

## ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ ДЕЙСТВИЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ МОДУЛЯТОРОВ Nox2-ЗАВИСИМОЙ ГЕНЕРАЦИИ АФК

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

---

*В статье проанализирована эффективность существующих подходов к фармакологическому управлению клеточной генерацией активных форм кислорода (АФК), ассоциированной с активностью фермента Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы (Е. С. 1.6.3.1), включая действие природных и синтетических антиоксидантов, модуляторов клеточных функций разного типа действия (модификаторы ионных токов, ингибиторы протеинкиназы С, агонисты 7-TMS рецепторов макрофагов, аминокислоты и метаболитные соединения), а также их комбинаций. Изложены перспективные направления разработки проблемы, а также основные результаты работы автора, актуальные не только с позиций фундаментальной науки (теория плейотропного действия лекарственных средств), но и с позиций практического приложения в виде вклада в разработку новых комбинированных лекарственных средств («Тетракард», «Лейаргунал», «Аспаргит», «Инокардин», «Гроцепрол»), внедренных в медицинскую практику и предназначенных для лечения ряда заболеваний, ассоциированных с оксидантным стрессом.*

**Ключевые слова:** Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы, обзор, антиоксиданты, модуляторы клеточных функций, теория плейотропного действия лекарственных средств, комбинированные лекарственные средства.

**N. A. Bizunok**

## **PHARMACOLOGICAL MODULATORS OF Nox2-DEPENDENT ROS GENERATION: FROM THE INDIVIDUAL TO THE UNIVERSAL REGULARITIES EFFICIENCY ACTION**

*The article analyzes the effectiveness of existing approaches to pharmacological management cell generation of reactive oxygen species (ROS) associated with the activity of the enzyme Nox2-NAD(P)H oxidase (EC 1.6.3.1), including the effect of natural and synthetic antioxidants, modulators of cellular functions of different types action (modifiers of ionic currents, protein kinase C inhibitors, agonists-7 TMS receptor of macrophages and metabotropic amino acid compound), and combinations thereof. Outlined promising areas of development issues, as well as the main results of the author, is important not only from the standpoint of fundamental science (the theory of the pleiotropic effects of drugs), but also from the standpoint of practical application in the form of a contribution to the development of new combination drugs («Tetrakard», «Leyargunal», «Aspargit», «Inokardin», «Grotseprol») embedded in the practice of medicine for the treatment of a number of diseases associated with oxidative stress.*

**Key words:** Nox2-NAD(P)H oxidase, review, antioxidants, modulators of cellular functions theory of drugs pleiotropic actions, drug combinations.

Исходя из известных механизмов сборки и активации Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы (Е. С. 1.6.3.1), обсуждавшихся ранее [17], среди наиболее перспективных подходов к управлению работой этого фермента и выходом конечных продуктов его активности можно выделить следующие:

- изменение процессов внутриклеточного фосфорилирования субъединиц комплекса с нарушением их ассоциации при помощи различных прямых и непрямых (опосредованных рецепторным связыванием) модулирующих воздействий, включая модификацию активности протеинкиназы С (PKC), фосфолипаз А, С, Д (PLA, PLC, PLD), арахидоновой кислоты (AA), Ca<sup>2+</sup>-токов и других ключевых механизмов клеточной сигнализации;

- модификацию структуры и функций цитоскелета клеток-носителей Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, включая количество и состав встроенных в мембраны фосфоинозитидов, взаимодействие с которыми фиксирует комплекс и обеспечивает его работу;

- использование синергических модулирующих воздействий в отношении механизмов, контролирующей сборку и активацию Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз;

- использование антирадикальных ловушек (антиоксидантов) различной радикальной специфичности и их синергических комбинаций для элиминации избытка первичных и вторичных продуктов активности фермента.

Современное состояние исследований, проводимых в этих направлениях, и задачи, требующие решения в этой связи, обсуждаются в настоящей работе.

### **Антиоксиданты природные и синтетические**

Попытки управления генерацией АФК, ассоциированной с активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, при помощи природных и синтетических антиоксидантов предпринимались параллельно расширению представ-

лений о механизмах действия и модулирующем потенциале этих соединений.

