервые раскрыта сложная природа модулирующего действия указанных фармакодинамических агентов в отношении клеточной генерации АФК, зависимой от активности фермента Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы [1, 2, 5–8, 27, 34, 38].

5. Впервые показано, что эффективным путем управления Nox2-зависимой генерацией АФК является комбинированное применение лигандов 7-TMS рецепторов и ионных каналов, модуляторов тубулина, аминокислот и растительных фенолов, которое способно обеспечить синергическое подавление этого процесса. Наиболее эффективны в этом отношении комбинации t-ресвератрола, мелатонина и L-аргинина (1/100/1000...1/10/1000 в диапазоне 10^{-5} М/ 10^{-4} – 10^{-3} М/ 10^{-3} – 10^{-2} М), ацетил-L-карнитина и таурина (1/10...10/1 в диапазоне 10^{-3} М/

10^{-4} – 10^{-2} М); таурина и L-аргинина (1/10 в диапазоне 10^{-3} – 10^{-2} М/ 10^{-2} М), N-ацетил-L-пролина и АТФ (1/1...10/1 в диапазоне 10^{-3} М/ 10^{-4} – 10^{-3} М); N-ацетил-L-пролина и ацетилсалициловой кислоты или мелоксикама (10/1 в диапазоне 10^{-4} – 10^{-3} М/ 10^{-5} – 10^{-4} М); инозина и L-аргинина (1/1 в диапазоне 10^{-3} М/ 10^{-3} М); инозина, салициловой кислоты и L-аргинина (10/1/10...1/1/10 в диапазоне 10^{-4} – 10^{-3} М/ 10^{-4} М/ 10^{-3} М); L-аргинина и ацетилсалициловой кислоты (10/1 в диапазоне 10^{-4} – 10^{-2} М/ 10^{-5} – 10^{-3} М). Характерно, что все комбинации, демонстрирующие зависимость от концентрации природ синергизма компонентов, реализуют паттерны амплифицирующей или параллельной плейотропности и сдвигают профиль эффективных концентраций модуляторов в область фармакологических [17, 15, 18].

6. На основе анализа закономерностей проявления синергического действия аминокислот с другими модуляторами клеточной активности были разработаны и реализованы предложения по созданию новых лекарственных средств, внедренных в медицинскую практику. Так на основе комбинации таурина и L-аргинина разработано лекарственное средство «Тетракард», на основе комбинации инозина с L-аргинином – лекарственное средство «Лейаргунал», на основе комбинации L-аргинина и ацетилсалициловой кислоты – лекарственное средство «Аспаргит», на основе комбинаций инозина, салицилатов и L-аргинина – лекарственное средство «Инокардин», которые предназначены для терапии ишемической болезни сердца, иммунодефицитов и в качестве кардио- и ангиопротекторов. На основе доказательства антиоксидантного потенциала N-ацетил-L-пролина разработано противовоспалительное и анальгезирующее средство «Гроцепрол» [18, 19, 21, 31, 36, 25, 4, 22].

7. Полученные результаты создают научную основу для эффективного фармакологического управления Nox2-зависимой клеточной генерацией АФК – процессом, лежащим в основе развития дегенеративных болезней сердца, мозга, почек и других органов. В итоге исследований разработана теория плейотропного действия лекарственных средств (биологически активных соединений), сущность которой заключается в том, что лекарственное средство реализует более одного механизма действия при индукции определенного фармакологического эффекта, в формирование которого вклад отдельных молекулярных механизмов может изменяться по мере увеличения силы воздействия (концентрации, дозы) лекарственного средства, что находит отражение в специфических паттернах биологического ответа (паттернах плейотропности), которые определяются взаимным усилением или ослаблением биологических эффектов этих взаимодействующих механизмов. Теория плейотропного действия объясняет неизвестные ранее закономерности действия лекарственных средств (биологически активных соединений) и может иметь широкие приложения в экспериментальной и клинической фармакологии [26–30, 45].

