

Влияние бромфенака на свободнорадикальное окисление в модельных системах

Эльмира Фанисовна Галимова*, Зульфия Гатиятовна Хайбуллина,
Дамир Ахметович Еникеев, Юлия Львовна Борцова,
Константин Сергеевич Мочалов, Саида Шамилевна Галимова,
Олег Юрьевич Травников, Танзиля Салаватовна Асадуллина,
Кира Сергеевна Аверьянова

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

Реферат

Цель. Исследование процессов свободнорадикального окисления в эксперименте на модельных системах при использовании противовоспалительного препарата бромфенака (наквана), широко применяемого в офтальмологии для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний передней камеры глаза.

Методы. Антиокислительную способность препарата оценивали методом регистрации хемилюминесценции и анализа модельных систем, генерирующих активные формы кислорода и воспроизводящих процессы перекисного окисления липидов с помощью хемилюминомера ХЛ-003. Определяли следующие параметры спонтанной и индуцированной хемилюминесценции: светосумму и максимальную амплитуду свечения, продолжительность латентного периода, амплитуду быстрой и медленной вспышки.

Результаты. При тестировании *in vitro* в двух разных вариантах модельных систем установлена высокая антиоксидантная активность исследуемого препарата, вплоть до полного подавления хемилюминесценции при добавлении 90 мкг бромфенака в инкубационную среду, что свидетельствует об угнетении процессов генерации активных форм кислорода. Продемонстрировано также достоверное увеличение суммарной антиокислительной активности на фоне бромфенака, о чём судили по величине интегрального параметра хемилюминесценции — светосуммы свечения, которая снижалась при введении 10 мкг препарата в 1,2 раза, а 90 мкг — в 1,5 раза. При сравнительном анализе антиоксидантных свойств различных нестероидных противовоспалительных средств, используемых в офтальмологической практике, продемонстрирована более выраженная эффективность бромфенака на фоне кеторолака, применение которого не сопровождалось статистически значимыми изменениями хемилюминесценции. Принципиально важная особенность механизма позитивного влияния бромфенака — прямая зависимость характера действия от его количества в реакционной среде, что открывает перспективы управляемой коррекции свободнорадикальных явлений и избыточной активации перекисного окисления липидов при нарушении баланса про- и антиоксидантных процессов в биологических системах.

Вывод. Сделано предположение, что протективные эффекты препарата при различных инфекционно-воспалительных поражениях глаз могут быть детерминированы — наряду с ранее известными свойствами, его антиоксидантной активностью, ограничением повышенного образования активных форм кислорода и явлений окислительного стресса.

Ключевые слова: офтальмология, бромфенак, окислительный стресс, свободнорадикальное окисление, хемилюминесценция.

Для цитирования: Галимова Э.Ф., Хайбуллина З.Г., Еникеев Д.А. и др. Влияние бромфенака на свободнорадикальное окисление в модельных системах. *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (4): 636–641. DOI: 10.17816/KMJ2019-636.

Effect of bromfenac on free radical oxidation in model systems

E.F. Galimova, Z.G. Khaibullina, D.A. Enikeev, Yu.L. Bortsova, K.S. Mochalov, S.Sh. Galimova,
O.Yu. Travnikov, T.S. Asadullina, K.S. Aver'yanova
Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Abstract

Aim. The study of free radical oxidation processes in an experiment on model systems using the anti-inflammatory drug bromfenac (nakwan) widely used in ophthalmology for the treatment of infectious and inflammatory diseases of the anterior chamber of the eye.

Methods. The antioxidant capacity of the drug was evaluated by chemiluminescence registration and analysis of model systems that generate reactive oxygen species and reproduce lipid peroxidation processes using the chemiluminomer CL-003. The following parameters of spontaneous and induced chemiluminescence were determined: light sum and maximum luminescence amplitude, duration of latent period, amplitude of fast and slow flash.

