

## Сравнительное изучение влияния биогенных стимуляторов на образование радикалов кислорода фагоцитами крови пациентов с сердечной недостаточностью в условиях *in vitro*

Асташкин Е.И., Круглова М.П., Глезер М.Г., Орехова Н.С., Новикова А.Н., Грачев С.В.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова. Москва, Россия

**Цель.** Изучить влияние биогенных стимуляторов Актовегина и Зифодина (депротеинизированные гемодериваты крови телят) на образование радикалов кислорода фагоцитами крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

**Материал и методы.** Образование радикалов кислорода регистрировали по люцигенин-зависимой хемилюминисценции на люминометре "Биотокс-7" (Россия) у 20 пациентов с ХСН II-III функциональных классов по NYHA. Оценивали хемилюминисценцию базальную и стимулированную форболовым эфиром (РМА), а также ингибиторную активность Актовегина и Зифодина.

**Результаты.** У пациентов с ХСН в крови наблюдалось "спонтанное" образование супероксид анион радикалов, что отражает наличие преактивированных фагоцитов. Определялось также выраженное увеличение уровня радикалов кислорода в ответ на добавление РМА (1 мкМ). Выраженность этого ответа дозозависимым образом подавлялась добавлением Актовегина и Зифодина. При сочетанном применении Актовегина и Зифодина на фоне действия РМА был зарегистрирован аддитивный ингибиторный эффект, который

не зависел от последовательности присоединения этих лекарственных препаратов.

**Заключение.** Актовегин и Зифодин снижают образование радикалов кислорода фагоцитами, выделенными из крови пациентов с ХСН. Аддитивность ингибиторных эффектов Актовегина и Зифодина свидетельствует об отсутствии идентичности их состава и невозможности переноса данных об эффективности и безопасности результатов, полученных в клинической практике при использовании Актовегина на Зифодин.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, фагоциты крови, хроническая сердечная недостаточность, поликомпонентные лекарственные препараты.

Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2014; 13(5): 58–63  
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2014-5-58-63>

Поступила 16/09-2014

Принята к публикации 01/10-2014

## Comparison study of biogenic stimulators influence on reactive oxygen species formation by blood phagocytes in patients with heart failure *in vitro*

Astashkin E. I., Kruglova M. P., Glezer M. G., Orekhova N. S., Novikova A. N., Grachev S. V.  
First Moscow State Medical University n.a. I. M. Sechenov. Moscow, Russia

**Aim.** To study the influence of biogenic stimulators Actovegin and Zifodine (deproteinized hemodrivates of calf blood) on reactive oxygen species formation by blood phagocytes in patients with chronic heart failure (CHF).

**Material and methods.** Reactive oxygen species formation was registered by lucigenine-dependent chemiluminescence on the luminometer "Biotox-7" (Russia) in 20 patients with CHF of II-III functional classes by NYHA. The hemiluminiscences basal and stimulated by farbolic ether (RMA) were measured, as also inhibitory activity of Actovegin and Zifodine.

**Results.** In CHF patients' blood there was "spontaneous" secretion superoxide anion radicals, that is showing presence of preactivated phagocytes. In addition, a significant increase of oxygen radicals is shown as a response to RMA (1 mcM). Actovegin and Zifodine dose-dependently suppressed prominence of the response. While

concomitantly applied Actovegin and Zifodine at the RMA background there was additive inhibitory effect found, which was not depended on consequence of additives.

**Conclusion.** Actovegin and Zifodine decrease reactive oxygen species secretion by phagocytes, which are extracted from the blood of CHF patients. Addictiveness of such inhibitory effects of Actovegin and Zifodine shows absence of their identity by structure and of improper translation of this data into conclusions on effectiveness and safety, found in clinical practice while prescribing Actovegin and Zifodine.

