

УДК 577.161.4:615.2.356

В. В. ВИНОГРАДОВ, И. И. СТЕПУРО, С. А. ЛАБОР, С. В. ВИНОГРАДОВ,
А. В. ТУМАНОВ

**МЕХАНИЗМЫ НЕКОФЕРМЕНТНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМПОНЕНТОВ
НЕЙРОВАЗОТРОПИНА ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ И РАЗРАБОТКА
АНТИСТРЕССОРНЫХ ТИАМИНСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ**

(Представлено академиком С. А. Усановым)

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно

Поступило 06.04.2015

Введение. Поливитаминный комплекс «антистрессин В» (включающий максимальные фармакопейные дозы витаминов V_1 , V_6 и V_{12}), способный за счет нивелирования стероидообусловленной иммуносупрессии (путем активации тиамином синтеза инсулина, уравнивающего супрессивные эффекты кортикостероидов, блокирования пиридоксином рецепции стероидных гормонов, усиления цианкобаламином катаболизма стероидов) и повышения эффективности иммуномодулирующей терапии в 2–3 раза снизить уровень летальности больных в условиях проведения интенсивного комплексного лечения сепсиса, для внутривенного применения более 25 лет назад был разработан на базе теории некоферментного действия витаминов [1–3] в лаборатории биохимии эндокринных желез Института биохимии НАН Беларуси. Начиная с 1994 года витамин $V_1+V_6+V_{12}$ в комбинации с иммуностимулирующей терапией в клинике Гродненского медицинского университета стали базисным лечением септических больных. Данный подход позволил снизить летальность в группе больных, подвергавшихся гемосорбции, с 37,4 % до 13,3 % и с 25 % до 8,3 % в группе больных, получавших ронколейкин [4].

В принципе, «антистрессин В» можно использовать и в диабетологии в лечебных целях, однако учитывая специфический оксидантный характер диабетических повреждений, требуется его корректировка по составу витаминных ингредиентов с учетом как системного (гормонально опосредованного), так и внутриклеточного антиоксидантного механизмов их действия. В связи с этим представлялось необходимым обозначить новое лекарственное средство как нейрвазотропин и включить в его состав вместо витамина V_{12} широко используемую в диабетологии липоевую кислоту, обладающую мощным антиоксидантным потенциалом [5].

Материалы и методы исследования. В экспериментах *in vitro*, которые проводили в присутствии пероксида водорода, использовали миоглобин из сердца лошади, а также парацетамол (фирма Sigma – Aldrich) и тирозин (фирма Sigma). Все другие реагенты высокой очистки производства России и Беларуси. Количество метмиоглобина в растворе определяли, используя молярный коэффициент поглощения ($M^{-1}cm^{-1}$): $\epsilon_{630} = 3700$ [6]. Оксоферрильные формы миоглобина получали, добавляя 100–1000-кратные молярные избытки пероксида водорода к водному раствору метмиоглобина. Полоса Сорэ миоглобина с максимумом при 407 нм после добавления пероксида водорода смещалась до 418 нм. Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения при 240 нм ($\epsilon_{240} = 39,4 M^{-1}cm^{-1}$) [7]. Образование димера парацетамола и тирозина контролировали спектрофотометрически. Расчет концентраций дитирозина или парацетамола проводили путем вычитания поглощения соединений пиридоксаль-5-фосфат, присутствующих в растворе, по формуле

$$\Sigma(\text{общее поглощение}) - \Sigma(\text{сумма поглощений всех соединений пиридоксаль-5-фосфат}) = \text{поглощение димеров тирозина или парацетамола.}$$

Используя молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{320} = 5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ определяли концентрацию димеров [8].

Результаты и их обсуждение. Димеры парацетамола, являющиеся важными маркерами окислительного стресса [9], позволяют проводить оценку антиоксидантной активности липоевой кислоты по степени ингибирования синтеза димеров, концентрация которых свидетельствует об уровне образования свободных радикалов в системе *in vitro*.

Из данных таблицы видно, что при инкубации миоглобина в присутствии гидропероксида липоевая кислота эффективно ингибирует образование димеров ($13,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ против $19,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) и, следовательно, проявляет антиоксидантное действие, инактивируя свободные радикалы парацетамола. Компоненты нейровазотропина: пиридоксальфосфат в меньшей степени ($5,78 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), а тиамин в большей ($3,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) потенцируют антиоксидантную активность липоевой кислоты, что фактически обосновывает необходимость их совместного применения.

