

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. 37–40. DOI 10.32416/2500-4379-2021-2-37-40
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. 37–40. DOI 10.32416/2500-4379-2021-2-37-40

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. Антиокислительная 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 Emicidin 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 / Emicidin. The antioxidant activity of Mexidol-Vet® is significantly higher than Emicidin by 28.1%.

Keywords: derivatives of 3-hydroxypyridine, Mexidol-Vet®, Emicidin, 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 %.

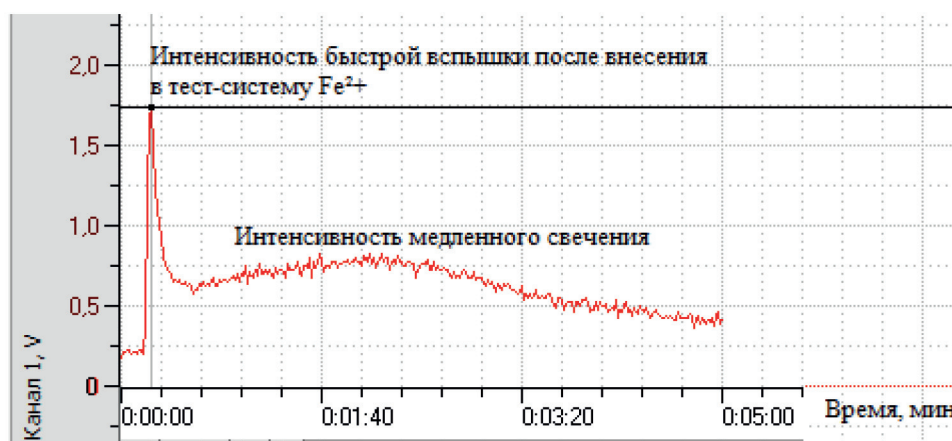


Рис. 1. Кинетика Fe^{2+} - индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови крыс
Fig. 1. Kinetics of Fe^{2+} - induced chemiluminescence of rat blood serum

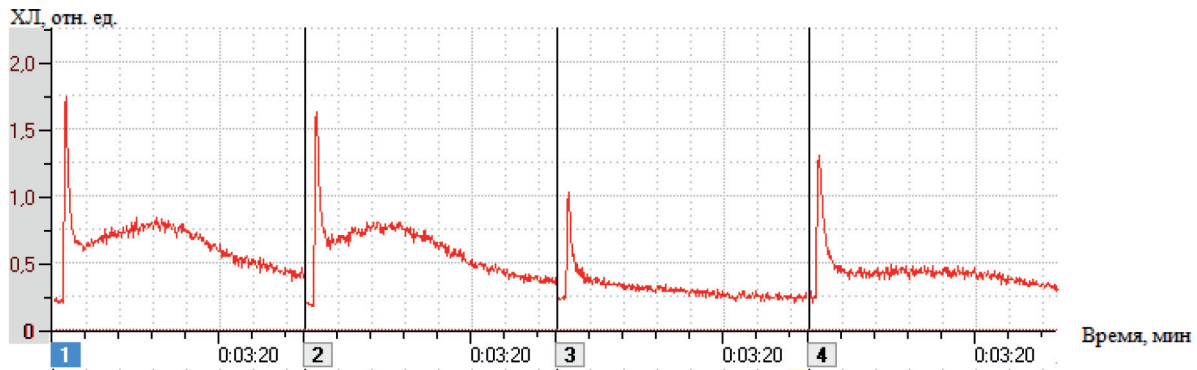


Рис. 2. Кинетика Fe^{2+} - индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови крыс (1), в присутствии плацебо (2), Мексидол-Вет® (3) и Эмицидина (4)
 Fig. 2. Kinetics of Fe^{2+} - induced chemiluminescence of rat blood serum (1), in the presence of placebo (2), Mexidol-Vet® (3) and Emicidin (4)

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 патолофизиолога / 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. Paśławska, 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. Turk-

seven, 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 pathophysiologicalist's view], *Rossiyskij 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], *Fotobiologiya 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., Paśławska 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.

Дачный сезон: акция на комплексное профилактическое обследование в столичных ветклиниках

В мае цена профилактического обследования составила 2500 рублей. В комплексе услуги обходятся почти на 15 % дешевле.

Комплексное профилактическое обследование включает в себя клинический осмотр домашнего животного, консультацию ветеринарного специалиста, взятие проб крови из вены, общий анализ мочи, общий клинический анализ крови, биохимические исследования крови, гельминтокопрологические исследования (позволяют выявлять яйца многих паразитических червей – гельминтов) и люминесцентную диагностику (позволяет обнаружить участки поражения на кожных и волосяных покровах).

Ветеринарные специалисты рекомендуют владельцам домашних животных не забывать о ежегодной диспансеризации. Оптимальное время – весна или осень. Профилактический осмотр специалиста, а также дополнительные методы обследования помогают оценить состояние здоровья животного, выявить заболевания на ранней стадии или обострение хронических болезней.

В столице функционирует 26 государственных ветеринарных клиник. Для консультации и оказания услуг можно предварительно записаться на прием к ветеринару онлайн на портале mos.ru, в мобильном приложении «Госуслуги Москвы» или по телефону: +7(495)612-04-25.

<https://mosobvet.ru/news/Dachnyysezonzstolichnykhvetklinikakhproydetaktsiyanakompleksnoeprofilakticheskoeobsledovanie/>