



ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

МЕТОДЫ ПОИСКА И ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ С АНТИОКСИДАНТНОЙ И ПРОТИВОГИПОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ.



Кислород, Свободные радикалы, Антиоксидантная система

Кислород – самый распространенный элемент в биосфере

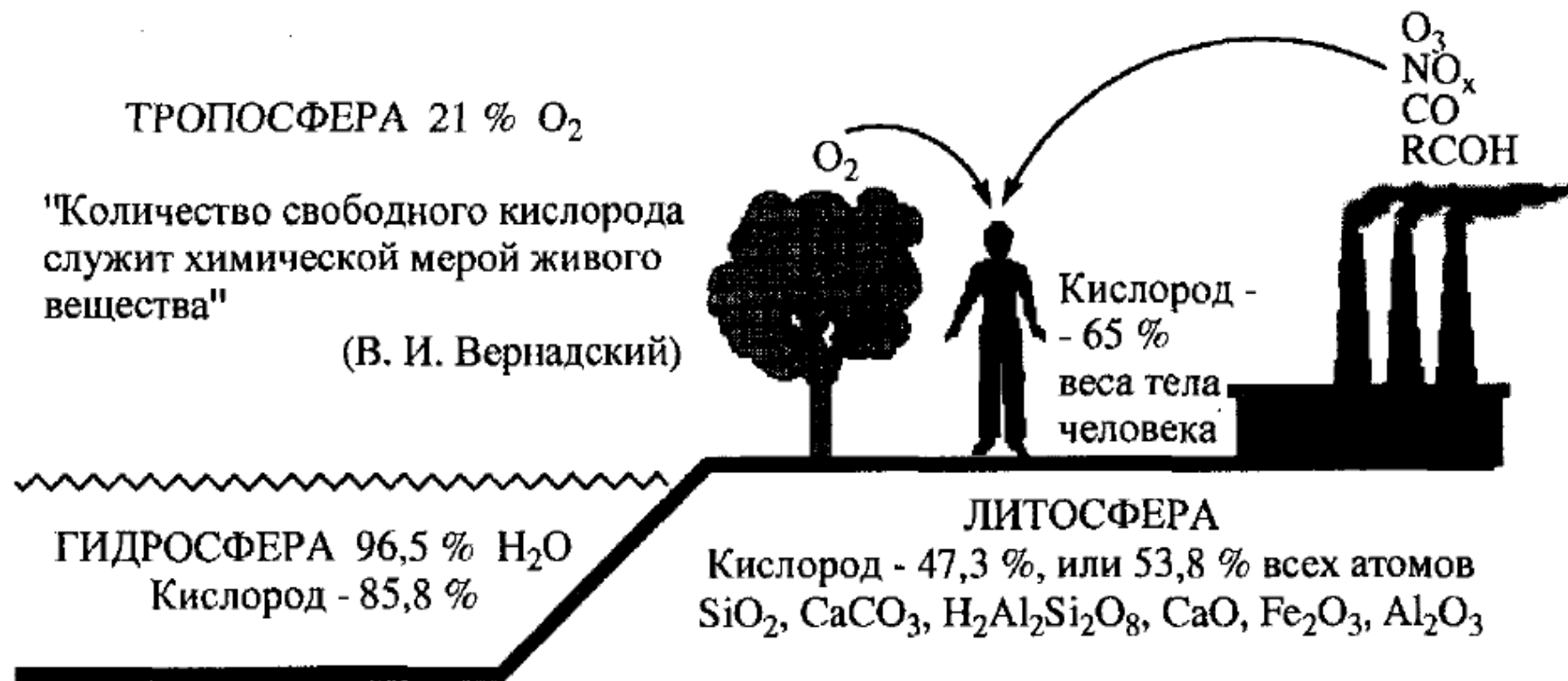
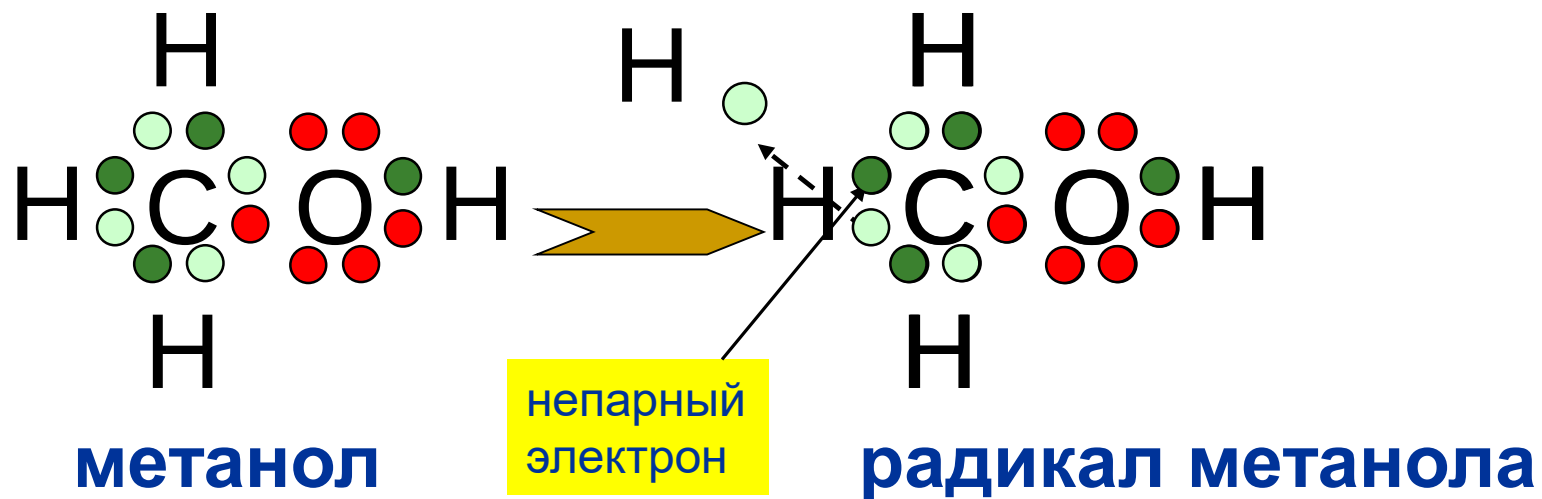