Ингибирование образования димеров парацетамола (ПА) и разрушения гема миоглобина (Мб) компонентами нейровазотропина (Лк – липоевая кислота, Т – тиамин, пиридоксаль-5-фосфат)

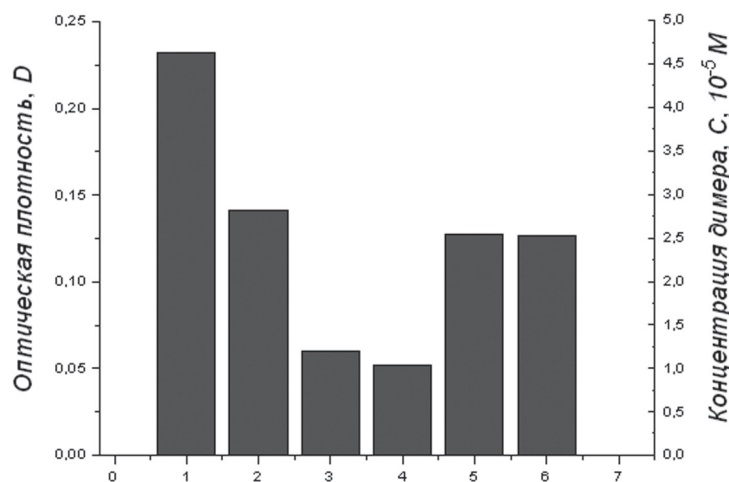
Группа	Значение ΔD_{320} , нм	Концентрация димера	Значение ΔD_{415} , нм	Концентрация разрушенного гема
Мб (10 мкМ) + ПА (1 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,977	$19,5 \cdot 10^{-5}$	0,213	$13,0 \cdot 10^{-7}$
Мб (10 мкМ) + ПА (1 мМ) + Лк (0,5 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,699	$13,9 \cdot 10^{-5}$	0,155	$9,57 \cdot 10^{-7}$
Мб (10 мкМ) + ПА (1 мМ) + Т (1 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,638	$12,8 \cdot 10^{-5}$	0,078	$4,8 \cdot 10^{-7}$
Мб (10 мкМ) + Т (1 мМ) + ПА (1 мМ) + Лк (0,5 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ)	0,165	$3,30 \cdot 10^{-5}$	0,106	$6,5 \cdot 10^{-7}$
Мб (10 мкМ) + пиридоксаль-5-фосфат (0,5 мМ) + ПА (1 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ).	0,623	$12,5 \cdot 10^{-5}$	0,081	$5 \cdot 10^{-7}$
Мб (10 мкМ) + пиридоксаль-5-фосфат (0,5 мМ) + ПА (1 мМ) + Лк (0,5 мМ) + H ₂ O ₂ (1 мМ).	0,289	$5,78 \cdot 10^{-5}$	0,116	$7,16 \cdot 10^{-7}$

Антиоксидантный потенциал липоевой кислоты, тиамина и пиридоксальфосфата подтверждают данные о снижении разрушения гема миоглобина свободными радикалами парацетамола в системе *in vitro*, что является прямым следствием альтерирующего действия окислительного стресса. По степени антистрессорной эффективности ингредиенты нейровазотропина составляют следующий ряд: тиамин ($4,8 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) – пиридоксальфосфат ($5,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) – липоевая кислота ($9,57 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). В контроле концентрация разрушенного гема составляла $13,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. Следовательно, именно липоевая кислота усиливает антиоксидантное действие витаминов В₁ и В₆, а не наоборот. Этот вывод подтверждают данные по димерам тирозина, биосинтез которых наряду с образованием димеров парацетамола служит равноправным маркером окислительного стресса.

Важным патогенетическим фактором диабетического повреждения тканей является неэнзиматическое гликозилирование белков, в процессе которого происходит генерация активных форм кислорода и образование тирозильных радикалов. Была изучена эффективность инактивирования свободных радикалов тирозина субстанциями создаваемого поливитаминного комплекса. Критерием инактивации служила степень ингибирования синтеза димеров, концентрация которых прямо пропорциональна содержанию свободных радикалов в системе *in vitro* [10].

На рисунке видно, что тиамин по эффективности ингибирующего действия на тирозильные радикалы (3 столбик) является гораздо более сильным антиоксидантом, чем липоевая кислота (2 столбик), но ее добавка позволяет достичь максимального защитного эффекта (4 столбик).

