

Н. А. Бизунок

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИОКСИДАНТОВ АЛЬФА-ТОКОФЕРОЛА И АСКОРБАТА НА МОДЕЛИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА ФАГОЦИТОВ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

На модели респираторного взрыва фагоцитов комбинация α -токоферола и аскорбата синергична при 10-кратном превалировании последнего, дальнейшее увеличение концентрации аскорбата ведет к снижению синергизма (1/100) и появлению антагонизма при соотношении компонентов 1/1000. Снижение концентрации компонентов в любом комбинаторном сочетании сопровождается аналогичной тенденцией.

Ключевые слова: α -токоферол, аскорбат, комбинации лекарственных средств, синергизм, антагонизм, активные формы кислорода, макрофаги.

The α -tocopherol and ascorbic acid acts synergistic in ratio 1/10 on the model of reactive oxygen species generation by respiratory burst of phagocytes. Rising concentration of ascorbic acid in ratios 1/100 and 1/1000 are decrease synergistic and increase antagonistic interactions. In case the falls of drug concentrations in any combination ratio, the same results were detected.

Key words: α -tocopherol, ascorbic acid, drug combinations, synergism, antagonism, reactive oxygen species, macrophages.

Активация фагоцитов индуцирует генерацию не только первичных активных форм кислорода (АФК), но и вторичных кислород- (О-) и углерод- (С-) центрированных радикальных интермедиатов [6]. Последствия образования радикальных продуктов многообразны. С одной стороны, они выполняют регуляторные функции, инициируя процессы клеточного деления, роста и физиологического обновления, с другой – необратимо повреждают биологические молекулы и нарушают оксидантный гомеостаз интерстиция, что ведет к разобщению регуляции жизнедеятельности и преждевременному запуску программы клеточной смерти.

Хорошо изучено два типа взаимодействий радикалов с биосубстратами – окисление и фрагментация. Первый тип чаще реализуется при действии О-центрированных радикальных форм, второй – С-центрированных. Первичным инициатором обоих типов могут быть биогенные АФК, которые в зависимости от собственной активности, композиции биомолекул в пределах их радиуса действия, и ионного баланса среды могут давать разные радикальные аддукты.

Введение экзогенных антирадикальных средств преследует целью – установить такой баланс различных радикальных форм, при котором будет превалировать их дисмутация и обрыв цепных радикальных реакций. В этом качестве чаще всего используют соединения, способные легко окисляться или восстанавливаться за счет отдачи или захвата электронов с образованием нейтральных для клеток метаболитов. Радикальные формы самих антиоксидантов также являются проблемой, поскольку, несмотря на меньшую активность, сохраняют деструктивный потенциал. В ряде случаев их взаимодействие приводит к регенерации молекул антиоксиданта, но чаще они являются вторичными инициаторами свободнорадикальных реакций. По этой причине поиск комбинаций антиоксидантов, в которых отдельные компоненты могли бы восстанавливать друг друга и пополнять «антиоксидантную буферную емкость» является важной задачей свободнорадикальной фармакологии.

В настоящей работе представлены результаты индивидуального и комбинированного действия природных антиоксидантов – α -токоферола и аскорбиновой кислоты (аскорбата) – на модели респираторного взрыва фагоцитов.

Планирование исследования и обработка результатов основаны на принципах, сформулированных Chou и Talalay [3] и подтвержденных 30-и летним периодом экспериментальной апробации при изучении взаимодействий биологически активных соединений и лекарственных средств на различных моделях *in vitro* и *ex vivo*.

Методы исследования

Среды и реагенты. В работе использовали α -токоферол – «Aldrich»; аскорбиновую кислоту – ЗАО «Пять океанов», Беларусь; люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) – «Sigma»; среду Хенкса без индикатора – ОАО «Диалек», Беларусь; диметилсульфоксид – ООО «Фармтехнология», Беларусь; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимозан (сухие пекарские дрожжи), сыворотку крови телят – ОАО «Диалек», Беларусь.

Комбинаторные сочетания. На первом этапе исследования изучалось индивидуальное действие α -токоферола и аскорбата в широком диапазоне концентраций – 10^{-9} – 10^{-5} М и 10^{-6} – 10^{-3} М, соответственно. По результатам этих испытаний было обосновано изучение 3-х молярных комбинаторных сочетаний антиоксидантов: 1 / 1 0 (10^{-8} – 10^{-5} М – α -токоферол + 10^{-7} – 10^{-4} М – аскорбат); 1 / 1 0 0 (10^{-8} – 10^{-5} М – α -токоферол + 10^{-6} – 10^{-3} М – аскорбат); 1 / 1 0 0 0 (10^{-9} – 10^{-6} М – α -токоферол + 10^{-6} – 10^{-3} М – аскорбат).