Results. When tested *in vitro* in two different model systems, a high antioxidant activity of the studied drug was established, up to complete suppression of chemiluminescence when 90 µg of bromfenac was added to the incubation medium, which characterizes the inhibition of the generation of reactive oxygen species. A significant increase in total antioxidant activity with bromfenac was also demonstrated, which is reflected by the integral parameter of chemiluminescence — light sum which decreased with the introduction of 10 µg of the drug by 1.2 times, and with 90 µg by 1.5 times. A comparative analysis of the antioxidant properties of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs used in ophthalmic practice demonstrated a more pronounced efficacy of bromfenac compared to ketorolac, the use of which was not accompanied by statistically significant changes in chemiluminescence. A very important mechanism of the positive effect of bromfenac is the direct dependence of the action on its quantity in the reaction medium, which opens up prospects for the controlled correction of free radical phenomena and the excessive activation of lipid peroxidation in the imbalance of the pro- and antioxidant processes in biological systems.

Conclusion. It is suggested that the protective effects of the drug in various infectious-inflammatory lesions of the eye can be determined, along with previously known properties, its antioxidant activity, restriction of increased production of reactive oxygen species and oxidative stress phenomena.

Keywords: ophthalmology, bromfenac, oxidative stress, free radical oxidation, chemiluminescence.

For citation: Galimova E.F., Khaibullina Z.G., Enikeev D.A. et al. Effect of bromfenac on free radical oxidation in model systems. *Kazan medical journal*. 2019; 100 (4): 636–641. DOI: 10.17816/KMJ2019-636.

Воспалительные процессы сосудистого тракта передней камеры глаза составляют от 7 до 30% в общей структуре заболеваний глаз [1]. Наиболее часто они возникают у людей молодого возраста в связи с активным применением контактных линз, приводящим к воспалительным процессам передней камеры и снижению зрительной функции. Инфекционно-воспалительные заболевания переднего отрезка глаза могут развиться и как осложнение острых респираторных вирусных инфекций, например при аденовирусной инфекции, и при наличии определённых факторов риска, в частности при снижении местного и общего иммунитета.

Современная офтальмология основывается на разработке безопасных методов лечения, а также активном внедрении неинвазивных диагностических подходов. Существуют критерии для препаратов, применяемых в офтальмологической практике:

- во-первых, высокая бактерицидная активность, быстрое проникновение в переднюю камеру глаза, склеру, цилиарное тело;
- во-вторых, хорошая переносимость и отсутствие неприятных ощущений при применении;
- в-третьих, осмолярность препарата, вязкость и водородный показатель (рН) должны соответствовать показателям слёзной жидкости [2].

Предметом наших исследований стал поиск объективного метода диагностики динамики воспалительных изменений передней камеры глазного яблока на фоне лекарственной коррекции. Был использован широко применяемый в офтальмологической практике препарат бромфенак.

Офтальмологический раствор бромфенака (наквана) служит нестероидным противовоспалительным препаратом, уникальность которого заключается в химической структуре, что определяет его выраженные ингибирующие свойства в отношении циклооксигеназы-2 и высокую липофильность, которая позволяет быстро проникать во все ткани глаза и поддерживать в них постоянную концентрацию [3–5]. На клиническом уровне данные фармакокинетические свойства проявляются в быстром уменьшении выраженности воспалительного процесса и купировании боли.

Бромфенак эффективен как в монотерапии, так и в комбинации со стероидами. Впервые исследования данного препарата были проведены Ohara и соавт., которые использовали его для профилактики миоза во время оперативного вмешательства по экстракции катаракты и установили, что бромфенак обладает выраженным антимиотическим эффектом [6].

Вместе с тем, молекулярные механизмы антиокислительного действия бромфенака

остаются не вполне ясными, что послужило предпосылкой для выполнения настоящего исследования. В частности, в литературе не освещено его влияние на свободнорадикальные процессы *in vitro* в модельных системах, что представляет интерес для комплексной оценки его эффективности.