**Антиоксидантные витамины.** Антиоксидантное действие витаминов Е, С, А было показано в многочисленных исследованиях in vitro и в исследованиях, выполненных на лабораторных животных [39]. Вместе с тем в ходе клинических испытаний были получены противоречивые результаты, по крайней мере, при назначении этих витаминов для лечения или профилактики сердечно-сосудистой патологии, ассоциированной с оксидантным стрессом. В таблице приведены наиболее значимые клинические испытания, показавшие как положительные, так и отрицательные результаты.

Недостаточная эффективность в клинике антирадикальных соединений не имеет пока удовлетворительных объяснений. Укоренилось представление о том, что они частично элиминируют некоторые вредные продукты оксидантного стресса, но не влияют на избыточную продукцию АФК и на прогрессирование оксидант-ассоциированной патологии. Кроме того, взаимодействие антиоксидантов, в том числе витамина Е протекает гораздо медленнее с супероксидом, чем реакция последнего с биомолекулами, включая NO•, что является важнейшей причиной неэффективности антиоксидантов при сердечно-сосудистой патологии. В некоторых исследованиях заявляется, что витамины не проникают в стенку сосудов в достаточной степени, и, таким образом могут создавать терапевтические концентрации в плазме крови, но не в тканях [40]. Что касается α-токоферола, то его взаимодействие с супероксид-анионом ведет к образованию токофероксил-радикала – достаточно сильного оксиданта, который, однако, может превращаться в витамин Е в присутствии витамина С или коэнзима Q [22]. Тем не менее ряд исследований, в которых эти витамины назначались одно-

Таблица. Основные клинические испытания антиоксидантных витаминов при сердечно-сосудистых заболеваниях, ассоциированных с оксидантным стрессом

Результат	Клиническое испытание
Положительный результат	ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Trial), J. Virtamo [et al.], 1998; ASAP (Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention Study); J. T. Salonen [et al.], 2000; CLAS (Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study), Azen [et al.], 1996; CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study), N. G. Stephens [et al.], 1996; SPACE (Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in Endstage renal disease), M. Boaz [et al.], 2000; WACS (Women's Antioxidant and Cardiovascular Study) N. R. Cook [et al.], 2007.
Действие не обнаружено	ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Trial), J. Virtamo [et al.], 1998; CARET ( $\beta$ -Carotene and Retinol Efficacy Trial) G. S. Omenn [et al.], 1996; HATS (HDL-Atherosclerosis Treatment Study), B. G. Brown [et al.], 2001; HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation Study) S. Yusuf [et al.], 2000; PPP (Primary Prevention Project), G. de Gaetano, 2001; SU. VI. MAX (Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants trial), M. Zureik [et al.], 2004; VEAPS (Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study), H. N. Hodis [et al.], 2002; WACS (Women's Antioxidant and Cardiovascular Study), N. R. Cook [et al.], 2007; WAVE (Women's Angiographic Vitamin and Estrogen Trial), D. D. Waters [et al.], 2002.
Отрицательный результат	ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Trial), J. M. Rapola [et al.], 1996; CARET ( $\beta$ -Carotene and Retinol Efficacy Trial), G. S. Omenn [et al.], 1996; WAVE (Women's Angiographic Vitamin and Estrogen Trial), D. D. Waters [et al.], 2002.

временно, не позволил доказать их терапевтической эффективности (таблица).

Существуют и другие причины низкой клинической эффективности антиоксидантных витаминов. Например, попытка назначения их пациентам на поздних стадиях атеросклеротического процесса, когда снижена чувствительность к действию антиоксидантов – заведомо безуспешна. Другая причина – неадекватный режим дозирования витаминов или выбор неподходящей изомерной формы витамина. Некоторые клинические испытания не учитывали диетических предпочтений пациентов и режима физической активности, что очень важно в подобных исследованиях, другие различались целевыми группами пациентов и стратегиями сопутствующей фармакотерапии.

