

Б.В. Дубовик, Н.А. Бизунок

# СИНЕРГИЧНЫЕ ИММУНОТРОПНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТА КРАСНОГО ВИНА ТРАНС-РЕСВЕРАТРОЛА, АНТИОКСИДАНТА АСКОРБАТА И ГОРМОНА МЕЛАТОНИНА НА МОДЕЛИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА ФАГОЦИТОВ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

*Фармакодинамическое взаимодействие транс-ресвератрола, мелатонина и аскорбата на модели респираторного взрыва макрофагов зависит от молярного отношения и концентраций компонентов и варьирует от сильного синергизма до антагонизма. Наиболее сильный синергизм продемонстрировала композиция ресвератрола и мелатонина в молярных соотношениях P1/M1...P1/M100. Тройная комбинация аскорбата с ресвератролом и мелатонином синергична в области высоких концентраций при значительном превалировании аскорбата и мелатонина над ресвератролом (соотношение P1/M100/A1000).*

**Ключевые слова:** транс-ресвератрол, мелатонин, аскорбиновая кислота, комбинации лекарственных средств, фармакодинамическое взаимодействие, синергизм, активные формы кислорода, макрофаги.

**B.V. Dubovik, N.A. Bizunok**

## **SYNERGISTIC IMMUNOTROPIC INTERACTIONS OF THE RED VINE COMPONENT TRANS-RESVERATROL, ANTIOXIDANT ASCORBIC ACID AND HORMONE MELATONIN ON THE MODEL OF RESPIRATORY BURST OF PHAGOCYTES**

*Pharmacodynamic interactions of the trans-resveratrol, melatonin and ascorbic acid dependent on composition ingredients, molar ratios and concentrations and exchangeable from synergistic to antagonistic pattern. The most potent synergistic action demonstrated the trans-resveratrol and melatonin combinations in molar ratios P1/M1...P1/M100. The combination of the trans-resveratrol with melatonin and ascorbic acid is synergistic in range of high concentrations permitting ascorbic acid and melatonin prepotency over trans-resveratrol (ratio P1/M100/A1000).*

**Key words:** trans-resveratrol, melatonin, ascorbic acid, drug combinations, pharmacodynamic interaction, synergism, reactive oxygen species, macrophages.

Постоянное и умеренное на протяжении жизни употребление красного вина жителями юга Франции и Средиземноморья ассоциируется с очень низкой заболеваемостью ишемической болезнью сердца, несмотря на избы-

точное содержание в рационе жиров, малоподвижный образ жизни и широко распространенное курение. К настоящему времени выполнено множество исследований с целью идентификации кардиопротекторных веществ красного вина. Не-

Таблица 1. Сравнительная эффективность изолированного и комбинированного действия ресвератрола, мелатонина и аскорбата на окислительный взрыв макрофагов (по критерию АУСХЛ, n=5)

Состав комбинации	КОК <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>2</sup> , моль/л <sup>2</sup>	Доверительный интервал (95%)	ЕС <sup>3</sup> <sub>max</sub> (моль/л)	E <sub>max</sub> <sup>4</sup> (%) (M±m)
Ресвератрол	—	1,81·10 <sup>-6</sup>	1,11·10 <sup>-6</sup> –2,91·10 <sup>-6</sup>	1·10 <sup>-5</sup>	-70,0±4,5
Мелатонин	—	2,98·10 <sup>-4</sup>	2,29·10 <sup>-4</sup> –3,88·10 <sup>-4</sup>	1·10 <sup>-3</sup>	-50,2±5,1
Аскорбат	—	—	—	1·10 <sup>-3</sup>	-24,2±7,8
<b>Композиция 1 Ресвератрол + Аскорбат</b>					
Ресвератрол	1	7,26·10 <sup>-6</sup>	1,59·10 <sup>-6</sup> –3,31·10 <sup>-5</sup>	10 <sup>5</sup>	-70,4±4,7 <sup>#</sup>
Аскорбат	100	7,26·10 <sup>-4</sup>	1,59·10 <sup>-4</sup> –3,31·10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>	
Ресвератрол	1	—	—	10 <sup>6</sup>	-44,6±2,3 <sup>#</sup>
Аскорбат	1000	—	—	10 <sup>3</sup>	
<b>Композиция 2 Ресвератрол + Мелатонин</b>					
Ресвератрол	1	7,10·10 <sup>-7</sup>	1,00·10 <sup>-7</sup> –5,07·10 <sup>-6</sup>	10 <sup>5</sup>	-83,4±5,2 <sup>*г</sup>
Мелатонин	1	7,10·10 <sup>-7</sup>	1,00·10 <sup>-7</sup> –5,07·10 <sup>-6</sup>	10 <sup>5</sup>	
Ресвератрол	1	1,40·10 <sup>-7</sup>	3,17·10 <sup>-8</sup> –6,17·10 <sup>-7</sup>	10 <sup>5</sup>	-84,2±5,5 <sup>*г</sup>
Мелатонин	10	1,40·10 <sup>-6</sup>	3,17·10 <sup>-7</sup> –6,17·10 <sup>-6</sup>	10 <sup>4</sup>	
Ресвератрол	1	4,40·10 <sup>-8</sup>	1,43·10 <sup>-8</sup> –1,35·10 <sup>-7</sup>	10 <sup>6</sup>	-81,2±1,9 <sup>*г</sup>
Мелатонин	100	4,40·10 <sup>-6</sup>	1,43·10 <sup>-6</sup> –1,35·10 <sup>-5</sup>	10 <sup>4</sup>	
<b>Композиция 3 Мелатонин + Аскорбат</b>					
Мелатонин	1	1,00·10 <sup>-4</sup>	1,75·10 <sup>-5</sup> –5,73·10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>	-50,0±2,3 <sup>#</sup>
Аскорбат	1	1,00·10 <sup>-4</sup>	1,75·10 <sup>-5</sup> –5,73·10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>	
Мелатонин	1	8,73·10 <sup>-5</sup>	2,14·10 <sup>-5</sup> –8,56·10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>	-56,1±2,1 <sup>#</sup>
Аскорбат	10	8,73·10 <sup>-4</sup>	2,14·10 <sup>-4</sup> –8,56·10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>	
<b>Композиция 5 Ресвератрол + Аскорбат + Мелатонин</b>					
Ресвератрол	1	2,96·10 <sup>-6</sup>	1,01·10 <sup>-6</sup> –8,62·10 <sup>-6</sup>	10 <sup>5</sup>	-76,8±3,3 <sup>*#г</sup>
Аскорбат	100	2,96·10 <sup>-4</sup>	1,01·10 <sup>-4</sup> –8,62·10 <sup>-4</sup>	10 <sup>3</sup>	
Мелатонин	10	2,96·10 <sup>-5</sup>	1,01·10 <sup>-5</sup> –8,62·10 <sup>-5</sup>	10 <sup>4</sup>	
Ресвератрол	1	3,65·10 <sup>-7</sup>	8,05·10 <sup>-8</sup> –4,66·10 <sup>-6</sup>	10 <sup>6</sup>	-62,7±2,1 <sup>*#г</sup>
Аскорбат	1000	3,65·10 <sup>-4</sup>	8,05·10 <sup>-5</sup> –4,66·10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>	
Мелатонин	100	3,65·10 <sup>-5</sup>	8,05·10 <sup>-6</sup> –4,66·10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>	

Примечание: <sup>1</sup>КОК – комбинаторное отношение компонентов; <sup>2</sup>IC<sub>50</sub> – концентрация испытуемого соединения, ингибирующая респираторный взрыв макрофагов на 50% по отношению к контролю при индивидуальном или комбинированном применении (моль/л); <sup>3</sup>ЕС<sub>max</sub> – максимальная эффективная концентрация; <sup>4</sup>E<sub>max</sub> – максимальный эффект, в % подавления ХЛ, указано среднее значение и ошибка среднего. P<0,05 в сравнении с изолированным действием (\*) – ресвератрола, (#) – аскорбата, (г) – мелатонина по t-критерию Стьюдента.

