

Министерство образования и науки Российской Федерации

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**



B.N. Коротаев

ОТЧЕТ

**о выполнении НИР «Изучение антиоксидантного, антигипоксического и
мембраностабилизирующего действия комплекса аминокислот, пептидов и
энзимов «Капэн»»**

№ 2017/449

Подразделение: НОЦ ХимБИ

Директор, к.х.н. Ольга Красных Красных О.П.

Пермь, 2018 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы Солдатов Солодников С.Ю. (заключение)
К.м.н., доцент (подпись, дата)

Исполнители темы Григорьев Триандафилова Г.А.(эксперимент)
(подпись, дата)

Маслова В.В.(эксперимент)
(подпись, дата)

1 Материалы и методы

1.1 Характеристика животных и условия содержания

В экспериментах использованы белые мыши CD-1 обоего пола, четырехмесячного возраста.

Источник животных: питомник лабораторных животных «Пущино», вторая генерация.

Карантин/адаптация: животные до начала исследования были помещены в отдельную комнату на период адаптации (14 дней). Во время этого периода у животных контролировалось проявление отклонений в состоянии здоровья согласно СОП «Прием животных, карантин, адаптация».

Распределение по группам производилось случайным образом, в качестве критерия выбора животных использовалась гомогенность групп по массе тела, так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 15% от средней массы животных одного пола.

Идентификация

Каждому животному присваивался индивидуальный идентификационный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка красителем (Табл. 1).

Таблица 1

Схема нумерации животных:

Индивидуальный номер животного	Локализация метки
1	Правое ухо
2	Левое ухо
3	Правая передняя лапа
4	Левая передняя лапа
5	Правая задняя лапа
6	Левая задняя лапа

На этикетке клетки определенного цвета указывалась группа, номера животных, метка, код исследования, фамилия и инициалы руководителя исследовательской группы.

Информация об уходе и содержании

Все процедуры по рутинному уходу за животными выполнялись в соответствии с СОП («Ежедневный осмотр состояния животных», «Рутинные манипуляции по уходу за грызунами», «Размещение и маркировка лабораторных животных»).

В комнате содержания животных поддерживались следующие условия: температура окружающего воздуха 18-24°C; относительная влажность 50-70%; естественная смена световых периодов; 100% вентилирование без рециркуляции со сменой воздуха 8 объемов комнаты в час.

Мыши содержались в стандартных поликарбонатных клетках (Bioskape) по 10 животных одного пола на клетку. Подстил: REHOFIX, производства J. RETTENMAIER & SÖHNE (Германия). Корм: «ПроКорм», полнорационный, для конвенциональных мелких лабораторных грызунов, апатогенный, производства АО «БиоПро» (Россия). Для питья использовалась профильтрованная водопроводная вода, которую давали животным в стандартных питьевых бутылочках (Bioskape) объемом 750 мл. Корм и питье без ограничения (*ad libitum*). Содержание животных исключало возможность контаминации подстилки, корма и воды, способной повлиять на результаты исследования.

Объектом исследования служил лосьон для тела «Капен», комплекс аминокислот, пептидов и энзимов, производства ООО НПК «Инфинити», дата изготовления 20.09.2017 г.

1.2 Методы исследования

1.2.1 Методика определения антиоксидантной активности.

Метод основан на способности нитропруссида натрия в водном растворе при физиологическом значении pH спонтанно генерировать оксид азота, который взаимодействует с кислородом с образованием нитрит-ионов. Концентрацию нитрит-ионов в среде можно оценить с помощью добавления реактива Грисса. Связывание оксида азота ведет к снижению образования нитрит-ионов.

Для изучения антиоксидантной активности лосьона «Капен» методика была адаптирована для использования на микропланшетном ридере Tecan M1000 PRO. Нитропруссид натрия (чда, ЗАО «Вектон», Россия) 10 mM готовился путем растворения навески в PBS pH 7,4. Реактив Грисса (чда, ЗАО «Вектон», Россия) 10% раствор готовился путем растворения навески в 12% уксусной кислоте. Растворы готовились в день эксперимента.

