

І. М. Ситник, М. В. Хайтович, П. А. Черновол

Антиоксидантна активність інгібіторів ангіотензину II та метаболітотропних кардіопротекторів за умов *in vitro* та *in silico*

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м.Київ

Ключові слова: антиоксидантна активність, тіотриазолін, ацетилцистеїн, лозартан, валсартан, електронні дескриптори

Відомо, що оксидативний стрес (ОС) відіграє провідну роль у патогенезі більше 100 захворювань. ОС є результатом збільшеної генерації вільних радикалів та зменшення фізіологічної антиоксидантної системи захисту організму за рахунок надлишкової кількості активних форм кисню (АФК), що виникає внаслідок порушення балансу між продукцією та деструкцією АФК [1]. Так, ключовою АФК є супероксид-аніон, який здатен ініціювати генерацію найреактивніших АФК, гідроксил-радикала $\text{HO}\cdot$ та пероксиїтритру ONOO^- , які надмірно формуються при ішемії та реперфузії, що є результатом низьких значень рН та гіпоксичних станів, сприяючи виходу Fe^{2+} з металопротеїназ при патологічних станах серцево-судинної системи [2].

Останнім часом вивчаються різноманітні сполуки з антиоксидантною активністю для корекції ОС. На моделях *in vivo* доведено кардіопротекторні та антиоксидантні властивості лікарських засобів (ЛЗ) N-ацетилцистеїну [3], тіотриазоліну [4]. Активно досліджуються кардіопротекторні властивості інгібіторів ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, зокрема, блокаторів рецепторів до ангіотензину (АТ) II [5].

На початкових етапах скринінгу потенційних ЛЗ важливим є використання методів первинної оцінки антиоксидантної активності (АОА) сполук у досліджах *in vitro* та за допомогою комп'ютерного прогнозування *in silico* [10, 11].

Тому актуальним питанням є пошук кардіопротекторних сполук з антиоксидантною активністю.

Мета дослідження – порівняльна оцінка антиоксидантної активності інгібіторів АТ II (лозартану, валсартану) та метаболітотропних кардіопротекторів (ацетилцистеїну, тіотриазоліну) на моделі інгібування супероксид-радикала *in vitro* та визначення залежності структура–антиоксидантна активність інгібіторів АТ II з використанням електронних дескрипторів *in silico*.

Матеріали та методи. Як об'єкти дослідження використовували лікарські засоби – ацетилцистеїн (ТОВ «Фарма Старт»), тіотриазолін (Arterium), лозартан (Zentiva), валсартан (Zentiva).

АОА досліджуваних ЛЗ вивчали на базі НДІ експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О. О. Богомольця.

Визначення АОА проводили відповідно до методики [6] та її модифікації [7]. За допомогою методу спектрофотометрії реєстрували зміни оптичної густини після внесення до середовища інкубації досліджуваних ЛЗ і визначали АОА за ступенем інгібування супероксид-радикала, що утворюється в модельній системі *in vitro* при автоокисненні адреналіну в адренохром у лужному середовищі. Розчин адреналіну готували на бідистильованій воді, використовуючи 0,1 % розчин адреналіну гідротартрату (ТОВ «Здоров'я») у перерахунку на 40,5 мг адреналіну. До мірної колби на 20 мл вносили 4,5 мл 0,1 % розчину адреналіну й додавали 10 мл бідистильованої води, після чого по 0,5–1,0 мл 0,1 н HCl, доводили рН до 2,0, потім бідистильятом доводили об'єм до 20 мл. До кювети біохімічного аналізатора SINNOWA BS-3000M вно-

сили 0,5 мл 0,15 моль/л карбонатного буфера рН 10,2, який містить 500 мг трилону Б на 1 л об'єму. Після цього вносили досліджувані ЛЗ у концентраціях 10^{-3} , 10^{-6} та 10^{-9} моль/л та об'ємом 0,125 мл. Реакцію запускали внесенням 0,1 мл розчину адреналіну. Оптичну густину визначали при довжині хвилі 340 нм проти карбонатного буфера.

