

## СОВРЕМЕННАЯ МЕДИЦИНА И ФАРМАЦЕВТИКА

УДК 615.2, 615.31

### К ВОПРОСУ ОБ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА «ТАМЕРОН»

### ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE DRUG «TAMERON»

**Артём Михайлович Ермаков**

кандидат биологических наук  
заместитель начальника отдела контроля  
фармацевтической службы качества  
МОУ «ИИФ»

старший научный сотрудник  
Институт теоретической и  
экспериментальной биофизики РАН  
Адрес: 142210 Московская обл.,  
г. Серпухов, Большой Ударный пер., д. 1а  
Тел.: +7(4967) 35-31-93  
E-mail: ao\_ermakovy@rambler.ru

**Елена Александровна Царькова**

советник Генерального директора АО «Столетика»  
Адрес: 142210, Московская область,  
г. Серпухов, Большой Ударный пер., д. 1а  
Тел.: +7 (4967) 12-84-88  
E-mail: info@stoletika.ru

#### Аннотация

В статье проведены исследования прямой антиоксидантной активности препарата «ТАМЕРОН», который разработан на основе активной фармацевтической субстанции аминодигидрофталазиндиона натрия. С помощью метода регистрации хемилюминисценции прибором Биотокс 10М было показано, что данное вещество способно в физиологических условиях взаимодействовать и нейтрализовать активные формы кислорода, которые являются индукторами воспалительных процессов и выработки провоспалительных цитокинов. Таким образом, препарат «ТАМЕРОН» можно рекомендовать для купирования быстротекущих и массивных воспалительных процессов при лечении острого респираторного дистресс-синдрома, вызванного коронавирусной инфекцией COVID-19.

**Ключевые слова:** «ТАМЕРОН», аминодигидрофталазиндин натрия, антиоксидант, активные формы кислорода, хемилюминисценция.

#### Summary

The article studies the direct antioxidant activity of the drug «TAMERON», which was developed on the basis of the active pharmaceutical substance aminodihydrophthalazinedione sodium salt. Using the method of registration of chemiluminescence with the Biotox 10M device, it was shown that this substance is capable of interacting under physiological conditions and neutralizing reactive oxygen species, which are inducers of inflammatory processes and the production of pro-inflammatory cytokines. Thus, the drug «TAMERON» can be recommended for the relief of rapid and massive inflammatory processes in the treatment of acute respiratory distress syndrome caused by coronavirus infection COVID-19.

**Keywords:** «TAMERON», aminodihydrophthalazindione sodium salt, antioxidant, reactive oxygen species, chemiluminescence.

В МОУ «Институт инженерной физики» с 2015 года ведется разработка новой лекарственной формы препарата в виде лиофилизата на основе аминодигидрофталазиндиона натрия под торговой маркой «ТАМЕРОН» [1,2]. Данный препарат обладает мощным иммуностропным действием, в частности регулирует биологическую активность иммунных клеток, нормализует избыточный синтез провоспалительных цитокинов – TNF- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6 гиперактивированны-

ми макрофагами [3,4]. Как показывают исследования, все биологические свойства аминодигидрофталазиндиона натрия преимущественно связаны с его антиоксидантной активностью. Причем в литературе описывается механизм опосредованной активации антиоксидантных систем препаратом за счет стабилизации транскрипционного фактора Nrf2. Этот белок влияет на экспрессию генов, связанных с регуляцией окислительно-восстановительного баланса

клетки [5]. Но есть данные о том, что аминоксигидрофталазиндион натрия способен быстро подавлять окислительный стресс, развиваемый макрофагами в модельных экспериментах [3]. Очевидно, что в данном случае захват активных форм кислорода (АФК) препарат осуществляет напрямую, путем химического взаимодействия с радикалами.

Поэтому целью данного исследования являлось изучение прямой антиоксидантной активности препарата «ТАМЕРОН» в биологическом образце – крови и плазме человека в норме и при воздействии индуктора окислительного стресса – пероксида водорода.

### Материалы и методы

Работу выполняли на образцах крови, взятой и вены у здоровых доноров непосредственно перед экспериментом (общий объем – порядка 10 мл). В кровь, для предотвращения свертывания, добавляли антикоагулянт – натриевую соль ЭДТА (Sigma, США). Далее образец разделяли на 2 части (по 5 мл), одну из которых центрифугировали с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия) при ускорении 5000g для отделения форменных элементов крови и получения плазмы крови. Образец крови перед измерением разбавляли физиологическим раствором (0,9% раствор хлорида натрия) в пропорции (кровь:физраствор) 1:3 для придания меньшей вязкости жидкости. В работе при измерении сигналов хемилюминесценции использовали 1 мл разбавленной крови или 1 мл плазмы крови. В качестве контрольного образца использовали 1 мл физраствора.