Рис. 1. Распределение кислорода в биосфере

За это время в организме человека вырабатывается **800-1700 кг** кислородных радикалов

Понятие о СР

- Радикал - это частица, отличающаяся от остальных частиц тем, что в электронном слое одного из ее атомов на внешней орбитали находятся не два взаимно удерживающих друг друга электрона, делающих эту орбиталь заполненной, а один или несколько одиночных (неспаренных) электронов [Владимиров, Арчаков, 1972; Клебанов, 2001]





Активные формы кислорода (АФК)

Кислородные радикалы	
кислород (бирадикал)	$O_2^{\bullet\bullet}$
супероксид-анион	$O_2^{\bullet-}$
гидроксил	$OH^{\bullet}$
пероксил	$ROO^{\bullet}$
алкоксил	$RO^{\bullet}$
окись азота	$NO^{\bullet}$
Нерадикальные кислородные метаболиты	
перекись водорода	H_2O_2
органические перекиси	$ROOH$
синглетный кислород	1O_2
гипогаллоиды	$HOCl, HOBr, HOI$
озон	O_3
альдегиды	$HCOR$
пероксинитрит	$ONOOH$

В **физиологических** условиях свободно-радикальное перекисное окисление липидов протекает на крайне низком уровне и носит скорее регуляторный характер

Важной физиологической функцией ПОЛ является

- обновление фосфолипидного состава мембран
- индукция биоэнергетических процессов
- активация ряда ферментов, регулирующих переключение метаболических путей клетки

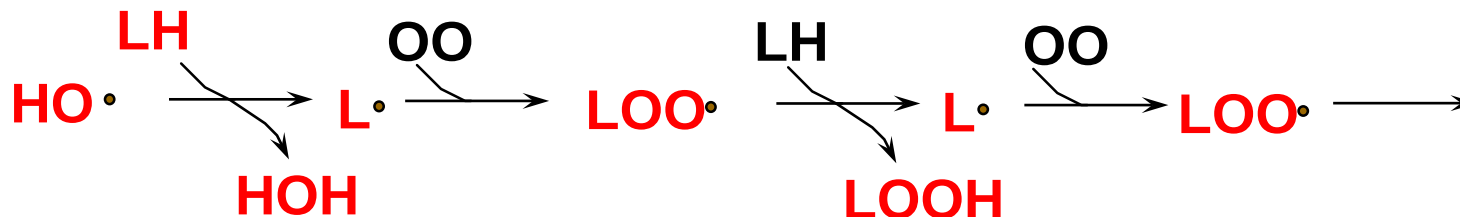
Продукты ПОЛ в малых концентрациях необходимы

- для регуляции проницаемости клеточных мембран
- стабильности липопротеиновых комплексов

Повреждающее действие радикалов гидроксила (HO·)

Радикалы гидроксила оказывают **повреждающее**, **мутагенное** или **летальное** действие на живые клетки из-за своей исключительно высокой реакционной способности.

- Они активируют провоспалительный фермент - **фосфолипазу A₂**, освобождающую арахидоновую кислоту, являющуюся источником медиаторов воспаления
- Они вызывают **разрывы нитей ДНК** и оказывают **мутагенное действие** на делящиеся клетки
- Они денатурируют белки и **инактивируют ферменты**
- Они инициируют **цепное окисление липидов** в биологических мембранах и липопротеинах крови



Избыточная активация процессов СРО приводит к развитию синдрома липидной перекисидации

- повреждение мембранных липидов
- нарушение ресинтеза АТФ
- накопление продуктов перекисной денатурации липидов и белков
- нарушение физико-химической структуры мембран клеток
- ингибирование ферментативных систем
- инактивирование цитоплазматических ферментов
- деполяризация ДНК
- расщепление АТФ и аминокислот
- снижение активности тиоловых ферментов

Многокомпонентная антиоксидантная система

```
graph TD; A[Многокомпонентная антиоксидантная система] --> B[Неферментативное звено]; A --> C[Ферментативное звено]; B --> D[Антиоксиданты водо- и жирорастворимые]; D --> E["• глутатион<br>• эрготионеина<br>• аскорбатная<br>окислительно-восстановительная<br>система"]; D --> F["• токоферолы (вит. Е)<br>• витамины А и К<br>• полифенолы (убихинон)<br>• флавоноиды (витамин Р)<br>• стероидные гормоны"]; C --> G["• СОД<br>• Каталаза<br>• ГПО<br>• ГР"];
```