АОА досліджуваних ЛЗ виражали у відсотках інгібування автоокиснення адреналіну та розраховували за формулою:

$$\text{АОА} = \frac{D_k - D_d}{D_k} \cdot 100, \text{ де}$$

АОА – антиоксидантна активність, %;
 D_k – оптична густина контрольної проби;
 D_d – оптична густина дослідної проби.

Значення квантово-хімічних параметрів молекулярних структур ЛЗ розраховували за допомогою програми Hyperchem Release 8.0. з використанням напівемпіричного методу-гамільтоніану PM3 [8].

Розраховували такі параметри: енергію вищої заповненої молекулярної орбіталі (the highest occupied molecular orbital, HOMO); енергію нижчої вакантної молекулярної орбіталі (the lowest unoccupied molecular orbital, LUMO); ΔE електронного переходу між HOMO та LUMO; потенціал іонізації (ionization potential, IP); жорсткість (η); значення зарядів (за Mulliken) молекул.

Статистичну обробку отриманих даних проводили методами варіаційної статистики за допомогою програм Excel 2010 та MedStat з використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за критерієм Шеффе.

Результати та їх обговорення. Порівнюючи ацетилцистеїн та тіотриазолін (табл. 1), виявлено, що при внесенні до модельної тест-системи досліджуваних ЛЗ статистично достовірно знижується оптична густина порівняно з контролем ($p < 0,01$). Найменші значення оптичної густини реєстрували при молярній концентрації 10^{-6} моль/л, відповідно й АОА при даній концентрації була найвищою та становила майже 80 %. Показник ΔD зменшувався в 2,0 разу при внесенні тіотриазоліну та в 4,8 разу – ацетилцистеїну. АОА тіотриазоліну в зазначеній концентрації склала близько 52 %.

Слід зазначити, що в концентраціях 10^{-3} та 10^{-6} моль/л ацетилцистеїн вірогідно перевершував тіотриазолін як за показником ΔD , так і за АОА ($p < 0,01$).

Результати визначення АОА препаратів групи блокаторів рецепторів AT II – валсартану та лозартану наведено в таблиці 2. Валсартан у концентраціях 10^{-3} та 10^{-6} моль/л не виявляв АОА (розраховане значення АОА складало 10,76 та 10,61 % відповідно), показники ΔD достовірно не відрізнялися від контролю, а в найнижчій з досліджених концентрацій 10^{-9} моль/л навіть мав прооксидантну дію. На відміну від валсартану інший препарат цієї групи –

Таблиця 1

Показники антиоксидантної активності ацетилцистеїну та тіотриазоліну в модельній тест-системі (n = 7)

Умова досліджу	Концентрація препарату, моль/л					
	10^{-3}		10^{-6}		10^{-9}	
	ΔD (M \pm m)	Антиоксидантна активність, %	ΔD (M \pm m)	Антиоксидантна активність, %	ΔD (M \pm m)	АОА, %
Контроль	0,1516 \pm 0,0070		-		-	
Ацетилцистеїн	0,0418 \pm 0,0026 ^{*,**}	72,37 \pm 2,85	0,0316 \pm 0,0012 ^{*,**}	79,11 \pm 1,69	0,0646 \pm 0,0023 [*]	57,64 \pm 2,67
Тіотриазолін	0,0879 \pm 0,0047 [*]	40,39 \pm 6,01	0,0730 \pm 0,0020 [*]	51,84 \pm 3,42	0,0798 \pm 0,0042 [*]	47,32 \pm 5,17

Примітка. * $p < 0,01$ порівняно з контролем, ** $p < 0,01$ порівняно з тіотриазоліном.

**Показники антиоксидантної активності валсартану та лозартану
в модельній тест-системі (n = 7)**

Умова досліджу	Концентрація препарату, моль/л					
	10 ⁻³		10 ⁻⁶		10 ⁻⁹	
	ΔD (M ± m)	Антиоксидантна активність, %	ΔD (M ± m)	Антиоксидантна активність, %	ΔD (M ± m)	Антиоксидантна активність, %
Контроль	0,1516 ± 0,0070		-		-	
Валсартан	0,1393 ± 0,0019	10,76 ± 2,01	0,1398 ± 0,0033	10,61 ± 1,63	0,1799 ± 0,0008*	-
Лозартан	0,1167 ± 0,0010*, **	25,07 ± 2,56	0,1204 ± 0,0008*,**	22,51 ± 2,58	0,1443 ± 0,0008**	11,46 ± 1,74

Примітка. *p < 0,01 порівняно з контролем, **p < 0,01 порівняно з валсартаном.