Получение клеток. Исследования выполнены на изолированных перитонеальных макрофагах крыс-самцов линии Вистар массой 200–250 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия содержала более 98% жизнеспособных клеток

по результатам теста с трипановым синим (0.1%), при дифференцированном подсчете которых в окрашенных мазках, макрофаги составляли около 90%.

Изучение респираторного взрыва. Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной (ИХЛ) генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251–002 (Финляндия).

Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемыми агентами в интервале концентраций 10^{-9} – 10^{-4} М при температуре 20–25 °С; контрольные пробы содержали эквивалентное количество среды. Каждый опыт проводился на клетках одного животного и включал весь изучаемый диапазон концентраций агента (комбинаторного сочетания). При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной среды Хенкса: 10^6 жизнеспособных макрофагов, люминол ($7 \cdot 10^{-5}$ М), опсонизированный зимозан ($5 \cdot 10^7$ частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, изучаемый агент (комбинацию агентов); в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды.

Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах, содержащих изучаемый агент и контрольных, при постоянной температуре (37°C), в дискретном режиме с интервалом 2–3 мин, на протяжении 30 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и площади под кривой ХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC). Последний показатель отражает вклад НАДФН-оксидазы фагоцитов (Nox2) в продукцию общего пула АФК. Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые агенты, выражали в % к контрольным значениям. Количество повторных опытов варьировало от 3 до 6.

Статистический анализ. Статистическую обработку первичных результатов проводили с использованием парного t-критерия, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5%.

Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации (IC_{16} – IC_{84}) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,1» и математических преобразований по Chou [4] при помощи специально разработанного алгоритма в программной оболочке Ehel.

Анализ взаимодействия. Результат взаимодействия α -токоферола и аскорбата оценивали по значению комбинаторного индекса (CI), который рассчитывали по формуле (1):

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

$(D)_j$ – доза (концентрация) агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; $(D_ч)_j$ – доза (концентрация) агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.

Значения CI трактовали в соответствии со следующей шкалой: CI < 0,1 – очень сильный синергизм (5+); CI=0,1-0,3 – сильный синергизм (4+); CI=0,3-0,7 – синергизм (3+); CI=0,7-0,85 – умеренный синергизм (2+); CI=0,85-0,90 – слабый синергизм (1+); CI=0,90-1,10 – аддитивный эффект (0); CI=1,10-1,20 – слабый антагонизм (1-); CI=1,20-1,45 – умеренный антагонизм (2-); CI=1,45-3,3 – антагонизм (3-); CI=3,3-10,0 – сильный антагонизм (4-); >10 – очень сильный антагонизм (5-).

Индекс снижения дозы (DRI) компонентов комбинации рассчитывали по формуле (2):

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

DRI показывает во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента комбинации для достижения того же эффекта, что вызывает изолированное действие компонентов.

Результаты представлены графически на рисунке 3 в виде распределений комбинаторного индекса (Fa-CI-plot) и индекса снижения дозы. (Fa-DRI-plot) как функция фракции Fa (фракции подавления ХЛ по отношению к контрольным значениям) в диапазоне 0,1- 0,95. CI < 1, = 1 и > 1 показывает синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно. На диаграммах указан 95% доверительный интервал, рассчитанный с использованием разработанного нами алгоритма на основе методических принципов Т.С.Chou и Н.Кim [4].