**Антиоксиданты полифенольной структуры.** В настоящее время известно примерно 10 000 соединений полифенольной структуры, естественным образом присутствующих в составе пищевых продуктов и подавляющих окислительный стресс [28]. Установлено, что полифенолы наряду с хорошо известной способностью улавливать супероксидный радикал, подавляют активность Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз. [16]. Это свойство показано для множества полифенолов и во многих клетках, включая клетки сосудистой стенки и тромбоциты [9]. Более того, отдельные полифенолы, например апоцинин, работают почти исключительно как ингибиторы Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, а не «ловушки» супероксида. Среди наиболее известных полифенолов, ингибирующее действие которых на Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы не вызывает сомнения, можно назвать транс-ресвератрол, выделенный из красного винограда и подавляющий транслокацию  $gp91^{phox}$  [34], растительный алкалоид берберин, ингибирующий экспрессию в макрофагах мРНК  $gp91^{phox}$  [6], эмодин, выделенный из корня ревеня и подавляющий Nox-зависимую генерацию АФК [14]. Сходным действием обладают 3-(4'-гидрокси-3',5'-диметоксифенил)пропионовая кислота (HDMPPA),

эллагиновая кислота [13], апоцинин [4] и дигомо- $\gamma$ -линоленовая ( $\omega$ -6) кислота [3]. Кроме того, показано, что полифенолы могут реализовывать свое антиоксидантное действие на Nox-зависимую генерацию АФК, работая как прямые промоторы «антиоксидантных» генов [29], а также регуляторы активности эндогенных геномных промоторов, таких как сертуины [31]. С позиций реализации прямого антирадикального действия отдельные производные фенола интересны своей способностью подавлять разрушение биомолекул не только за счет взаимодействия с кислород-центрированными радикалами, к которым относятся и АФК, но и с углерод-центрированными радикалами биомолекул, что может вносить существенный вклад в их защитное действие при окислительном стрессе *in vivo* [30].

Анализ результатов исследований, представленных в научной периодике, свидетельствует о том, что антиоксиданты – производные фенола – в условиях *in vivo* могут реализовать как прямое антирадикальное действие, так и не прямое (фармакодинамическое) действие, ассоциированное с изменением активности ферментов-генераторов АФК или активацией механизмов антиоксидантной защиты. Иначе, ряд антиоксидантов реализует несколько различных механизмов действия, в совокупности обеспечивающих их антиоксидантную активность в условиях Nox-ассоциированной генерации АФК.

При этом остался ряд вопросов, не получивших объяснений в работах, выполненных ранее: Каковы структурные детерминанты антиоксидантного действия производных фенола при Nox2-зависимой генерации АФК? Чем обусловлен ход кривых «доза (концентрация) – эффект» для этих соединений? Можно ли прогнозировать избирательную активность антиоксиданта к процессам, ассоциированным с Nox2-зависимой генерацией АФК, и если да, то, каким образом? Как использовать эти знания для повышения эффек-

тивности антиоксидантной фармакотерапии? Каковы оптимальные сочетания антиоксидантных витаминов между собой, с полифенолами, а также с модуляторами клеточной активности в свете современных представлений о синергизме?

### **Модуляторы клеточных функций разного типа действия**

Изучение модуляторов клеточных функций как потенциальных средств управления активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз продолжается по крайней мере в течение трех последних десятилетий. В первом приближении трудно найти группу соединений, не охваченную этим поиском, что создает иллюзию глубокой изученности вопроса. На самом же деле ситуация обратная. Важнейшей причиной того, что проблема эффективного управления активностью Nox2-зависимой генерации АФК до сих пор не получила решения является то, что ни в одной из работ, доступных для анализа, не была поставлена эта задача как таковая. Дело в том, что Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаза получила полное, как нам сегодня представляется, описание всего 10 лет назад, а её функции и физиологическая регуляция изучаются до сих пор. По этой причине работы более раннего периода касаются не управления активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз и генерацией АФК, ассоциированной с этой активностью, а изучению влияния того или иного индивидуального соединения или группы соединений на респираторный взрыв фагоцитов, чаще всего нейтрофилов или активированных макрофагов. Респираторный взрыв в этих клетках обеспечивается не только активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, но и других ферментов, участвующих в образовании и превращении АФК, например таких, как миелопероксидаза (МПО), и интересен лишь как источник большого количества разнообразных оксидантов. В подобных исследованиях практически невозможно установить, какая мишень обеспечивает модулирующее действие того или иного соединения. Но даже такие исследования проводились не системно, а хаотически – разными авторами, на различных моделях, в различных условиях – и преследовали целью лишь изучение свойств самих соединений, как правило, в связи с разработкой какого-либо лекарственного средства или метода лечения. На основе этих данных невозможно составить представление об управлении респираторным взрывом, как целостным процессом генерации АФК в клетках определенного типа.