смотря на то, что эти исследования еще не завершены, главными кандидатами признаются полифенолы, такие как стильбены и флавоноиды [22], среди которых особое место занимает ресвератрол.

Ресвератрол (3,4',5-тригидроксистерилбен) представляет собой фитоалексин (фитоэстроген), синтезируемый в коже винограда в ответ на повреждение или инвазию паразитических грибов и бактерий. Он присутствует в красном вине в виде транс-и цис-изомеров [22], соотношение которых исключительно вариабельно в разных сортах винограда. В некоторых из них цис-изомеры находятся в больших концентрациях по отношению к транс-, в других – напротив, преобладает транс-форма [10, 22]. В настоящее время фармакологические свойства обеих изоформ интенсивно изучаются, но именно транс-ресвератрол считается главным кандидатом на кардиопротекторное действие [10, 15]. Исследования in vitro, ex vivo и in vivo обнаружили у него широкий спектр фармакологической активности, включая модуляцию метаболизма липопротеинов, противовоспалительное и антиагрегантное действие, противоопухолевые и вазодилатирующие свойства [7, 12, 15, 22]. Изучение механизмов действия ресвератрола показывает, что в их основе лежат как антиоксидантные свойства молекулы, обеспечивающие модификацию свободнорадикальной трансформации биообъектов, так и способность

ресвератрола регулировать различные внутриклеточные каскады сигнализации, включая активность протеинкиназ, трансмембранных кальциевых токи и экспрессию генов [7, 8, 10, 11, 12, 22].

Особое внимание в этой связи привлекают иммуномодулирующие свойства ресвератрола, поскольку многие из обнаруженных у него фармакологических эффектов тем или иным образом ассоциированы с изменением функции иммунокомпетентных клеток, и, прежде всего, макрофагов, как ключевых факторов в реализации специфических и неспецифических иммунных ответов. Важнейшую роль в этих ответах играет система генерации активных форм кислорода (АФК), благодаря которой макрофаг не только реализует микробицидную активность, но, главным образом, обеспечивает специфические лимфоцитарные реакции и формирование иммунологической памяти [3, 4, 13].

Генерация АФК происходит при участии двух главных ферментных комплексов, одновременное или избирательное включение которых зависит от ряда клеточных событий, включая степень дифференцировки, природу индуктора, праймирование и многое другое. Одним источником АФК является активированная NADH/NADPH-оксидаза (Nox2), встроенная в плазматическую мембрану. Она генерирует супероксидный анион-радикал (O<sub>2</sub>•-), расходуя поглощаемый клеткой кислород и синтезированный в ней NADPH·H<sup>+</sup> [13]. Другой источник – ксантинооксидаза (ХО), которая катализирует окислительное гидроксилирование пуриновых метаболитов (ксантинов и гипоксантинов) с образованием мочевой кислоты и одновременным восстановлением кислорода в O<sub>2</sub>•- или пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [10]. Повышенная генерация АФК активированными макрофагами играет важную роль в развитии и прогрессировании ряда хронических воспалительных процессов, таких как атеросклероз, ревматоидный артрит, остеоартриты, болезни легких, нейродегенеративные состояния [13]. Поиск способов управления макрофагальной генерацией АФК является актуальным направлением исследованием в области иммунофармакологии, которое развивается кафедрой фармакологии БГМУ в течение последнего десятилетия.

В этой связи исключительно перспективными представляются соединения, сочетающие антирадикальные свойства и влияние на клеточные механизмы активации ферментов-генераторов АФК, а также их композиции. Многолетние исследования показали, что молекулы, обладающие антирадикальным действием, например фенолы, не могут поддерживать собственную регенерацию и быстро истощаются в отсутствие электронодоноров, что препятствует реализации реального антиоксидантного потенциала таких веществ и обеспе-

чивает возможность их использования в качестве антиоксидантов. В то же время, соединения, обладающие антирадикальными свойствами, но не способные к регенерации, не могут поддерживать собственную регенерацию и быстро истощаются в отсутствие электронодоноров, что препятствует реализации реального антиоксидантного потенциала таких веществ и обеспе-

чивает многочисленные неудачи их клинического применения. Таким образом, априори обоснованным становится поиск рациональных комбинаций антирадикальных агентов и биомодуляторов, работающих синергично в условиях *ex vivo* и *in vivo*.

Анализ ранее выполненных исследований [2, 7, 10, 13, 20, 21, 22] показал, что структурные особенности, антирадикальные и биологические свойства ресвератрола, мелатонина и аскорбата позволяют рассчитывать на их антиоксидантный синергизм в условиях респираторного взрыва фагоцитов. Эта идея легла в основу настоящей работы.

#### Материал и методы

**Среды и реагенты.** В работе использовали ресвератрол (3,4',5-тригидроксистильбен) – «SigmaAldrich», Германия; ме-

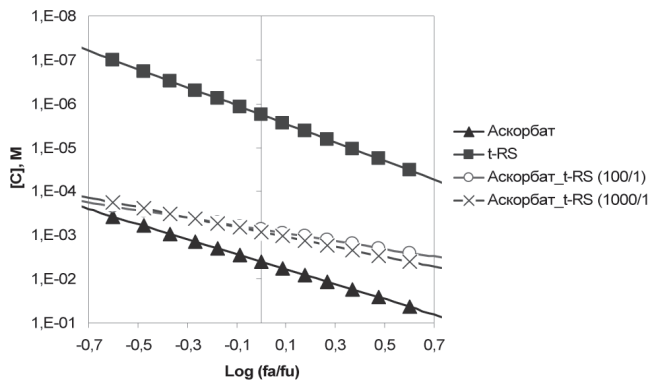
латонин (N-(2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)-1-пропен-2-амин) – «Serva», Германия; аскорбиновую кислоту – «SigmaAldrich», Германия; люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) – «Sigma», Германия; среду Хенкса без индикатора – ОАО «Диалек», Беларусь; диметилсульфоксид – ООО «Фармтехнология», Беларусь; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимозан (сухие пекарские дрожжи); сыворотку крови крупного рогатого скота – ОАО «Диалек», Беларусь.