Результаты и обсуждение

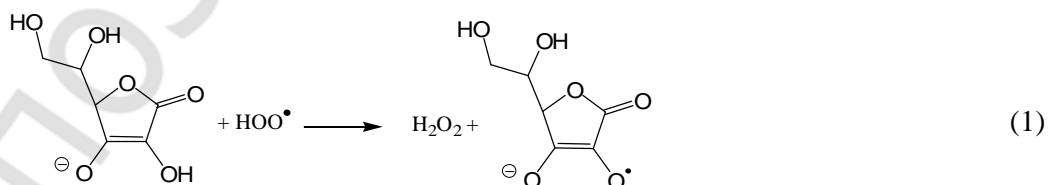
Максимальная эффективность α -токоферола в отношении респираторного взрыва макрофагов (E_{max}) достигает 50% при концентрации 8,8 мкМ, активность относительно не высока (таблица 1), что типично для токоферолов в системах, содержащих структурированные липиды. Феномен объясняется снижением подвижности атома водорода гидроксигруппы α -токоферола из-за сильного сольватационного эффекта воды, а также его склонностью накапливаться в липидах, что ведет к снижению концентрации в водной фазе, куда вытесняются пероксильные радикалы [7]. Кроме того, при взаимодействии с пероксидами α -токоферол способен превращаться в α -Тс-О-радикалы, которые за счет раскрытия пиранового цикла и внутримолекулярной перегруппировки трансформируются в С-центрированные интермедиаты, окисляющие биосубстраты [3, 10].

Таблица 1.

Эффективные ингибирующие концентрации (IC_{16-84}) α -токоферола и аскорбата на модели респираторного взрыва макрофагов

Агент	IC, M					Коэффициенты регрессии	
	16	30	50	70	84	<i>a</i>	<i>b</i>
AUC ХЛ							
α -Токоферол	7 $3,8 \cdot 10^{-7}$	6 $1,8 \cdot 10^{-6}$	6 $8,8 \cdot 10^{-6}$	—	—	- 2,68	- 0,53
Аскорбат	4 $2,3 \cdot 10^{-4}$	4 $9,4 \cdot 10^{-4}$	—	—	—	- 1,39	- 0,58
DAUC ХЛ							
α -Токоферол	7 $2,5 \cdot 10^{-7}$	6 $1,2 \cdot 10^{-6}$	6 $6,1 \cdot 10^{-6}$	—	—	- 2,71	- 0,52
Аскорбат	4 $1,6 \cdot 10^{-4}$	3 $1,6 \cdot 10^{-3}$	—	—	—	- 0,62	- 0,35

Что касается аскорбата, то его невысокая активность в клеточном тесте, на первый взгляд трудно объяснимая, может быть обусловлена следующим обстоятельством. Аскорбат – исключительно эффективный антиоксидант, способный к саморегенерации (рисунок 1, реакции 1, 2):



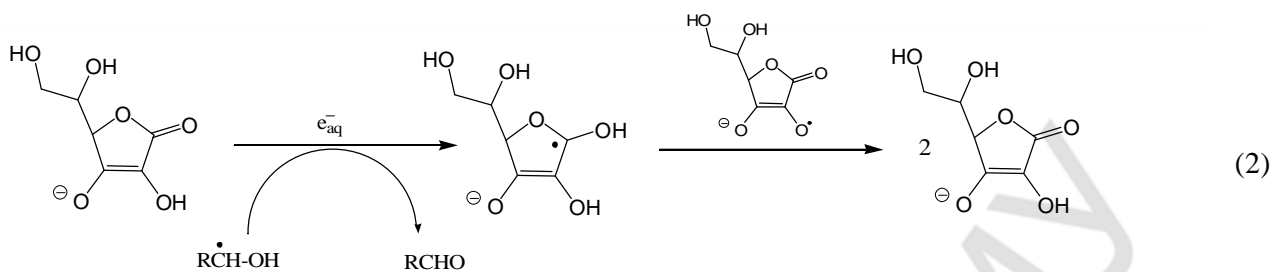


Рис. 1. Радикальные трансформации и саморегенерация аскорбиновой кислоты (цитируется по [1])

В результате радикальных превращений аскорбата образуются его O-центрированные и C-центрированные радикалы, которые при взаимодействии дают 2-е молекулы восстановленного аскорбата. Это происходит при своеобразном радикальном балансе, нарушение которого ведет к проявлению прооксидантного действия аскорбата. Следует отметить, что при значениях pH близких к 7,0 аскорбат находится в монодиссоциированном состоянии, в котором он проявляет выраженные восстановительные свойства. Очевидно, относительный избыток образования O-центрированных радикалов аскорбата в условиях массивной генерации АФК в макрофагах и является причиной его низкой антиоксидантной активности в клеточной системе.

Широкий антирадикальный профиль аскорбата позволяет считать его универсальным восстановителем других антиоксидантов. Именно поэтому аскорбат комбинируют с липофильными и гидрофильными антиоксидантами различной радикальной специфичности. Однако это полезное свойство аскорбата до сих пор не имеет надлежащих экспериментальных подтверждений на доказательных моделях.