**Key words:** active oxygen species, blood phagocytes, chronic heart failure, polycomponent drugs.

Cardiovascular Therapy and Prevention, 2014; 13 (5): 58–63  
<http://dx.doi.org/10.15829/1728-8800-2014-5-58-63>

АТФ – аденозинтрифосфат, КМЦ – кардиомиоциты, ФК – функциональный класс, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, SOD – супероксид дисмутаза, РМА – phorbol miristat acetate – форбол мириститат ацетат – стимулятор протеин киназы С (PKC).

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Тел./факс: +7 (495) 622-96-01

e-mail: 287ast@mail.ru

[Асташкин Е.И. – д.б.н., профессор кафедры патологии, заведующий лабораторией экстремальных состояний НИЦ, Круглова М.П. – ассистент кафедры патологии, Глезер М.Г. – д.м.н., профессор кафедры профилактической и неотложной кардиологии, заведующая лабораторией функциональных методов исследования и рациональной фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний НИЦ, Орехова Н.С. – к.м.н., с.н.с. лаборатории экстремальных состояний НИЦ, Новикова А.Н. – лаборант-исследователь лаборатории экстремальных состояний НИЦ, Грачев С.В. – д.м.н., академик РАН, заведующий кафедрой патологии].

Синдром хронической сердечной недостаточности (ХСН) связан с нарушением сократительной активности сердца и возникает при разнообразных патологиях сердечно-сосудистой системы, в т.ч. артериальной гипертензии, после инфаркта миокарда, в результате миокардитов, при хроническом увеличении нагрузки на сердце, ишемии, токсических воздействиях [1]. ХСН характеризуется нарушением энергетического обмена, уменьшением синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), гипертрофией, ремоделированием и дилатацией сердца, снижением фракции выброса, падением кровоснабжения различных органов и тканей, включая сердце [2, 3]. ХСН сопровождается окислительным стрессом, когда радикалы кислорода образуются фагоцитами, поступающими из крови в пораженную ткань, или генерируются непосредственно в кардиомиоцитах (КМЦ) и выступают в качестве цитотоксических агентов, которые вызывают гибель клеток [4]. Однако клинические исследования, посвященные изучению способности антиоксидантов снижать заболеваемость и смертность при ХСН, закончились неудачно [3]. Причиной такого результата может быть сложная природа эффектов, которые радикалы кислорода оказывают на клетки сердца. В последние годы было показано, что в то время, как высокие концентрации радикалов кислорода повреждают дезоксирибонуклеиновую кислоту, белки и липиды, в т.ч. входящие в структуру биомембран, более низкие уровни радикалов являются важными физиологическими регуляторами, участвующими в разнообразных клеточных реакциях и процессах (редокс сигнализации) [5, 6]. Установлено, что внутриклеточные радикал-зависимые сигнальные каскады в КМЦ связаны с такими жизненно важными процессами, как сопряжение между возбудимостью и сократимостью КМЦ, энергетическим обменом и метаболизмом. Нарушение редокс сигнализации выступает в качестве патофизиологической причины различных состояний, включая энергетическое голодание, изменение метаболизма, силы и эффективности сокращения, аритмии [7]. Процессы ремоделирования сердца при ХСН контролируются разнообразными внутриклеточными сигнальными каскадами, запускаемыми внеклеточными воздействиями: ангиотензином II, эндотелином-1, норадреналином, натрийуретическими пептидами, инсулиноподобным фактором роста, гипоксией, цитокинами, перегрузкой давлением [6]. Радикалы кислорода модулируют активность внутриклеточных каскадов, индуцированных внеклеточными стимулами. Под влиянием активных форм кислорода — радикалы кислорода и пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), сигнальные ферментативные каскады, влияющие, в конечном итоге, на активность генов, могут как усиливаться, так и ослабевать [7].