Раствор изучаемого препарата «ТАМЕРОН» готовили из образца опытной партии лекарственного средства, изготовленного на производственной площадке МОУ «Институт инженерной физики». Для этого содержимое флакона с препаратом растворяли в 1 мл дистиллированной воды. При измерении сигнала хемилюминесценции в исследуемый образец вносили 10 мкл препарата «ТАМЕРОН» (конечная концентрация около 0,01 мг/мл). Это обеспечивало концентрацию препарата, в которой он находится при введении в организм человека. Для моделирования условий окислительного стресса использовали пероксид водорода. Рабочий раствор пероксида водорода (Реахим, Россия) готовили путем разбавления 30% исходного раствора вещества в дистиллированной воде до финальной концентрации 3% (эта концентрация соответствует раствору с молярностью 1 М). Пероксид водорода из рабочего раствора вносили в образец в объеме 100 мкл, что обеспечи-

вало его финальную концентрацию 100 мкМ. Эта концентрация пероксида водорода используется в биологических исследованиях в качестве индуктора окислительного стресса [6]. Для усиления эффекта генерации АФК пероксидом водорода использовали хлорид железа (II) (Реахим, Россия), который вносили в испытуемый образец в объеме 10 мкл (из исходного раствора в концентрации 1 М, приготовленного на дистиллированной воде) до финальной концентрации  $\text{FeCl}_2$  10 мкМ.

Для измерения хемилюминесценции аминоксигидрофталазиндиона натрия использовали прибор «Биотокс 10М» (ООО «НЕРА-С», Россия). Данный прибор позволяет производить измерение слабого свечения (хемилюминесценции) с помощью фотоумножителя. Полученные данные записывали с помощью программы, прилагаемой к устройству.

Процедура измерения хемилюминесценции пробы осуществлялась следующим образом. Образец (физраствор, кровь или плазма крови) в стеклянной пробирке (прилагаемой к прибору) помещался в кюветное отделение и далее в течение 5 минут проводили запись количества импульсов в секунду. После этого последовательно в образец добавляли раствор препарата «ТАМЕРОН», раствор пероксида водорода и раствор хлорида железа. Для этого, не останавливая записи показаний с прибора, открывали кюветное отделение и в образец вносили 10 мкл препарата «ТАМЕРОН». Далее записывали сигнал хемилюминесценции в течение 5 мин, затем в образец вносили 100 мкл раствора пероксида водорода и продолжали запись сигнала еще 5 мин. В раствор на финальной стадии измерений вносили 10 мкл  $\text{FeCl}_2$  и продолжали запись еще 5 мин. Каждую серию измерений проводили не менее 3-х раз. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы Sigma Plot 10 (США).

### Результаты и обсуждения

На *рисунке 1* представлены типичные результаты измерения хемилюминесценции образца физиологического раствора. Видно, что сам по себе раствор и раствор после добавления препарата «ТАМЕРОН» не обладает способностью к хемилюминесценции. При добавлении пероксида водорода к этой смеси наблюдался резкий всплеск регистрируемого сигнала, который затем не затухал в течение длительного времени (вплоть до 20 мин наблюдений).

При изучении сигнала, поступающего от образца крови или плазмы, наблюдалась несколько другая картина (*рисунки 2 и 3*). Как видно из

## СОВРЕМЕННАЯ МЕДИЦИНА И ФАРМАЦЕВТИКА

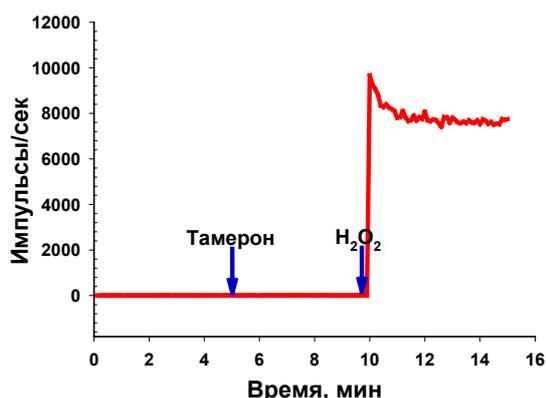
рисунка 2, сам образец разбавленной крови человека не обладал регистрируемой прибором собственной хемилюминесценцией. Добавление препарата «ТАМЕРОН» не приводило к изменениям в интенсивности регистрируемого сигнала и в отличие от физиологического раствора, последующее внесение пероксида водорода также не сопровождалось сколь-нибудь значимыми изменениями в интенсивности наблюдаемого сигнала. Напротив, добавление хлорида железа (II) приводило к настолько интенсивным сигналам, что по сути это были предельно-измеряемые значения светового излучения фотоумножителем прибора.

