

Для цитирования: Смирнова К.В. Сравнительная эффективность антиоксидантных препаратов в эксперименте in vitro / К.В. Смирнова, Д.И. Гильдилов // УДК 619:615
Российский ветеринарный журнал. — 2021. — № 2. — С. DOI:
For citation: Smirnova K.V., Gildikov D.I., Comparative efficacy of antioxidant drugs in an in vitro experiment, Russian veterinary journal (Rossijskij veterinarnyj zhurnal), 2021, No. 2, pp. DOI: RAR

Сравнительная эффективность антиоксидантных препаратов в эксперименте in vitro

К.В. Смирнова, студентка 3-го курса факультета ветеринарной медицины; призёр (3 место) Первой научно-практической Олимпиады «Мексидол-Вет®: 12 лет ветеринарной практики» в номинации «Молодой ветеринарный специалист» (ksushkotova@mail.ru);

Д.И. Гильдилов, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры общей патологии им. В.М. Коропова (gildikovdmiv@mail.ru)

ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина (109472, РФ, г. Москва, ул. Ак. Скрябина, д. 23).

Целью работы было изучение антиоксидантной активности производных 3-оксипиридина: Мексидол-Вет® и Эмицидин в модельной системе окисления. Посредством метода хемилюминесценции установлено, что введение в тест-систему препарата Мексидол-Вет® в дозе 1 мг достоверно подавляет амплитуду быстрой вспышки и снижает образование фотонов (значение светосуммы), по сравнению с тест-системой/плацебо и тест-системой/Эмицидин. Антиоксидантная активность препарата Мексидол-Вет® достоверно превосходит активность препарата Эмицидин на 28,1 %.

Ключевые слова: производные 3-оксипиридина, Мексидол-Вет®, Эмицидин, антиоксиданты, активные формы кислорода, хемилюминесценция.

Comparative efficacy of antioxidant drugs in an in vitro experiment

K.V. Smirnova, 3rd year student of the Veterinary medicine faculty; Prize-winner (3rd place) of the First scientific and practical Olympiad «Mexidol-Vet®: 12 years of veterinary practice» in the category «Young veterinary specialist» (ksushkotova@mail.ru);

D.I. Gildikov, PhD in Veterinary Science, Associate professor of Department of general pathology named after V.M. Koropov (gildikovdmiv@mail.ru).

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — Moscow Veterinary Academy named after K.I. Skryabin (23, Ac. Skryabina str., Moscow, RF, 109472).

The aim of this work was to study the antioxidant activity of 3-hydroxypyridine derivatives: Mexidol-Vet® and Emicydin in a model oxidation system. Using the chemiluminescence method, it was found that the introduction of Mexidol-Vet® into the test system at a dose of 1 mg reliably suppresses the amplitude of a fast flash and decreases the formation of photons (light sum value), compared with the test system / placebo and the test system / Emicydin. The antioxidant activity of Mexidol-Vet® is significantly higher than Emicydin by 28.1%.

Keywords: derivatives of 3-hydroxypyridine, Mexidol-Vet®, Emicydin, antioxidants, reactive oxygen species, chemiluminescence.

Сокращения: АО — антиоксиданты, АФК — активные формы кислорода, СРО — свободнорадикальное окисление, ХЛ — хемилюминесценция

Введение

В организме животных окислительный метаболизм обусловлен равновесием процессов СРО и нейтрализацией биорадикалов, способствует постоянному синтезу АФК, в норме компенсируемому функционированием компонентов антиоксидантной системы [5]. Преобладающее образование АФК в условиях дисфункции или недостаточной активности антиоксидантной системы находит отражение в нарушениях на клеточном, тканевом и органном уровнях [3]. В связи с этим, в настоящее время активно применяют препараты различной химической структуры, обладающие антиоксидантной активностью, которые могут иметь природное или синтетическое происхождение [7...10].

Пристальное внимание ветеринарных специалистов в качестве перспективных лекарственных средств, регулирующих процессы окисления и перекисидации, привлекли соединения гетероароматических фенолов, в частности производные 3-оксипиридина [4].