**Комбинаторные сочетания.** На первом этапе исследования изучалось индивидуальное действие ресвератрола, аскорбата и мелатонина в диапазоне концентраций от  $10^{10}$  до  $10^{12}$  М. По результатам этих испытаний было обосновано изучение следующих молярных комбинаторных сочетаний ресвератрола и аскорбата – P1/A100 и P1/A1000 ( $10^{10}$  –  $10^{15}$  М

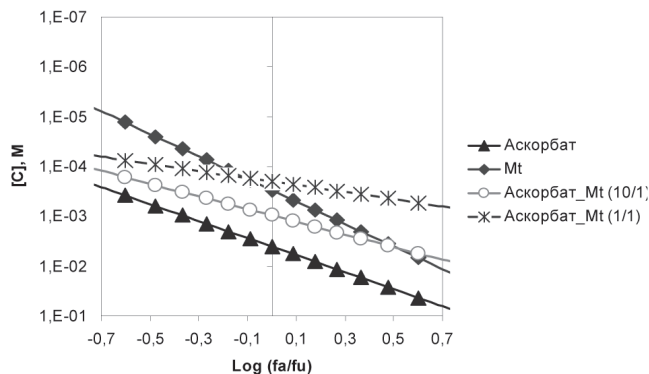
Таблица 2. Значения комбинаторного индекса (CI) для композиций ресвератрола, мелатонина и аскорбата

КОК <sup>1</sup>	CI [по данным IC, %] <sup>2</sup>					M [CI] <sub>30-70</sub> <sup>3</sup>	Результат взаимодействия
	16	30	50	70	84		
Ресвератрол + Аскорбат AUC ХЛ							
P1/A100	30,73	11,61	4,21	1,54	0,59	7,46	4-
P1/A1000	2,91	1,42	0,68	0,33	0,17	0,99	0
DAUC ХЛ							
P1/A100	2,30	1,70	1,37	1,13	0,94	1,50	3-
P1/A1000	0,25	0,24	0,34	0,61	1,10	0,34	3+
Аскорбат + Мелатонин AUC ХЛ							
A1/M1	4,51	1,31	0,36	0,10	0,03	0,79	2+
A10/M1	1,96	0,99	0,51	0,28	0,16	0,71	2+
DAUC ХЛ							
A1/M1	0,73	0,52	0,42	0,25	0,30	0,46	3+
A10/M1	1,44	0,61	0,43	0,40	0,40	0,52	3+
Ресвератрол + Мелатонин AUC ХЛ							
P1/M1	1,54	0,79	0,39	0,19	0,10	0,56	3+
P1/M10	0,07	0,07	0,08	0,09	0,10	0,08	5+
P1/M100	0,07	0,05	0,04	0,03	0,02	0,05	5+
DAUC ХЛ							
P1/M1	1,46	0,85	0,51	0,29	0,18	0,65	3+
P1/M10	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	5+
P1/M100	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	5+
Ресвератрол + Мелатонин + Аскорбат AUC ХЛ							
P1/M10/A100	11,05	4,56	1,82	0,73	0,31	3,01	3-
P1/M100/A1000	3,12	1,15	0,42	0,16	0,06	0,74	2+
DAUC ХЛ							
P1/M10/A100	1,37	0,97	0,74	0,58	0,46	0,83	2+
P1/M100/A1000	0,34	0,20	0,17	0,16	0,16	0,18	4+

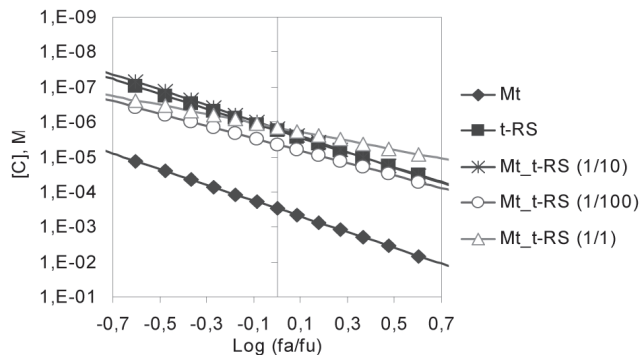
Примечание к таблицам 2 и 3. <sup>1</sup>Комбинаторное отношение компонентов. <sup>2</sup>CI (DRI) [16%...84%] – значения комбинаторного индекса (или индекса снижения дозы) на уровне E=16...84%. <sup>3</sup>Средневзвешенное значение, рассчитанное, как  $M[CI]_{30-70} = [3CI_{30} + 2CI_{50} + CI_{70}] / 6$ .



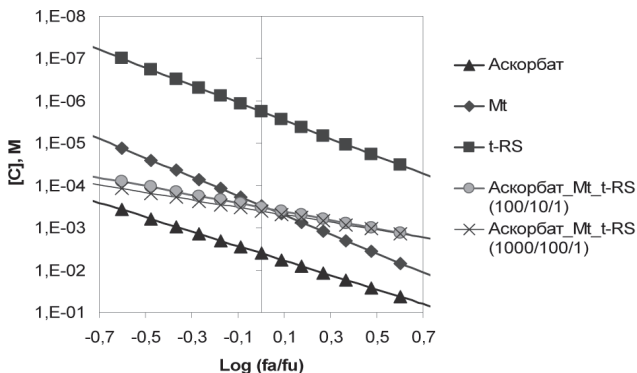
### 1.1. Ресвератрол+Аскорбат



### 1.2. Аскорбат+Мелатонин

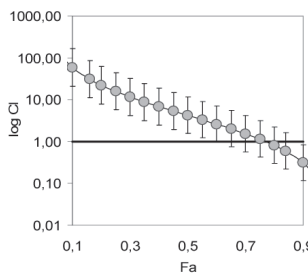


### 1.3. Ресвератрол+Мелатонин



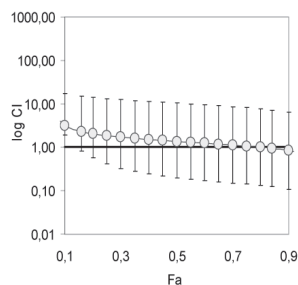
### 1.4. Ресвератрол+Мелатонин+Аскорбат

**Рис. 1.** Распределение медианного эффекта (median-effect plot) для различных комбинаторных сочетаний ресвератрола, мелатонина и аскорбата на модели зимозан-индуцированного респираторного взрыва макрофагов (по AUC ХЛ). Log (fa/fu) – логарифм отношения фракции активной (fa) и неактивной (fu); [C], M – концентрация индивидуальных соединений или суммарная концентрация компонентов комбинации, моль/л (экспоненциальный формат); t-RS – транс-ресвератрол; Mt – мелатонин. Для комбинаций представлены результирующие кривые концентрация-эффект.