Неферментативное звено

Ферментативное звено

**Антиоксиданты
водо- и жирорастворимые**

- СОД
- Каталаза
- ГПО
- ГР

- глутатион
 - эрготионеина
 - аскорбатная
- окислительно-восстановительная система**

- токоферолы (вит. Е)
- витамины А и К
- полифенолы (убихинон)
- флавоноиды (витамин Р)
- стероидные гормоны

**Именно взаимодействие
эндогенных антиоксидантов
между собой является
основой поддержания
гомеостаза свободно-
радикальных реакций в клетке**

**Такое соотношение
прооксидантных и
антиоксидантных систем
определяет**

**«АНТИОКСИДАНТНЫЙ
СТАТУС ОРГАНИЗМА»**

(Ф.З. Меерсон, 1981)

Заболевания и нарушения, связанные с СРО

(Gutteridge J.M., 1993 и Loeckl L., et. al., 1999)

Заболевания и нарушения	Характер вовлечения свободных радикалов
Атеросклероз	Недостаточность или истощение защитных факторов
Нарушения мозга Гипоксия, ишемия Болезнь Паркинсона Болезнь Альцгеймера Синдром Дауна Рассеянный склероз Реперфузионные повреждения	Патологическое окисление субстратов, изменения конц. O_2 Использование лекарств и токсинов $\uparrow$ образования $O_2^{\cdot-}$, H_2O и $HClO$ активированными фагоцитами Недостаточность или истощение защитных факторов Структурная нарушения клетки Патологическое окисление субстратов, изменения конц. O_2
Хронический гранулематоз	Генные нарушения в антиоксидантной системе
Сахарный диабет	Патологическое окисление субстратов, изменения конц. O_2
Ревматоидный артрит	$\uparrow$ образование $O_2^{\cdot-}$, H_2O и $HClO$ активированными фагоцитами
Нарушения обмена железа Идиопатический гемохроматоз Талассемия	Передача электронов кислороду переходными металлами Передача электронов кислороду переходными металлами
Болезни легких Астма Асбестоз Респираторный дистресс-синдром	$\uparrow$ образование $O_2^{\cdot-}$, H_2O и $HClO$ активированными фагоцитами $\uparrow$ образование $O_2^{\cdot-}$, H_2O и $HClO$ активированными фагоцитами $\uparrow$ образование $O_2^{\cdot-}$, H_2O и $HClO$ активированными фагоцитами
Канцерогенез и радиационные повреждения	Повреждение тканей
Токсические состояния, вызванные: Ксенобиотиками (CC_4 , паракват, сигаретный дым, алкоголь) Ионами металлов (Hg, Fe, Cu, и тд.) Цитостатиками (доксорубицин, блеомицин)	Использование лекарств и токсинов Передача электронов кислороду переходными металлами Использование лекарств и токсинов

АНТИОКСИДАНТЫ – это соединения, которые препятствуют образованию свободных радикалов, и таким образом предотвращают развитие болезней, вызываемых повреждением клеточных структур свободными радикалами (Владимиров Ю.А., 1998)

По механизму действия их можно разделить на:

- "поглотители" (**scavenger of free radicals**), которые очищают организм от всех свободных радикалов, чаще всего восстанавливая их до стабильных неактивных продуктов
- "ловушки" (**trap of free radicals**) - антиоксиданты, которые имеют сродство к какому-то определенному свободнорадикальному продукту (ловушки синглетного кислорода, гидроксил-радикала и т.д.). Часто используют для уточнения механизма свободнорадикальной реакции
- антиоксиданты, обрывающие цепи (**chain breaking antioxidants**) - вещества, молекулы которых более реакционноспособны, чем их радикалы. Чаще всего – фенолы, легко отдающие свои электроны, превращая радикал, с которым они прореагировали, в молекулярный продукт, а сами при этом превращаются в слабый феноксил-радикал, не участвующий в продолжении цепной реакции

АНТИОКСИДАНТЫ – это соединения, которые препятствуют образованию свободных радикалов, и таким образом предотвращают развитие болезней, вызываемых повреждением клеточных структур свободными радикалами (Владимиров Ю.А., 1998)

- Жирорастворимые
 - ❖ Токоферолы
 - ❖ Инол
 - ❖ Пробукол
 - ❖ Убихинол
- Водорастворимые
 - ❖ Аскорбат
 - ❖ Тролокс
 - ❖ Биофлавоноиды
 - ❖ Оксипиридины
- Тиоловые АО
 - ❖ Глутатион
 - ❖ Липоевая кислота
- Препараты непрямого действия
 - ❖ N-ацетилцистеин
 - ❖ Компламин
 - ❖ Селенит натрия
 - ❖ Дефероксамин
- Ферменты – препараты СОД.