В качестве примера можно привести исследования, в которых изучалось действие адреналина. Так Costa Rosa и соавторами было показано, что адреналин может усиливать образование  $H_2O_2$  в активированных макрофагах [10], другие АФК при этом не учитывались. Вместе с тем Корргасч и соавторы показали ингибирующее влияние адреналина на генерацию оксидантов лейкоцитами [7]; в этом исследовании учитывались любые АФК, но использовалась иная модель. Авторы последнего исследования предположили, что адреналин играет роль физиологического протектора при повреждающем действии АФК *in vivo*.

Однако назначение добровольцам адреналина в дозе 0,1 мкг/кг/мин приводило к усилению респираторного взрыва нейтрофилов в ответ на индуктор формилметионил-лейцил-фенилаланин (f-MLP) [11].

Другой пример – изучение влияния дофамина и изопреналина на продукцию супероксидного радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) полиморфноядерными лейкоцитами в тесте восстановления цитохрома С с использованием f-MLP, форбол-миристатацетата (ФМА) и опсонизированного зимозана (OZ) в качестве индукторов. Показано, что оба симпатомиметика подавляли генерацию клетками АФК лишь в концентрациях, превышающих 10 мкМ [8], тогда как Opdahl и соавторы установили аналогичный эффект изопреналина в ответ на f-MLP, но не ФМА [12]. В то же время Nilson на различных моделях фагоцитарной генерации АФК показал ингибирующее действие очень низких концентраций ( $10^{-10}$ – $10^{-8}$  М) изопреналина в ответ на f-MLP и кальциевый ионофор A23187, но не диацилглицерол [26]. Поскольку в упомянутых выше исследованиях использовались различные методологические подходы к изучению и оценке фагоцитарной продукции АФК, получены столь противоречивые результаты, что практически невозможно оценить модулирующий потенциал адренергических соединений. Примеров подобных вышеприведенным – множество.

Что касается работ более позднего периода (последнего десятилетия), то их отличает две особенности: переключение интереса исследователей на другие изоформы НАД(Ф)Н-оксидаз, открытые в этот период, и тотальная смена курса исследований из-за взрывного развития геноинженерных технологий. Сегодня поиск сосредоточился главным образом вокруг управления экспрессией субъединиц ферментов семейства НАД(Ф)Н-оксидаз. Результаты этих исследований открыли возможность изучить локализацию НАД(Ф)Н-оксидаз, физиологическую регуляцию их активности, функции АФК, генерируемых при их участии, однако не позволили пока существенно продвинуться в разработке технологий лечения Nox-ассоциированной патологии. Вместе с тем эти исследования обеспечивают возможность поиска таких технологий и средств уже не «в слепую», но опираясь на современные представления о регуляции работы ферментов этого семейства, как это показано в предыдущих разделах настоящего обзора. С учетом этих представлений удалось выделить несколько наиболее перспективных групп соединений, включая модуляторы ионных токов и внутриклеточных сигнальных каскадов, агонисты клеточных 7-TMS рецепторов – адренергические соединения и биогенные амины, аминокислоты и метаболитные соединения.

**Модуляторы ионных токов.** Блокаторы кальциевых каналов L-типа. Соединения этой группы потенциально способны ингибировать Nox2-зависимую генерацию АФК, исходя из важной роли кальция в индукции сборки этого фермента и наличия у макрофагов кальциевых каналов L-типа. Наиболее изучены с этих позиций производные дигидропиридина, которые отличаются между собой не только по активности, но и по эффективности в отношении разных изоформ НАД(Ф)Н-оксидаз. Показано, например, что НАД(Ф)

Н-оксидазы, локализованные в кардиомиоцитах и почках, более чувствительны к действию бинидипина, чем цилнидипина [5]. Азелнидипин способен также подавлять активность Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз и снижать уровень экспрессии мРНК p22<sup>phox</sup> и gp91<sup>phox</sup> (Nox2) [19]. Нифедипин наряду с подавлением активности фермента повышает экспрессию NO-синтаз в отдельных клетках [27]. Различия в действии дигидропиридинов, имеющие важное значение для их практического применения при оксидант-ассоциированной патологии, до сих пор не вполне ясны. Кроме того, до сих пор не раскрыт потенциал взаимодействия этих соединений с иными модуляторами клеточных функций. *Блокаторы натриевых и калиевых токов.* Эффекты этих соединений в отношении Nox2-зависимой генерации АФК изучены мало, хотя в последнее время интерес к ним возрос на фоне расширения представлений об участии АФК в регуляции работы Na и K каналов [35].