Рекомендации по практическому применению результатов

Результаты настоящего исследования позволили обосновать перспективность разработки новых лекарственных средств иммуномодулирующего и антиоксидантного типа действия на основе 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина (патент № 17006 от 30.04.2013, Приложение F), 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутилпирокатехина (патент № 16942 от 30.04.2013, Приложение G), 5-метокси-1,3-бензоксатиол-2-она (патент № 16827 от 28.02.2013, Приложение H), на основе синергической комбинации t-ресвератрола и мелатонина (патент № 16758 от 28.02.2013, Приложение J); лекарственного средства противогерпетического действия на основе 4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ола (патент № 11659 от 28.02.2009, Приложение K); лекарственных средств иммуностимулирующего действия, а также диагностикумов для клинической лабораторной практики и экспериментально-исследовательской работы на основе 4,6-ди-трет-бутил-2,2-диметил-1,3-бензоксатиол-7-ола (патент № 16609 от 30.12.2012, Приложение L) и 3,5-ди-трет-бутил-2-метокси-N-фениланилина (патент № 16612 от 30.12.2012, Приложение M).

Результаты исследования индивидуального и комбинированного действия аминокислот и их производных использованы при разработке лекарственных средств, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств Республики Беларусь и выпускаемых отечественной фарминдустрией:

– лекарственного средства «Тетракард» (название на этапе разработки – «Лизаргин») (ГР № 12/06/2007 от 26.06.2012) в состав которого входят таурин и L-аргинин (Акт внедрения результатов исследования от 27.12.2007, Приложение N);

– лекарственного средства «Гроцепрол» (название на этапе разработки – «Ацепрол») (ГР № 10/12/1830 от 30.12.2010) на основе N-ацетил-L-пролина (Акт внедрения результатов исследования от 26.12.2007, Приложение P);

– лекарственного средства «Лейаргунал», (название на этапе разработки – «Лейаргунал») (ГР № 12/12/2057 от 28.12.2012) на основе комбинации инозина и L-аргинина (Акт внедрения результатов исследования от 05.12.2007, Приложение Q);

– лекарственного средства «Аспаргит», (название на этапе разработки – «Аспаргит») (ГР № 07/08/1480 от 28.09.2007) на основе комбинации ацетилсалициловой кислоты и L-аргинина (Акт внедрения результатов исследования от 09.10.2007, Приложение R);

– лекарственного средства «Инокардин», (название на этапе разработки – «Кардинозин») (ГР № 12/03/1419 от 26.03.2012) на основе комбинации инозина, L-аргинина и ацетилсалициловой кислоты (Акт внедрения результатов исследования от 27.12.2007, Приложение S);

– лекарственного средства «Нейрамин». (название на этапе разработки – «Нейрамин») (ГР № 12/03/1566 от 27.03.2012), содержащего L-аргинин и L-триптофан (Акт внедрения результатов исследования от 18.12.2007, Приложение Т);

– лекарственного средства «Валикар». (название на этапе разработки – «Гексаминат») (ГР № 12/01/1963 от 31.01.2012), содержащего комплекс аминокислот, производные глутамина и карнитина (Акт внедрения результатов исследования от 14.11.2007, Приложение У).

Алгоритм изучения и обработки результатов комбинированного действия биологически активных соединений и антиоксидантов в соответствии с теорией комбинаторного индекса Chou–Talalay, разработанный в рамках настоящего исследования (Приложение D), внедрен в научно-исследовательскую работу УО «Белорусский государственный медицинский университет» (удостоверение на рационализаторское предложение № 46 от 10.10.2012, Приложение Е).