В лунку 96-луночной плашки вносили 100 мкл раствора нитропруссида натрия и 10 мкл пробы исследуемого лосьона «Капэн». Смесь инкубировали 150 минут при комнатной температуре. Затем в лунку вносили 100 мкл раствора реактива Грисса. Оптическую плотность измеряли через 10 минут при длине волнны 545 нм.

Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ связывания NO} = 100 * (\text{ODк} - \text{ODо}) / \text{ODк},$$

Где OD_k – оптическая плотность контрольной пробы,

OD_o – оптическая плотность опытной пробы.

Результаты:

Было установлено, что комплекс аминокислот, пептидов и энзимов «Капэн» обладает антиоксидантной активностью в концентрациях 4 мкл/мл и 8 мкл/мл. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Исследование антиоксидантной активности комплекса аминокислот, пептидов и энзимов «Капэн»

Препарат, концентрация	Процент связывания NO (M±SEM)
Капэн, 4 мкл/мл	11,0±2,2
Капэн, 8 мкл/мл	33,8±1,4

1.2.2 Методика оценки действия лосьона «Капэн» (комплекса аминокислот, пептидов и энзимов) на мембрану эритроцитов.

Получение эритроцитов.

Кровь из хвостовой вены двух белых крыс SD собирали в пластиковые пробирки, содержащие этилендиаминетрауксусную кислоту в качестве антикоагуланта. Образец охлаждали, затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин. Осевшие эритроциты трижды промывали забуференным фосфатами (pH 7,4) раствором хлорида натрия (далее PBS). Промытую эритроцитарную массу ресуспенсировали в PBS, чтобы получить 5%-ную (об/об) суспензию, которую использовали в течение 6 часов.

Гемолиз эритроцитов.

Гемолиз проводили в пробирках Эппендорфа объемом 2 мл. Контрольные пробы содержали 1,0 мл изотоничекого PBS, 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной супензии, а также эквивалентное количество спирта этилового 40%. Максимальный гемолиз достигался путем добавления 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной супензии к 1,0 мл дистиллированной воды. Для проведения частичного гемолиза эритроцитов готовили раствор PBS с разведением в 2,5 раза, к 1,0 мл которого добавляли 0,2 мл 5%-ной эритроцитарной супензии. После внесения эритроцитарной супензии пробы инкубировали при комнатной температуре 5 минут и проводили центрифугирование (4000 об/мин, 5 мин). Уровень гемолиза оценивали по поглощению трех образцов каждой надосадочной жидкости при длине волны 535 нм на мультипланшетном ридере Tecan M1000 PRO.

Оценка влияния лосьона «Капэн» (комплекса аминокислот, пептидов и энзимов) на степень гемолиза эритроцитов.

К содержимому проб (0,2 мл 5%-ной эритроцитарной супензии в 1 мл изотонического PBS или PBS, разбавленного в 2,5 раза, или дистиллированной воды) добавляли «Капэн» для создания концентрации 4 мкл/мл и 8 мкл/мл. Инкубирование, центрифугирование и определение степени гемолиза проводили аналогично контрольным пробам.

Мембраностабилизирующую активность (МА) в гипотоническом растворе PBS рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ MA} = 100 * (\text{ODк} - \text{ODо}) / \text{ODк},$$

Где OD_к – оптическая плотность контрольной пробы,

OD_о – оптическая плотность опытной пробы.

Результаты:

Было установлено, что лосьон «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов) в концентрациях 4, 8 и 40 мкл/мл обладает мембраностабилизирующим действием при осмотическом гемолизе эритроцитов. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Мембраностабилизирующая активность лосьона «Капэн» (комплекса аминокислот, пептидов и энзимов), %

Препарат, концентрация	Процент МА ($M \pm SEM$)
Капэн, 4 мкл/мл	16,6±5,9
Капэн, 8 мкл/мл	22,5±4,6
Капэн, 40 мкл/мл	55,8±4,9

1.2.3 Методика оценки действия концентрата лосьона «Капэн» (комплекса аминокислот, пептидов и энзимов) в модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией

1.2.3.1 Исследование антигипоксической активности лосьона «Капэн» (комплекса аминокислот, пептидов и энзимов) при курсовом трансдермальном введении

Опыты были поставлены на белых мышах (самцах и самках) линии CD-1 массой от 36,0 до 44,5 грамм. Животные были разделены на две группы по 7 животных (4 самца и 3 самки) в опыте и контроле. Накануне опыта животные не получали корм в течение 12 часов. Вода в свободном доступе.