На российском ветеринарном пространстве лицензированные средства этой группы представлены препаратами Мексидол-Вет® и Эмицидин. Эти лекарства являются структурными аналогами соединений группы витамина В₆ и имеют одно действующее вещество. Препараты обладают выраженным антиоксидантным, антигипоксантным и мембранопротекторным эффектами.

Цель исследования

Оценить эффективность АО в эксперименте in vitro.

Материалы и методы

Перспективное рандомизированное плацебо контролируемое исследование было выполнено на кафедре общей патологии имени В.М. Коропова ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрябина. Материалом послужила сыворотка крови здоровых половозрелых самцов белых крыс ($n=26$) массой 200...280 г.

Исследуемые препараты (Мексидол-Вет® и Эмицидин) разводили в физиологическом растворе так, чтобы концентрация была сопоставима с терапевтической. Отбирали аликвоту пробы, эквивалентной 1 мг действующего вещества АО и добавляли в тест-систему, в которой инициировали образование АФК и СРО липидов.

У крыс брали пробы крови в пластиковую пробирку, содержащую раствор гепарина. Гепарин готовили разведением стандартного раствора (5 тыс. ед. в 1000 мкл) в 10 раз физиологическим раствором NaCl. На 1000 мкл крови брали 100 мкл приготовленного раствора. Хранили раствор гепарина при температуре 4° С.

Кровь в пробирках выдерживали 30 минут, центрифугировали при 3000 мин⁻¹. Далее отбирали сыворотку в объеме 500 мкл и разводили 20,0 мл солевого буфера. Состав буфера: 2,72 г KH_2PO_4 , 7,82 г KCl, 1 г цитрата натрия $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{Na} \times 5,5 \text{H}_2\text{O}$ на 1 л дистиллированной воды. Величину pH полученного раствора доводили до 7,45 ед. титрованием насыщенным раствором КОН. Помещали в кюветную камеру прибора. Интенсивность ХЛ фиксировали в течение 5 минут на аппаратно-программном комплексе «ХЛ-003», (Россия), с использованием программного обеспечения «PowerGraph», Россия, версия 2.1. Свечение ХЛ индуцировали добавлением в тест-систему 100 мкл 50 мМ раствора $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$.

Для анализа данных ХЛ и получения результатов использовали следующие расчетные параметры: светосумма — характеризует общее количество фотонов, образовавшихся в течение всего времени измерения; рассчитывается как интеграл кривой

ХЛ; максимальная интенсивность — максимальное значение интенсивности свечения в течение всего времени измерения.

Результаты экспериментов на модельной системе определяли по степени изменения ХЛ в присутствии исследуемых препаратов и пересчитывали в % от контроля по формуле: $(S \text{ ХЛ контроль} - S \text{ ХЛ с препаратом}) / S \text{ ХЛ контроль} \times 100 \%$.

Статистическую обработку полученных данных проводили на программе AnalystSoftInc., «STATPLUS», версия 2015. Различия расценивались как достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты

В опыте установлено, что введение в тест-систему сыворотки крови крыс ионов двухвалентного железа вызывает развитие характерной кинетики ХЛ, в которой можно дифференцировать несколько стадий: быстрая вспышка, латентный период и медленное свечение (рис. 1).

Анализ кинетических кривых развития Fe^{2+} — индуцированной ХЛ сыворотки крови крыс, а также в присутствии плацебо и АО (рис. 2, табл.) показал, что в контрольной пробе (блок № 1) и тест-системе с плацебо (блок № 2) значения светосуммы и интенсивности максимальной светимости достоверно не различаются: амплитуда быстрой вспышки достигает значения $1,54 \pm 0,18$ и $1,53 \pm 0,21$ отн. ед., соответственно; наблюдается эффект увеличения амплитуды медленного свечения в контрольной пробе до $181,35 \pm 17,01$ отн. ед. и $181,3 \pm 1,2$ отн. ед., соответственно. Антиокислительная активность плацебо составляет 0,01 %.

Введение в тест-систему препарата Мексидол-Вет® в дозе 1 мг (блок № 3) приводит к уменьшению амплитуды быстрой вспышки на 51,6 % ($p \leq 0,05$) и супрессии свечения медленной вспышки в 1,5 раза ($p \leq 0,05$), по сравнению с контрольной пробой.