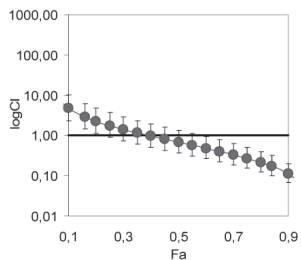


2.1

P1/A100

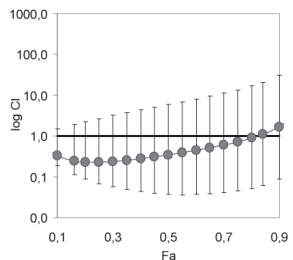


2.3



2.2

P1/A1000



2.4

AUC ХЛ (Совокупная генерация АФК)

DAUC ХЛ (Нох-зависимая генерация АФК)

**Рис. 2.** Характер распределения CI для различных комбинаторных сочетаний ресвератрола и аскорбата. Числовые данные представлены в таблицах 2 и 3. CI (Fa-CI-plot) представлены как функция фракции fa, полученная путем расчета по алгоритму Chou в диапазоне fa 0,1-0,95. CI < 1, = 1 и > 1 показывает синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно. На диаграммах указан 95% доверительный интервал.

– ресвератрол +  $10^{x6} - 10^{x2}$  М – аскорбат); ресвератрола и мелатонина P1/M1, P1/M10 и P1/M100 ( $10^{x8} - 10^{x5}$  М – ресвератрол +  $10^{x7} - 10^{x4}$  М – мелатонин); аскорбата и мелатонина A1/M1, A10/M1 ( $10^{x6} - 10^{x2}$  М – аскорбат +  $10^{x7} - 10^{x4}$  М – мелатонин), а также тройной композиции ресвератрол + мелатонин + аскорбат P1/M10/A100 и P1/M100/A1000 ( $10^{x8} - 10^{x5}$  М – ресвератрол +  $10^{x7} - 10^{x4}$  М – мелатонин +  $10^{x6} - 10^{x2}$  М – аскорбат).

**Получение клеток.** Исследования выполнены на изолированных перитонеальных макрофагах-резидентах крыс 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

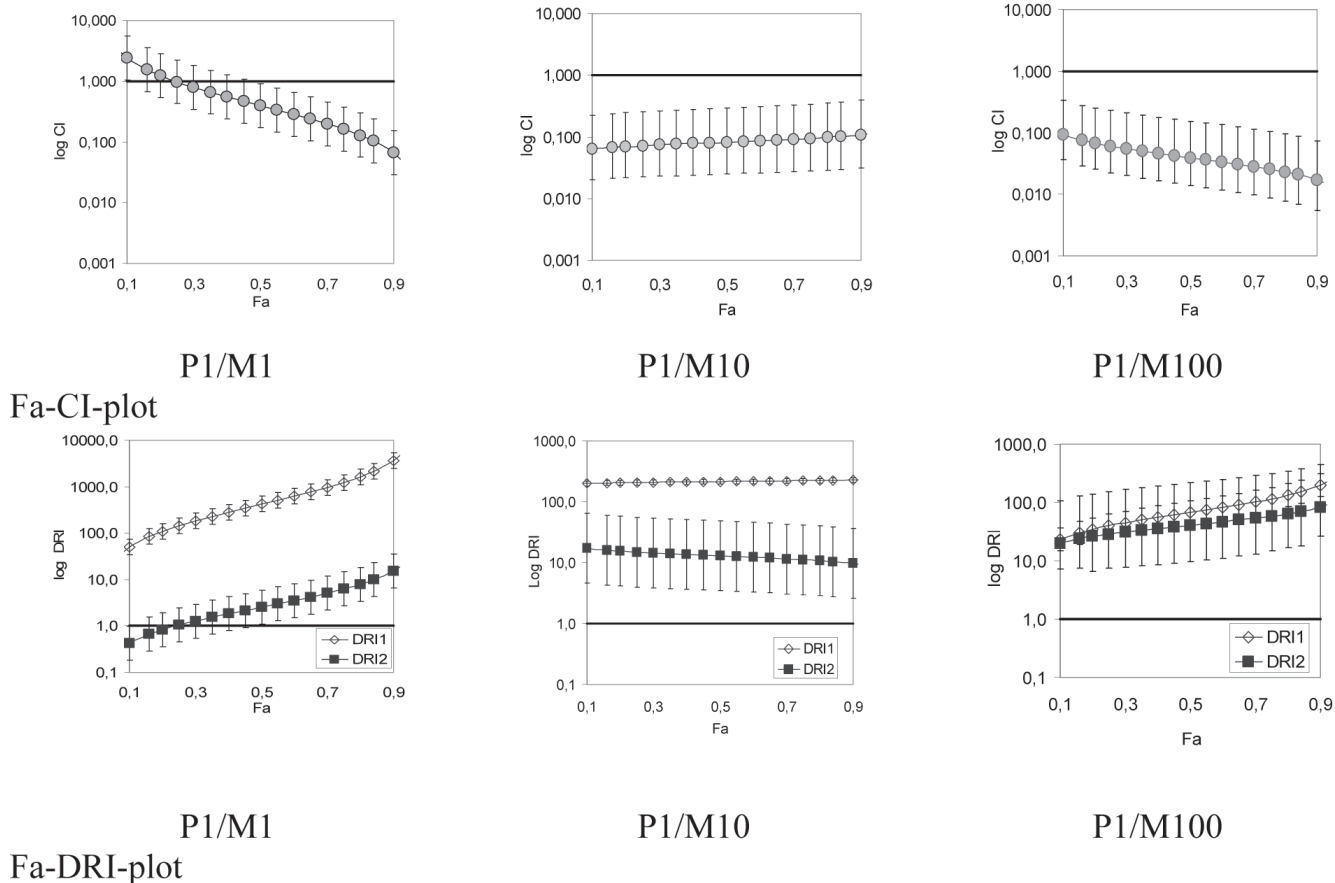
хемилюминесценции (ХЛ) в условиях взрывной (ИХЛ) генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251 – 002 (Финляндия).

Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемыми соединениями и их композициями 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 ( $74 \cdot 10^5$  М), опсонизированный зимозан ( $54 \cdot 10^7$  частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, изучаемый агент (комбинацию агентов); в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды.

Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах, содержащих изучаемые соединения (композиции) и контрольных, при постоянной температуре (37°С), в дискретном режиме с интервалом 2 – 3 мин, на протяжении 30 мин.

Таблица 3. Значения индекса снижения дозы (DRI) для комбинаций ресвератрола, мелатонина и аскорбата (AUC ХЛ)