Оценку влияния бромфенака на свободнорадикальные процессы проводили посредством хемилюминесцентного анализа в модельных системах, генерирующих активные формы кислорода, с использованием портативного хемилюминомера ХЛ-003 [7]. Перед измерением свечения исследуемый объём 0,09% раствора препарата смешивали с 2 мл изотонического раствора натрия хлорида, содержащего люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион) в конечной концентрации 10^{-5} М, помещали в светоизолированную камеру прибора, перемешивали и вели запись хемилюминесценции (ХЛ) при 37 °С в течение 5 мин.

Для регистрации Fe^{2+} -индуцированной ХЛ препарат добавляли к модельной системе, генерирующей активные формы кислорода. Образование активных форм инициировали введением 1 мл 50 мМ раствора сульфата железа. Конечная концентрация $FeSO_4$ в среде инкубации составляла 2,5 мМ. Реакция сопровождалась ХЛ, избирательно усиливающейся в присутствии люминола. Запись свечения проводили в течение 5 мин при постоянном перемешивании.

При оценке Fe^{2+} -индуцированной ХЛ определяли величину спонтанного свечения, продолжительность латентного периода от момента введения ионов железа до начала развития медленной вспышки. Оценивали также амплитуду быстрой и медленной вспышки. Об интенсивности люминол-зависимой ХЛ судили по светосумме и максимальной амплитуде свечения, которые соответствовали скорости образования активных форм кислорода.

Антиокислительную активность препарата в биологической среде тестировали при его добавлении к липидам, полученным из куриного желтка, содержащего липопротеиновые комплексы, сходные с липидами крови. Желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5, гомогенизировали, доводили содержание белка до 1 мг/мл последовательным разведением (в среднем 25 мл гомогената на 1 л буфера). Отбирали 20 мл смеси, ХЛ инициировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сульфата железа при постоянном перемешивании, что приводило к окислению ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов.

Для статистической обработки использовали пакет прикладных программ Statistica 10.0 for Windows (StatSoft, Inc.). Данные обработаны непараметрическими методами и представлены в виде средней арифметической величины (М) и стандартной ошибки средней арифметической (m). Различия изучали с использованием U-теста Манна–Уитни. Достоверными считали результаты при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Информативным и удобным способом оценки изменения свободнорадикальных процессов служит измерение ХЛ — свечения, возникающего при образовании свободных радикалов в биологических образцах и тест-системах. Судить о про- или антиокислительной активности препаратов *in vitro* можно по изменению интенсивности ХЛ при добавлении в модельные системы [8].

Полученные данные (рис. 1) свидетельствуют о высокой антиокислительной активности препарата: добавление бромфенака в среду инкубации в количестве от 5 до 90 мкг значительно подавляет свечение модельной системы. Отметим, что в офтальмологической практике бромфенак назначают в виде инсталляций в конъюнктивальный мешок по 1 капле 0,9% раствора однократно, то есть разовая доза препарата составляет ориентировочно 45 мкг. Следовательно, бромфенак обладает антиоксидантной активностью в концентрациях, близких к дозе, используемой при лечении воспалительных процессов в передней камере глаза.

Антиокислительный эффект был дозозависимым: с повышением количества изучаемого препарата происходило снижение интенсивности ХЛ вплоть до полного подавления свечения, что открывает возможности для управления свободнорадикальными процессами путём изменения его уровня.

Для выявления антиокислительных эффектов бромфенака в биологической среде была дана оценка его действия на перекисное окисление липидов. С этой целью препарат добавляли к липидам куриного белка, сходным по составу с липидами крови.

На представленных записях видно, как уменьшаются показатели медленной вспышки при добавлении бромфенака (рис. 2), то есть антиокислительные свойства сохраняются и в биологической среде.

В качестве интегрального параметра интенсивности ХЛ рассматривают светосумму свечения, которую регистрируют в течение 5 мин инкубации. Показатели люминол-зависимой ХЛ представлены в табл. 1.