Комбинированное действие α -токоферола и аскорбата

Классическим примером комбинации «фенольный антиоксидант + восстановитель» является сочетание α -токоферола и аскорбата. Комбинированное использование α -токоферола и аскорбата – известный способ повышения антиоксидантного потенциала обоих. Эта комбинация имеет веское теоретическое обоснование и считается аксиомой антирадикальной фармакологии. Однако доказательства эффективности такой комбинации получены в химических и биохимических тестах, исключающих возможность прямой экстраполяции *ex vivo*. Литературные данные о результатах исследования таких комбинаций *ex vivo* или на биологических моделях неоднозначны – от сообщений о выраженном потенцировании до антагонизма [5, 7, 8, 9, 11]. В большинстве случаев это связано с дефектами в планировании и выполнении таких исследований – оценкой эффективности единственного комбинаторного сочетания или одной дозы (концентрации), выбранной на основании результатов тестирования в простых химических системах. Следует также учитывать, что оба соединения в зависимости от условий могут

работать как антиоксиданты и как прооксиданты [1, 2]. Прооксидантный потенциал аскорбата хорошо изучен и большинством профессионалов разделяется точка зрения, согласно которой он проявляется при низких концентрациях аскорбата в биосредах.

С позиций обоснования комбинированного применения α -токоферола и аскорбата исключительно актуальны исследования различных комбинаторных композиций в широких диапазонах концентрации на биологически релевантных моделях.

В настоящей работе представлены результаты исследования 3-х таких композиций [α -токоферол + аскорбат] – 1/10, 1/100, 1/1000, соответственно. Молярное соотношение компонентов выбиралось с учетом результатов предварительного тестирования индивидуальной антиоксидантной активности.

Анализ полученных результатов показывает, что наиболее выгодным с позиций синергизма является комбинация α -токоферола и аскорбата в молярном соотношении 1/10 (рисунок 2, таблицы 2 и 3).

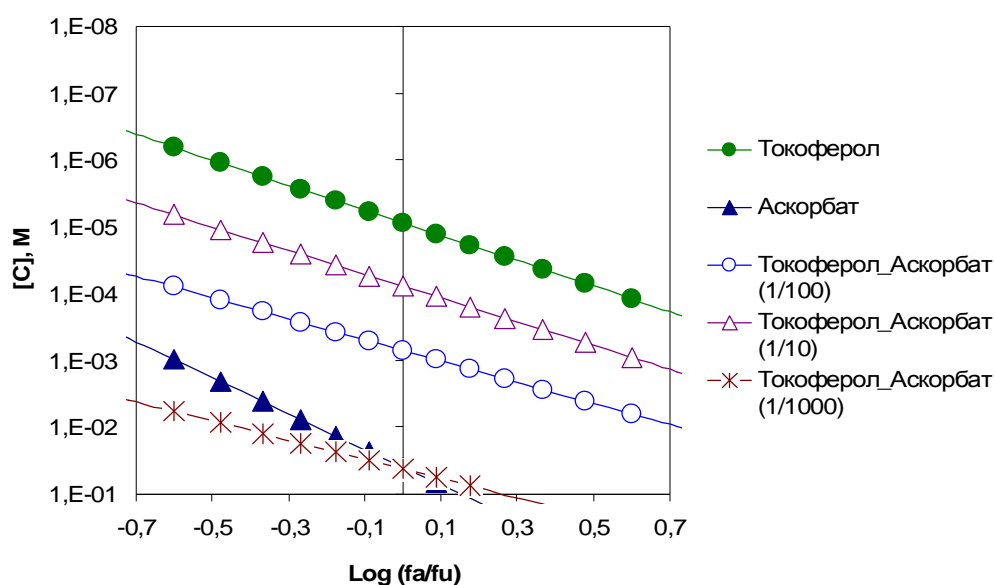


Рис. 2. Распределение медианного эффекта (median-effect plot) при изолированном и комбинированном действии α -токоферола и аскорбата на модели зимозан-индуцированного респираторного взрыва макрофагов

Log (fa/fu) – логарифм отношения эффективной к неэффективной фракции; [C], M – концентрация вещества в моль/л. Для комбинаций рассчитываются суммарные концентрации компонентов.