Классификация антиоксидантов прямого действия

1. Донаторы протона	
■ Фенолы	Токоферолы, ионол, пробукол, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, произв. фенолов и нафтолов, катехины, эстрогены, лазароиды
■ Азот -содержащие гетероциклические вещества	Мелатонин, произв. 1,4-дигидропиридина, 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин, произв. пирролопиримидина
■ Тиолы	Глутатион, цистеин, гомоцистеин, эрготионеин, дигидролипоевая кислота, N-ацетилцистеин
■ α, β-Диенолы	Аскорбиновая кислота
■ Порфирины	Билирубин
2. Полиены	Ретиноиды, каротиноиды
3. Катализаторы	
■ Имитаторы СОД	Нитроксилы, аминоксилы, металлопорфирины
■ Имитаторы ГП	Селеноорганические и теллур-содержащие соединения
4. Ловушки радикалов	Нитроны
5. Комплексообразователи (хелаторы)	ЭДТА и ее соли, десфероксамин, карнозин, карведилол, 1,10-батофенантролин, изоникотинольные соединения, некоторые флавоноиды

В соответствии с (В.Г. Зайцев, О.В. Островский и др., 2003)

Митохондриально-адресованные антиоксиданты семейства SkQ и mitoQ разработаны НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

Вещества созданы на основе убихинона (mitoQ) и пластохинона (SkQ), а также их короткоцепочных аналогов. Молекула семейства SkQ представляет из себя сложно устроенную структуру, состоящую из двух основных частей: антиоксидантной «головы» и «хвоста», отвечающего за проникновение молекулы в митохондрию.

Наиболее эффективное соединение из митохондриально-адресованных антиоксидантов представляет из себя конъюгат родамина 19 с цепочкой из 12 углеродных атомов, служащим линкером для соединения катионного остатка с антиоксидантной «головой», но не имеющего такой «головы».



Методы изучения свободно- радикальных процессов

Методы изучения свободно-радикальных процессов



в соответствии с Kohen R, Nyska A., 2002

Методы изучения свободно-радикальных процессов

- ✓ **Количественное определение радикалов**
 - *прямой подход (электронный парамагнитный резонанс, метод спиновых ловушек, хемилюминесценция)*
 - *непрямой подход (оценка повреждения ДНК, оценка повреждения белков, определение продуктов ПОЛ)*
- ✓ **Количественное определение маркеров окислительного повреждения**
 - *оценка повреждения ДНК*
 - *оценка повреждения белков (карбонилы, перекисное окисление)*
 - *иммуногистохимические маркеры, используемые в токсикологической патологии для визуализации феномена окислительного стресса*
 - *оценка перекисного окисления липидов*
- ✓ **Количественная оценка антиоксидантных систем**
 - *определение специфических низкомолекулярных антиоксидантов*
 - *определение антиоксидантных ферментов*
 - *определение общей антиоксидантной активности (профиль восстановительной способности)*

Для изучения антиоксидантной активности веществ широко используются физические и физико-химические методы:

1. ORAC – oxygen radical absorbance capacity;
2. TRAP – total radical trapping antioxidant parameter;
3. FRAP – ferric reducing antioxidant power;
4. TEAC – (Randox) – trolox equivalent antioxidant capacity;
5. ABTS – (2,2) – azinobis (3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulfonic acid;
6. TBARS – thiobarbituric acid reactive substance.

СКРИНИНГ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛИ АСКОРБАТЗАВИСИМОГО ПОЛ

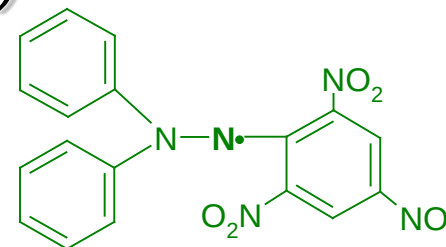
Ланкин В.З. и др., // Труды московского общества испытателей природы. - М., 1975. -Т.52. -С.73-78)

- **Вещества сравнения - ионол, тролокс**
- **UV-Vis спектрофотометр цифровой Apl PD-303UV (Япония), центрифуга лабораторная ОПН-3 (Россия), гомогенизатор, термостат водяной EL-20 (Votice, Польша)**
- **Исследования проводили на 4% экстракте гомогената печени крыс на 0,1М трис-HCl-буфере с pH 7,4, термостатируемого при 37°C**
- **Реакцию индуцировали 50 мМ аскорбиновой кислотой (Chemapol, Чехия), после инициирования в пробе осаждался белок и прерывалась реакция 0,2 мл 50% трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугирования при 3 тыс. об/мин в течении 10 минут, затем к надосадочной жидкости добавляли 0,8% раствор 2-тиобарбитуровой кислоты, пробы кипятили 10 минут на водяной бане**
- **Степень перекисного окисления липидов определяли по изменению оптической плотности окрашенного триметинового комплекса в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой при длине волны 532 нм в кювете с длиной оптического пути 10мм**
- **Активность определяли по формуле:**
$$\% \text{ ингибирования} = 100 - (E_{\text{оп}}/E_{\text{контр}} * 100),$$

где $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы с веществом,
 $E_{\text{контр}}$ – оптическая плотность пробы, не содержащей вещества.

СКРИНИНГ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛИ ДФПГ •

J. Glavind (Acta Chemica Scand, 1963)



- Вещества сравнения – ионол и тролокс
- Спектрофотометр Arel PD-303UV (Япония)
- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ•) – свободный радикал, легко присоединяющий электрон или протон водорода от Н-донорных молекул, становясь стабильным (Mambro et al., 2003)
- Использовался спиртовой 1×10^{-5} М/л раствор ДФПГ• (Sigma, США). Антирадикальная активность соединений регистрировалась по снижению оптической плотности при длине волны 517 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Активность вещества сравнивали со контрольными показателями пиригаллола, который полностью подавляет радикал ДФПГ•.
- Расчет процента ингибирования проводили по формуле:
$$\% \text{ ингибирования} = 100 - (D_1/D_2 * 100),$$

