

Цитопротективный и антиоксидантный эффект препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» на культивируемых клетках человека и собаки (доклинические исследования)

К.В. Лисицкая, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, ветеринарный врач онколог-морфолог.

Институт биохимии им. А.Н. Баха (ИНБИ), Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, стр. 2).

Ветеринарная клиника «Биоконтроль» (115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, стр. 10).

Цель исследования: тестирование антиоксидантного действия препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» in vitro на культивируемых клетках человека и собаки.

Объектами исследования являлись антиоксидантные свойства препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» in vitro в тест-моделях на основе культивируемых клеток человека (линия аденокарциномы кишечника HT-29) и собаки (линия эпителия почки собаки MDCK1).

В ходе выполнения работы использовался метод анализа антиоксидантных свойств in vitro в культивируемых клетках, основанный на флуориметрической детекции интенсивности свободно-радикального окисления в культуре после внесения азоинициатора свободно-радикальных реакций.

В результате исследования было выявлено, что концентрации 0,05...0,5 мМ препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» оказывают достоверное in vitro антиоксидантное действие в культивируемых клетках линий HT-29 и MDCK1.

Ключевые слова: антиоксидантный, культура клеток, пролиферативный, свободно-радикальное окисление, тест-система, цитопротективный, МЕКСИДОЛ-ВЕТ

Сокращения: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ПОЛ — перекисное окисление липидов, СРО — свободнорадикальное окисление, DCFH-DA — дихлородигидрофлуоресцеиндиацетат, DCF — дихлорофлуоресцеин, LLC-PK — клетки эпителия почек свиней

Введение

Оценка биологических эффектов от различных препаратов, в том числе, лекарственных средств, играет ключевую роль при их разработке и изучении. Разнообразные биологические эффекты препаратов исследуют как *in vivo* — в экспериментах на лабораторных животных, так и *in vitro* — на модельных тест-системах [1].

В последние десятилетия тест-модели на основе культур клеток находят все более широкое применение в связи с этическими проблемами, возникающими при проведении экспериментов на животных, что особенно характерно для стран США и ЕС. В связи с этим роль исследований на культивируемых клетках в оценке биологически активных препаратов с каждым годом неуклонно возрастает. Модельные системы на основе культивируемых клеток используются для оценки биодоступности, антиоксидантных, иммуномодулирующих, химиофилактических, про- и пребиотических и других свойств различных биологически активных веществ [1].

Многочисленные *in vitro* и *in vivo* исследования показывают, что препарат «Мексидол» является ингиби-

тором свободнорадикальных процессов, ПОЛ и обладает выраженным антигипоксическим, антиоксидантным, мембраностабилизирующим и ангиолитическим действиями [2]. Механизм антиоксидантного действия «Мексидола» включает в себя повышение активности эндогенных антиоксидантных систем, например, фермента супероксиддисмутазы, который катализирует дисмутацию супероксида в кислород и пероксид водорода. Кроме того, антигипоксическое действие «Мексидола» обусловлено не только его собственными антиоксидантными свойствами, но и входящим в его состав сукцинатом, который в условиях гипоксии, поступая во внутриклеточное пространство, способен окисляться дыхательной цепью [2, 3]. Однако к настоящему моменту отсутствуют исследования *in vitro* на культивируемых клетках человека и других млекопитающих, доказывающие антиоксидантное действие препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» непосредственно на уровне клеток.

Цель исследования

Протестировать биологические эффекты препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» *in vitro* на культивируемых клетках человека и собаки и определить его потенциальное антиоксидантное действие.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись антиоксидантные свойства препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» *in vitro* в тест-моделях на основе культивируемых клеток человека (линия аденокарциномы кишечника HT-29) и собаки (линия эпителия почки собаки MDCK1).