Стократное превалирование аскорбата по отношению к α -токоферолу (комбинация 1/100) ведет к появлению антагонизма в области низких концентраций антиоксидантов, хотя средневзвешенное значение CI не изменяется за счет некоторого увеличения синергизма в области высоких концентраций. В целом эффект такой комбинации соответствует критериям аддитивности. Индекс снижения дозы (DRI) показывает, что для аскорбата существует значительный дозовый резерв при его 10-и и 100-кратном превалировании над α -токоферолом (таблица 3, рисунок 3 – DRI-plot).

Таблица 2.

Значения комбинаторного индекса (CI) для различных комбинаторных сочетаний [α -токоферол + аскорбат] на модели респираторного взрыва макрофагов (AUC ИХЛ)

КОК ¹ (Т/А)	CI ² [IC, %]					М [CI] ₃₀₋₇₀ ³	Результат взаимодействия ⁴
	16	30	50	70	84		
1/10	0,97	0,88	0,80	0,73	0,67	0,83	2+
1/100	1,43	1,08	0,82	0,63	0,49	0,92	0
1/1000	18,2	9,98	5,84	3,65	2,42	7,55	4-

В соотношении 1/1000 α -токоферол и аскорбат вступают в антагонистические взаимодействия. На диаграмме распределения медианного эффекта видно (рисунок 2), что характер результирующей кривой «концентрация-эффект» для комбинации 1/1000 отличается значительным снижением активности и эффективности по сравнению с другими сочетаниями и изолированным использованием антиоксидантов. Анализ распределения комбинаторного индекса (рисунок 3 – CI-plot) показывает, что антагонизм по результирующему эффекту отмечается во всем эффективном диапазоне.

¹ Комбинаторное отношение компонентов

² Комбинаторный индекс (CI) рассчитан по методике Chou [4].

³ Средневзвешенное значение рассчитано, как $M[CI]_{30-70} = \sum [3CI_{30} + 2CI_{50} + CI_{70}] / 6$.

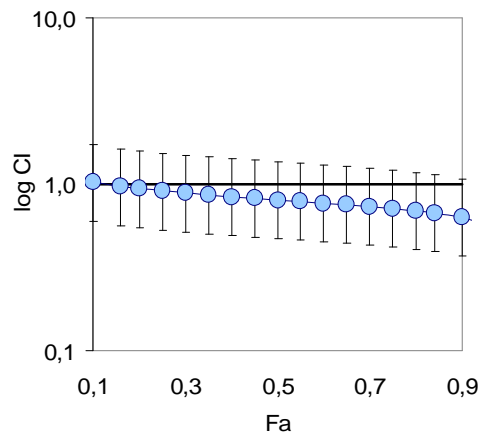
⁴ Описание условных обозначений содержится в методах исследования.

Таблица 3.

Значения индекса снижения дозы (DRI) для различных комбинаторных сочетаний [α -токоферол + аскорбат] на модели респираторного взрыва макрофагов (AUC ИХЛ)

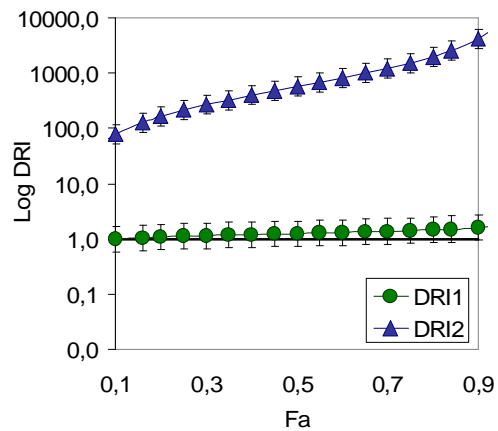
КОК (Т/А)	Компонент	DRI [IC, %]					M [DRI] ₃₀₋₇₀ ⁵
		16	30	50	70	84	
1/10	α -Токоферол	1,0	1,1	1,3	1,4	1,5	1,2
	Аскорбат	127,9	265,2	568,0	1216,9	2523,1	524,7
1/100	α -Токоферол	0,8	1,0	1,2	1,6	2,1	1,2
	Аскорбат	9,3	22,5	56,6	142,5	345,0	53,9

⁵ Средневзвешенное значение рассчитано, как $M[DRI]_{30-70} = \sum [3DRI_{30} + 2DRI_{50} + DRI_{70}] / 6$.