лозартан проявив АOA у всіх концентраціях та вірогідно відрізнявся від валсартану (p < 0,01). Варто зазначити, що лозартан характеризувався прямопропорційною залежністю АOA від концентрації: зі зниженням молярної концентрації знижувалася їхня АOA. Так, у разі внесення лозартану до модельної тест-системи в концентрації 10⁻³ моль/л ΔD знижувався в 1,3 разу порівняно з контролем, а значення АOA складало 25 %.

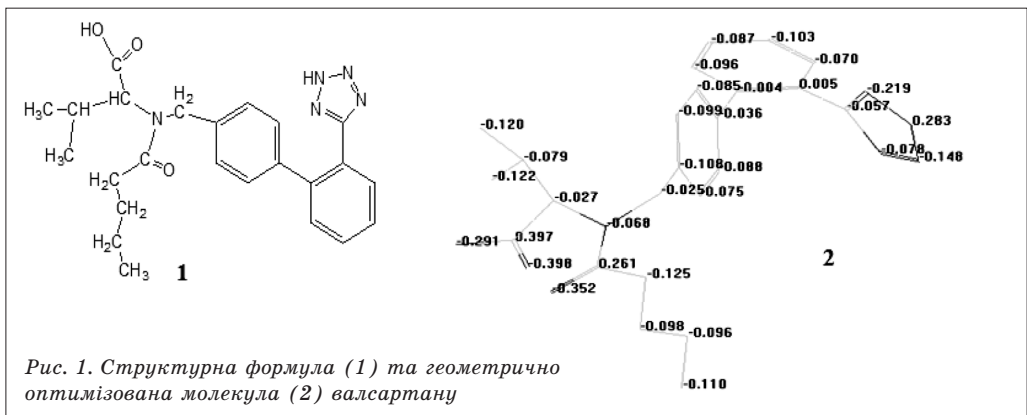
Таким чином, досліджені інгібітори АТ II, близькі за хімічною будовою, показали різну здатність до взаємодії з супероксид-радикалом у модельній системі автоокиснення адреналіну. Для з'ясування причин виявлених розбіжностей було застосовано квантово-хімічні комп'ютерні методи, що дозволяють визначити механізми взаємодії антиоксидантів та вільних радикалів, антиоксидантні властивості різних кла-

сів сполук на основі прогнозування кількісного співвідношення структура-активність (quantitative structure-activity relationship, QSAR) [9–11].

З цією метою нами було проведено квантово-хімічні розрахунки молекул валсартану та лозартану – біфенілових похідних тетразолу. Квантово-хімічні розрахунки молекул тіотриазоліну та ацетилцистеїну не проводили, беручи до уваги, що дані препарати є похідними сполук, різних за своєю хімічною будовою.

Визначали найзначущі електронні дескриптори АOA відносно АФК: енергію вищої заповненої МО (HOMO), потенціал іонізації (IP), енергію нижчої вакантної МО (LUMO), ефективні заряди на атомах, жорсткість (η) [10].

Структурні формули та геометричну оптимізацію досліджуваних молекул із зазначенням електронних зарядів на атомах наведено на рисунках 1, 2.



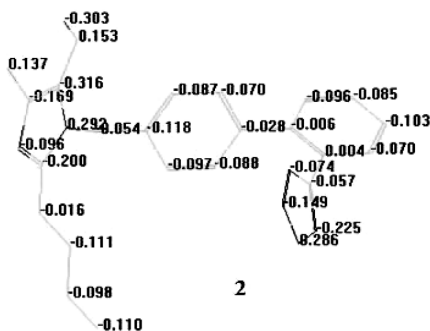
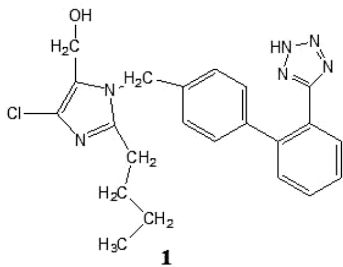


Рис. 2. Структурна формула (1) та геометрично оптимізована молекула (2) лозартану

Молекула лозартану на відміну від валсартану має гідроксиметильний боковий фрагмент з локалізацією негативного заряду на атомі кисню (-0,303). Тому, ефективніше буде нейтралізувати АФК.