Модели для изучения антиоксидантных свойств in vitro. СРО играет важнейшую роль в развитии раз-

личных хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистую патологию, сахарный диабет, катаракту, нейродегенеративные заболевания и опухолевые процессы. Кроме того, окислительный стресс является одной из составляющих процесса старения. Интенсивность СРО в организме модулируется целым рядом антиоксидантов — соединений, которые способны блокировать СРО в концентрациях, сопоставимых с таковыми для окисляемых молекул-мишеней [1]. Антиоксиданты снижают интенсивность СРО важнейших макромолекул клеток — липидов, белков и ДНК, приводящего к их повреждению.

К настоящему времени описано множество соединений, относящихся к антиоксидантам и объединенных в различные классы. Это витамины (С, А, Е), микро- и макроэлементы (медь, марганец, цинк, селен, железо), каротиноиды, флавоноиды, фенольные и другие соединения.

Центральная роль в оценке антиоксидантной емкости биологически активных веществ принадлежит методикам в пробирке. К настоящему моменту разработаны модели для анализа антиоксидантных свойств *in vitro* на основе культивируемых клеток. Методы *in vitro* позволяют оценивать процессы СРО непосредственно в живых клетках, моделирующих процессы в организме.

Методики регистрации интенсивности СРО непосредственно в клетках многочисленны [4] и включают в себя методы оценки эффектов от действия оксиданта на уровне окислительного повреждения структур клетки, например, повышение проницаемости митохондриальной мембраны, фрагментацию генетического материала клетки, экспрессию различных проапоптотических белков-маркеров окислительного стресса.

Удобной методикой оценки интенсивности СРО в культуре является использование флуорохромов, которые способны проникать в живые клетки, где под действием свободных радикалов из нефлуоресцирующих соединений образуются флуоресцентные продукты. В качестве самых широко распространенных флуорохромов необходимо отметить DCFDA (DCFH-DA), дигидрородамин, гидроэтидин. Другие флуорохромы, например, луминол, описанный в 1960 г. Totter с соавт., и луцигенин, имели широкое распространение в культуральных экспериментах *in vitro*, однако в настоящее время не используются в связи с низкой специфичностью [4]. Так, для луцигенина описано ауто-формирование радикала кислорода, что приводит к артефактам измерения СРО.

DCFH-DA является наиболее удобным флуорохромом для детекции интенсивности непосредственно в культуре. Соединение аккумулируется в цитозоле, где под действием эстераз клетки деацетируется в DCF. Свободные радикалы (пероксильный, радикал NO₂, карбонат-радикал, гидроксил-радикал) конвертируют нефлуоресцентное соединение в флуорохром с пиком флуоресценции около 525 нм при длине волны возбуждающего света 498 нм. Данный метод получил широкое распространение в связи с относительной простотой, достаточно высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов [1].

In vitro модели на основе культивируемых клеток для определения антиоксидантной активности соединений

используют общую стратегию, которая заключается в инкубации клеток в присутствии потенциального антиоксидантного агента, дальнейшее воздействие инициатора СРО и методику для оценки активности радикалов в клетке [1]. Для генерации СРО в культуре используют различные синтетические радикалы, основным критерием выбора которых служат стабильность и длительность жизни. Наиболее часто используемыми в культуре соединениями являются AAPH, ABTS, DPPH.

Азосоединение AAPH 2,2'-азобис(2-амидино-пропан) дигидрохлорид вызывает в клетках реакции ПОЛ. Распад AAPH сопровождается генерацией в среде пероксильных радикалов, вызывающих, в свою очередь, оксидативное повреждение внутриклеточных соединений (рис. 1). Ранее было показано, что добавление AAPH в культуральную среду, в которой культивировали LLC-RK, приводит к стабильной генерации пероксильного радикала, который вызывает гибель клеток и образование в среде соединений, реактивных в отношении тиобарбитуровой кислоты [5]. В целом, преимуществом AAPH перед пероксидом водорода является большая стабильность генерации соединением пероксильных радикалов.