где D_1 – изменение оптической плотности при добавлении веществ в исследуемой концентрации,
 D_2 – изменение оптической плотности при добавлении пиригаллола.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА МОДЕЛИ ABTS •

C. Rice-Evans (Methods in Ensimology, 1994)

- Спектрофотометр PD-303 UV (APEL, Япония) с программным обеспечением
- Препараты сравнения - ионол, тролокс
- Использовали водный раствор радикала ABTS• (0,5 мг/мл) (MP Biomedicals, Франция)
- Реакцию инициировали 0,612 мМ раствором перекиси водорода
- Процесс подавления максимума поглощения измеряли во времени в течение 30 мин. и определяли спектрофотометрически по падению оптической плотности при длине волны 734 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм, что регистрировалось на компьютере в программном обеспечении
- Активность веществ определялась на 10 минуте реакции
$$\% \text{ ингибирования} = 100 - (E_{\text{оп}}/E_{\text{контр}} * 100),$$
где $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы с веществом,
 $E_{\text{контр}}$ – оптическая плотность пробы не содержащей вещества.

Что такое хемилюминесценция (ХЛ)?

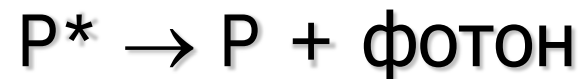
Хемилюминесценция (ХЛ) — это свечение, сопровождающее химическую реакцию.

Процесс хемилюминесценции включает в себя две стадии:



Образование продукта в электроном возбужденном состоянии

(хемилюминесцентная реакция).



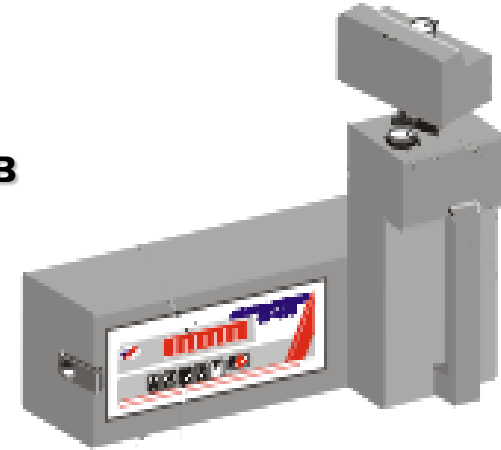
Испускание кванта света (люминесценция).

На сегодня наиболее изучены три типа процессов, сопровождающихся ХЛ:

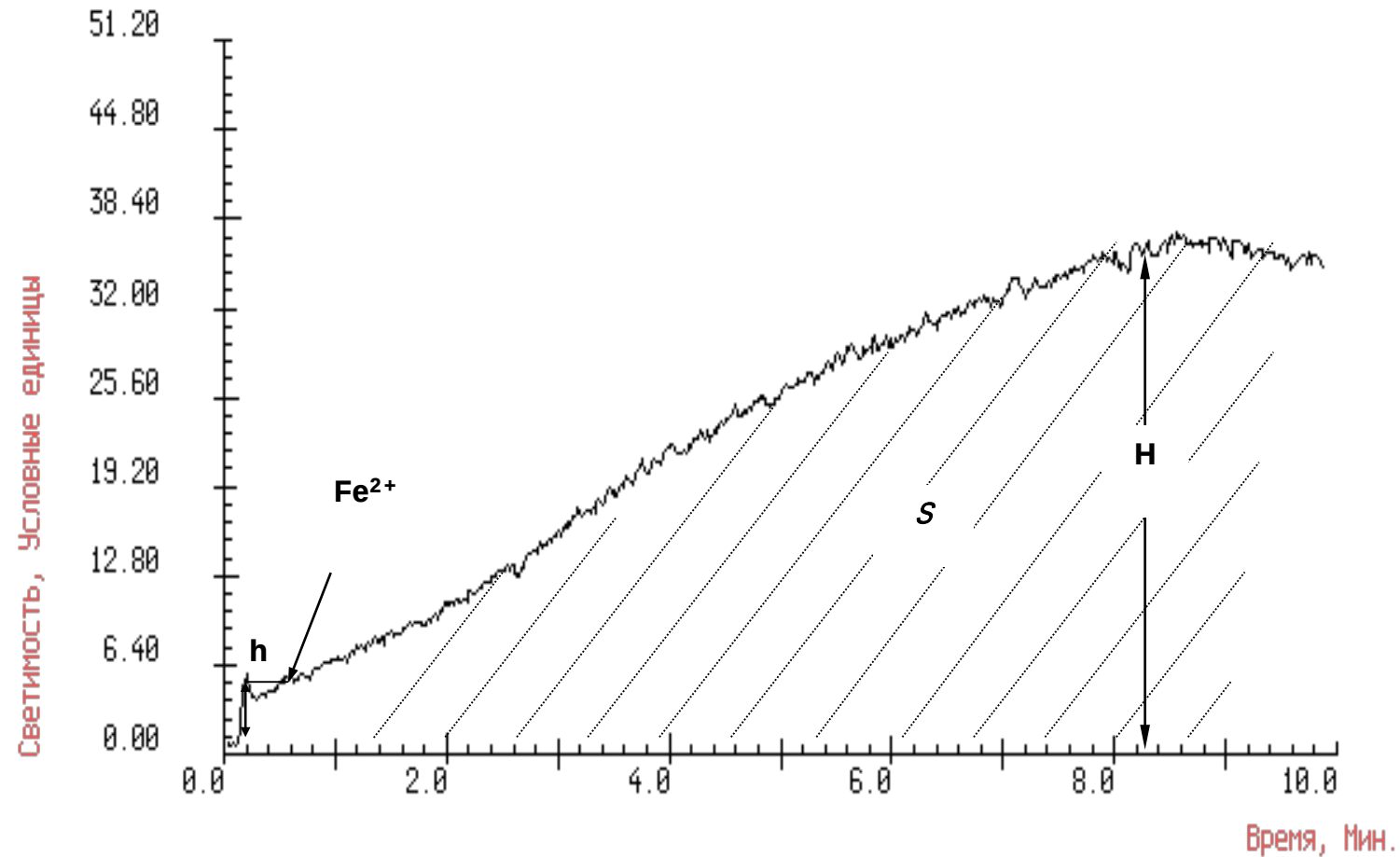
1. ХЛ в системах, содержащих АФК.
2. ХЛ, сопровождающая реакции цепного (свободнорадикального и пероксидного окисления органических соединений, преимущественно липидов).
3. ХЛ с применением хемилюминесцентных маркеров, таких как люминол – маркер гидроксильного радикала и люцигенин, являющийся маркером супероксидного радикала