Не менш важливими є енергії граничних МО. Відомо, що НОМО характеризує взаємодію молекули з електроноакцепторами, а LUMO – з електронодонорами. Відповідно до теореми Купменса, енергії граничних орбіталей з протилежним знаком відповідають значенням потенціалу іонізації молекули IP (енергія НОМО) або її спорідненості до електрона EA (енергія LUMO) [10].

З результатів, наведених у таблиці 3, видно, що лозартан має вищі значення енергії НОМО (-8,854 eV) та відповідно нижчі значення потенціалу іонізації IP та енергії переходу між НОМО та LUMO. Тобто, лозартан має енергетично вигідніше положення, швидше захоплюючи вільні радикали та віддаючи протон H з найменшою затратою енергії (8, 854 eV), що й пояснює його вищу АOA порівняно з валсартаном. Крім того, нижчі параметри жорсткості η (4,066 eV) вказують на більшу реакційну здатність лозартану. Подібне пояснення АOA лозартану, пов'язане з наявністю гідроксиметильного фрагмента бокового ланцюга, на основі

якого синтезують нові класи сполук з АО активністю, так звані АО-сартани, дають автори іншого дослідження [12].

Отримані результати в подальшому можуть бути використані для пошуку та прогнозування АOA серед нових похідних сартану, визначення механізмів кардіопротекторної дії блокаторів АТ II *in vivo* та можливості комбінованого застосування останніх з препаратами метаболітного типу дії для підвищення ефективності фармакотерапії серцево-судинних захворювань.

Висновки

1. На моделі інгібування супероксид-радикала *in vitro* встановлено, що метаболітні кардіопротектори ацетилцистеїн та тіотриазолін виявляють АOA в широкому діапазоні концентрацій, 10^{-9} – 10^{-3} моль/л. Найбільшу АOA (79 %) має ацетилцистеїн у концентрації 10^{-6} моль/л, перевершуючи таку тіотриазоліну.
2. З двох досліджених препаратів групи блокаторів рецепторів АТ II (валсартан, лозартан) тільки лозартан характеризується наявністю АOA, яка становить 22,51 та 25,07 % за концентрацій 10^{-6} та 10^{-3} моль/л відповідно.
3. За антиоксидантної активністю блокатор рецепторів АТ II лозартан значно поступається метаболітним

Таблиця 3

Квантово-хімічні параметри молекул лозартану та валсартану (гамільтоніан PM3)

Препарат	Параметр, eV				
	НОМО	LUMO	IP	ΔE	η
Лозартан	-8,854	-0,721	8,854	8,133	4,066
Валсартан	-9,643	-0,572	9,643	9,071	4,536

кардіопротекторам – ацетилцистеїну та тіотриазоліну.

4. Квантово-хімічними розрахунками підтверджено, що лозартан за рахунок гідроксиметильного бічного

ланцюга має властивості швидко захоплювати вільні радикали та віддавати протон водню з найменшою затратою енергії, що й пояснює його вищу АОА порівняно з валсартаном.