На фоне введения в тест-систему Эмицидина в дозе 1 мг (блок № 4) амплитуда быстрой вспышки снижается на 7,8 %, а светосумма кривой ХЛ частично снижается на 32,7 % ($p \leq 0,05$). Антиокислительная активность Эмицидина составляет 32,7 %.

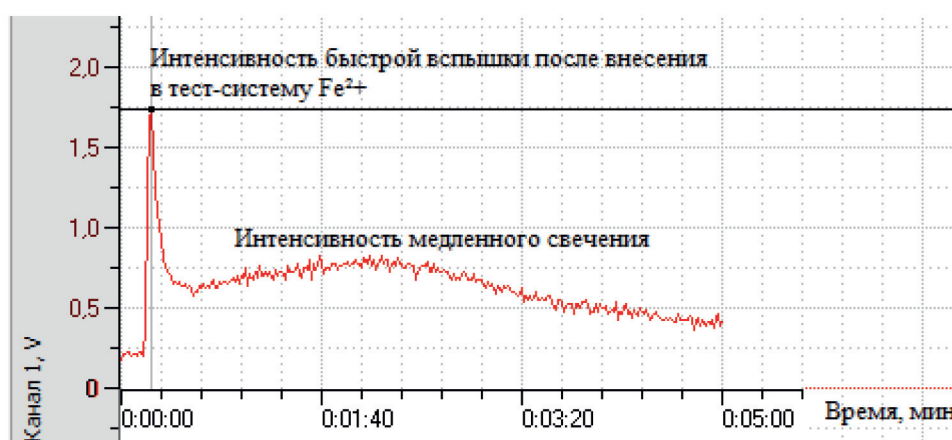


Рис. 1. Кинетика Fe^{2+} - индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови крыс
Fig. 1. Kinetics of Fe^{2+} - induced chemiluminescence of rat blood serum

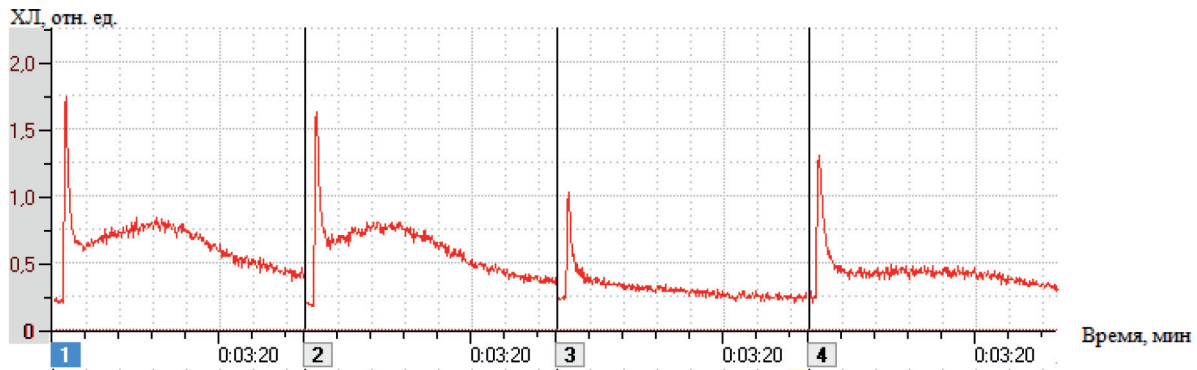


Рис. 2. Кинетика Fe^{2+} - индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови крыс (1), в присутствии плацебо (2), Мексидол-Вет® (3) и Эмицидина (4)
 Fig. 2. Kinetics of Fe^{2+} - induced chemiluminescence of rat blood serum (1), in the presence of placebo (2), Mexidol-Vet® (3) and Emicidin (4)

Изменение хемилюминесценции в тест-системе при добавлении антиоксидантов Changes in chemiluminescence in the test system upon addition of antioxidants		
Исследуемые пробы	Светосумма, отн. ед.	Максимальная интенсивность, отн. ед.
Контрольная проба сыворотки крови (n= 26)	181,35±17,01	1,54±0,18
Тест-система с плацебо (n= 26)	181,33±0,42	1,52±0,21
Тест-система с Мексидол-Вет®, 1 мг (n=26)	87,79±6,63*/**	1,02±0,2*/**
Тест-система с Эмицидином, 1 мг (n=26)	122,05±4,98*	1,42±0,1

Примечание: * $p < 0,05$ — сравнение с контрольной пробой и плацебо; ** $p < 0,05$ — сравнение с данными тест-системы / Эмицидин.