В сердце радикалы кислорода образуются в разных источниках, включая внутриклеточные ферменты — ксантин оксидаза, разобщенные формы NO-синтаз, липоксигеназы и др., систему цитохромов P-450 и митохондрии, однако ведущая роль принадлежит различным изоформам НАДФН — никотинамид аденин динуклеотид фосфат (восстановленный) оксидазного ферментативного комплекса, которые не только отличаются по структуре и функциям, но и регулируются по разным механизмам. Помимо этого, важную роль в радикал-зависимом состоянии сердца, а также гибели КМЦ играют фагоциты крови, мигрирующие в пораженные участки миокарда при ишемии, воспалении и других патологических процессах, протекающих в сердечно-сосудистой системе [4]. Отсюда следует, что замедлить развитие гипертрофии миокарда, ремоделирования сердца и ХСН с помощью снижения генерации радикалов кислорода в результате действия одного химического агента невозможно. В связи с этим значительный интерес представляет использование природных, а также созданных искусственно поликомпонентных препаратов, действующих на разные механизмы и этапы редокс сигнализации. Одним из таких поликомпонентных препаратов является Актовегин, который представляет собой ультрафильтрат крови телят [8]. В состав Актовегина входит ~200 компонентов с молекулярной массой  $\leq 5$  кДа. В связи с комплексной природой препарата, изучить фармакокинетику и фармакодинамику его биологически активных компонентов невозможно. Механизм действия Актовегина носит сложный плейотропный характер, что определяет его применение при разных патологиях, включая нарушение периферического и церебрального кровообращения, ожогах, плохо заживающих ранах, радиационных повреждениях клеток, диабетической полинейропатии [8, 9]. Установлено, что Актовегин усиливает транспорт глюкозы в клетки, стимулирует клеточный энергетический метаболизм, увеличивает потребление кислорода в условиях ишемии. Актовегин ускоряет процесс заживления ран, тормозит образование язв голеней и нижних конечностей при диабетической полинейропатии у людей и лабораторных животных, уменьшает болезненное воспаление и изъязвление слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и ротовой полости при химио- и лучевой терапии опухолей [10-12].

В последние годы были продемонстрированы антиоксидантные эффекты Актовегина на первичной культуре нейронов гиппокампа крыс и других типах нейронов [9, 13], а также при генерации радикалов кислорода фагоцитами крови пациентов с СН [14, 15]. Кроме того, в этих же исследованиях было показано, что Актовегин подавлял развитие некроза и апоптоза клеток, индуцированных различными цитотоксическими стимулами.

Недавно на фармацевтическом рынке Китая появился препарат Зифодин (Zifodin), который в настоящее время зарегистрирован также и в некоторых странах СНГ. Производители Зифодина (компания Wuhan Humanwell Pharmaceuticals Co., Ltd.) утверждают, что этот продукт по составу идентичен Актовегину, в связи с чем многочисленные экспериментальные и клинические данные, полученные на Актовегине, можно однозначно перенести на Зифодин.

Принимая во внимание широкое применение Актовегина в клинической практике при различных патологических состояниях и заболеваниях, целью настоящего исследования было изучить в опытах *in vitro* на одних и тех же пробах влияние Актовегина и Зифодина на образование радикалов кислорода фагоцитами крови пациентов с ХСН II-III функциональных классов (ФК) по NYHA. Была также предпринята попытка (на основе наличия или отсутствия аддитивного эффекта на уровень радикалов кислорода при сочетанном использовании препаратов) установить потенциальную их идентичность.

## Материал и методы

В опытах использовали люцигенин, форболовый эфир – форбол миристат ацетат (РМА), супероксид дисмутаза (SOD), диметилсульфоксид, среду RPMI-1640 и среду Хенкса (все реагенты производства Sigma, США).

Критерии отбора пациентов для исследования:

- мужчины и женщины;
- возраст >18 лет;
- наличие клинических признаков ХСН ФК II-III

по классификации сердечной недостаточности Нью-Йоркской ассоциации сердца (New York Heart Association, NYHA).