1. Poljsak B. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants / B. Poljsak, D. Šuput, I. Milisav // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – V. 2013. – P. 1–11. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/956792>
2. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems / Jian-Ming Lüa, P. H. Lin, Q. Yao, C. Chen // *J Cell Mol Med*. – 2010. – № 14 (4). – P. 840–860.
3. Analysis of redox and apoptotic effects of anthracyclines to delineate a cardioprotective strategy / J. M. Fulbright, D. E. Egas-Bejar, W. W. Huh, J. Chandra // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2015. – № 76 (6). – P. 1297–307.
4. Ефективність застосування тіотриазоліну за умов доксорубіцинової кардіоміопатії / І. С. Чекман, Т. С. Трофімова, І. А. Мазур, Н. О. Горчакова // *Запорозький медичинський журнал*. – 2010. – Т. 12, № 5. – С. 207–210.
5. Efficacy and safety of the angiotensin II receptor blocker losartan for hypertrophic cardiomyopathy: the INHERIT randomised, double-blind, placebo-controlled trial / A. Axelsson, K. Iversen, N. Vejstrup [et al.] // *Lancet Diabetes Endocrinol*. – 2015. – № 3 (2). – P. 123–131.
6. Методи оцінки антиоксидантної активності речовин при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліджах *in vitro* / Губський Ю. І., Дунаєв В. В., Беленічев І. Ф. [та ін.] // *Методичні рекомендації*. – Київ : ДФЦ МОЗ України, 2001. – 19 с.
7. Сирота Т. В. Новый подход в исследовании реакции автоокисления адреналина: возможность полярографического определения активности супероксиддисмутазы и антиоксидантных свойств различных препаратов / Сирота Т. В. // *Биомедицинская химия*. – 2012. – Т. 58, вып. 1. – С. 77–87.
8. Соловьев М. Е. Компьютерная химия / М. Е. Соловьев, М. М. Соловьев. – Москва : Солон-пресс, 2005. – 325 с.
9. Alov P. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds / P. Alov, I. Tsakovska, I. Pajeva // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2015. – № 15. – P. 85–104
10. Evaluation of the antiradical properties of phenolic acids / O. Koroleva, A. Torkova, I. Nikolaev [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – № 15. – P. 16351–16380.
11. Szeląg M. Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites / M. Szeląg, D. Mikulski, M. Molski // *J. Mol Model*. – 2012. – № 18. – P. 2907–2916.
12. Losartan-antioxidant hybrids: novel molecules for the prevention of hypertension-induced cardiovascular damage / G. García, P. M. Rodríguez, R. Alajarín [et al.] // *J Med Chem*. – 2009. – V. 52, № 22. – P. 7220–7227.

І. М. Ситник, М. В. Хайтович, П. А. Черновол

Антиоксидантна активність інгібіторів ангіотензину II та метаболітотропних кардіопротекторів за умов *in vitro* та *in silico*

Мета дослідження – порівняльна оцінка антиоксидантної активності (АОА) інгібіторів ангіотензину (АТ) II (лозартану, валсартану) та метаболітотропних кардіопротекторів (ацетилцистеїну, тіотриазоліну) на моделі інгібування супероксид-радикала *in vitro* та визначення залежності структура – антиоксидантна активність інгібіторів АТ II з використанням електронних дескрипторів *in silico*.

Визначення АОА проводили методом спектрофотометрії за ступенем інгібування супероксид-радикала, що утворюється в модельній системі *in vitro* при автоокисненні адреналіну в адренохром у лужному середовищі. Значення квантово-хімічних параметрів молекулярних структур ЛЗ розраховували з використанням напівемпіричного методу РМЗ.

Встановлено, що метаболітні кардіопротектори ацетилцистеїн та тіотриазолін виявляють АОА в широкому діапазоні концентрацій, 10^{-9} – 10^{-3} моль/л. Найбільшу АОА (79 %) має ацетилцистеїн у концентрації 10^{-6} моль/л, перевершуючи таку тіотриазоліну. З двох досліджених препаратів групи блокаторів рецепторів АТ II (валсартан, лозартан) лише лозартан характеризується наявністю АОА, яка становить 22,51 та 25,07 % за концентрацій 10^{-6} та 10^{-3} моль/л відповідно. За антиоксидантною активністю блокатор рецепторів АТ II лозартан значно поступається метаболітним кардіопротекторам – ацетилцистеїну та тіотриазоліну.

Квантово-хімічними розрахунками підтверджено, що лозартан за рахунок гідроксиметильного бічного ланцюга має властивості швидко захоплювати вільні радикали та віддавати протон водню з найменшою затратою енергії, що й пояснює його вищу АОА порівняно з валсартаном.