**Ингибиторы протеинкиназы С (PKC).** Многочисленные исследования показали, что PKC является сильным активатором ферментов семейства НАД(Ф)Н-оксидаз. Так хелеритрин, ингибитор PKC, снижает активность этого фермента через фосфорилирование цитоплазматических субъединиц оксидазы [25]. Вдобавок клинические испытания показали, что подавление активности PKC при назначении её избирательно ингибитора LY333531 сопровождается снижением генерации O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> и восстановлением функции эндотелия, нарушение которой были индуцированы гипергликемией и ассоциированы с гиперактивностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидазы [18]. При этом особую актуальность приобретают исследования, направленные на поиск способов управления активностью отдельных изоформ фермента, как путем прямых модулирующих влияний, так и косвенных, обусловленных рецепторным сигналом. С этих позиций особую актуальность приобретает изучение агонистов и антагонистов макрофагальных рецепторов, а также метаболитных средств.

**Агонисты 7-TMS рецепторов макрофагов.** Среди агонистов 7-TMS рецепторов макрофагов наибольший интерес с позиций управления активностью Nox2-зависимой генерацией АФК в этих клетках представляют адренергические альфа- и бета-агонисты. Многолетний интерес к адренергическим соединениям поддерживается их высокой востребованностью в клинике для лечения патологии ассоциированной с оксидантным стрессом и ещё более возрос после того, как были получены весомые доказательства регулирующей роли симпатической нервной системы в развитии иммунного ответа [36]. Эти исследования не только объяснили существование на макрофагах адренергических рецепторов, но и позволили получить доказательства их важной регулирующей роли в реализации антиген-презентирующей функции макрофагов, зависимой от активности Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз. Вместе с тем недавние исследования позволили объяснить вариабельность действия адренергических агонистов на макрофагальную продукцию оксидантов [24], что открывает новые подходы к использованию этих соединений и стимулирует интерес к изучению как индивидуаль-

ных эффектов адренергических агонистов, так и их комбинаций с другими модуляторами клеточных функций.

Другой группой соединений, представляющих интерес с позиции управления иммунным ответом и, в частности, различными функциями макрофагов, являются биогенные амины. Среди биогенных аминов особое внимание привлекает мелатонин, который может обладать мощным модулирующим потенциалом в отношении Nox2-зависимой генерации АФК за счет сочетания прямого антирадикального действия [23] и непрямого, обусловленного активацией специфических мелатониновых рецепторов, недавно обнаруженных на макрофагах [15]. При этом мелатонин представляется исключительно перспективным для комбинированного применения из-за синергизма с антиоксидантами иного типа действия [1].

**Аминокислоты и метаболитные соединения.** Несмотря на то, что фармакодинамический потенциал аминокислот интенсивно изучается, об их действии на Nox2-ассоциированную генерацию АФК известно мало. С этих позиций наиболее перспективными представляются **L-пролин и его производные, участие которых в редокс-регуляции не вызывает сомнений** [37], а также аминокислоты, обладающие высоким иммуномодулирующим потенциалом: L-аргинин [32], L-триптофан [38], таурин [21]. Среди метаболитных соединений наибольший интерес с этих позиций представляют пуринергические агонисты, например, инозин [20], а также L-карнитин и его производные [2]. При этом наиболее интересны различные комбинации аминокислот и метаболитных соединений, обладающие, по данным ряда авторов, высоким иммуномодулирующим, цитопротекторным и антиоксидантным потенциалом [2, 21, 32, 37, 38].

В контексте изучения индивидуального действия биологически активных соединений на Nox2-ассоциированную генерацию АФК исключительный интерес представляют аспекты, связанные с оценкой дозовых закономерностей действия и факторов, детерминирующих различия в активности и эффективности отдельных модуляторов, поскольку такие знания чрезвычайно важны для надлежащего управления целевым эффектом. До недавнего времени эти проблемы выпадали из поля зрения исследователей.