Результаты настоящего исследования, имеющие фундаментальное значение, могут использоваться при подготовке специалистов разного профиля в области медицины, биологии, биохимии. Прикладные аспекты теории плеiotропного действия могут быть использованы для разработки новых лекарственных средств.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Бизунок, Н.А. Биогенные амины – эндогенные модуляторы клеточной генерации активных форм кислорода / Н.А. Бизунок // Белорусский медицинский журнал. – 2004. – № 4. – С. 34–36.
2. Бизунок, Н.А. Мелатонин модулирует генерацию активных форм кислорода в клеточных системах / Н.А. Бизунок // Известия НАН Беларуси, серия медицинских наук. – 2006. – № 4. – С. 84–87.
3. Бизунок, Н.А. Влияние экранированных фенолов на клеточную генерацию свободных радикалов кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро // Рецепт. – 2006. – № 6. – С. 27–40.
4. Бизунок, Н.А. НАДФ-оксидазы – потенциальные фармакологические мишени в лечении кардиоваскулярной патологии / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Рецепт. – 2006. – № 2. – С. 33–42.
5. Бизунок, Н.А.. Влияние цитоактивных агентов на НАДФ-оксидазную генерацию активных форм кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Рецепт. – 2006. – № 1. – С. 36–39.
6. Бизунок, Н.А. Производные аминокислот – потенциальные модификаторы клеточной продукции оксидантов / Н.А. Бизунок // Рецепт. – 2006. – № 3. – С. 28–32.
7. Бизунок, Н.А. Адренергическая регуляция клеточной продукции активных форм кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, А.В. Наджарян // Рецепт. – 2007. – № 1. – С. 34–38.
8. Бизунок, Н.А. Влияние адренергических средств на НАДФ-оксидазную продукцию активных форм кислорода в макрофагах / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т. 71, № 2. – С. 43–46.
9. Synthesis and study of antiviral and anti-radical properties of aminophenol derivatives / O. Shadyro [et al.] // Bioorganik and Medicinal Chemistry Letters. – 2008. – Vol. 18, № 7. – P. 2420–2423.
10. Антиоксидантный потенциал серосодержащих производных фенола на модели генерации активных форм кислорода фагоцитами / Н.А. Бизунок [и др.] // Известия НАН Беларуси, серия медицинских наук. – 2011. – № 3. – С. 83–88.
11. Антиоксидантный потенциал аминокислотсодержащих производных фенола на модели генерации активных форм кислорода фагоцитами / Н.А. Бизунок [и др.] // Известия НАН Беларуси, серия медицинских наук. – 2011. – № 4. – С. 61–66.

12. Антиоксидантный потенциал серосодержащих структурных аналогов α -токоферола на модели респираторного взрыва фагоцитов / Н.А. Бизунок [и др.] // Медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 6–12.
13. Управление респираторным взрывом фагоцитов стерически затрудненными производными фенола / Н.А. Бизунок [и др.] // Медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 12–16.
14. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические взаимодействия антиоксидантов альфа-токоферола и аскорбата на модели респираторного взрыва фагоцитов / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 16–21.
15. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические иммуномодулирующие взаимодействия пуринов на модели дыхательного взрыва макрофагов / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 9–13.
16. Дубовик, Б.В. Синергичные иммуотропные взаимодействия компонента красного вина транс-ресвератрола, антиоксиданта аскорбата и гормона мелатонина на модели респираторного взрыва фагоцитов / Б.В. Дубовик, Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 52–61.
17. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические иммуномодулирующие взаимодействия изопротеренола, нифедипина, изобутил-метилксантина, колхицина и транс-ресвератрола на модели дыхательного взрыва макрофагов / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 134–143.
18. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические иммуносупрессивные взаимодействия аминокислот и антиоксидантов на модели респираторного взрыва фагоцитов / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 25–33.
19. Бизунок, Н.А. Фармакодинамический синергизм ацетил-L-карнитина и таурина на модели респираторного взрыва макрофагов / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 34–37.
20. Действие ресвератрола, производных бензойной и коричной кислот на генерацию активных форм кислорода в макрофагах / Н.А. Бизунок [и др.] // Известия НАН Беларуси, серия медицинских наук. – 2012. – № 1. – С. 48–53.
21. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические взаимодействия N-замещенных производных L-пролина и клеточных модуляторов разного типа действия на модели Fc-гамма-R-зависимого фагоцитоза / Н.А. Бизунок // Известия НАН Беларуси, серия медицинских наук. – 2012. – № 2. – С. 53–62.
22. Бизунок, Н.А. Антиоксидантные и кардиозащитные свойства комбинации ацетилсалициловой кислоты и L-аргинина (Аспаргита) при ишемическом/реперфузионном повреждении миокарда / Н.А. Бизунок, А.А. Жданов, Б.В. Дубовик // Известия НАН Беларуси, серия медицинских наук. – 2012. – № 4. – С. 42–47.

23. Антиоксидантные свойства производных бензойной кислоты и кумарина на модели Nox2 -зависимой генерации активных форм кислорода в макрофагах / Н.А. Бизунок [и др.] // Медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 22–24.

24. Новые индукторы респираторного взрыва фагоцитов из химических классов пространственно защищенных бензоксатиолов и фениланилинов – потенциальные иммуностимулирующие средства / Н.А. Бизунок [и др.] // Медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 34–40.

25. Бизунок, Н.А. Фармакодинамический потенциал комбинаций инозина и АТФ с L-аргинином и салицилатами / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 40–45.