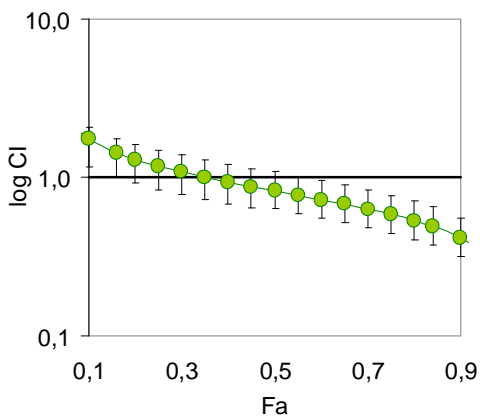


Fa-CI-plot

1/10

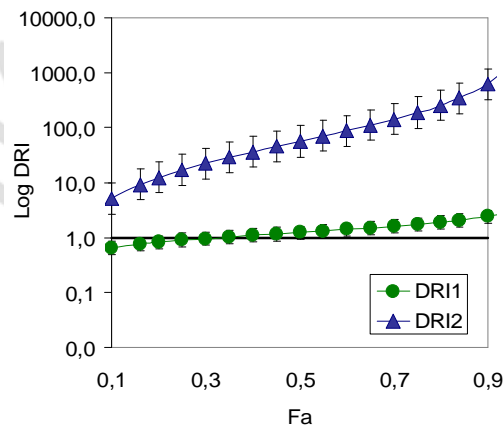


Fa-DRI-plot

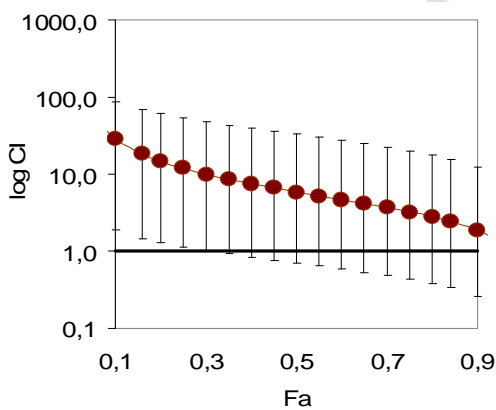


Fa-CI-plot

1/100

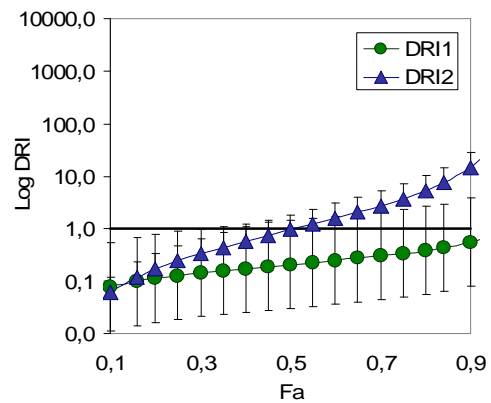


Fa-DRI-plot



Fa-CI-plot

1/1000



Fa-DRI-plot

Рис. 3. Характер распределения CI и DRI для различных комбинаторных сочетаний α -токоферола и аскорбата (AUC ИХЛ)

CI (Fa-CI-plot) и DRI (Fa-DRI-plot) представлены как функция фракции Fa, полученная путем расчета по Chou при Fa 0,1-0,95. CI < 1, = 1 и > 1 показывает синергизм, аддитивный

эффект и антагонизм, соответственно. На диаграммах указан 95% доверительный интервал, рассчитанный с использованием алгоритма Т.С.Chou и Н.Кim.

На основе полученных результатов и известных свойств α -токоферола и аскорбата, их взаимодействие в условиях генерации избытка АФК, например, при респираторном взрыве макрофагов, можно представить следующим образом (рисунок 4).