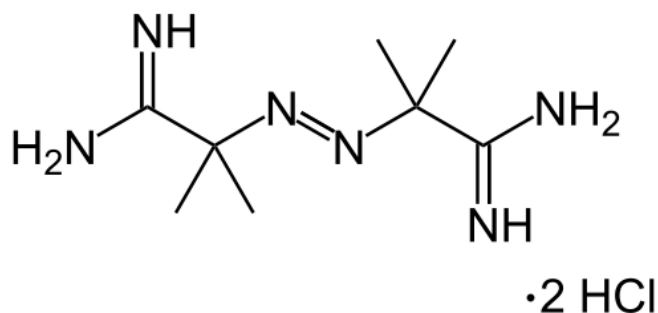


Рис. 1. Химическое строение молекулы AAPH

Fig. 1. The chemical structure of the AAPH molecule

Данная стратегия была использована в работе по тестированию антиоксидантных свойств препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ». В качестве инициатора СРО использовали AAPH. Для исследования на тест-модели была взята методика, описанная Elisia I., Kitts D.D. (2008) и модифицированная Samaranyaka A.G.P. с соавт. (2010), для определения антиоксидантной активности гидролизата хека на культивируемых клетках аденокарциномы кишечника человека Caco-2 [6]. Согласно данной методике, клетки культивировали на 96-луночном черном планшете в присутствии раствора гидролизата течение 2 ч, далее аспирировали раствор и вносили на 30 мин DCFH-DA. После аспирации раствора в культуру вносили AAPH и определяли флуоресценцию непосредственно после внесения, через 1 и 2 ч после инкубации. В тест-системе данная методика была модифицирована с сокращением интервалов считывания до 30 мин (0, 30, 60, 90 мин инкубации).

Анализ антиоксидантного эффекта препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в тест-моделях на основе клеток линий HT-29 и MDCK1. Для создания биотест-систем для определения цитопротективного действия использовали две линии культивируемых клеток — аденокарциномы кишечника человека линии HT-29 и почки собаки линии MDCK1.

Концентрации препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ», не оказывающие цитотоксических эффектов, были выбраны для дальнейших исследований антиоксидантных свойств. С этой целью из 2,5%-го и 5%-го стерильных растворов препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» готовили растворы с концентрациями 0,005...0,5 мМ, разбавляя исходный раствор стерильным солевым раствором.

Для определения интенсивности свободно-радикального окисления в культуре использовали 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA, «Sigma», США). Готовили стоковый раствор DCFH-DA с концентрацией 5 мМ в этиловом спирте. Непосредственно перед введением в лунки планшета из стокового раствора готовили 10 мкМ раствор на солевом растворе Хэнкса.

СРО индуцировали в лунках, добавляя в них по 100 мкл 1 мМ азоинициатора ААРН (ААПГ, или 2,2' азобис (2-метилпропионамидин) дигидрохлорид). С этой целью непосредственно перед внесением в культуру готовили 100 мМ раствор ААРН, из которого получали 1 мМ раствор на солевом растворе Хэнкса.

Для определения *in vitro* антиоксидантной активности в лунках стерильных черных 96-луночных планшет с высокими адгезивными свойствами поверхности («Brande», США) проводили пассаж 100 мкл клеточной суспензии с цитозом 106 клеток/мл. Краевые лунки планшета заполняли бесклеточной культуральной средой для создания одинаковых условий влажности во всех опытных лунках планшета. Планшет инкубировали в термостате в течение 12...24 ч для осаждения клеток и прикрепления клеток к поверхности культурального пластика.

Далее аспирировали содержимое лунок и вносили в лунки по 100 мкл раствора препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в концентрациях 0,05...0,5 мМ. В качестве контроля выступали клетки, культивируемые в 100 мкл солевого раствора без добавления препарата. Планшет инкубировали в термостате в течение 2 ч, далее аспирировали содержимое лунок и добавляли 100 мкл рабочего раствора DCFH-DA (30 мин), после чего аспирировали раствор и индуцировали перекисное окисление, внося в лунки 100 мкл рабочего раствора ААРН.

Определяли интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 528 нм на спектрофотометре-флуориметре «Superly 2» фирмы BioTek (США) сразу после добавления ААРН («0»), через 30, 60 и 90 минут.