Ключові слова: антиоксидантна активність, тіотриазолін, ацетилцистеїн, лозартан, валсартан, електронні дескриптори

И. Н. Сытник, Н. В. Хайтович, П. А. Черновол

Антиоксидантная активность ингибиторов ангиотензина II и метаболитотропных кардиопротекторов в условиях *in vitro* и *in silico*

Цель исследования – сравнительная оценка антиоксидантной активности (АОА) ингибиторов ангиотензина (АТ) II (лозартана, валсартана) и метаболитотропных кардиопротекторов (ацетилцистеина и тиотриазолина) на модели ингибирования супероксид-радикала *in vitro* и определение зависимости структура – антиоксидантная активность ингибиторов АТ II с использованием электронных дескрипторов *in silico*.

Определение АОА проводили методом спектрофотометрии по степени ингибирования супероксид-радикала, который образуется в модельной системе *in vitro* при аутоокислении адреналина в адренохром в щелочной среде. Значения квантово-химических параметров молекулярных структур ЛС рассчитывали с использованием полуэмпирического метода PM3.

Установлено, что метаболитотропные кардиопротекторы ацетилцистеин и тиотриазолин проявляют АОА в широком диапазоне концентраций, 10^{-9} – 10^{-3} моль/л. Наибольшую АОА (79 %) имеет ацетилцистеин в концентрации 10^{-6} моль/л, превосходя тиотриазолин. Из двух исследованных препаратов группы блокаторов рецепторов АТ II (валсартан, лозартан) только лозартан характеризуется наличием АОА, которая составляет 22,51 та 25,07 % при концентрациях 10^{-6} и 10^{-3} моль/л соответственно. По антиоксидантной активности блокатор рецепторов АТ II лозартан значительно уступает метаболитным кардиопротекторам – ацетилцистеину и тиотриазолину.

Квантово-химическими расчетами подтверждено, что лозартан за счет гидроксиметильной боковой цепи имеет свойства быстро захватывать свободные радикалы и отдавать протон водорода с наименьшей затратой энергии, что и объясняет его более высокую АОА по сравнению с валсартаном.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, тиотриазолин, ацетилцистеин, лозартан, валсартан, электронные дескрипторы

I. M. Sytnik, M. V. Khaitovych, P. A. Chernovol

Antioxidant activity of angiotensin II inhibitors and metabotropic cardioprotectors under conditions *in vitro* and *in silico*

The aim of this work was a comparative assessment of antioxidant activity (AOA) of angiotensin (AT) II inhibitors (valsartan, losartan) and metabolic cardioprotectors (acethylcysteine, thiotriazolol) on the model of superoxide radical inhibition in vitro and determination of structure – antioxidant activity relationship of AT II inhibitors with application of electronic descriptors in silico.

Determination of AOA was carried out spectrophotometrically by the degree of superoxide radical inhibition, which is generated in a model test system of adrenaline autoxidation in an alkaline medium at a wavelength of 340 nm. The quantum-chemical computations of molecular structures of investigated compounds were calculated by semi-empirical method PM3.

It was determined that cardioprotectors – N-acethylcysteine and thiotriazolol demonstrate AOA at wide concentration range – of 10^{-9} M to 10^{-3} M. The highest AOA level (79 %) was fixed for N-acethylcysteine at 10^{-6} M surpassing thiotriazolol. Among AT II blockers such activity was detected for losartan only and amounted to 22,51 % and 25,07 % at the concentration of 10^{-6} M and 10^{-3} M respectively. AT II blocker losartan was considerably inferior to cardioprotectors as an antioxidant.

The quantum-chemical calculations confirmed that losartan has property of quick scavenging of free radicals and donating of hydrogen proton with minimum energy consumption due to its hydroxymethyl side chain, which explain the highest level of AOA compare to valsartan.

Key words: antioxidant activity, thiotriazolol, N-acethylcysteine, losartan, valsartan, electronic descriptors

Надійшла: 6 січня 2016 р.

Контактна особа: Ситник Інна Миколаївна, аспірант, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, буд. 39/1, вул. Шовковична, м. Київ, 01601. Тел.: +38 0 66 215 29 66. Електронна пошта: innasytnik10@gmail.com