26. Бизунок, Н.А. Структурные детерминанты антиоксидантной активности производных фенола, дифенола и полифенолов в отношении активных форм кислорода, генерируемых макрофагами в различных условиях микроокружения / Н.А. Бизунок // Военная медицина. – 2013. – № 1. – С. 84–94.

27. Бизунок, Н.А. Плейотропное действие модуляторов клеточных функций на макрофагальную генерацию активных форм кислорода при FcR -зависимом фагоцитозе / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 44–47.

28. Бизунок, Н.А. Плейотропность фармакологического эффекта – новый взгляд на действие биологически активных соединений и лекарственных средств / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 152–157.

29. Бизунок, Н.А. Плейотропное действие биологически активных соединений и лекарственных средств: фундаментальные и прикладные аспекты / Н.А. Бизунок // Известия НАН Беларуси, серия медицинских наук. – 2013. – № 2. – С. 36–50.

30. Bizunok N.A. Theory of pleiotropic action of biologically active compounds and medicines – basic principles and practical application / N.A. Bizunok // Open Journal of Clinical Diagnostics. – 2013. – Vol. 3, № 3. – P. 94–104.

Статьи в сборниках научных работ

31. Волчек, А.В. Изыскание противовоспалительных агентов среди производных пролина / А.В. Волчек, М.Б. Бокова, Н.А. Бизунок // Труды молодых ученых. Юбилейное издание: сб. науч. работ / под общ. ред. С.Л. Кабака. – Минск, 2001. – С. 37–39.

32. Бизунок, Н.А. Новое иммуностимулирующее средство в классе фениланилина / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро // БГМУ: 90 лет в авангарде медицинской науки и практики: сб. науч. тр. / Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: А.В. Сикорский [и др.]. – Минск, 2011. – Т. 1. – С. 70.

33. Бизунок, Н.А. Иммуномодулирующее средство в классе тиодифенолов / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро // БГМУ: 90 лет в авангарде меди-

цинской науки и практики: сб. науч. тр. / Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: А.В. Сикорский [и др.]. – Минск, 2011. – Т. 1. – С. 69.

Материалы конференций, тезисы докладов

34. Бизунок, Н.А. Влияние биогенных аминов на клеточную генерацию активных форм кислорода / Н.А. Бизунок // Материалы 7-го съезда фармацевтов Республики Беларусь «Фармация XXI века», Витебск, 22 окт. 2004 г. / Витеб. гос. мед. ун-т; под общ. ред. В.В. Кугач. – Витебск, 2004. – С. 222–225.

35. Шадыро, О.И. Производные пирокатехина и аминофенола – эффективные модуляторы оксидантного статуса биосистем / О.И. Шадыро, Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик // Материалы 7-го съезда фармацевтов Республики Беларусь «Фармация XXI века», Витебск, 22 окт. 2004 г. / Витеб. гос. мед. ун-т; под общ. ред. В.В. Кугач. – Витебск, 2004. – С. 340–342.

36. Волчек, А.В. Фармакологические свойства N-ацетил-L-пролина / А.В. Волчек, Н.А. Бизунок // Вестник РГМУ: материалы Пироговской студенческой науч. конф. / Рос. гос. мед. ун-т; редкол.: В.Н. Ярыгин [и др.]. – Москва, 2006. – № 2 (49). – С. 352.

37. Бизунок, Н.А. Оценка антиоксидантного потенциала производных пирокатехина и аминофенола на клеточной модели генерации активных форм кислорода / Н.А. Бизунок, Б.В. Кратёнок // Вестник РГМУ: материалы Пироговской студенческой науч. конф. / Рос. гос. мед. ун-т; редкол.: В.Н. Ярыгин [и др.]. – Москва, 2006. – № 2 (49). – С. 344.

38. Бизунок, Н.А. Фармакология НАДФН-оксидаз / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро // Молекулярная медицина и биохимическая фармакология: материалы респ. науч. конф., Гродно, 28–29 июня 2007 г. / Гос. учреждение «Науч.-произв. центр «Ин-т фармакологии и биохимии Нац. акад. наук Беларуси»; редкол.: П.С. Пронько [и др.]. – Гродно, 2007. – С. 17–23.