КОК		DRI [по данным IC, %]					M [DRI] <sub>30-70</sub>
		16	30	50	70	84	
Ресвератрол + Аскорбат							
P1/A1000	Аскорбат	1,8	2,9	4,8	7,8	12,6	4,4
	Ресвератрол	0,4	0,9	2,1	4,9	10,7	2,0
Аскорбат + Мелатонин							
A1/M1	Аскорбат	7,6	17,1	40,1	93,9	212,1	37,6
	Мелатонин	0,2	0,8	3,0	11,1	38,9	3,3
A10/M1	Аскорбат	2,2	3,2	4,6	6,7	9,6	4,3
	Мелатонин	0,7	1,5	3,4	7,9	17,6	3,2
Ресвератрол + Мелатонин							
P1/M1	Мелатонин	83,1	183,3	419,1	958,1	2114,1	391,0
	Ресвератрол	0,7	1,3	2,5	5,0	9,8	2,3
P1/M10	Мелатонин	203,4	208,2	213,4	218,8	224,0	211,7
	Ресвератрол	16,0	14,4	12,9	11,5	10,4	13,4
P1/M100	Мелатонин	30,3	44,9	67,8	102,2	151,5	62,1
	Ресвератрол	23,9	31,1	40,9	53,8	70,0	38,2
Ресвератрол + Мелатонин + Аскорбат AUC ХЛ							
P1/M10/A100	Аскорбат	4,2	7,5	13,6	24,7	43,9	12,4
	Мелатонин	1,3	3,5	10,1	29,1	80,3	10,0
	Ресвератрол	0,1	0,2	0,6	1,5	3,7	0,6
P1/M100/A1000	Аскорбат	2,7	5,4	11,0	22,3	44,1	10,1
	Мелатонин	0,8	2,5	8,2	26,3	80,8	8,4
	Ресвератрол	0,6	1,7	4,9	13,9	37,3	4,8
DAUC ХЛ							
P1/M10/A100	Аскорбат	5,1	26,5	148,8	836,3	4361,6	202,2
	Мелатонин	14,0	15,2	16,6	18,2	19,8	16,2
	Ресвератрол	0,9	1,2	1,5	1,9	2,4	1,4
P1/M100/A1000	Аскорбат	5,6	25,0	118,6	562,9	2498,1	145,9
	Мелатонин	15,5	14,4	13,2	12,2	11,3	13,6
	Ресвератрол	10,0	10,9	11,8	12,8	13,9	11,5



**Рис. 3.** Характер распределения CI и DRI для различных комбинаторных сочетаний ресвератрола и мелатонина (AUC ХЛ). Числовые данные представлены в таблицах 2 и 3.

Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и площади под кривой ХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC). Последний показатель отражает вклад Nox2 в продукцию общего пула АФК, генерируемых клеткой. Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые соединения (композиции), выражали в % к значениям контроля. Количество повторных опытов варьировало от 5 до 10.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку первичных результатов внутри серии проводили с использованием парного t-критерия, межсерийные сравнения выполняли по t-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5% ( $p < 0,05$ ).

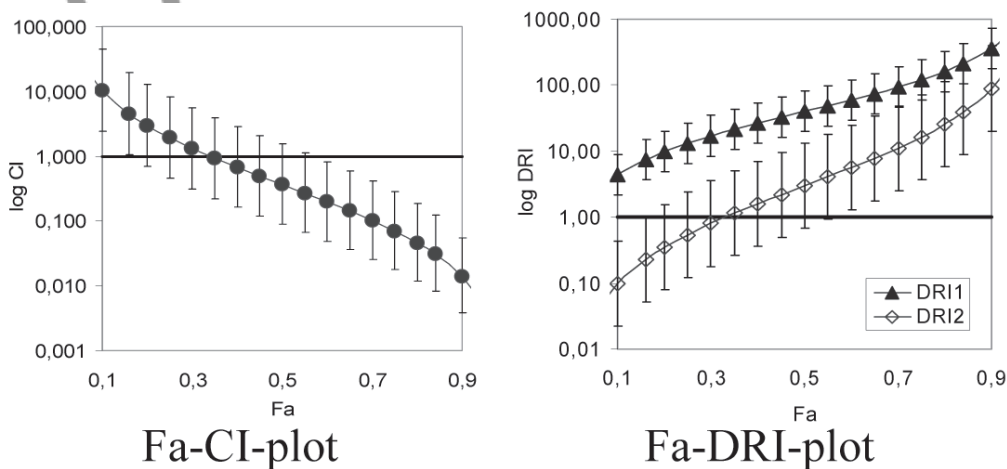
Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации ( $IC_{16} - IC_{84}$ ) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,1» и математических преобразований по Chou [6] при помощи специально разработанного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

**Анализ взаимодействия.** Результат взаимо-

действия тестируемых соединений оценивали по значению комбинаторного индекса (CI), который рассчитывался по формуле (1):

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

( $D_j$ ) – доза (концентрация) агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; ( $D_x_j$ ) – доза (концентрация) агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.



**Рис. 4.** Характер распределения CI и DRI для комбинаторного сочетания аскорбата и мелатонина

Значения CI трактовали в соответствии со следующей шкалой [6]: 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):

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

Значение DRI показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента в комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием компонента.

Результаты представлены графически 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 эффективном диапазоне  $E_{10}$ - $E_{95}$  (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 методики T. Chou и H. Kim [6].

#### Результаты и обсуждение Индивидуальное действие

Тестирование индивидуального действия соединений показало, что наиболее активным и эффективным ингибитором респираторного взрыва фагоцитов является ресвератрол (таблица 1). В отношении суммарной генерации АФК, оцениваемой нами по АУС ЛХЛ,  $IC_{50}$  ресвератрола составила 1,8 (1,1x2,9) мкМ, для мелатонина этот показатель равнялся 0,3 (0,2x0,4) мМ, аскорбат подавлял свечение только на 24% в максимальной испытанной концентрации. Возможные

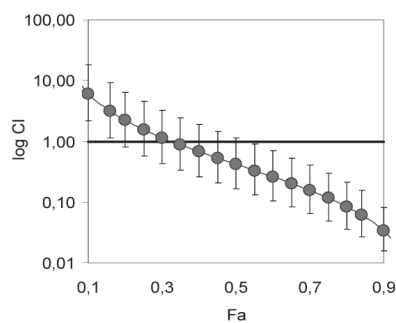
причины низкой активности аскорбата в клеточных тестах, обнаруженные нами и другими авторами [10, 5, 13], обсуждались ранее [1].

#### Комбинированное действие

Максимальная эффективность испытанных комбинаций представлена в таблице 1. Если опираться только на эти результаты, как делают большинство исследователей в Беларуси и ряде стран Восточной Европы при выполнении доклинических и клинических испытаний, то можно заключить, что комбинация ресвератрола и мелатонина незначительно превосходит по эффективности более активный компонент ресвератрол, другие же комбинации не имеют преимуществ перед индивидуальными компонентами или уступают им, как в случае P1/A1000 или P1/M100/A1000. Скорее всего, результатом такого анализа станет вывод об отсутствии преимуществ у комбинаций и вопрос о разработке на их основе новых клинических стратегий или лекарственных средств будет «исключен из повестки». Однако анализ с использованием методики профессора Chou – руководителя Центральной лаборатории доклинических испытаний Мемориального онкологического центра им. Слоуна-Кеттеринга (Нью-Йорк), широко апробированной в экспериментальных и клинических испытаниях, ведет к иным заключениям.

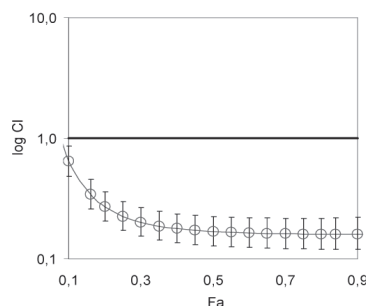
#### Комбинация 1 – Ресвератрол + Аскорбат.