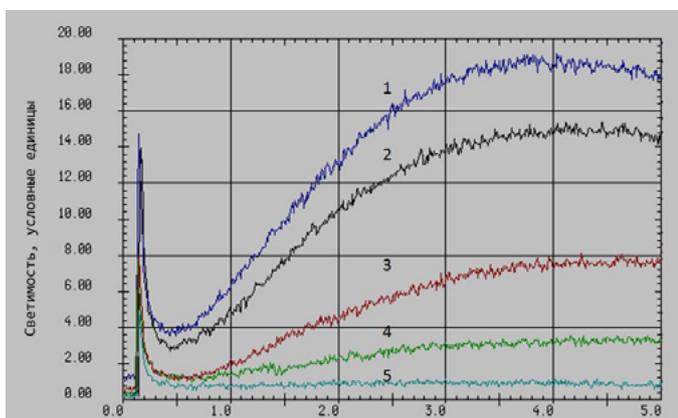


Рис. 1. Запись хемилюминесценции в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода, при добавлении бромфенака: 1 — контроль; 2 — 5 мкг; 3 — 10 мкг; 4 — 30 мкг; 5 — 90 мкг

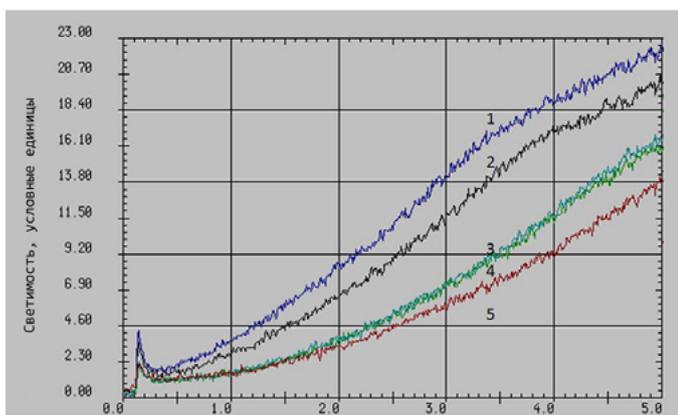


Рис. 2. Запись хемилюминесценции в модельной системе, инициирующей реакции перекисного окисления липидов, при добавлении бромфенака: 1 — контроль; 2 — 5 мкг; 3 — 10 мкг; 4 — 30 мкг; 5 — 90 мкг

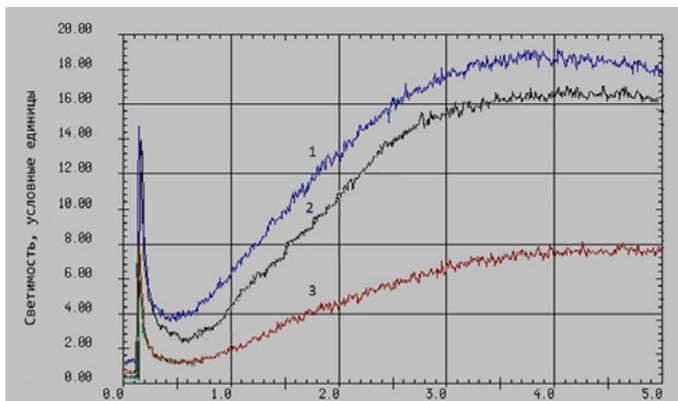


Рис. 3. Запись хемилюминесценции в модельной системе, генерирующей активные формы кислорода, при добавлении 10 мкг бромфенака (3), 45 мкг кеторолака (2); отдельно представлен контроль (1)

Исследование суммарной антиокислительной активности при добавлении разных доз препарата выявило достоверные различия между показателями светосуммы, которые на фоне бромфенака в дозе 10 мкг снижались более чем в 1,2 раза, 90 мкг — в 1,5 раза. Показано, что величина светосуммы ХЛ определяет потенциальную способность липидов подвергаться окислению [7].

Приблизительно в той же степени под влиянием протестированных доз уменьшались значения максимальной светимости, что указывает на повышение антиокислительной ак-

тивности. Данные различия свидетельствуют о том, что бромфенак при применении *in vivo* может усиливать защитные свойства слезной жидкости благодаря повышению уровня суммарной антиокислительной активности.