39. Новый индуктор клеточной генерации активных форм кислорода в ряду экранированных фенолов / Н.А. Бизунок [и др.] // Белорусские лекарства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 2–3 ноября 2010 г. / Гос. учреждение «Науч.-произв. центр «Ин-т фармакологии и биохимии Нац. акад. наук Беларуси»; редкол.: П.Т. Петров [и др.]. – Минск, 2010. – С. 26–28.

40. Структурные аналоги α -токоферола модулируют генерацию активных форм кислорода макрофагами / Н.А. Бизунок [и др.] // Белорусские лекарства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 2–3 ноября 2010 г. / Гос. учреждение «Науч.-произв. центр «Ин-т фармакологии и биохимии Нац. акад. наук Беларуси»; редкол.: П.Т. Петров [и др.]. – Минск, 2010. – С. 28–31.

41. Антирадикальная активность производных коричной кислоты на модели клеточной генерации активных форм кислорода / Н.А. Бизунок [и др.] // Белорусские лекарства: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 2–3 но-

ября 2010 г. / Гос. учреждение «Науч.-произв. центр «Ин-т фармакологии и биохимии Нац. акад. наук Беларуси»; редкол.: П.Т. Петров [и др.]. – Минск, 2010. – С. 31–33.

42. Синергичные иммуномодулирующие комбинации ресвератрола и мелатонина / Н.А. Бизунок [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы Междунар. науч.-практ. конф., 29–30 сентября 2011 г. / Гродн. гос. мед. ун-т.; редкол.: П.С. Пронько [и др.]. – Гродно, 2011. – С. 13–16.

43. Бизунок, Н.А. Иммуномодулирующий и антиоксидантный потенциал 2-анилино-4,6-ди-трет-бутилфенола / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы Междунар. науч.-практ. конф., 29–30 сентября 2011 г. / Гродн. гос. мед. ун-т.; редкол.: П.С. Пронько [и др.]. – Гродно, 2011. – С. 20–23.

44. Новое иммуномодулирующее средство в классе бензоксатиола / Н.А. Бизунок [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы Междунар. науч.-практ. конф., 29–30 сентября 2011 г. / Гродн. гос. мед. ун-т.; редкол.: П.С. Пронько [и др.]. – Гродно, 2011. – С. 16–19.

45. Бизунок, Н.А. Теория плейотропного действия биологически активных соединений и лекарственных средств – фундаментальные и прикладные аспекты / Н.А. Бизунок // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы XI Междунар. науч. конф., 17–18 мая 2013 г. / Издательский центр БГУ; редкол.: В.А. Прокашева [и др.]. – Минск, 2013. – С. 109–111.

Патенты

46. Ингибитор размножения вирусов герпеса: пат. 11659 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/39, А 61Р 31/00, С 07D 327/00 / Е.И. Бореко, Б.В. Дубовик, Н.А. Бизунок, Н.И. Павлова, В.Н. Повалишев, Г.И. Полозов, О.В. Савинова, О.И. Шадыро ; заявитель Учр. Бел. гос. ун-та «Науч.-исслед. ин-т физ.-хим. проблем», Гос. учр. «Науч.-исслед. ин-т эпидем. и микробиол.» Мин. здрав. Респ. Беларусь. – № а 20070843; заявл. 06.07.07; опубл. 28.02.09 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2009. – № 1. – С. 53.

47. Индуктор окислительного взрыва фагоцитов: пат. 16609 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/39 (2006.01), А 61Р 37/00 (2006.01), С 07D 327/04 (2006.01) / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро, Г.И. Полозов; заявитель Бел. гос. ун-т. – № а 20110737; заявл. 31.05.11; опубл. 30.12.12 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – № 6. – С. 69–70.

48. Индуктор окислительного взрыва фагоцитов, иммуностимулирующее средство: пат. 16612 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/136 (2006.01) А 61Р 37/00 (2006.01) С 07С 211/55 (2006.01) / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро, Г.А. Ксендзова, В.Л. Сорокин; заявитель Бел. гос. ун-т. – № а 20110743; заявл.

31.05.11; опубл. 30.12.12 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2012. – № 6. – С. 70.

49. Иммуномодулирующее средство: пат. 16942 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/05 (2006.01), А 61Р 37/02 (2006.01), С 07С 39/11 (2006.01) / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро, Г.И. Полозов; заявитель Бел. гос. ун-т. – № а 20110738; заявл. 31.05.11; опубл. 30.04.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2013. – № 2. – С. 56.