Все исследуемые разбавления препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» и контроль добавляли в шести повторностях. Рассчитывали среднее значение флуоресценции в лунках опыта и контроля и стандартное отклонение, далее пересчитывали значения флуоресценции в процентах по отношению к значению контроля после 90 мин инкубации, которое считали 100 % (солевой раствор).

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные при тестировании антиоксидантного действия препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» *in vitro* на культивируемых клетках HT-29, представлены на рисунке 2. Как видно из представленных данных, препарат «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в концентрациях

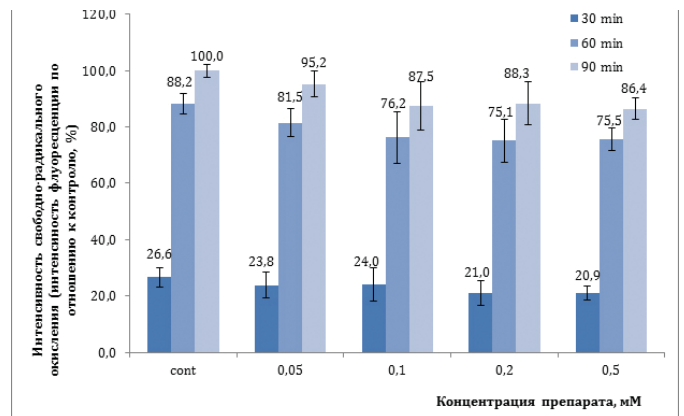


Рис. 2. Антиоксидантное действие препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» *in vitro* на культивируемых клетках HT-29 (2 ч прединкубации)

Fig. 2. Antioxidant action of the drug «MEXIDOL-VET» *in vitro* on cultured cells of HT-29 (2 h preincubation)

1. Результаты анализа цитопротективных свойств препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в тест-системе на основе клеток линий HT-29

Концентрация препарата, мМ	Интенсивность флуоресценции в лунках, рассчитанная по отношению к контролю, %		
	30 мин	60 мин	90 мин
контроль	38,1 ± 1,79	80,96 ± 3,29	100 ± 4,92
0,05	34,03 ± 1,99 *	72,59 ± 3,18 *	90,18 ± 3,56 *
0,1	33,66 ± 1,49 *	69,63 ± 2,83 *	86,02 ± 3,94 *
0,2	32,37 ± 2,01 *	70,43 ± 2,63 *	88,02 ± 2,87 *
0,4	27,91 ± 1,83 *	65,95 ± 4,38 *	83,17 ± 5,28 *

Примечание. * — достоверно значимые результаты.

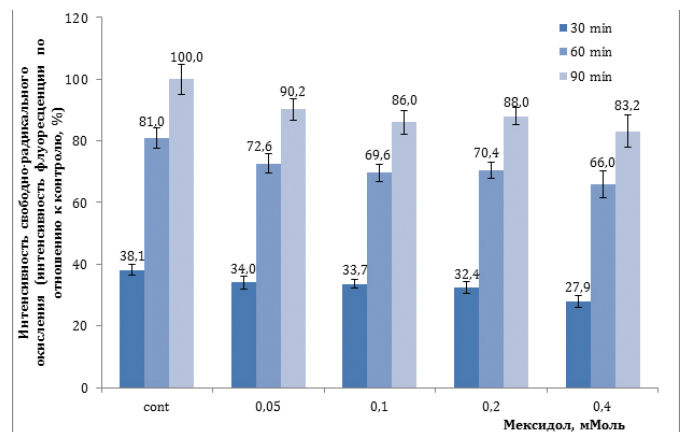


Рис. 3. Антиоксидантное действие препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» *in vitro* на культивируемых клетках MDCK1 (2 ч прединкубации)

Fig. 3. Antioxidant action of the drug «MEXIDOL-VET» *in vitro* on cultured cells of MDCK1 (2 h preincubation)

2. Результаты анализа цитопротективных свойств препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в тест-системе на основе клеток линий MDCK1

Концентрация препарата, мМ	Интенсивность флуоресценции в лунках, рассчитанная по отношению к контролю, %		
	30 мин	60 мин	90 мин
контроль	26,6 ± 3,49	88,2 ± 3,67	100,0 ± 2,28
0,05	23,8 ± 4,56	81,5 ± 5,08	95,2 ± 4,61
0,1	24,0 ± 5,99	76,2 ± 9,16	87,5 ± 8,58 *
0,2	21,0 ± 4,35	75,1 ± 7,77 *	88,3 ± 7,64 *
0,5	20,9 ± 2,46	75,5 ± 4,01 *	86,4 ± 3,80 *

Примечание. * — достоверно значимые результаты.