В патогенезе воспаления тканей глаза особое место принадлежит арахидоновой кислоте, которая при участии изоферментов циклооксигеназы-1 и -2 быстро превращается в эйкозаноиды, прежде всего в простагландины — одни из самых важных липидных медиаторов воспаления [9]. В свою очередь арахидоновая кислота образуется из мембранных фосфолипидов

Таблица 1. Уровень люминол-зависимой хемиллюминесценции в модельной системе при добавлении бромфенака (усл.ед.), n=30

Параметр	Контроль	Бромфенак, 10 мкг	p	Бромфенак, 90 мкг	p
Светосумма	3,5±0,15	2,8±0,21	0,008815	2,3±0,19	0,000007
Спонтанная светимость	1,12±0,05	1,3±0,2	0,386257	0,8±0,19	0,108880
Максимальная светимость	1,54±0,05	1,2±0,17	0,060031	1,1±0,1	0,000228

Примечание: в таблицах результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая величина; m — стандартная ошибка средней арифметической; p — уровень статистической значимости различий.

Таблица 2. Уровень люминол-зависимой хемиллюминесценции в модельной системе при добавлении кеторолака (усл.ед.), n=30

Параметр	Контроль	Кеторолак, 45 мкг	p	Кеторолак, 450 мкг	p
Светосумма	3,6±0,13	3,3±0,19	0,19	3,2±0,22	0,12
Спонтанная светимость	1,05±0,04	1,1±0,12	0,69	0,9±0,11	0,20
Максимальная светимость	1,47±0,06	1,3±0,13	0,24	1,2±0,14	0,08

при участии фосфолипазы A_2 и представляет собой источник для синтеза различных типов простагландинов. Простагландины вызывают повышение проницаемости сосудов передней камеры с увеличением концентрации белка во внутриглазной жидкости, тем самым повышая внутриглазное давление с последующим увеличением проницаемости гематофтальмического барьера.

Постулируемый механизм действия бромфенака заключается в ингибировании циклооксигеназы-2. В некоторых работах утверждают, что раствор бромфенака клинически эффективен не только для лечения глазного воспаления и уменьшения глазной боли после удаления катаракты (стандартного назначения, одобренного в настоящее время в США), но и в ряде других терапевтических и хирургических ситуаций [10].

Сравнительные исследования безопасности, фармакокинетики и фармакодинамики бромфенака и аналогичных нестероидных противовоспалительных препаратов выявили его преимущества в отношении подавления образования простагландина E_2 при различных патологических состояниях, а также высокую эффективность в низких концентрациях при меньшей частоте введения и более доступной стоимости [11, 12].

Установленные в нашей работе сведения о выраженной антиоксидантной активности бромфенака демонстрируют неизвестные и не описанные ранее в литературе свойства соеди-

нений этого ряда, что открывает новые потенциальные области их применения.

В этой связи примечательны результаты выполненной нами сравнительной оценки антиоксидантной характеристики бромфенака и кеторолака, также относящегося к классу нестероидных противовоспалительных препаратов и используемого в глазной практике (рис. 3).

Как следует из этих данных, кеторолак обладает низкой антиоксидантной активностью, его нельзя рассматривать как средство нормализации окислительно-восстановительных процессов при офтальмологической патологии.

Столь же неэффективен был кеторолак и в отношении влияния на суммарную антиоксидантную активность (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии его способности нормализовать антиоксидантную ёмкость системы при угрозе развития окислительного стресса.

Следовательно, в условиях наших экспериментов обнаружено, что противовоспалительные свойства бромфенака могут быть обусловлены не только изменением активности циклооксигеназы, но и модуляцией баланса про- и антиоксидантных систем.

ВЫВОДЫ

1. При тестировании бромфенака в модельных системах установлена дозозависимая антиоксидантная активность. Полученные данные свидетельствуют о необходимости подбора оптимальной дозы препарата, использова-

ние которой не будет инициировать нарушений баланса между образованием активных форм кислорода и антиоксидантной способностью.