В исследование не включали пациентов с острыми ишемическими заболеваниями: острый инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, острые воспалительные процессы, а также лиц, ранее (<3 мес. до исследования) получавших Актовегин, имеющих ХСН ФК I или IV и выраженные изменения функции почек и печени.

Всем были выполнены стандартные клинико-лабораторные и инструментальные исследования, на проведение которых все пациенты подписывали информированное согласие при поступлении в стационар.

В соответствии с критериями включения и не включения в ГКБ № 59 г. Москвы были отобраны 20 пациентов (10 женщин и 10 мужчин), средний возраст которых составил  $73 \pm 6,7$  года, в среднем фракция выброса, определенная в В режиме (аппарат Vivid 7, GE) составила  $42,8 \pm 4,1\%$ . Все больные были в стабильном состоянии (отсутствие изменений в состоянии или терапии в течение 7 сут, предшествующих исследованию). Все больные получали ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента,  $\beta$ -адреноблокаторы, петлевые диуретики. Девяти пациентам были назначены антагонисты альдостерона.

**Определение радикалов кислорода.** Спонтанное и индуцированное стандартным стимулятором образование радикалов кислорода регистрировали на хемилиуметре “Биотокс-7” (Россия). Измерения проводили

при 25° С. Образование супероксид-анионов ( $O_2^{\cdot -}$ ) регистрировали в непрерывном режиме, и выражали в числе импульсов в сек, а также оценивали по интегральным значениям хемилиуминесценции (светосумма за 10 с) [16].

Кровь для определения образования свободных радикалов кислорода в количестве 0,5-1,0 мл отбирали из образцов гепаринизированной (30 МЕ/мл) крови, взятых для проведения стандартного общепринятого лабораторного обследования пациентов. Из этой крови в кювету хемилиуминометра переносили 100 мкл крови, добавляли люцигенин (конечная концентрация 30 мкМ) и регистрировали “спонтанную” генерацию радикалов кислорода, возникающую в процессе взаимодействия клеток крови со стенкой кюветы, которая наблюдалась при наличии в крови исходно преактивированных (праймированных) фагоцитов крови.

Затем к пробе добавляли стандартный стимулятор (форболовый эфир – РМА -1 мкМ), амплитуда ответа которого принималась за 100% (контроль). На фоне действия РМА в кювету добавляли разные концентрации Актовегина для определения концентрационной зависимости его ингибиторного эффекта. Для каждой точки использовали от 4 до 7 повторных измерений. К другим пробам крови этого же пациента после регистрации “спонтанного” образования радикалов кислорода и стимуляции фагоцитов крови РМА добавлялся Зифодин, который также концентрационно-зависимым образом снижал уровень радикалов кислорода. В следующих сериях экспериментов на пробах крови одних и тех же пациентов было изучено влияние на образование свободных радикалов кислорода сочетанного действия Актовегина и Зифодина, Зифодина и Актовегина, которые добавляли в дозе 8 мг/мл после воздействия РМА.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с применением программы SigmaPlot. Данные представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Межгрупповые различия оценивали по значению *t* – критерия Стьюдента для независимых выборок. Достоверными считали результаты при  $p < 0,05$ .

Работа выполнена в рамках программы, включенных в государственное задание по теме: “Изучение патофизиологических механизмов воспаления при сердечно-сосудистых заболеваниях (клинико-экспериментальные исследования)”.

## Результаты

При помещении пробы крови пациентов с ХСН в кювету хемилиуминометра наблюдалось “спонтанное” образование супероксид анион радикалов, которое возрастало со временем и подавлялось добавкой SOD. Такая реакция отражает наличие в пробе преактивированных фагоцитов, которые подвергаются стимуляции в результате адгезии на стенке кюветы.