**Комбинированное действие биологически активных соединений.** С позиций управления активностью Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз исследование комбинаций представляет интерес по нескольким причинам. Главная из них – потенциал синергизма комбинаций с появлением эффектов, не достижимых при изолированном действии биологически активных соединений [33]. Такие комбинации представляют исключительный интерес с позиции разработки новых лекарственных средств. Другая причина состоит в том, что в реальности клетка подвержена одновременному действию нескольких биологически активных соединений, поэтому поиск закономерностей совокупного действия при инициации нескольких внутриклеточных сигнальных путей представляет интерес не только с позиции прикладных, но и фундаментальных аспектов фарма-

## Обзоры и лекции



Рисунок. Парадигма изыскания подходов к управлению Nox2-зависимой генерацией АФК в клетках

кологии и клеточной биологии. И, наконец, изучение сочетанного действия биомодуляторов с использованием современного методического аппарата комбинаторной фармакологии [33] поможет раскрыть неизвестные до сих пор аспекты Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах при FcR-зависимом фагоцитозе, служащем основой иммунологической устойчивости. Анализ данных литературы показывает, что вопросы комбинированного действия биологически активных соединений на Nox2-зависимую генерацию АФК мало разработаны, поэтому такое направление исследований представляет широкие возможности для научного поиска и интенсивно разрабатывается на кафедре фармакологии УО БГМУ.

В соответствии с изложенными выше проблемами, парадигму работ проводимых к этому направлению на кафедре фармакологии УО БГМУ, можно представить в виде схемы (рисунок).

Результаты, достигнутые при разработке этого направления можно изложить в виде положений, содержание которых раскрыто в серии публикаций автора [1].

### Выводы

1. Среди соединений, принадлежащих к химическим классам структурных аналогов  $\alpha$ -токоферола и кумарина, производных дифенола и пирокатехина, включая тиофенолы и аминофенолы, производных бензойной и коричной кислот (изучено 87 наименований) впервые обнаружены эффективные ингибиторы свободнорадикальных реакций, притекающих с участием Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, представляющие интерес в качестве потенциальных иммуномодулирующих и антиоксидантных лекарственных средств, включая 3,5-ди-трет-бутилпирокате-хин, 3-(2-гидроксиэтилтио)-4,6-ди-трет-бутилпирокатехин, 5-метокси-1,3-бен-зоксатиол-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<sup>-</sup>) ведет к сни-

жению антиоксидантной активности соединений на порядки величин. Установлено, 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 плейотропного действия этих соединений, обусловленным, помимо молекулярной структуры, химическим составом биосреды, в которой они функционируют.

2. 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 (OZ) 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.

3. Синергические комбинации известных антиоксидантов ( $\alpha$ -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 триплетах ингредиентов. К числу наиболее эффективных относятся синергические комбинации  $\alpha$ -токоферола с аскорбатом в молярном соотношении 1/10 ( $10^{-8}$ – $10^{-4}$  M/ $10^{-6}$ – $10^{-3}$  M), t-ресвератрола с мелатонином при молярных соотношениях от 1/1 до 1/100 ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  M/ $10^{-7}$ – $10^{-3}$  M), а также аскорбата с мелатонином и t-ресвератролом в молярном соотношении 1000/100/1 ( $10^{-5}$ – $10^{-3}$  M/ $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M/ $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M). Показано, что комбинации природных антиоксидантов, демонстрирующие зависимый от концентрации синергизм компонентов, формируют два паттерна плейотропности – параллельной (комбинация аскорбата с мелатонином и t-ресвератролом) и амплифицирующей (комбинация мелатонина с t-ресвератролом), что указывает на различную природу мишеней их модулирующего действия.

4. 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 (изучено 48 веществ) являются высокоактивными регуляторами Nox2-зависимой клеточной генерации АФК ингибирующего или стимулирующего типа действия. При этом впервые показано, что действие ингибиторов является плейотропным и проявляется в различных паттернах зависимости эффекта от концентрации. Амплифицирующий паттерн характеризуется зависимым от концентрации экспоненциальным усилением ингибиру-

вания 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 плейотропности отличает постоянство вклада Nox2-зависимой компоненты в зависимое от концентрации модулятора ингибирование клеточной продукции АФК, он характерен для антагонистов  $\beta$ -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, изопrenalин и АМФ реализуют паттерн элиминирующей плейотропности, 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.