2. В перспективе появляется возможность для контроля свободнорадикальных процессов в широком диапазоне концентраций, что после проведения дополнительных исследований позволит рекомендовать использование данного препарата в качестве средства нормализации про- и антиоксидантного баланса в передней камере глаза при инфекционно-воспалительных процессах.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев О.И., Суоров А.В., Акентьева Е.В. Особенности верификации воспалительных заболеваний глаз. *Офтальмол. ведомости*. 2014; 7 (2): 13–17. [Lebedev O.I., Suorov A.V., Akent'eva E.V. Features of ophthalmic inflammatory diseases results of a federal study. *Ophthalmologicheskie vedomosti*. 2014; 7 (2): 13–17. (In Russ.)]
2. Rajpal R.K., Ross B., Rajpal S.D., Hoang K. Bromfenac ophthalmic solution for the treatment of postoperative ocular pain and inflammation: safety, efficacy, and patient adherence. *Patient Preference and Adherence*. 2014; 25 (8): 925–931. DOI: 10.2147/PPA.S46667.
3. Cho H., Wolf K., Wolf E. Management of ocular inflammation and pain following cataract surgery: focus on bromfenac ophthalmic solution. *Clin. Ophthalmol.* 2009; 3: 199–210. DOI: 10.2147/OPTH.S4806.
4. Hoy S. Bromfenac ophthalmic solution 0.07%: A review of its use after cataract surgery. *Clin. Drug Invest.* 2015; 35 (8): 525–529. DOI: 10.1007/s40261-015-0309-3.
5. Sheppard J., Cockrum P., Justice A., Jasek M. *In vivo* pharmacokinetics of Bromfenac ophthalmic solution 0.075%, Bromfenac ophthalmic solution 0.07%, and Nepafenac/Amfenac ophthalmic suspension 0.3% in rabbits. *Ophthalmol. Therap.* 2018; 7 (1): 157–165. DOI: 10.1007/s40123-018-0130-1.
6. Ohara K., Ohkubo A., Miyamoto T. et al. Prevention of miosis during cataract surgery by topical bromfenac sodium. *Rinsho Ganka (Jpn. J. Clin. Ophthalmol.)*. 2004; 58: 1325–1328.
7. Фархутдинов Р.Р., Галимов Ш.Н., Галимова Э.Ф. Свободнорадикальное окисление в норме и патологии. *Практикующий врач сегодня*. 2010; 2: 54–61. [Farkhutdinov R.R., Galimov Sh.N., Galimova E.F. Free radical oxidation in health and disease. *Praktikuyushchiy vrach segodnya*. 2010; 2: 54–61. (In Russ.)]
8. Азнабаев Б.М., Янбухтина З.Р., Мухамадеев Т.Р. и др. Влияние витальных красителей для офтальмохирургии на свободнорадикальное окисление в модельных системах. *Практич. мед.* 2017; 2 (9): 12–15. [Aznabaev B.M., Yanbukhtina Z.R., Mukhamadeev T.R. et al. Effect of vital dyes for ophthalmic surgery on free-radical oxidation in model systems. *Practicheskaya Meditsina*. 2017; 2 (9): 12–15. (In Russ.)]
9. Ahuja M., Dhake A., Sharma S., Majumdar D. Topical ocular delivery of NSAIDs. *AAPSJ*. 2008; 10: 229–241. DOI: 10.1208/s12248-008-9024-9.
10. Walters T., Smyth-Medina R., Cockrum P. An *ex vivo* human aqueous humor-concentration comparison of two commercial bromfenac formulations. *Clin. Ophthalmol.* 2018; 12: 943–947. DOI: 10.2147/OPTH.S170540.
11. Jones B., Neville M. Nepafenac: an ophthalmic non-steroidal antiinflammatory drug for pain after cataract surgery. *Ann. Pharmacotherap.* 2013; 47 (6): 892–896. DOI: 10.1345/aph.1R757.
12. Chinchurreta Capote A.M., Lorenzo Soto M., Rivas Ruiz F. et al. Comparative study of the efficacy and safety of bromfenac, nepafenac and diclofenac sodium for the prevention of cystoid macular edema after phacoemulsification. *Intern. J. Ophthalmol.* 2018; 11 (7): 1210–1216. DOI: 10.18240/ijo.2018.07.22.