50. Иммуномодулирующее и антиоксидантное средство: пат. 17006 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/05 (2006.01), А 61Р 37/02 (2006.01), А 61Р 39/06 (2006.01), С 07С 39/08 (2006.01) / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро, Г.И. Полозов; заявитель Бел. гос. ун-т. – № а 20110739; заявл. 31.05.11; опубл. 30.04.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2013. – № 2. – С. 56.

51. Иммуномодулирующее средство: пат. 16827 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/39 (2006.01), А 61Р 37/02 (2006.01), С 07D 327/04 (2006.01) / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро, Г.И. Полозов; заявитель Бел. гос. ун-т. – № а 20110740; заявл. 31.05.11; опубл. 28.02.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2013. – № 1. – С. 59.

52. Иммуномодулирующее средство: пат. 16758 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/047 (2006.01), А 61К 31/4045 (2006.01), А 61Р 37/02 (2006.01) / Н.А. Бизунок, Б.В. Дубовик, О.И. Шадыро; заявитель Бел. гос. ун-т. – № а 20110742; заявл. 31.05.11; опубл. 28.02.2013 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2013. – № 1. – С. 59.

РЭЗІЮМЭ

Бізунок Наталля Анатольеўна **Фармакалогія клеткавай генерацыі актыўных формаў кіслароду,** **асацыяванай з актыўнасцю Nox2-НАД(Ф)Н-аксідаз**

Ключавыя словы: Nox2-НАД(Ф)Н-аксідаза, макрафагі, актыўныя формы кіслароду (АФК), хемілюмінесцэнцыя, антыаксіданты, кветкавыя мадулятары, камбінацыі, сінергізм, плейатропнасць, тэорыя.

Мэта працы: распрацоўка сродкаў кіравання клеткавай генерацыяй АФК, асацыяванай з актыўнасцю фермента Nox2-НАД(Ф)Н-аксідазы (Е.С. 1.6.3.1) на падставе індывідуальных хімічных спалучэнняў (фармакалагічных агентаў) і іх сінергічных камбінацый.

Метады даследавання: хемілюмінесцэнтныя метады колькаснага вызначэння АФК у клеткавых сістэмах і біялагічных вадкасцях.

Вынікі працы і іх навуковая навізна. Выкананая праца з'яўляецца першым сістэматычным даследаваннем па пошуку эфектыўных сродкаў кіравання Nox2-залежнай генерацыяй АФК – галоўным патогенетычным звяном шматлікіх цяжкіх захворванняў. Сукупнасць атрыманых вынікаў дазволіла распрацаваць новую тэорыю плейатропнага дзеяння біялагічна актыўных спалучэнняў (лекавых сродкаў), сфарміраваць арыгінальныя падыходы да кіравання Nox2-залежнай генерацыяй АФК з дапамогай індывідуальных хімічных спалучэнняў і іх камбінацый, абгрунтаваць распрацоўку і рэкамендацыі па медыцынскаму выкарыстанню лекавых сродкаў на падставе амінакіслот і іх вытворных для лячэння паталагічных станаў, асацыяваных з гіперактыўнасцю Nox2, такіх як запаленне (на падставе N-ацэтыл-L-праліна), ішэмічных і рэперфузійных пашкоджанняў міякарда (на падставе камбінацыі L-аргініну з саліцылатамі), прагрэсуючы атэрасклероз (на падставе камбінацыі L-аргініну і таўрыну), імунадэфіцытныя станы (на падставе камбінацыі L-аргініну і іназіну).

Ступень выкарыстання: вынікі дысертацыйнай працы выкарыстаны пры распрацоўцы сямі арыгінальных лекавых сродкаў, якія былі ўкаранены ў медыцынскую практыку і вырабляюцца фарміндустрыяй Рэспублікі Беларусь: «Тэтракард», «Грацэпрол», «Лейаргунал», «Аспаргіт», «Інакардын», «Нейрамін», «Валікар», а таксама для абгрунтавання перспектыўнасці распрацоўкі новых лекавых сродкаў іммунамадулюючага і антыаксідантнага тыпу дзеяння на падставе экраніраваных вытворных дыфенолу і піракатэхіну (сем патэнтаў на вынаходніцтва).