На основе анализа выполненных ранее пилотных исследований, а также данных литературы об антирадикальном потенциале и иммуномодулирующих свойствах ресвератрола [7, 22] и аскорбата [13], было выдвинуто предположение о синергизме комбинации, в которой аскорбат будет выступать в роли восстановителя для ресвератрола, содержащего фенольное и резорциновое кольца, связанные между собой виниленовым фрагментом и требующего постоянного донора электронов для регенерации. Ранее нами показано, что такие эффекты аскорбат демонстрирует в комбинации с другим производным фенола – токоферолом в сочетаниях T1/A10 и T1/A100 [1]. Учитывая наличие нескольких восстановительных центров в молекуле ресвератрола, взаимодействие изучали в условиях 100 и 1000-кратного превалирования ас-

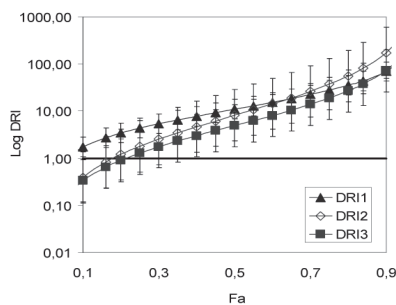


Fa-CI-plot

AUC ХЛ

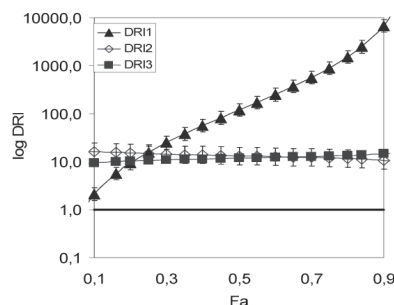


DAUC ХЛ



Fa-DRI-plot

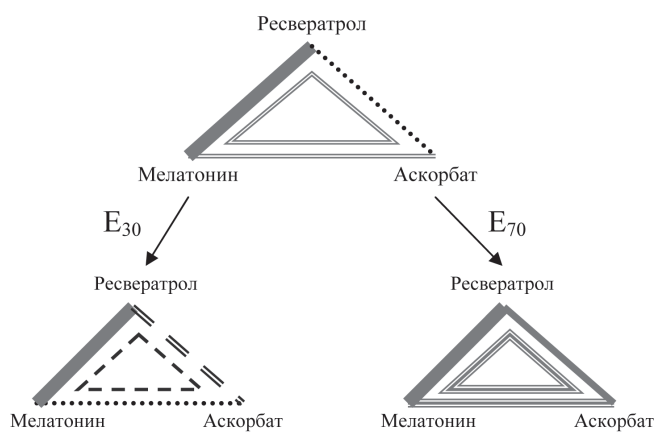
AUC ХЛ



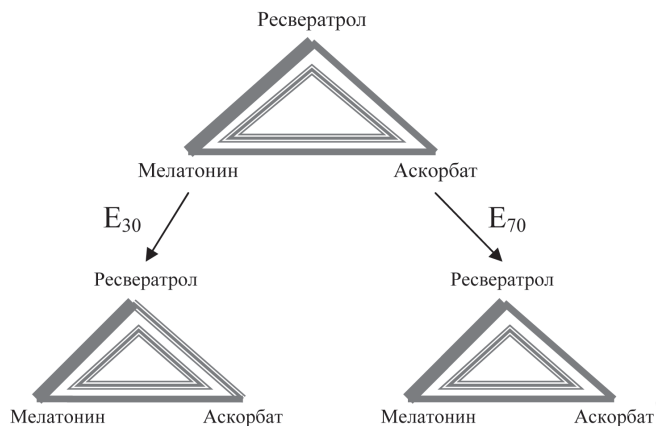
XЛ

DAUC

Рис. 5. Характер распределения CI и DRI для комбинации ресвератрола, мелатонина и аскорбата в соотношении P1/M100/A1000. Числовые данные представлены в таблицах 2 и 3.



6.1. Совокупная генерация АФК в макрофагах



6.2. Nox2-зависимая генерация АФК в макрофагах

**Рис. 6.** Взаимодействие ресвератрола, мелатонина и аскорбата на модели респираторного взрыва фагоцитов (AUC ХЛ) по результатам испытания наиболее рациональных комбинаторных сочетаний: P1/A1000, P1/M100, A10/M1, P1/M100/A1000.

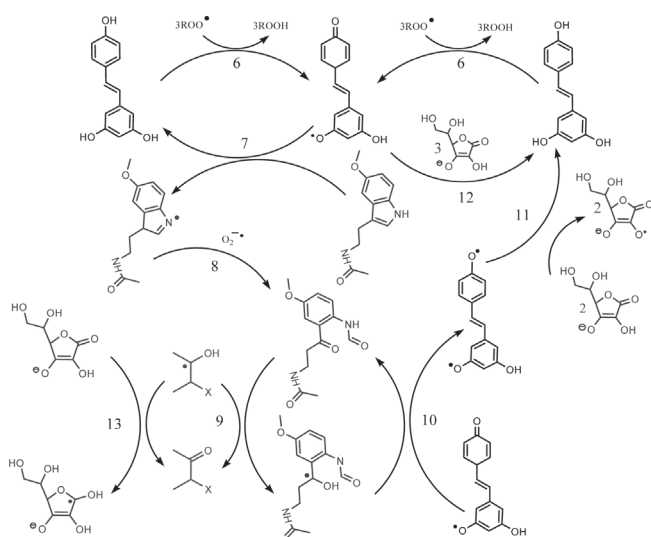
Условные обозначения: – очень сильный синергизм (5+), – сильный синергизм (4+), – синергизм (3+), – умеренный синергизм (2+), – аддитивный эффект (0), – слабый антагонизм (1-), – умеренный антагонизм (2-).

корбата.

Характер прямых «концентрация-эффект» (в обработке по Chou и Kim) для комбинации ресвератрол+аскорбат показывает, что они имеют меньший угол наклона по сравнению с прямыми прототипов (рисунок 1.). Это само по себе может рассматриваться как преимущество композиций при совпадении по другим учитываемым признакам.

Вопреки ожиданиям, активность ресвератрола в комбинации с аскорбатом снижалась во всем диапазоне эффективных концентраций. Дальнейший анализ комбинации показал, что взаимодействие ресвератрола и аскорбата соответствует критериям аддитивности в соотношении 1/1000, тогда как при сочетании 1/100 проявляется выраженный антагонизм компонентов в отношении совокупной клеточной генерации АФК, если судить по средневзвешенным показателям комбинаторного индекса (таблица 2, рисунок 2 – анализ по AUC).

Анализ значений комбинаторного индекса на различных уровнях эффекта показывает, что взаимодействие компонентов зависит от их концентраций. С увеличением концентрации компонентов в клеточной суспензии растет вероятность синергизма, для проявления которого, однако, необходимо 1000-кратное превалирование аскорбата (рисунок 2.2).