Добавление РМА вызывало резкое увеличение генерации радикалов кислорода (в 3-5 раз). Последующая обработка пробы на фоне действия РМА Актовегином сопровождалась снижением уровня радикалов. Ингибиторный эффект Актовегина зависел от концентрации и у части пациентов (3% от всей группы) был зарегистрирован при кон-

центрации <1 мг/мл, однако у подавляющего большинства пациентов наблюдался при более высоких концентрациях. Достоверный ингибиторный эффект развивался при дозах Актовегина 2 мг/мл и более высоких. Кривая ингибиторного действия Актовегина выходила на насыщение при 4 мг/мл. Ингибиторный эффект Актовегина в зависимости от концентрации показан на рисунке 1.

Аналогичный ингибиторный эффект на фоне действия РМА оказывал Зифодин в том же диапазоне концентраций. Следует отметить, что ингибиторное действие Зифодина было менее выраженным по сравнению с Актовегином, но эти различия не достигали статистической значимости. Однако, как и Актовегин, Зифодин в концентрации 4 мг/мл приводил к максимальному ингибиторному эффекту, когда последующее его добавление не оказывало действия. Зависимость ингибиторного эффекта Зифодина от концентрации представлена на рисунке 2. Таким образом, как Актовегин, так и Зифодин при действии на одни и те же пробы крови пациентов, в одно и то же время проведения опытов в одинаковом диапазоне доз снижают уровень супероксид радикалов, индуцированный одним из самых сильных стимуляторов фагоцитов человека – РМА.

В серии опытов было изучено сочетанное действие Актовегина и Зифодина на уровень радикалов кислорода, генерируемый РМА-стимулированными фагоцитами крови пациентов с ХСН. Оказалось, что на фоне действия РМА, добавление сперва Актовегина, а затем Зифодина оказывало аддитивный ингибиторный эффект. В этих опытах использовались дозы Зифодина и Актовегина, которые вызывали максимально возможное снижение уровня радикалов кислорода (рисунок 3 А). Адди-

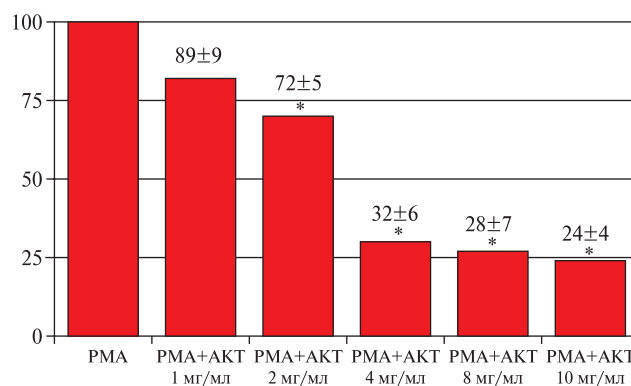


Рис. 1 Дозозависимый ингибиторный эффект Актовегина (АКТ) на фоне действия РМА.

Примечание: за 100% принята амплитуда ответа на РМА (1 мкМ). Актовегин в дозах  $\geq 2$  мг/мл вызывал достоверное снижение уровня радикалов кислорода (\* –  $p < 0,05$ ).

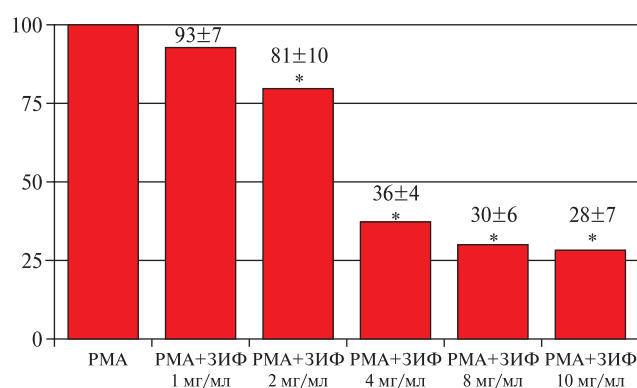


Рис. 2 Дозозависимый ингибиторный эффект Зифодина (ЗИФ) на фоне действия РМА.