Методика опыта.

Первая опытная группа получала 40 % этиловый спирт трансдермально в дозе 1,3 мл/кг (0,05 мл спирта на 40 гр. веса мыши). Вторая опытная группа получала лосьон «Капэн» трансдермально в дозе 1,3 мл/кг (0,05 мл препарата на 40 гр. веса мыши). Перед нанесением спирта и Капэна кожу в межлопаточной области выбивали, спирт и Капэн наносили на кожу в межлопаточной области в вышеуказанных дозах. Третья группа контрольная интактная. Нанесение препаратов проводили в течение 7 дней. На 8 день через 40 минут после нанесения препаратов на кожу животные помещались в сосуды с притертой пробкой емкостью 250 мл. Дополнительную герметизацию проводили с использованием вазелина и ленты «Parafilm». Фиксировали время гибели животных. Критерием гибели являлось прекращение дыхательной и двигательной активности. Результаты представлены в таблице 4 и на рисунке 1.

1.2.3.2 Исследование антигипоксической активности концентрата лосьона «Капэн» (комплекса аминокислот, пептидов и энзимов) при курсовом пероральном введении.

Опыты были поставлены на белых мышах (самцах и самках) линии CD-1 массой от 36 до 44 грамм. Животные были разделены на две группы по 10 животных (5 самцов и 5 самок). Накануне опыта животные не получали корм в течение 12 часов. Вода в свободном доступе.

Методика опыта.

Первая опытная группа получала 40 % этиловый спирт перорально в дозе 1мл/кг (0,04 мл спирта в 0,2 мл воды на 40 гр. веса мыши). Вторая опытная группа получала лосьон «Капэн» перорально в дозе 1мл/кг (0,04 мл концентрата в 0,2 мл воды на 40 гр. веса мыши). Введение веществ проводили в течение 7 дней. На 8 день через 40 минут после введения веществ животные помещались в сосуды с притертой пробкой емкостью 250 мл. Дополнительная герметизация проводилась с использованием вазелина и ленты «Parafilm». Фиксировалось время гибели животных. Критерием гибели являлась прекращение дыхательной и двигательной активности. Результаты представлены в таблице 4 и на рисунке 1.

Таблица 4

Антигипоксическая активность лосьона для тела «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов) при трансдермальном и пероральном пути введения

№ п/п	Препарат	Доза, мл/кг	Продолжительность жизни, сек (M±SD)
1	контроль	---	1042,5± 10,78
2	Спирт 40%, трансдермально	1,3 мл/кг	1097,1±38,65
3	Капэн, трансдермально	1,3 мл/кг	1097,1±71,37
4	Спирт 40% перорально	1,0 мл/кг	1036,5±75,84
5	Капэн, перорально	1,0 мл/кг	1078±50,90