0,1...0,5 мг/мл обладал достоверно значимым антиоксидантным действием, выражающимся в снижении интенсивности флуоресценции после 90 мин инкубации клеток. При этом антиоксидантное действие характеризовалось дозо-зависимым характером, и самый выраженный эффект ингибирования СРО был отмечен для концентрации 0,5 мМоль, который составил $86,4 \pm 3,80$ % в сравнении с контрольными значениями $100 \pm 2,28$ % (в пересчете на интенсивность флуоресценции контрольных лунок). Результаты анализа антиоксидантных эффектов препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в культуральной тест-системе на основе клеток HT-29 представлены в таблице 1.

Достоверное *in vitro* антиоксидантное действие препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» было выявлено в культивируемых клетках почки собаки линии MDCK1 (рис. 3). Как видно из представленных данных, препарат «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в концентрациях 0,05...0,4 мг/мл обладал достоверно значимым антиоксидантным действием, выражающимся в снижении интенсивности флуоресценции после 90 мин инкубации клеток в дозо-зависимым характере. Наиболее выраженный эффект ингибирования СРО был отмечен для концентрации 0,5 мМоль, который составил $83,2 \pm 5,28$ % в сравнении с контрольными значениями $100 \pm 4,92$ % (в пересчете на интенсивность флуоресценции контрольных лунок). Результаты анализа антиоксидантных эффектов препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» в культуральной тест-системе на основе клеток HT-29 представлены в таблице 2.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных экспериментов показано, что концентрации 0,05...0,5 мМ препарата «МЕКСИДОЛ-ВЕТ» также оказывают достоверное *in vitro* антиоксидантное действие в культивируемых клетках HT-29 и MDCK1. Результаты тестирования препарата в двух тест-системах характеризуются воспроизводимостью.

Библиография

1. Лисицкая, К.В. Анализ функциональных свойств биологически активных веществ на моделях эукариотических клеток (обзор). / К.В. Лисицкая, И.В. Николаев, А.А. Торкова, В.О. Попов, О.В. Королёва // Прикладная биохимия и микробиология. — 2012. — Т. 48. — № 6. — С. 1–18.
2. Воронина, Т.А. Антиоксидант Мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина // ПФИБН. — 2001. — №1. — С. 2–12.
3. Воронина, Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т.А. Воронина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2012. — № 12. — С. 86–90
4. Halliwell, B. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? / B. Halliwell, M. Whiteman // Br J Pharmacol. — 2004. — Vol. 142. — pp. 231–255.
5. Yokozawa, T. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. / T. Yokozawa, E.J. Cho, Y. Hara, K. Kitani // J Agric Food Chem. — 2000. — Vol. 48. — No. 10. — pp. 5068–5073.
6. Samaranayaka, A.G. Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. / A.G. Samaranayaka, D.D. Kitts, E.C. Li-Chan // J Agric Food Chem. — 2010. — Vol. 58. — No. 3. — pp. 1535–1542.

References

1. Lisickaja K.V., Nikolaev I.V., Torkova A.A., Popov V.O., Koroljova O.V., *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*, 2012, Vol. 48, No. 6, pp.1–18.
2. Voronina T.A., *PFI BN*, 2001, No. 1. pp. 2–12.
3. Voronina T.A. *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S.S. Korsakova*, 2012, No. 12, pp. 86–90.
4. Halliwell B., Whiteman M., *Br J Pharmacol.*, 2004, Vol. 142, pp. 231–255.
5. Yokozawa T., Cho E.J., Hara Y., Kitani K., *J Agric Food Chem.*, 2000, Vol. 48, No. 10, pp. 5068–5073.
6. Samaranayaka A.G., Kitts D.D., Li-Chan E.C., *J Agric Food Chem.*, 2010, Vol. 58, No. 3, pp.1535–1542.