Антиоксидантный потенциал тиамина повышает не только липоевая кислота, но и сам тирозин (3 столбик) за счет окислительного превращения молекулы витамина в более реакционно-



Образование димеров тирозина в пероксидазных реакциях катализируемых метмиоглобином: 1 – Mb (10 мкМ) + Туг (1 мМ) + H₂O₂ (1 мМ); 2 – Mb (10 мкМ) + Туг (1 мМ) + Лк (0,5 мМ) + H₂O₂ (1 мМ); 3 – Mb (10 мкМ) + Туг (1 мМ) + Т (1 мМ) + H₂O₂ (1 мМ); 4 – Mb (10 мкМ) + Туг (1 мМ) + Лк (0,5 мМ) + Т (1 мМ) + H₂O₂ (1 мМ); 5 – Mb (10 мкМ) + пиридоксаль-5-фосфат (0,5 мМ) + Туг (1 мМ) + H₂O₂ (1 мМ); 6 – Mb (10 мкМ) + пиридоксаль-5-фосфат (0,5 мМ) + Туг (1 мМ) + Лк (0,5 мМ) + H₂O₂ (1 мМ)

способные окисленные метаболиты (тиохром, оксидигидротиохром, тиаминдисульфид, а также тиольные и трициклические продукты), обезвреживающие свободные радикалы.

Кстати, 4 столбик представляет собой макет нового, возможно, еще более сильного, чем «нейровазотропин» антиоксиданта «гомеостазина», содержащего тиамин, липоевую кислоту и тирозин вместо пиридоксаля, поскольку пиридоксаль-5-фосфат в сочетании с тирозином и липоевой кислотой (5 и 6 столбики) был менее эффективен, чем тиамин (3 и 4 столбики).

На интенсивность свободнорадикальных процессов, как известно, в значительной мере влияет содержание ионов Fe²⁺. Увеличение внутриклеточной концентрации Fe²⁺ происходит при окислительном стрессе за счет высвобождения извне- и внутриклеточных депо, разрушения Fe-S-кластеров аконитазы супероксидным радикалом, а также распада других Fe²⁺-содержащих белков и восстановления Fe³⁺ в составе ферритина [9]. Антиоксидантные свойства липоевой кислоты объясняются ее способностью переводить Fe²⁺ в Fe³⁺, а также хелатировать двухвалентные катионы (Fe²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺) и выводить их из организма. Хелатирование ионов металлов липоевой кислотой ведет к снижению интенсивности протекания реакции Фентона. Аналогичный эффект вызывает и тиамин, замыкая на себя высокоактивные гидроксильные радикалы.

Механизм окисления тиамин в реакции Фентона может быть следующим [10]: разрыв связи НО–ОН под действием иона железа Fe²⁺ приводит к образованию радикалов •ОН и анионов гидроксила ОН⁻. Затем ОН-радикал взаимодействует с молекулой тиамин, со вторым углеродом тиазолового компонента, давая радикал тиамин. Взаимодействие радикала тиамин со вторым гидроксил-радикалом приводит к образованию продукта гидроксильирования тиамин Т-ОН. Гидроксил внедряется в тиазоловый компонент и затем взаимодействует с аминогруппой пиримидинового компонента с образованием циклического продукта. Однако данная реакция эффективно протекает в кислой среде, когда протонирован 1-азот пиримидина. Нейтральная форма тиамин после образования свободного радикала тиамин, центрированного на втором углероде тиазола, трансформируется в свободно радикальную трициклическую форму тиамин. Второй гидроксил радикал или супероксид-анион окисляют свободно радикальную форму тиамин в тиохром.

Об участии гидроксильных радикалов в окислении тиамин в тиохром свидетельствуют данные об ингибировании окисления тиамин алифатическими спиртами. После добавления в раствор, содержащий тиамин, ионы железа Fe²⁺ и пероксид водорода высоких концентраций этанола наблюдали практически полное ингибирование образования тиохрома [11] за счет высокой скорости взаимодействия гидроксильных радикалов с этанолом ($k = 7,2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$).

На фоне липоевой кислоты при окислительном стрессе тиамин также уменьшает выход тиохрома. Однако антиоксидантное действие тиамин проявляет и в этих условиях, что отражает резкое снижение синтеза димеров парацетамола и тирозина по сравнению с инкубационной средой, содержащей одну липоевую кислоту (таблица, рисунок). Из таблицы и рисунка видно, что аналогичным (но менее выраженным) действием в принятых условиях обладает и пиридоксальфосфат. Известно, что пиридоксаль и пиридоксальфосфат образуют с первичными аминогруппами белков основания Шиффа, которые являются сильными хелаторами ионов металла. Образование хелатов металлов, в том числе хелатов ионов железа сильно ингибирует протекание реакций гидроксилирования, инициированных реагентом Фентона [6].