5. 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<sup>-4</sup>–10<sup>-3</sup> М/10<sup>-3</sup>–10<sup>-2</sup> М), ацетил-L-карнитина и таурина (1/10...10/1 в диапазоне  $10^{-3}$  М/10<sup>-4</sup>–10<sup>-2</sup> М); таурина и L-аргинина (1/10 в диапазоне  $10^{-3}$ –10<sup>-2</sup> М/10<sup>-2</sup> М), N-ацетил-L-пролина и АТФ (1/1...10/1 в диапазоне  $10^{-3}$  М/10<sup>-4</sup>–10<sup>-3</sup> М); N-ацетил-L-пролина и ацетилсалициловой кислоты или мелоксикама (10/1 в диапазоне  $10^{-4}$ –10<sup>-3</sup> М/10<sup>-5</sup>–10<sup>-4</sup> М); инозина и L-аргинина (1/1 в диапазоне  $10^{-3}$  М/10<sup>-3</sup> М); инозина, салициловой кислоты и L-аргинина (10/1/10...1/1/10 в диапазоне  $10^{-4}$ –10<sup>-3</sup> М/10<sup>-4</sup> М/10<sup>-3</sup> М); L-аргинина и ацетилсалициловой кислоты (10/1 в диапазоне  $10^{-4}$ –10<sup>-2</sup> М/10<sup>-5</sup>–10<sup>-3</sup> М). Характерно, что все комбинации, демонстрирующие зависимый от концентрации прирост синергизма компонентов, реализуют паттерны амплифицирующей или параллельной плейотропности и сдвигают профиль эффективных концентраций модуляторов в область фармакологических.

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».

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.

### Литература

1. Бизунок, Н. А. Фармакология клеточной генерации активных форм кислорода, ассоциированной с активностью NOX2-НАД(Ф)Н-оксидаз / Н. А. Бизунок // Автореф. дис. ... д. м. н. 2013. – 41 с.
2. Копелевич, В. М. Витаминоподобные соединения L-карнитин и ацетил-L-карнитин: от биохимических исследований к медицинскому применению / В. М. Копелевич // Укр. Биохим. Журн. – 2005. – Т. 77, № 4. – С. 30–50.
3. Anti-atherosclerotic effects of dihomo-gamma-linolenic acid in ApoE-deficient mice / S. Takai [et al.] // Journal of atherosclerosis and thrombosis. – 2009b. – Vol. 16. – P. 480–489.
4. Apocynin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats by reducing levels of reactive oxygen species / J. Liu [et al.] // Canadian journal of physiology and pharmacology. – 2010. – Vol. 88. – P. 745–752.
5. A dihydropyridine L-type/T-type calcium channel blocker, affords additive benefits for prevention of cardiorenal injury in hypertensive rats / E. Yamamoto [et al.] // Journal of hypertension. – 2010. – Vol. 28. – P. 1321–1329.
6. Berberine inhibits NADPH oxidase mediated superoxide anion production in macrophages / L. K. Sarna [et al.] // Canadian journal of physiology and pharmacology. – 2010. – Vol. 88. – P. 369–378.
7. Beta-adrenergic modulation of FM2P-and zymosan-induced intracellular and extracellular oxidant production by polymorphonuclear leukocytes / S. Kopprasch [et al.] // Mol. Cell. Biochem. – 1997. – Vol. 168, № 1–2. – P. 133–139.
8. Dopamine inhibition of superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes. / M. Yamazaki [et al.] // J. Allergy Clin. Immun. – 1989. – Vol. 83, № 5. – P. 967–972.
9. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis / N. Ryszawa [et al.] // J. Physiol. Pharmacol. – 2006. – Vol. 57. – P. 611–626.