Аналогичные результаты были получены и при изучении образцов плазмы крови человека (рисунк 3). Внесение препарата «ТАМЕРОН» и пероксида водорода в исследуемый образец плазмы крови не сопровождалось изменением сигнала. Образцы плазмы крови человека начи-

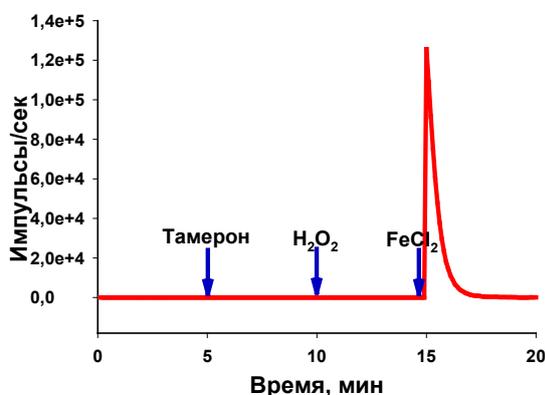
нали испускать кванты света только после добавления хлорида железа (II).

Известно, что хемилюминесценция люминола обусловлена его химическим взаимодействием с АФК (рисунк 4) [7]. В частности депротонированный ион люминола в растворе взаимодействует с одно или двух электронным окислителем, что приводит к образованию радикала люминола. Далее он превращается либо в азахинон, который переходит в окисленное промежуточное перекисное соединение, или при взаимодействии с гидропероксильным радикалом, или при непосредственном взаимодействии с супероксид радикалом. Последнее вещество нестабильно и претерпевает превращение в 3-аминофталевый дианион, причем электроны здесь находятся в триплетном состоянии, которое затем переходит в синглетное состояние. Возвращение электронов 3-аминофталевый дианиона из возбужденного состояния в нормальное сопровождается испусканием квантов света с длиной волны 425 нм. Описанная реакция люминола широко используется в криминалистике для обнаружения следов крови, а также в качестве для обнаружения различных аналитов в люминиметрических тест системах [8].

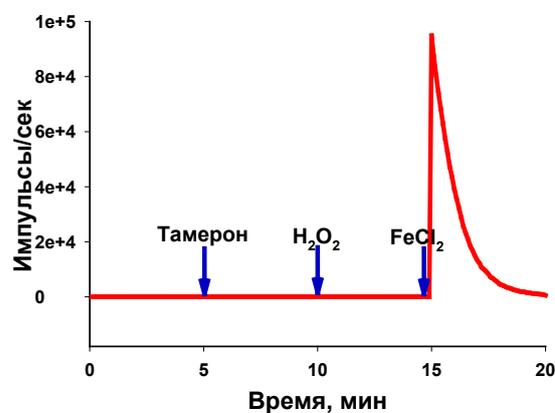
Важно отметить, что в случае люминола, реакция может происходить только в достаточно сильнощелочных условиях (при pH 8-10), которые клетке, межклеточной среде или крови не свойственны. Тогда как натриевая соль люминола, являющейся активной фармацевтической субстанцией препарата «ТАМЕРОН», способна диссоциировать с образованием аниона и при более низких значениях pH, близких к физиологическим. Из представленной схемы видно, что аминоксидогидрофалазиндион натрия напрямую взаимодействует с различными формами АФК.



**Рис. 1.** Хемилюминесценция физиологического раствора, измеренная люминиметром. Стрелками показано добавление препарата «ТАМЕРОН» (аминоксидогидрофалазиндиона натрия) и пероксида водорода ( $H_2O_2$ )



**Рис. 2.** Хемилюминесценция разбавленной физиологическим раствором крови человека, измеренная люминиметром. Стрелками показано добавление препарата «ТАМЕРОН» (аминоксидогидрофалазиндиона натрия), пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и хлорида железа (II) ( $FeCl_2$ )



**Рис. 3.** Хемилюминесценция плазмы крови человека, измеренная люминиметром. Стрелками показано добавление препарата «ТАМЕРОН» (аминоксидогидрофалазиндиона натрия), пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и хлорида железа (II) ( $FeCl_2$ )

Как показывают полученные в работе экспериментальные данные, в норме «ТАМЕРОН» в биологических жидкостях не проявляет реакционной способности, но при добавлении индуктора окислительного стресса – пероксида водорода, распад которого катализирован ионами двухвалентного железа (реакция Фентона), люминол натрия мгновенно вступает в химическую реакцию с выделением квантов света. Это указывает на то, что «ТАМЕРОН» может длительное время, не подвергаясь химическим изменениям, циркулировать в организме. При появлении же свободных АФК либо в локальных зонах (например, в очагах воспаления) или в системном кровотоке препарат способен их незамедлительно нейтрализовать. Стоит отметить, что «ТАМЕРОН» взаимодействует с наиболее токсичными для клетки радикалами – супероксид и гидропероксид анионами. Именно эти радикалы отвечают за дальнейшее развитие свободнорадикальной цепи и процессы перекисного окисления липидов мембран клеток, белков, других биологических структур и развитие окислительного стресса в целом [9].