Исходя из вышеизложенного можно полагать, что усиленный субстанцией антидиабетического действия (где тиоктовая кислота заменила витамин B_{12}) разработанный нами ранее антистрессорный витаминный комплекс («антистрессин В»), теперь обозначенный как «нейровазотропин», будет эффективным средством профилактики диабетических ангио- и полинейропатий. Предполагается, что нейровазотропин будет более эффективным в профилактике и коррекции стрессобусловленных осложнений сахарного диабета, чем зарубежные аналоги, что позволит в этой части решить проблему импортозамещения.

Заключение. Арсенал средств некоферментной витаминологии, которая не нуждается в гипотезе коферментного механизма действия вводимых витаминов, пополнила линейка новых антистрессорных тиаминсодержащих препаратов. Замена цианкобаламина в составе успешно апробированного в клинической сепсисологии иммуностропного антистрессина В ($B_1+B_6+B_{12}$) на липоевую кислоту привела к созданию нейровазотропина – противодиабетического лекарственного средства с усиленным антиоксидантным потенциалом. При инкубации миоглобина в присутствии гидропероксида компоненты нейровазотропина (тиамин, липоевая кислота и в меньшей степени пиридоксальфосфат) ингибируют образование димеров парацетамола и тирозина – маркеров оксидативного стресса, свидетельствующих об уровне образования свободных радикалов в системе *in vitro*. Дальнейшая модификация нейровазотропина за счет включения в его состав тирозина (или замены пиридоксинального ингредиента на тирозин) приведет к созданию нового лекарственного средства «гомеостазин» с возможно еще более выраженными антиоксидантными свойствами, что необходимо для коррекции различной патологии, сопряженной с окислительным стрессом (инфаркт миокарда, инсульт головного мозга и др.).

Создание антистрессина В, а затем – нейровазотропина и последующая разработка гомеостазина, способных нивелировать повреждающее действие системного (гормонального) и клеточных видов стресса (оксидативного, нитрозильного, карбонильного), является существенным вкладом в дальнейшее развитие некоферментной витаминологии как отдельной научно-практической дисциплины в медицине.

Литература

1. Виноградов В. В. Гормональные механизмы метаболического действия тиамин. Минск, 1984.
2. Vinogradov V., Vodoyevich V., Rozcho A. Concept of the noncoenzymatic thiamine effects // Medical Hypotheses. 1997. Vol. 49. P. 487–495.
3. Виноградов В. В. Некоферментная витаминология. Гродно, 2000.
4. Виноградов В. В. Стресс и патология. Минск, 2007.
5. Виноградов В. В., Стенуро И. И., Надольник Л. И. и др. // Новости медико-биологических наук. 2013. Т. 7, № 2. С. 151–158.
6. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North-Holland, Amsterdam, 1971.
7. Fenwick C. W., English A. M., Wishart J. F. // J. Am. Chem. Soc. 1977. Vol. 119. P. 4758–4764.
8. Ostadal H., Daneshvar B., Skibsted L. H. // Free Radic. Res. 1996. Vol. 24. P. 429–438.
9. Стенуро И. И., Стенуро В. И. Окисленные производные тиамин. Механизмы образования под действием активных форм азота, кислорода и в реакциях, катализируемых гемопротеинами. LAP LAMBERT Academic Publishing. Saarbruchen, Deutschland, 2014.
10. Стенуро А. И., Адамчук Р. И., Опарин А. Ю., Стенуро И. И. // Биохимия. 2008. Т. 73, № 9. С. 1281–1293.
11. Aechbach R., Amado R., Neukom H. // Biochem. Biophys. Acta. 1976. Vol. 430. P. 292–301.

**MECHANISMS OF NONCOZYME ACTION OF NEUROVASOTROPIN
COMPONENTS DURING OXIDATIVE STRESS AND DEVELOPMENT OF ANTI-STRESS
THIAMINE-CONTAINING DRUGS**

Summary

The substitution of cyanocobalamine for lipoic acid in the composition of immunotropic anti-stressin B ($B_1+B_6+B_{12}$), which was successfully tested in clinical sepsiology, resulted in the development of neurovasotropin, an antidiabetic drug with enhanced antioxidant capacity. During incubation of myoglobin in the presence of hydroperoxide, components of neurovasotropin (thiamine, lipoic acid, and to a lesser extent pyridoxal phosphate) inhibited the production of dimers of paracetamol and tyrosine, markers of oxidative stress indicating the level of free radical formation in the system *in vitro*. Further modification of neurovasotropin due to its incorporation in tyrosine (or substitution of the pyridoxine constituents for tyrosine) will result in the development of a new drug "homestasin" with probably more pronounced antioxidant properties, which is necessary for correction of different pathologies related to oxidative stress (myocardial infarction, cerebral stroke, etc).