**Рис. 7.** Гипотетические взаимодействия ресвератрола, мелатонина и аскорбата при комбинированном применении в условиях взрывной фагоцитарной генерации АФК

Поскольку изолированное действие ресвератрола и аскорбата в отношении Nox2-зависимой и совокупной генерации АФК макрофагов различалось, представлялось целесообразным проанализировать действие композиции на Nox2-зависимый процесс (таблица 1, рисунок 2 – анализ по DAUC). Очевидно, что эффект соответствует критериям синергизма в сочетании 1/1000 (рисунок 2.4), что касается сочетания 1/100, высокая вариабельность ответа делает заключение об антагонизме менее надежным (рисунок 2.3).. Отличительной особенностью является и то, что в отношении Nox2-зависимой продукции АФК происходило быстрое насыщение эффекта изученных композиций.

Таким образом, в отношении Nox2-зависимой продукции АФК компоненты работают скорее синергично или аддитивно в эффективном диапазоне ( $E_{16-84}$ ). Что касается совокупной генерации АФК, то комбинации ресвератрола и аскорбата синергичны в диапазоне концентраций, превышающих  $IC_{50}$  при условии 1000-кратного превалирования аскорбата. Расчет DRI показывает, что существует возможность значительного снижения концентраций компонентов в диапазоне  $E_{50-84}$  (таблица 3).

#### Комбинация 2 – Ресвератрол + Мелатонин

Теоретические предпосылки рациональности такой комбинации состоят в потенциале взаимодействия этих соединений на разных этапах реализации их антирадикального и биологического действия. Оба компонента такой комбинации обладают мощным антирадикальным потенциалом, но различаются радикальной специфичностью и кинетическими характеристиками радикальных трансформаций и могут обеспечивать взаимную регенерацию. При этом мелатонин в качестве восстановителя имеет очевидное преимущество – в отличие от аскорбата он не дает агрессивных радикальных форм или токсичных для клетки метаболитов. Кроме того, оба соединения имеют различные мишени биологического действия в фагоцитах, воздействие на которые, ведет к одинаковому результату – подавлению респираторного взрыва [2, 10].

Эта композиция соответствовала критериям синергизма во всех изученных молярных отношениях (P1/M1, P1/M10, P1/M100). Наиболее сильный синергизм проявлялся при 100 и 10-кратном превалировании мелатонина, тогда как в сочетании 1/1 синергизм уменьшался и приобретал выраженную дозозависимость (рисунок 3).

#### Комбинация 3 – Аскорбат + Мелатонин



Испытание этой комбинации показало, что аскорбат и мелатонин работали синергично в изученных сочетаниях (A1/M1 и A10/M1). Действие на совокупную генерацию АФК зависело от концентрации (рисунок 4).

В отношении Nox2-зависимой генерации АФК синергизм проявлялся уже при низких концентрациях и носил насыщающий характер (таблица 2). В обоих случаях комбинация превосходила в максимальной эффективности индивидуальные эффекты аскорбата и не уступала мелатонину (таблица 1). Десятикратное изменение концентрации мелатонина практически не влияло на результат взаимодействия.

Таким образом, при тестировании двухкомпонентных комбинаций наиболее рациональным оказалось сочетание мелатонина и ресвератрола. Эту комбинацию отличает сильный синергизм компонентов (таблица 2) и широкие возможности управления их дозой (концентрацией) (таблица 3).

#### **Комбинация 4 – Ресвератрол + Мелатонин + Аскорбат**

Такая комбинация представляется наиболее обоснованной с позиций синергизма, учитывая индивидуальный антирадикальный потенциал компонентов и их иммунотропные свойства.

Изучение тройной комбинации антиоксидантов в сочетаниях, выбранных с учетом результатов предварительного исследования, показало, что с позиций синергизма наиболее рациональна композиция P1/M100/A1000 как в отношении совокупной, так и Nox2-зависимой продукции АФК в макрофагах (таблица 2, рисунок 5). При этом в отношении Nox2-зависимой генерации компоненты демонстрировали выраженное синергичное действие и насыщающий эффект с уровня  $E_{30}$ . Совокупная генерация АФК зависела от концентрации компонентов.

Наглядно результаты испытания комбинаций ресвератрола, мелатонина и аскорбата можно представить в виде полигонограммы (рисунок 6). Если рассматривать трёхкомпонентную комбинацию, то по средневзвешенным значениям CI она синергична, как в отношении совокупной (2+), так и Nox2-зависимой (4+) генерации АФК, что свидетельствует о её потенциальной эффективности вне зависимости от клеточных источников свободных радикалов кислорода. Что касается двойных сочетаний, то в отношении Nox2-зависимой генерации, все они синергичны с кинетикой насыщения на уровне  $E_{30}$  (рисунок 6.2). Это свидетельствует о высоком запасе прочности и целесообразности практического применения таких сочетаний ресвератрола, мелатонина и аскорбата при избыточной активации Nox2. Что касается совокупной клеточной генерации АФК, то результат целиком зависит от концентрации испытываемых компонентов (рисунок 6.1). Так, в области относительно низких концентраций, обеспечивающих 30% эффект ( $E_{30}$ ), тройная комбинация демонстрировала слабый антагонизм (1-), комбинация ресвератрола и аскорбата – умеренный антагонизм (2-), а мелатонин и аскорбат взаимодействовали аддитивно. С увеличением концентрации компонентов ( $E_{70}$ ) все испытанные комбинации работали синергично. Этот феномен можно объяснить следующим обстоятельством. В диапазоне низких концентраций более вероятны конкурентные отношения антиоксидантов с люминофором за АФК с одной стороны, и восстановители – с другой. Однако в случае Nox2-зависимой генерации АФК этого не происходит. Причиной могут быть ингибирующие влияния ресвератрола и мелатонина на процессы сборки этого ферментного комплекса. Синергизм биологического действия этих веществ в фагоцитах весьма вероятен, так как фагоциты несут рецепторы мелатонина, через активацию которых, как недавно показано [9], можно управлять сборкой Nox2 и синтезом различных регуляторных молекул. Ресвератрол ингибирует Nox2, но не влияет на активность ксантиноксидазы при респираторном взрыве [10]. Наиболее вероятными механизмами управления активностью Nox2 считается регуляция внут-

риктелочных кальциевых токов и киназных каскадов, включая NK, ERK и p38 MAPK, необходимых для сборки фермента [8, 10]. Кроме того, ресвератрол модифицирует экспрессию генов в фагоците, хотя дизайн нашего исследования не позволяет рассчитывать на это действие. Таким образом, кинетика насыщения эффекта в отношении Nox2-зависимого пула АФК может быть обусловлена синергичной модификацией клеточного метаболизма в дополнение к прямому антирадикальному действию.

Что касается совокупной продукции АФК, то здесь, по видимому, доминируют прямые антирадикальные эффекты компонентов, гипотетические взаимодействия которых представлены на рисунке 7. Потенциальное преимущество композиции ресвератрола, мелатонина и аскорбата состоит в том, что она способна нейтрализовать не только кислород-центрированные, но и углерод-центрированные (реакции 9 и 13) радикалы биологических молекул, одновременно обеспечивая взаимную регенерацию компонентов. Патологическое значение неконтролируемой продукции кислород- и углерод-центрированных радикалов *in vivo* широко обсуждается в научной периодике [13, 18], а поиск эффективных ингибиторов их образования является актуальной задачей свободнорадикальной фармакологии и биохимии.