ABSTRACT

K.V. Lisitskysya.

Institute of the biochemistry named after A.N. Bahk, Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences» (119071, Moscow, Leninsky pr., 33, build. 2).

Veterinary clinic «Biokontrol» (115478, Moscow, Kashirskoye av., 24, build. 10)

Cytoprotective and Antioxidant Effect of «MEXIDOL-VET» on Cultured Cells of Human and Dog (Preclinical Studies). The purpose of research was conducting the test of antioxidant effect «MEXIDOL-VET» *in vitro* on cultured cells of human and dog.

The objects of research were the antioxidant properties of «MEXIDOL-VET» in test models *in vitro* based on cultured cells of human (adenocarcinoma line of the intestine HT-29) and the dog (MDCK1 kidney epithelial line).

In the course of work, used method to analyze antioxidant properties *in vitro* in cultured cells, based on fluorimetric detection of the intensity of free radical oxidation in culture after the introduction of azoinitiator free radical reactions.

As a result of research, it was found that concentrations of 0.05...0.5 mM of the drug «MEXIDOL-VET» have a significant antioxidant effect *in vitro* in cultured cells of HT-29 and MDCK1 lines.

Keywords: antioxidant, cell culture, proliferative, oxidative stress, test system, cytoprotective, MEXIDOL-VET.



КАРДИОЛОГИЯ

ЗДОРОВЬЕ ЖИВОТНЫХ ПОД ЗАЩИТОЙ

+7 (495) 626 - 47 - 55
www.pharmasoft-vet.ru



НЕВРОЛОГИЯ



АДАПТАЦИЯ



АНЕСТЕЗИОЛОГИЯ



ХИРУРГИЯ



ЭКСТРЕМАЛЬНЫЕ НАГРУЗКИ



ГЕРИАТРИЯ



ТЕРАПИЯ

ООО «ВЕКТОРФАРМ»
исключительный дистрибьютор лекарственных
препаратов ООО «НПК «ФАРМАСОФТ»
ФАРМАСОФТ

МЕКСИДОЛ • ВЕТ ГИПОКСИИ БОЛЬШЕ НЕТ



Успех любого оперативного вмешательства является результатом совместных действий, как оперирующего врача, так и анестезиолога.

Наркоз - контролируемое угнетение ЦНС, вызывающее дисрегуляцию функций организма, в том числе дыхания и сердечной деятельности, особенно при входе и выходе из наркоза. Это приводит к гипоксии органов и тканей. Кроме того, любое повреждение, в том числе операция, вызывает относительную локальную гипоксию тканей за счет воздействия на питающие сосуды разрезом, швом, а также послеоперационным отеком в области вмешательства.

Мексидол-Вет облегчает наступление наркоза, сокращает время выхода животных из наркотического сна, снижает вероятность постнаркотических психозов, а также позволяет снизить количество ранних и поздних послеоперационных осложнений. Назначая Мексидол-Вет до и после операции, вы облегчаете проведение пациента через наркоз, снижаете анестезиологические риски, в результате чего уменьшается вероятность неблагоприятного течения раневого процесса, риск несостоятельности швов, анастомозов и замедление регенерации тканей.

Показания:

- при возрастных нарушениях организма; для улучшения состояния кожно-волосного покрова; при острой и хронической сердечно-сосудистой и сердечно-легочной патологии; с целью профилактики наркотических и постнаркотических осложнений; в посттравматический и послеоперационный периоды; при эпилепсии, эписиндроме; при черепно-мозговых травмах; при экзогенно-органических заболеваниях головного мозга; в период экстремальных нагрузок (транспортировка, участие в выставках и соревнованиях).

Продолжительность приема препарата зависит от тяжести операции или травмы.