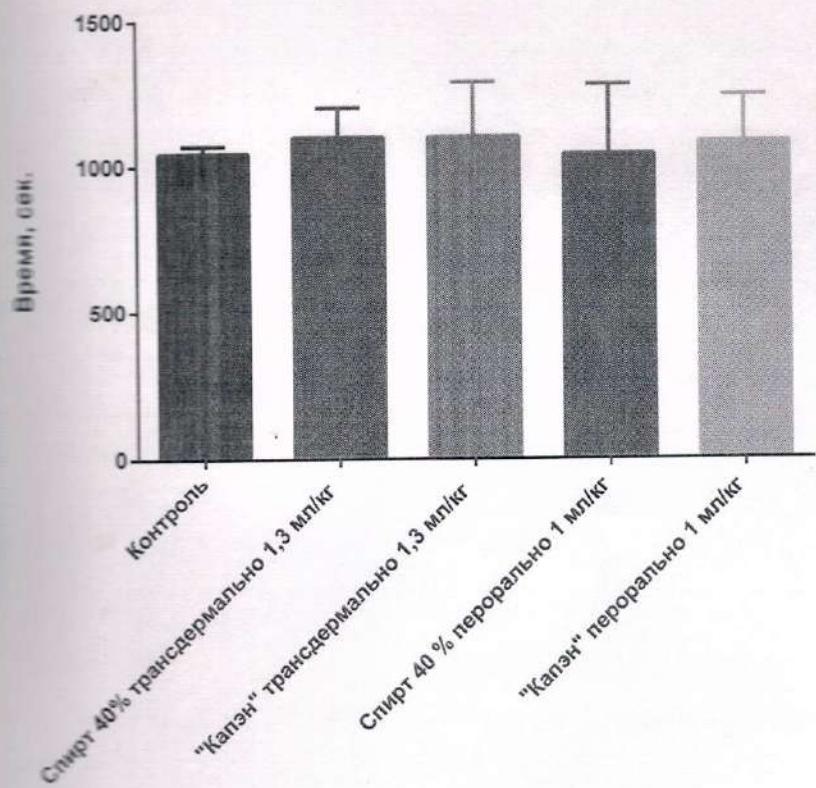


Рис.1 Антигипоксическое действие 40 % спирта этилового и лосьона «Капэн» при трансдермальном и пероральном пути введения, ($M \pm SD$).

Заключение

Объектом тестирования служил лосьон для тела «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов), производства ООО «НПК Инфинити», дата изготовления 20.09.2017 г. Изучение антиоксидантного действия было проведено по методике, изложенной в статье Marzocci, I., Marguire, J.J., Droy-lefaiz, M.T., Packer, L., 1994. The nitric oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201, 748–755. Методика адаптирована для изучения антиоксидантной активности с использованием микропланшетного ридера.

Изучение антигипоксического действия было проведено в модели гипоксической гипоксии с гиперкардией согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Миронов А. Н. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Изучение мембраностабилизирующего действия было проведено на эритроцитах крови белых крыс в модели гипотонического гемолиза.

Лосьон для тела «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов) в опытах на животных был изучен в одной дозе.

Установлено, что лосьон для тела «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов) обладает минимальным антиоксидантным действием, вызывает уменьшение образования свободных радикалов до $33,8 \pm 1,4\%$ в концентрации 8 мкл/мл и до $11,0 \pm 2,2\%$ в концентрации 4 мкл/мл.

При изучении мембраностабилизирующего действия лосьона для тела «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов) на эритроцитах крови крыс выявлено выраженное дозозависимое, мембраностабилизирующее действие, под действием лосьона для тела «Капэн» гемолиз эритроцитов уменьшился на $55,8 \pm 4,9\%$ в концентрации 40 мкл/мл, на $22,5 \pm 4,6$ в концентрации 8 мкл/мл, и на $16,6 \pm 5,9\%$ в концентрации 4 мкл/мл.

При изучении антигипоксического действия лосьона для тела «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов) в модели гипоксической гипоксии с гиперкардией при курсовом применении установлено, что продолжительность жизни мышей при курсовом трансдермальном и пероральном пути введения по сравнению с контролем не изменилась. Антигипоксического действия не установлено.

Лосьон для тела «Капэн» (комплекс аминокислот, пептидов и энзимов) не обладает выраженным антиоксидантным и связанным с ним антигипоксическим действием, но обладает выраженным мембраностабилизирующим эффектом. Мембраностабилизирующее действие лосьона «Капэн», возможно, связано с его составом, включающим в себя аминокислотный комплекс, используемый тканями организма для восстановления поврежденных клеточных структур. Механизм действия лосьона «Капэн» нуждается в дополнительном исследовании.