Примечание: за 100% принята амплитуда ответа на РМА (1 мкМ). Зифодин в дозах  $\geq 2$  мг/мл вызывал достоверное снижение уровня радикалов кислорода (\* –  $p < 0,05$ ).

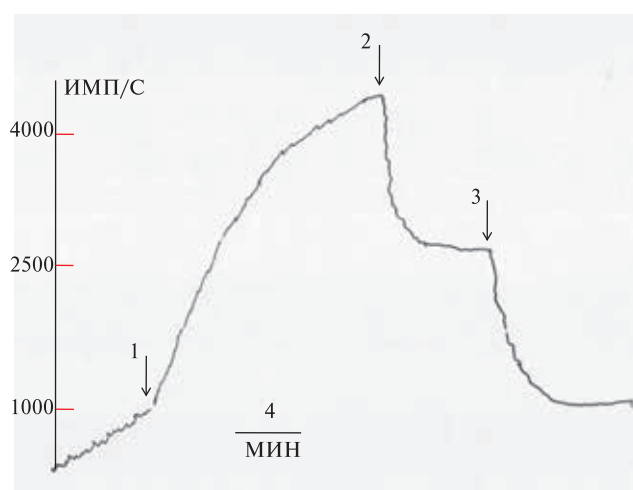


Рис. 3А Комбинированное влияние Актовегина (2) и Зифодина (3) на уровень радикалов кислорода, индуцированный РМА (1).

Примечание: 1 – РМА (1 мкМ); 2 – Актовегин (8 мг/мл); 3 – Зифодин (8 мг/мл).

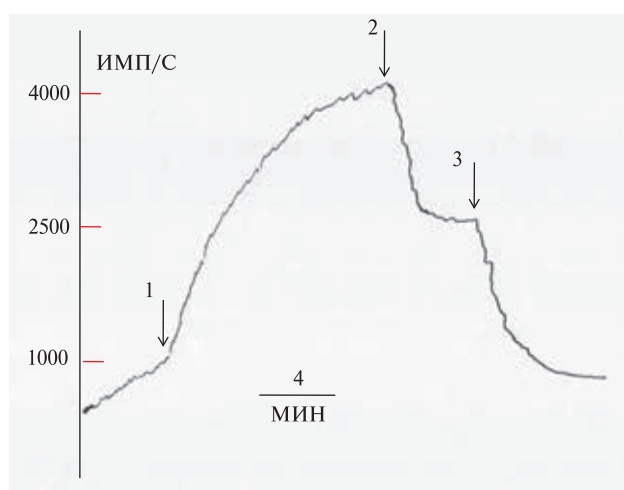


Рис. 3Б Комбинированное влияние Зифодина (2) и Актовегина (3) на уровень радикалов кислорода, индуцированный РМА (1).

Примечание: 1 – РМА (1 мкМ); 2 – Зифодин (8 мг/мл); 3 – Актовегин (8 мг/мл).

тивный эффект был также зарегистрирован, когда первым после РМА к пробам крови добавляли Зифодин, а затем Актовегин (рисунок 3 Б). Если Актовегин и Зифодин были бы идентичны, тогда добавление одного из этих препаратов в оптимальной дозе должно полностью подавлять эффект другого препарата. Аддитивный ингибиторный эффект Актовегина и Зифодина свидетельствует о том, что в каждом препарате имеются разные компоненты, снижающие уровень радикалов кислорода, т.е. эти препараты не идентичны.

## Обсуждение

С помощью определения биологических ответов на стимуляторы и ингибиторы, действующие на клетки системы врожденного иммунитета, можно оценить ряд важных параметров:

- состояние этой системы у конкретного пациента;
- силу ответной реакции на исследуемый агент;
- изменение этих показателей в процессе развития заболевания;
- эффективность проводимого лечения.