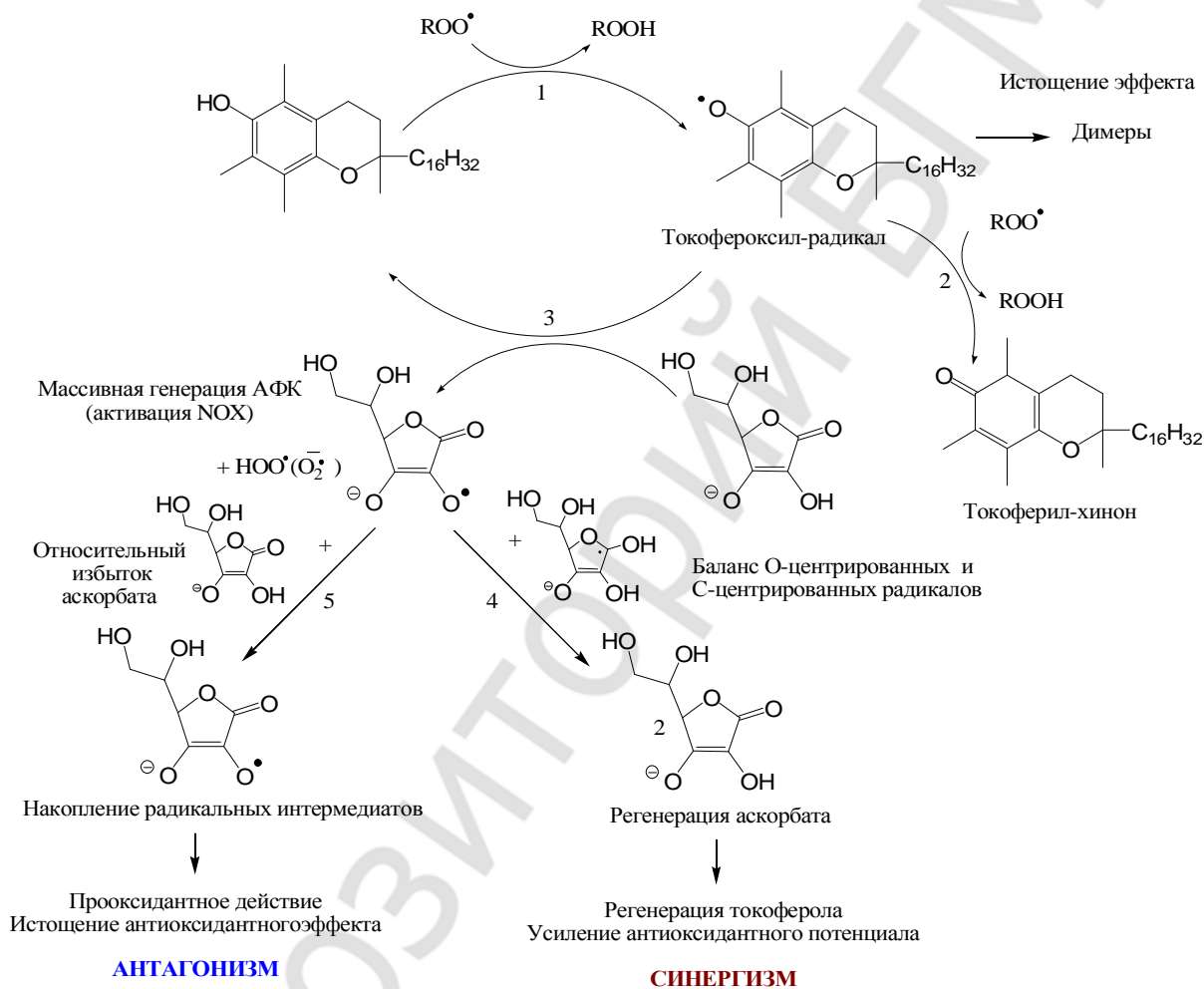


Рис. 4. Гипотетические взаимодействия α -токоферола и аскорбата и их радикальные трансформации в различном редокс-окружении

При отсутствии восстановителей α -токоферол, взаимодействуя с O-центрированными радикалами, превращается в α -токофероксил-радикал (1), который, при подходящих условиях может отдавать электрон и превращаться в α -токоферил-хинон (2), еще более вероятно его димеризация или дисмутация с иными радикальными интермедиатами, а также перегруппировка с

образованием С-центрированных агрессивных аддуктов. В любом случае происходит истощение антиоксидантного потенциала α -токоферола. Добавление аскорбиновой кислоты, которая при физиологических значениях pH находится в монодиссоциированной форме и проявляет выраженные восстановительные свойства, создает условия для регенерации α -токоферола. Проблемой являются О-центрированные радикалы самого аскорбата, которые образуются не только в реакции (3), но и при взаимодействии аскорбата с иными АФК. Недавно показано, что аскорбат может работать и как восстановитель, превращаясь при этом в С-центрированные радикальные интермедиаты [1]. Дальнейшее взаимодействие О- и С-центрированных радикалов аскорбата ведет к его регенерации (4). Однако, такое взаимодействие возможно при определенном балансе радикальных форм, который, очевидно, имеет место в условиях оксидантного гомеостаза. При значительном превалировании определенных радикальных продуктов ситуация может изменяться. Например, в условиях респираторного взрыва фагоцитов количество генерируемых клетками АФК увеличивается на порядки, давая при этом избыток О-центрированных радикальных форм аскорбата, которые проявляют прооксидантное действие. Возможно, именно по этой причине аскорбат, который в химических тестах является эффективной ловушкой супероксида, демонстрирует слабый суммарный антиоксидантный потенциал на моделях фагоцитарной генерации АФК.