Такие взаимодействия чрезвычайно чувствительны к любым флюктуациям среды, поэтому люминофор, содержащийся в относительно высоких концентрациях, будет вносить вклад в радикальные взаимодействия компонентов. Учитывая, что эти влияния нивелируются с увеличением концентраций ресвератрола, мелатонина и аскорбата, результат взаимодействия высоких концентраций будет отличаться от низких концентраций. Включение люминола во взаимодействие антирадикальных соединений позволяет оценивать запас прочности антиоксидантов и их композиций и облегчает выбор доз для испытаний *in vivo*. Полученные результаты, кроме того, поддерживают точку зрения о том, что антиоксидантный потенциал комбинаций фенолов и аскорбата лежит в области высоких концентраций, что необходимо учитывать при их доклиническом и клиническом изучении.

#### **Выводы**

1. Действие композиций ресвератрола, мелатонина и аскорбата на модели респираторного взрыва макрофагов при любом комбинаторном сочетании зависит от концентраций антиоксидантов в отношении общего количества АФК, генерируемых при респираторном взрыве, и характеризуется кинетикой быстрого насыщения в отношении Nox2-зависимого пула АФК.

2. Характер взаимодействия ресвератрола и аскорбата зависит от концентраций и молярных соотношений компонентов комбинации. Более рациональной является комбинация с 1000-кратным превалированием аскорбата. Уменьшение аскорбата на порядок (соотношение P1/A100) ведет к снижению антиоксидантного синергизма и проявлению прооксидантных свойств. В обеих композициях в области низких концентраций ресвератрола и аскорбата превалирует антагонизм.

3. Мелатонин и аскорбат синергично ингибируют респираторный взрыв макрофагов в молярных соотношениях A1/M1...A10/M1. Сила синергизма прямо коррелирует с концентрацией компонентов комбинации.

4. Ресвератрол и мелатонин проявляют выраженный синергизм при молярных соотношениях P1/M1...P1/M100. Комбинация мелатонина и ресвератрола демонстрирует наибольший синергизм и максимальную стабильность эффекта при значительных вариациях концентраций компонентов.

5. Тройная комбинация аскорбата с ресвератролом и мелатонином синергична в области высоких концентраций при значительном превалировании аскорбата и мелатонина над ресвератролом (соотношение P1/M100/A1000). На модели

фагоцитарной генерации АФК эта комбинация не обнаруживает преимуществ перед сочетаниями ресвератрола и мелатонина.

## Литература

1. 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.
2. Бизунок, Н. А. Мелатонин модулирует генерацию активных форм кислорода в клеточных системах / Н. А. Бизунок // Вести НАН Беларуси, медицинская серия. 2006. № 4. С. 84 – 87.
3. Земсков, В. М. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток) / В. М. Земсков, А. А. Барсуков, С. А. Безносенко // Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Х. И. Истамов. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995. Гл. 6. С. 154 – 162.
4. Пинегин, В. В. Макрофаги: свойства и функции / В. В. Пинегин, М. И. Карсонова // Иммунология. 2009. № 4. С. 241 – 249.
5. Anderson, R. Physiological potential of ascorbate,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol individually and in combination in the prevention of tissue damage, carcinogenesis and immune dysfunction mediated by phagocyte-derived reactive oxidants / R. Anderson, A. Theron // J. World Review of Nutrition and Dietetics. 1990. Vol. 62. P. 27 – 58.
6. Chou, T-Ch. 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.
7. Gao, X. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production / Xiaohua Gao [et al.] // Biochemical Pharmacology. 2001. Vol. 62. № 9. P. 1299 – 1308.
8. Iyori, M. Resveratrol Modulates Phagocytosis of Bacteria through an NF- $\kappa$ B-Dependent Gene Program / Mitsuhiro Iyori, Hideo Kataoka, Haque Mohammad Shamsul, Kazuto Kiura, Motoaki Yasuda, Takashi Nakata, Akira Hasebe, Ken-ichiro Shibata // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. Vol. 52, № 1. P. 121 – 127.
9. Lattin, J. G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages / Jane Lattin [et al.] // J. Leukoc. Biol. 2007. Vol. 82. P. 16 – 32.
10. Leiro, J. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes / J. Leiro [et al.] /

/ J. Leukoc. Biol. 2004. Vol. 75. P. 1156 – 1165.

11. Leiro, J. Resveratrol modulates rat macrophage functions / Leiro J, Alvarez E, Garcia D, Orallo F. // Int. Immunopharmacol. 2002. Vol. 2, № 6. P. 767 – 774.
12. Liu, F-Ch. Chondroprotective effects and mechanisms of resveratrol in advanced glycation end products-stimulated chondrocytes / Feng-Cheng Liu [et al.] // Arthritis Research and Therapy 2010. Vol. 12. 167 p.
13. Murphy, M. P. Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation / M. P. Murphy, K. S. Echtay, F. H. Blaikie, J. Asin-Cayueta et al. // The Journal of Biological Chemistry. 2008. Vol. 278. № 49. P. 48534 – 48545.
14. Parfenov, E. A. Successes and perspectives in the creation of therapeutic preparations based on ascorbic acid (review) / E. A. Parfenov, L. D. Smirnov // Pharmaceutical Chemistry J. 1992. Vol. 26, № 9 – 10. P. 657 – 676.
15. Penumathsa, S. V. Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease / S. V. Penumathsa, N: Maulik // Can J Physiol Pharmacol. 2009. Vol. 87. P. 275 – 286.
16. Quinn, M. T. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction / M. T. Quinn, m. C. b. Ammons, f. R. Deleo // Clinical Science. 2006. Vol. 111. P. 1 – 20.
17. Rotondo, S. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function / S. Rotondo [et al.] // British J. Pharmacology. 1998. Vol. 123. P. 1691 – 1699.
18. Shadyro, O. I. Quinones as free-radical fragmentation inhibitors in biologically important molecules / O. I. Shadyro, G. K. Glushonok, T. G. Glushonok, I. P. Edimecheva, A. G. Moroz, A. A. Sosnovskaya, I. L. Yurkova, G. I. Polozov // Free radical research. 2002. Vol. 36, № 8. P. 859 – 867.
19. Sharma, P. Ascorbate-mediated enhancement of reactive oxygen species generation from polymorphonuclear leukocytes: modulatory effect of nitric oxide / Prashant Sharma [et al.] // J. Leukoc. Biol. 2004. Vol. 75. P. 1070 – 1078.
20. Skwarlo-Sonta, K. Melatonin in immunity: comparative aspects / K. Skwarlo-Sonta // Neuro Endocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, Suppl 1. P. 61 – 6.
21. Tucsek, Zs. Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1 / Zs. Tucsek [et al.] // J. Leuk. Biol. 2011. Vol. 89. № 1. P. 105 – 111.
22. Tyagi, S. Clinical and medicinal applications of resveratrol / S. Tyagi [et al.] // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2010. Vol. 3. P. 49 – 52.

Поступила 22.08.2011 г.