## Заключение

Таким образом, проведенные в работе экспериментальные исследования показывают, что помимо описываемых в литературе механизмов антиоксидантной активности аминдигидрофталазиндиона натрия за счет опосредованной регуляции им экспрессии генов системы антиоксидантной защиты он способен непосредственно

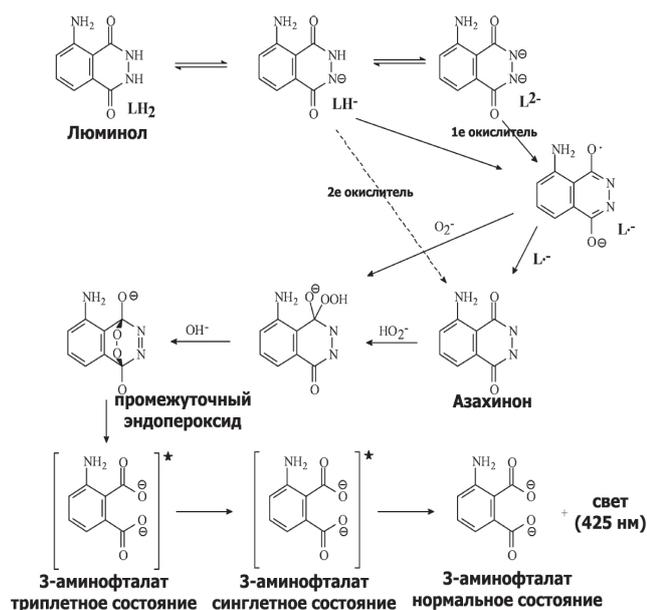


Рис. 4. Схема химического превращения люминола при взаимодействии со свободными радикалами (объяснение см. в тексте) [7]

участвовать в подавлении развития окислительного стресса. Учитывая химические свойства препарата «ТАМЕРОН», а также то, что ионизированная форма этого вещества способна образовываться и в физиологических условиях можно сделать вывод о том, что этот препарат способен напрямую, за счет химической реакции нейтрализовать активные формы кислорода, которые являются индукторами воспалительных процессов и выработки провоспалительных цитокинов. Это свойство препарата может быть важным для купирования быстротекущих и массивных воспалительных процессов. Например, «ТАМЕРОН» может с успехом применяться для лечения острого респираторного дистресс-синдрома, вызванного окислительным стрессом и цитокиновым штормом при тяжелом течении коронавирусной инфекции COVID-19.

## Литература

1. Царьков А.Н., Царькова Е.А. Инновационный препарат «ТАМЕРОН» // Известия Института инженерной физики, 2019. №4(54). С.111-115.
2. Царьков А.Н., Краснова Ю.В., Царькова Е.А. Технология производства иммуностропного инновационного препарата «ТАМЕРОН» // Известия Института инженерной физики, 2020. №2(56). С.82-86.
3. Мрикаев Б.М. Разработка физико-химических, клеточных и молекулярных моделей изучения эффектов нового отечественного иммуномодулятора «Галавит» (Экспериментальное исследование): дисс. канд. мед. наук. М., 2005. 138 с.
4. Сологуб Т.В., Осинцев О.Ю. Применение иммуномодулирующего препарата «Галавит» в комплексной терапии гриппа // Клиницист, 2012. №2. С.76-81.
5. Scofield V.L., Yan M., Kuang X., Kim S.J., Wong P.K. The drug monosodium luminol (GVT) preserves crypt-villus epithelial organization and allows survival of intestinal T cells in mice infected with the ts1 retrovirus // Immunol Lett., 2009. 122(2). P.150-158.
6. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress // Redox Biol., 2017. 11. P.613-619.
7. Barni F., Lewis S.W., Berti A., Miskelly G.M., Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection // Talanta, 2007. 72(3). P.896-913.
8. Khan P., Idrees D., Moxley M.A., Corbett J.A., Ahmad F., von Figura G., Sly W.S., Waheed A., Hassan M.I. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses // Appl Biochem Biotechnol., 2014. 173(2). P.333-55.
9. Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative Stress // Annu Rev Biochem., 2017. 86. P.715-748.