## Обзоры и лекции

10. Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages / L. F. Costa Rosa [et al.] // *Biochem. Pharmac.* – 1992. – Vol. 44, № 11. – P. 2235–2241.
11. Effects of inotropes on human leucocyte numbers, neutrophil function and lymphocyte subtypes / A. M. Burns [et al.] // *Br. J. Anaesth.* – 1997. – Vol. 78, № 5. – P. 530–535.
12. Effect of beta – adrenergic agents on human neutrophil granulocyte activation with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and phorbol myristate acetate / H. Opdahl [et al.] // *Pharmac. Toxicol.* – 1993. – Vol. 72, № 4–5. – P. 221–228.
13. Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells / W. J. Lee [et al.] // *J. Vasc. Surg.* – 2010. – Vol. 52. – P. 1290–1300.
14. Emodin and rhein inhibit LIGHT-induced monocytes migration by blocking of ROS production / S. K. Heo [et al.] // *Vascular pharmacology.* – 2010. – Vol. 53. – P. 28–37.
15. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system / A. Carrillo-Vico [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS).* – 2003. – Vol. 60, № 10. – P. 2272–2278.
16. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats / N. A. Al-Awwadi [et al.] // *Journal of agricultural and food chemistry.* – 2005. – Vol. 53. – P. 151–157.
17. Groemping, Y. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective / Y. Groemping, K. Rittinger // *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 386(Pt 3). – P. 401–416.
18. Gutterman, D. D. Vascular dysfunction in hyperglycemia: is protein kinase C the culprit? / D. D. Gutterman // *Circulation research.* – 2002. – Vol. 90. – P. 5–7.
19. Inhibitory effects of a dihydropyridine calcium channel blocker on renal injury in aldosterone-infused rats / Y. Y. Fan [et al.] // *Journal of hypertension.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1855–1862.
20. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a post-transcriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock / G. Hasko [et al.] // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 1013–1019.
21. Kim, C. Production of reactive oxygen and nitrogen species in phagocytes is regulated by taurine chloramines / C. Kim, Y. N. Cha // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – Vol. 643. – P. 463–472.
22. Malondialdehyde and selected antioxidant plasma levels in conservatively treated patients with kidney diseases / K. Gazdikova [et al.] // *Bratislavske lekarske listy.* – 2000. – Vol. 101. – P. 490–494.
23. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans / R. J. Reiter [et al.] // *Acta Biochimica Polonica.* – 2003. – Vol. 50, № 4. – P. 1129–1146.
24. Multiple G-protein-coupling specificity of  $\beta$ -adrenoceptor in macrophages / M. Magocsi [et al.] // *Immunology.* – 2007. – Vol. 122. – P. 503–513.
25. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels / C. A. Hamilton [et al.] // *Hypertension.* – 2002. – Vol. 40. – P. 755–762.
26. Nielson, C. P. Beta-adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation / C. P. Nielson // *J. Immun.* – 1987. – Vol. 139, № 7. – P. 2392–2397.
27. Nifedipine, a calcium-channel blocker, attenuated glucose intolerance and white adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-A(y) mice / M. Iwai [et al.] // *American journal of hypertension.* – 2011. – Vol. 24. – P. 169–174.
28. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials / L. Badimon [et al.] // *Cardiovasc. Ther.* – 2010. – Vol. 28. – P. 202–215.
29. Polyphenols and glutathione synthesis regulation / J. Ø. Moskaug [et al.] // *American Journal of Clinical Nutrition.* – 2005. – Vol. 81, № 1. – P. 277S–283S.
30. Quinones as free-radical fragmentation inhibitors in biologically important molecules / O. I. Shadyro [et al.] // *Free radical research.* – 2002. – Vol. 36, № 8. – P. 859–867.
31. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols / Ch. Sangwoon [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2010. – Vol. 501, № 1. – P. 79–90.
32. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology / E.1. Peranzoni [et al.] // *Immunobiology.* – 2007. – Vol. 212, № 9–10. – P. 795–812.
33. T-Ch Chou. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch. Chou // *Pharmacological reviews.* – 2006. – Vol. 58. – P. 621–681.
34. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption / F. Orallo [et al.] // *Molecular pharmacology.* – 2002. – Vol. 61, № 2. – P. 294–302.
35. The nondepolarizing, normokalemic cardioplegia formulation adenosine-lidocaine (adenocaine) exerts anti-neutrophil effects by synergistic actions of its components / W. Shi [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2012. – Vol. 143. – P. 1167–1175.
36. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system / I. J. Elenkov [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52. – P. 595–638.
37. The Metabolism of Proline as Microenvironmental Stress Substrate / J. M. Phang [et al.] // *J. Nutr.* – 2008. – Vol. 138. – P. 2008S–2015S.
38. The effect of tryptophan administration on ileum contractility and oxidant status in mice / Ç. Özer [et al.] // *Amino Acids.* – 2007. – Vol. 32, № 3. – P. 453–458.
39. Traber, M. G. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective / M. G. Traber, J. F. Stevens // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – Vol. 51. – P. 1000–1013.
40. Vitamin E supplementation in patients with carotid atherosclerosis: reversal of altered oxidative stress status in plasma but not in plaque / F. Micheletta [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 136–140.