Модель ХЛ для изучения антиоксидантной активности

- Fe^{2+} -индуцированная хемилюминесценция липидов (Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А., // Уфа, 1995. 54с)
- Изучение антиоксидантной активности веществ, ингибиторный анализ
- «Хемилюминомер-03» (Уфа, Россия), связанный интерфейсом с компьютером IBM Pentium-133, гомогенизатор
- Реакционная смесь объемом 20 мл содержит липиды куриного желтка. Инициирование ПОЛ осуществляется введением раствора FeSO_4 (ЧДА, Украина) (конечная концентрация 2,5 мМ) при интенсивном перемешивании и t 37°C, после чего в течение 10 мин измеряется кинетика хемилюминесценции.

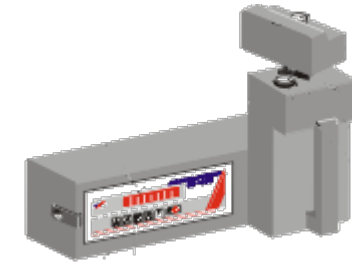


Кинетика реакции Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции желточных липопroteинов

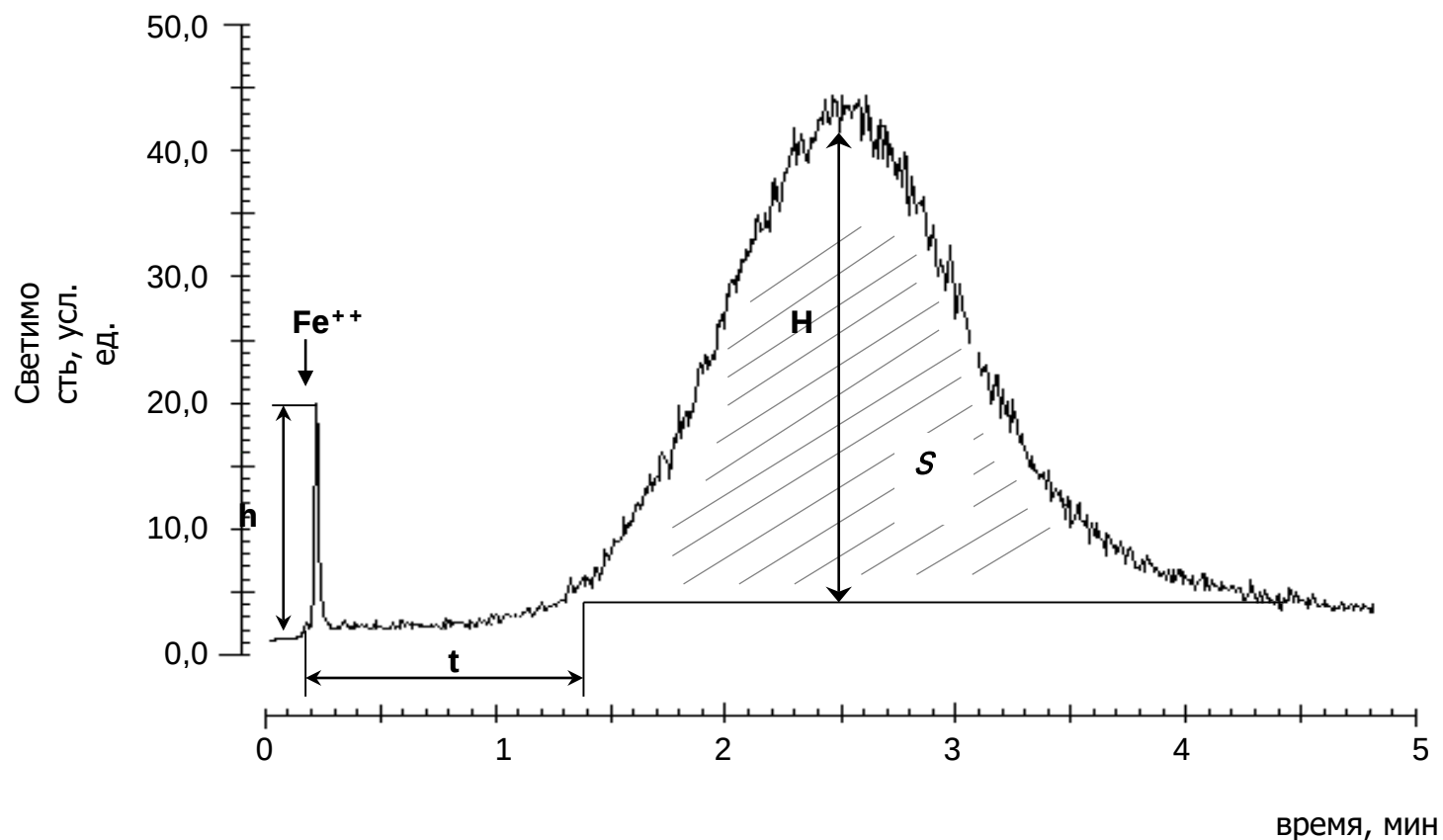


Метод ХЛ для изучения антирадикальной активности активности с люминолом

- Хемилюминесценция, сопровождающая аутоокисление люминола с генерацией активных форм кислорода (Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А., // Уфа, 1995. 54с)
- Изучение антирадикальной активности веществ, ингибиторный анализ
- «Хемилюминомер-03» (Уфа, Россия), связанный интерфейсом с компьютером IBM Pentium-133