Фагоциты крови активно участвуют в воспалительном процессе при структурных перестройках и гибели КМЦ, продуцируя провоспалительные цитокины, цитолитические агенты и радикалы кислорода. Количество и активность преактивированных (праймированных) фагоцитов в крови выступает в качестве своеобразного индикатора процесса воспаления, который динамично изменяется во времени по мере развития ХСН. Чем больше клеток погибает при ХСН, тем более выражено воспаление, и как следствие больше активирующих химических сигналов поступает из пораженной области в кровь, действует на фагоциты, и переводит их в состояние преактивации, т.е. состояние готовности клеток синергистически отвечать на последующую стимуляцию в области поражения сердца. Степень праймирования фагоцитов крови можно определять в условиях *in vitro* по “спонтанной” генерации радикалов кислорода, возникающей в результате взаимодействия фагоцитов крови со стенкой кюветы, или по выраженности ответной реакции на действие стандартных стимуляторов [14], в нашем случае — по ответу на РМА. Характерной особенностью фагоцитов крови пациентов с ХСН является высоко амплитудные ответы на стимулятор РМА (рисунки 1 и 2), что свидетельствует о наличии в крови большого количества праймированных фагоцитов. Полученные данные свидетельствуют о возможности Актовегина и Зифодина снижать уровень радикалов кислорода, образуемых преактивированными фагоцитами крови пациен-

тов с ХСН [15], что приводит к уменьшению выраженности окислительного стресса и процессов воспаления. Аналогичные результаты по снижению уровня радикалов кислорода под влиянием Актовегина были получены на культуре первичных нейронов крыс [9], а также на перевиваемых нейронах человека [13, 14].

В связи с тем, что Актовегин состоит из низкомолекулярных компонентов, не обладающих выраженными антигенными свойствами, его длительный прием не связан с неблагоприятными реакциями системы благоприобретенного иммунитета, в т.ч. реакциями образования антител. Одна из главных проблем комплексных поликомпонентных лекарственных препаратов связана с получением воспроизводимого состава компонентов, отличающихся как по своей структуре, так и содержанию. Часто определить природу действующих компонентов в таких препаратах не представляется возможным. Недавно созданный препарат Зифодин по утверждению производителя, идентичен Актовегину, однако кроме инструкции по применению Зифодина, в Интернете нет никакой информации о его свойствах, результатах доклинических и клинических исследований. Зифодин, подобно Актовегину, дозозависимым образом снижает уровень РМА-индуцированных радикалов кислорода (рисунок 2). Недавно в лаборатории было установлено, что в бесклеточной системе, генерирующей радикалы кислорода в реакции Фентона в присутствии пероксида водорода и катионов железа с переменной валентностью, Актовегин оказывал антиокислительное действие (т.е. удалял уже образовавшиеся радикалы кислорода, подобно стандартному антиоксиданту — Тролоксу) [15]. Однако однозначно экстраполировать эти результаты на Зифодин нельзя, поскольку неизвестно идентичны ли эти препараты по структуре, а, следовательно, и по активности. Выявленный аддитивный характер действия этих двух препаратов (рисунок 3А и 3Б) свидетельствует о наличии в их составе разных компонентов, что не позволяет однозначно перенести результаты, полученные с Актовегином, на Зифодин.

## Заключение

Актовегин и Зифодин дозозависимым образом подавляют образование радикалов кислорода фагоцитами крови пациентов с ХСН ФК II–III и тем самым снижают выраженность окислительного стресса.

Актовегин и Зифодин оказывают аддитивный ингибиторный эффект на фагоцитах крови пациентов с ХСН, стимулированных РМА, что свидетельствует о наличии разных компонентов в этих препаратах и не позволяет однозначно переносить результаты, полученные с Актовегином на Зифодин.