Что касается комбинации [α -токоферол + аскорбат], то в условиях респираторного взрыва избыток аскорбата, вероятно, будет обладать выраженным прооксидантным потенциалом, который проявляется в виде антагонизма антиоксидантов. Если количество аскорбата таково, что антиоксидантный потенциал α -токоферола, восстанавливаемого при его участии, превалирует, компоненты будут демонстрировать синергизм на модели респираторного взрыва фагоцитов.

Выводы:

1. Результат взаимодействия α -токоферола и аскорбата определяется, с одной стороны, характером комбинации – молярным сочетанием компонентов и их концентрацией (дозой), с другой – условиями действия: составом и прооксидантным профилем биосреды.
2. На модели респираторного взрыва фагоцитов комбинация α -токоферола и аскорбата синергична при 10-кратном превалировании последнего, дальнейшее увеличение концентрации аскорбата ведет к уменьшению синергизма (1/100) и появлению антагонизма при соотношении компонентов 1/1000. Тенденция к уменьшению синергизма отмечается и при снижении концентрации компонентов в любом комбинаторном сочетании.

Литература

1. *Бринкевич, С. Д.* Влияние аскорбиновой кислоты и её производных на радиационно-химические превращения гидроксилсодержащих органических соединений / С. Д. Бринкевич, О. И. Шадыро // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42. № 4. С. 297–302.
2. *Ерин, А. Н.* Витамин Е: молекулярные механизмы действия в биологических мембранах / А. Н. Ерин [и др.] // Кислородные радикалы в биологии и медицине. Рига: РМИ, 1988. С. 109–129.
3. *Повалишев, В. Н.* Влияние α -токоферола и его серосодержащих аналогов на радиационно-химические превращения гексана и этанола / В. Н. Повалишев, Г. И. Полозов, О. И. Шадыро // Химия высоких энергий. 2006. Т. 40. № 5. С. 349–354.
4. *Chou, T-Ch.* Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch. Chou // Pharmacological reviews. 2006. V. 58. P. 621–681.
5. *Dadheech, G.* Oxidative stress, α -tocopherol, ascorbic acid and reduced glutathione status in schizophrenics / G. Dadheech [et al.] // Indian J. of Clinical Biochemistry. 2006. V. 21, № 2. P. 34–38.
6. *Joe, V.* Production of oxygen-centered radicals by neutrophils and macrophages as studied by electron spin resonance (ESR) / Joe V. Bannister, William H. Bannister // Environmental Health Perspectives. 1985. V. 64. P. 37–43.
7. *Liu, C.* α -Tocopherol and ascorbic acid decrease the production of β -apo-carotenals and increase the formation of retinoids from β -carotene in the lung tissues of cigarette smoke-exposed ferrets in vitro / C. Liu, R. M. Russell, X-D. Wang // J. Nutr. 2004. V. 134, № 2. P. 426–430.
8. *Parfenov, É. A.* Successes and perspectives in the creation of therapeutic preparations based on ascorbic acid (review) / É. A. Parfenov, L. D. Smirnov // Pharmaceutical Chemistry J. 1992. V. 26, № 9–10. P. 657–676.
9. *Peeling, J.* Protective effects of free radical inhibitors in intracerebral hemorrhage in rat / J. Peeling [et al.] // Brain Research. 1998. V. 795. P. 63–70.
10. *Povalishev, V. N.* Effects of α -tocopherol and related compounds on reactions involving various organic radicals / V. N. Povalishev, G. I. Polozov, O. I. Shadyro // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2006. V. 16. P. 1236–1239.
11. *Tomasetti, M.* α -Tocopheryl succinate promotes selective cell death induced by vitamin K3 in combination with ascorbate / M. Tomasetti [et al.] // British J. of Cancer. 2010. V. 102. P. 1224–1234.