- Инициирование ХЛ осуществляли введением раствора FeSO_4 (конечная концентрация 2,5 мМ) при интенсивном перемешивании в систему, содержащую люминол (Serva, Германия) (1 мкМ) и цитрат натрия (ЧД, Россия) (5 мМ), после чего в течение 5 мин измеряли кинетику хемилюминесценции.



Кинетика реакции хемилюминесценции Fe^{2+} -индуцированного окисления люминола

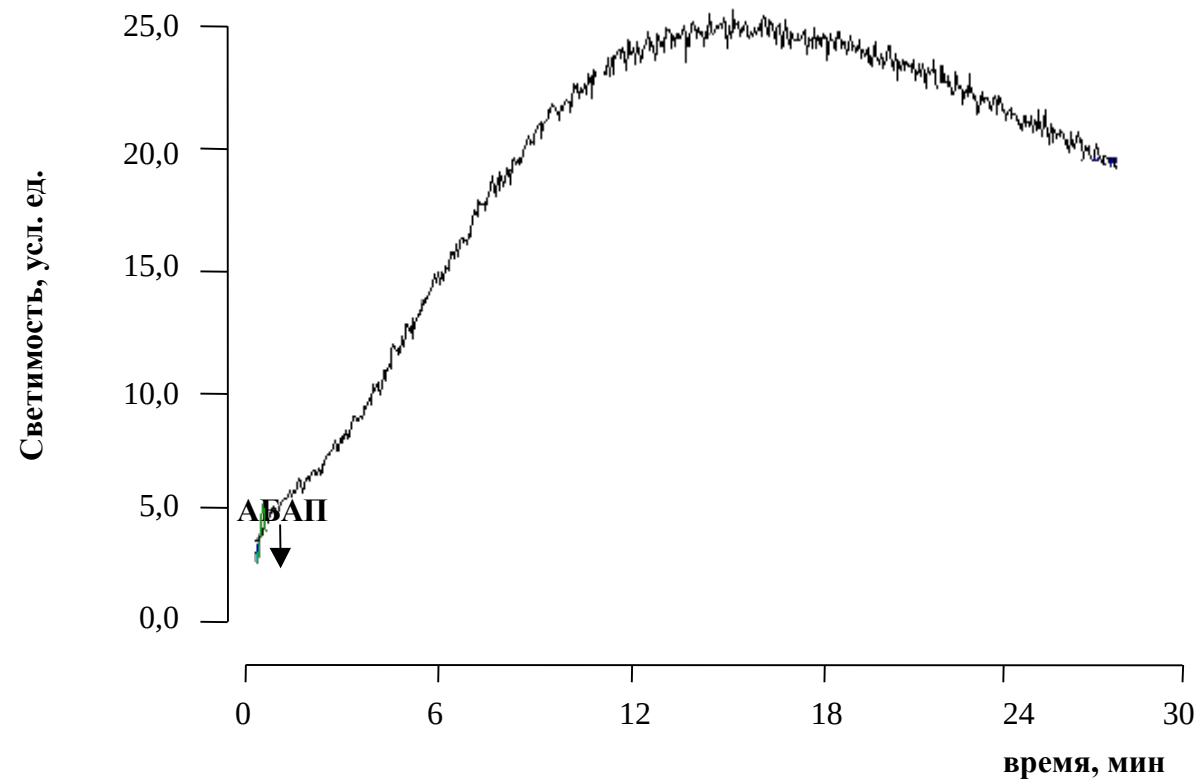


Метод ХЛ для изучения антирадикальной активности активности с АБАП

- ХЛ при термическом разложении 2,2`-азобис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорида (АБАП), с образованием пероксильного радикала ($RO_2\bullet$) (Клебанов Г.И. и др., 2001).
- Изучение антирадикальной активности веществ, ингибиторный анализ
- «Хемилюминомер-03» (Уфа, Россия), связанный интерфейсом с компьютером IBM Pentium-133
- Инициирование реакции осуществлялось АБАП, который при $t\ 37^\circ C$ разлагается, образуя пероксильные радикалы. В пробу, содержащую 2,5 мкМ люминола (Serva, Германия) в фосфатном буфере pH 7,4 при постоянном перемешивании и $t\ 37^\circ C$ вносили 50 мМ АБАП (Fluka, Швейцария) и измеряли кинетику ХЛ в течении 30 мин.