Из таблицы видно, что антиокислительная активность препарата Мексидол-Вет® в тест-системе составила 51,6 %, что статистически достоверно превосходит антиоксидантную активность Эмицидина в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Обсуждение

При помощи метода ХЛ в тест-системе установлено, что введение Мексидол-Вет® в дозе 1 мг достоверно подавляет амплитуду быстрой вспышки и снижает образование фотонов (значение светосуммы), по сравнению с тест-системой/плацебо и тест-системой/Эмицидин. Антиокислительная активность препарата Мексидол-Вет® превосходит препарат Эмицидин на 28,1 % ($p < 0,05$).

Доказано, что измерение интенсивности ХЛ — это наиболее информативный метод для изучения действия АО [2]. Во-первых, в ХЛ системах осуществляется непосредственное детектирование свободных радикалов, а не продуктов окисления. Во-вторых, этот метод позволяет регистрировать кинетику взаимодействия АО с радикалами, то есть регистрировать развитие процесса во времени. ХЛ метод определения уровня АО основан на сравнении ХЛ радикал-продуцирующей системы в отсутствие и присутствии АО. При добавлении АО в радикал-генерирующую систему изменяется кинетика свечения, вызванная изменением количества свободных радикалов [6].

При анализе кинетики свечения в исследуемых тест-системах регистрируемыми параметрами явля-

ются максимальная светимость быстрой вспышки и светосумма медленного свечения [1]. Интенсивность быстрой вспышки при определенных условиях пропорциональна концентрации предшествующих гидроперекисей, которые образовались в системе по ряду причин до введения раствора сульфата железа. Длительность латентного периода зависит от времени достижения «критической» концентрации ионов двухвалентного железа в системе, которое в свою очередь определяется вкладом веществ, влияющих на окисление и/или элиминацию Fe^{2+} . Интенсивность или светосумма медленного свечения определяется скоростью свободнорадикальных реакций, протекающих в гидрофобной фазе липопротеинов, и способностью ингибиторов липидных радикалов [6]. Из этого следует, что в основе антиоксидантного действия препаратов Мексидол-Вет® и Эмицидин лежит способность их действующего вещества (производных 3-оксипиридина) ингибировать перекисное окисление липидов, во многом обусловленное образованием АФК и появлением каталитически активных ионов железа.

Заключение

Введение в тест-систему препарата Мексидол-Вет® в дозе 1 мг достоверно подавляет амплитуду быстрой вспышки и снижает образование фотонов (значение светосуммы), по сравнению с тест-системой/плацебо и тест-системой/Эмицидин. Антиокислительная активность препарата Мексидол-Вет® достоверно превосходит активность препарата Эмицидин на 28,1 %.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Библиография

1. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологической химии. — 2009. — Т. 49. — С. 341-388.
2. Владимиров, Ю.А. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина, Д.Ю. Измайлов // Биофизика. — 2011. — № 56 (6). — С. 1081-1090.
3. Гильди́ков, Д.И. Окислительный стресс у животных: взгляд патофизиолога / Д.И. Гильди́ков // Российский ветеринарный журнал. — 2020. — № 4. — С. 10-18.
4. Гильди́ков, Д.И. Коррекция окислительного стресса у собак при гепатите / Д.И. Гильди́ков, Т.В. Лосева // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. — 2018. — № 1. — С. 90-93.
5. Журавлев, А.И. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение / А.И. Журавлев, С.М. Зубкова. — М.: Белые альвы, 2014. — 304 с.
6. Измайлов, Д.Ю. Определение активности антиоксидантов методом измерения кинетики хемилюминесценции / Д.Ю. Измайлов, Е.М. Демин, Ю.А. Владимиров // Фотобиология та фотомедицина. — 2011. — № 2. — С. 70-76.
7. Мартусевич, А.К. Антиоксидантная терапия: современное состояние, возможности и перспективы / А.К. Мартусевич, К.А. Карузин, А.С. Самойлов // Биорадикалы и антиоксиданты. — 2018. — Т. 5. — № 1. — С. 5-23.
8. Candellone, A. Redox unbalance in the hyperthyroid cat: a comparison with healthy and non-thyroidal diseased cats / A. Candellone, P. Gianella, L. Ceccarelli, G. Raviri, P. Badino, S. Roncone, H.S. Kooistra, G. Meineri // BMC Vet Res. — 2019 May. — Vol. 8. — No. 15(1). — pp. 136.
9. Michałek, M. Antioxidant defence and oxidative stress markers in cats with asymptomatic and symptomatic hypertrophic cardiomyopathy: a pilot study / M. Michałek, A. Tabiś, U. Paślawska, A. Noszczyk-Nowak // BMC Vet Res. — 2020 Jan. — Vol. 30. — No. 16 (1). — pp. 26.
10. Turkseven, S. Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuates liver inflammation and fibrosis in cirrhotic rats / S. Turkseven, M. Bolognesi, A. Brocca, P. Pesce, P. Angeli, M. Di Pascoli // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. — 2020 Feb. — Vol. 1. — No. 318(2). — G298-G304.

References

1. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Svobodny`e radikaly` i kletochnaya xemilyuminescenciya [Free radicals and cellular chemiluminescence], *Uspexi biologicheskoy ximii*, 2009, Vol. 49, pp. 341-388.
2. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmajlov D.Yu., Kineticheskaya xemilyuminescenciya kak metod izucheniya reakcij svobodny`x radikalov [Kinetic chemiluminescence as a method for studying free radical reactions], *Biofizika*, 2011, No. 56 (6), pp. 1081-1090.
3. Gil`dikov D.I., Okislitel`ny`j stress u zhivotny`x: vzglyad patofiziologa [Oxidative stress in animals: a pathophysioligist's view], *Rossijskij veterinarny`j zhurnal*, 2020, No. 4, pp. 10-18.
4. Gil`dikov D.I., Loseva T.V., Korrekciya oksitel`nogo stressa u sobak pri gepatite [Correction of oxidative stress in dogs with hepatitis], *Voprosy` normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*, 2018, No. 1, pp. 90-93.
5. Zhuravlyov A.I., Zubkova S.M., *Antioksidanty`. Svobodnoradikal`naya patologiya, starenie* [Antioxidants. Free radical pathology, aging], Moscow, Bely`e al`vy`, 2014, 304 p.
6. Izmajlov D.Yu., Demin E.M., Vladimirov Yu.A., Opredelenie aktivnosti antioksidantov metodom izmereniya kinetiki xemilyuminescencii [Determination of antioxidant activity by measuring chemiluminescence kinetics], *Fotobilogiya ta fotomedicina*, 2011, No. 2, pp. 70-76.
7. Martusevich A.K., Karuzin K.A., Samojlov A.S., Antioksidantnaya terapiya: sovremennoe sostoyanie, vozmozhnosti i perspektivy` [Antioxidant therapy: current state, opportunities and prospects], *Bioradikaly` i antioksidanty`*, 2018, Vol. 5, No. 1, pp. 5-23.
11. Candellone A., Gianella P., Ceccarelli L., Raviri G., Badino P., Roncone S., Kooistra H.S., Meineri G., Redox unbalance in the hyperthyroid cat: a comparison with healthy and non-thyroidal diseased cats, *BMC Vet Res.*, 2019 May, Vol. 8, No. 15(1), pp. 136.
12. Michałek M., Tabiś A., Paślawska U., Noszczyk-Nowak A., Antioxidant defence and oxidative stress markers in cats with asymptomatic and symptomatic hypertrophic cardiomyopathy: a pilot study, *BMC Vet Res.*, 2020 Jan., Vol. 30, No. 16 (1), pp. 26.
13. Turkseven S., Bolognesi M., Brocca A., Pesce P., Angeli P., Di Pascoli M., Mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuates liver inflammation and fibrosis in cirrhotic rats, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 2020 Feb, Vol. 1, No. 318(2), G298-G304.