Галіна прымянення: фармакалогія, клінічная фармакалогія, фізіялогія, паталогія, клетачная біялогія, імуналогія, тэрапія.

РЕЗЮМЕ

Бизунок Наталья Анатольевна

Фармакология клеточной генерации активных форм кислорода, ассоциированной с активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз

Ключевые слова: Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаза, макрофаги, активные формы кислорода (АФК), хемилюминесценция, антиоксиданты, клеточные модуляторы, комбинации, синергизм, плейотропность, теория.

Цель работы: разработка средств управления клеточной генерацией АФК, ассоциированной с активностью фермента Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы (Е.С. 1.6.3.1) на основе индивидуальных химических соединений (фармакологических агентов) и их синергических комбинаций.

Методы исследования: хемилюминесцентные методы количественного определения АФК в клеточных системах и биологических жидкостях.

Результаты работы и их научная новизна. Настоящая работа является первым систематическим исследованием по изысканию эффективных средств управления Nox2-зависимой генерацией АФК – ключевым патогенетическим звеном многих тяжелых заболеваний. Совокупность полученных результатов позволила разработать новую теорию плейотропного действия биологически активных соединений (лекарственных средств), сформировать оригинальные подходы к управлению Nox2-зависимой генерацией АФК посредством индивидуальных химических соединений и их комбинаций, обосновать разработку и рекомендации по медицинскому применению лекарственных средств на основе аминокислот и их производных для лечения патологических состояний, ассоциированных с гиперактивностью Nox2, таких как воспаление (на основе N-ацетил-L-пролина), ишемические и реперфузионные повреждения миокарда (на основе комбинации L-аргинина с салицилатами), прогрессирующий атеросклероз (на основе комбинации L-аргинина и таурина), иммунодефицитные состояния (на основе комбинации L-аргинина и инозина).

Степень использования: результаты диссертационной работы использованы при разработке семи оригинальных лекарственных средств, внедренных в практическое здравоохранение и выпускаемых фарминдустрией Республики Беларусь: «Тетракард», «Гроцепрол», «Лейаргунал», «Аспаргит», «Инокардин», «Нейрамин», «Валикар», а также для обоснования перспективности разработки новых лекарственных средств иммуномодулирующего и антиоксидантного типа действия на основе экранированных производных дифенола и пирокатехина (семь патентов на изобретение).

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

SUMMARY

Bizunok Natalia

Pharmacology of the reactive oxygen species generation by cells via enzyme Nox2-NAD(P)H-oxidase

Key words: Nox2-NAD(P)H-oxidase, macrophages, reactive oxygen species (ROS), chemiluminescence, antioxidants, modulators of cell functions, combinations, synergism, pleiotropy, theory.

Study goal: elaboration of arsenal to have control over ROS generation by cells via enzyme Nox2-NAD(P)H-oxidase (E.C. 1.6.3.1) on the basis of distinct chemical agents (pharmacological agents) and their synergistic combinations.

Study methods: quantitative ROS detection in the cell systems and biological liquids by chemiluminescent methods.

Results of study and their novelty. This is the first systematic investigation of the arsenal to have control over ROS generation by cells via enzyme Nox2-NAD(P)H-oxidase – the key pathogenesis mechanism a number of heavy diseases. The results of research allow found of the new theory of biological active agents or drugs actions – the pleiotropy theory. Besides this the investigation allow to form a novel approaches to the Nox2-dependent ROS generation by distinct chemical agents and their combinations and found of drugs engineering on the basis of amino acids and their derivatives for medication of wide range pathological stations associated with Nox2 hyper activation such as inflammation (on the basis of N-acetyl-L-proline), ischemic and reperfusions miocard injury (on the basis of L-arginine and salicylic acid derivatives combinations), progressive atherosclerosis (on the basis of L-arginine and taurine combinations) and immunodeficiency (on the basis of L-arginine and inosine combinations).

Degree of application: data was applied for engineering of seven drugs state-of-the-art in the medical practice and manufacturing in the Republic of Belarus «Thetracard», «Groceprol», «Leyargunal», «Aspargit», «Inocardine», «Neuramine», «Valicar» and for grounding of elaboration novel immunotropic and antioxidative drugs on the basis of diphenol and pyrocatechol derivatives screened by ditert-butyls (seven patents of invention).

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

Подписано в печать 23.10.13. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,7. Тираж 60 экз. Заказ 645.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».
ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.