## Литература

1. Remme WJ. Overview of the relationship between ischemia and congestive heart failure. Clin Cardiol 2000; 23 (Suppl. IV): IV 4-8.
2. Astashkin EI, Glezer MG Energy metabolism of the heart. Issue 4 Cell death during ischemia/reperfusion. Current approaches to prevention and treatment. M.: Medicom 2011; 12 p. Russian (Асташкин Е. И., Глезер М. Г. Энергетический обмен сердца. Вып. 4. Гибель клеток при ишемии/реперфузии. Современные подходы к профилактике и лечению. М.: Медиком 2011; 1-12).
3. Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. Lancet 2011; 378: 704-12.
4. Jordan JE, Zhi-Qing Z, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. Cardiovasc Res 1999; 43: 860-78.
5. Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM. Novel aspects of ROS signaling in heart failure. Basic Res Cardiol 2013; 108(4): 359.
6. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton Ph, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. Circ Res 2012; 111(8): 1091-106.
7. Mudd JO, Kass DA. Tackling heart failure in twenty-first century. Nature 2008; 451(7181): 919-28.
8. Machicao F, Muresanu DF, Hundsberger H, et al. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. J Neurolog Sciences 2012; 322 (1-2): 222-7.
9. Emlinger MW, Kriebel M, Ziegler D. Neuroprotective and anti-oxidative effects of the hemodialysate actovegin on primary rat neurons *in vitro*. Neuromol Med 2011; 13 (4): 266-74.
10. Sinka L, Hlavatý P. Clinical experiences with treatment of ulcer cruris. Fortsch Med 1973; 91(24): 959-61.
11. Shao-Xiong Wu, Tian-Tian Cui, Chong Zhao, et al. A prospective, randomized, multi-center trial to investigate Actovegin in prevention and treatment of acute oral mucositis caused by chemoradiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. Radiotherapy and Oncology 2010; 97: 113-8.
12. Zhang XC, Xiao F, Wei LC, et al. Clinical study of the effect of Actovegin in the prevention of acute irradiation oropharyngeal mucositis. J Pract Stomatol 2006; 22: 496-8.
13. Yurinskaya MM, Vinokourov MG, Grachev SV, Astashkin EI. Aktovegin reduces apoptosis of neuroblastoma cells SK-N-SH, induced by hydrogen peroxide, resulting in inhibition of p38MAPK and PI-3K. Doklady Akademii of Sciences 2014; 456 (5): 618-21. Russian (Юринская М. М., Винокуров М. Г., Грачев С. В., Асташкин Е. И. Актовегин снижает апопоз клеток нейробластомы SK-N-SH, индуцированный пероксидом водорода, в результате ингибирования p38MAPK и PI-3K. Доклады Академии Наук 2014; 456(5): 618-21).
14. Astashkin EI, Glezer MG, Vinokourov MG, et al. Aktovegin reduces the level of oxygen radicals in whole blood samples of patients with heart failure and inhibits the development of tumor necrosis human neuronal line SK-N-SH. Doklady Akademii of Sciences 2013; 448 (2): 232-5. Russian (Асташкин Е. И., Глезер М. Г., Винокуров М. Г., и др. Актовегин снижает уровень радикалов кислорода в образцах цельной крови пациентов с сердечной недостаточностью и подавляет развитие некроза перевиваемых нейронов человека линии SK-N-SH. Доклады Академии Наук 2013; 448(2): 232-5).
15. Astashkin EI, Glezer MG, Orekhova NS, et al. Influence aktovegina on blood phagocytes during oxidative stress in patients with heart failure. Farmateka 2014; 9 (282): 14-9. Russian (Асташкин Е. И., Глезер М. Г., Орехова Н. С., и др. Влияние актовегина на фагоциты крови при оксидативном стрессе у пациентов с сердечной недостаточностью. Фарматека 2014; 9(282): 14-9).
16. Chen YL, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. Methods Mol Biol 2012; 844: 115-24.