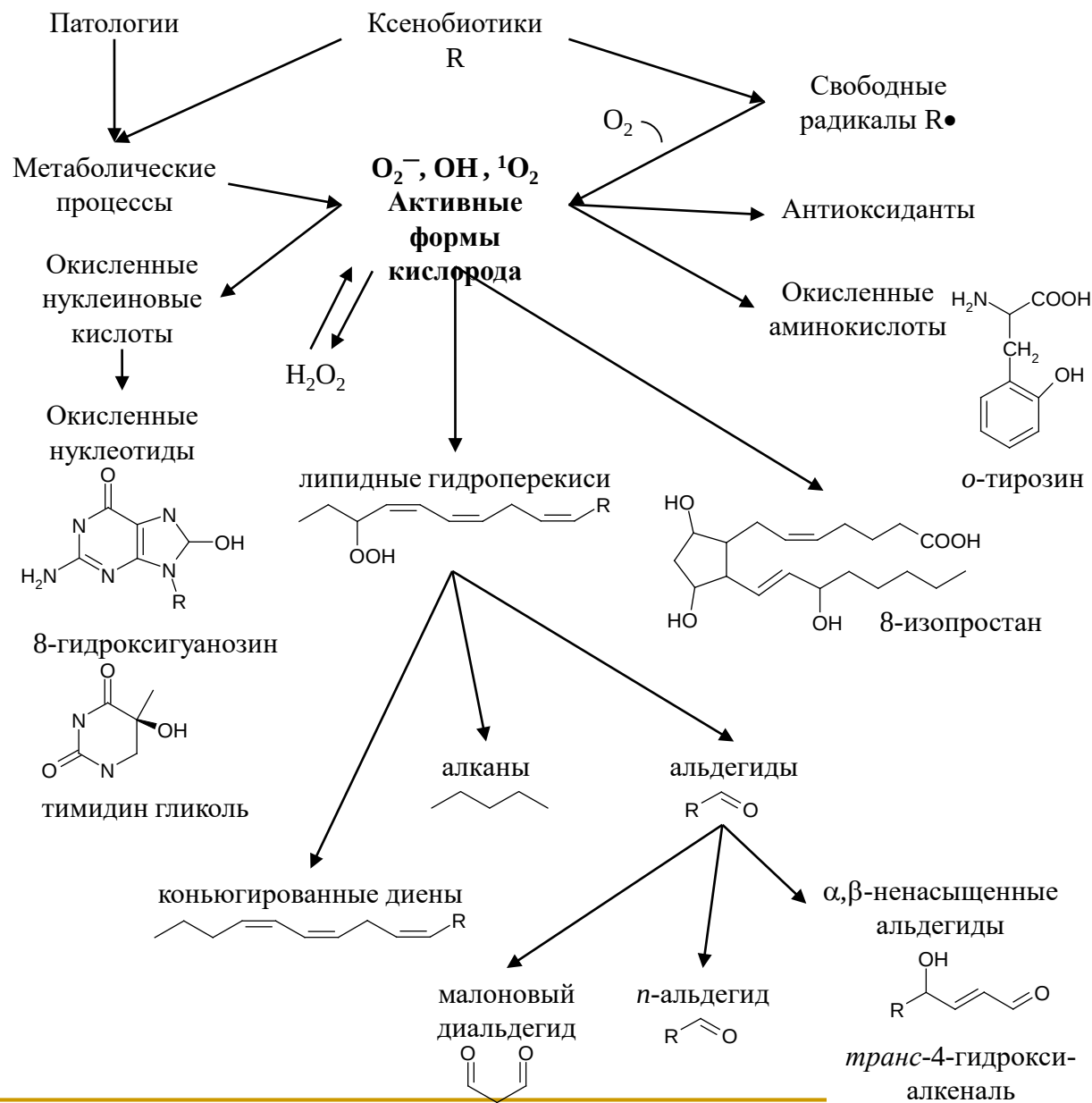


Кинетика реакции АБАП-индуцированной хемилюминесценции



Продукты свободно-радикального окисления

[de Zwart, 1999].



Более широкое распространение получили не прямые методы анализа молекулярных продуктов СРО, а именно количественное измерение первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов.

К первичным продуктам ПОЛ относятся гидроперекиси липидов $ROOH$ и диалкилперекиси $ROOR'$, к вторичным – основания Шиффа, диеновые конъюгаты, различные альдегиды (4-гидроксианеналь, МДА) и др.

Непрямые методы достаточно информативны и соответствуют основным аналитическим критериям, таким как точность, достоверность, чувствительность и специфичность.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ

(Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Г., 1987; Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., 1988)

- Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Россия), центрифуга лабораторная ОПН-3 (Россия), гомогенизатор МШ-2 (Россия)

В ПЛАЗМЕ

К 1% ортофосфорной кислоте, 10 ммоль/л раствору сернокислого железа и 0,6% раствору ТБК добавляли 0,3 мл плазмы крови. Пробы помещали на кипящую водяную баню на 60 минут, охлаждали, экстрагировали 4 мл бутанола, перемешивали и оставляли на 20 минут. Далее пробы центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин.

Центрифугат фотометрировали при длине волны 535 нм.

В ГОМОГЕНАТАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

К 6% ортофосфорной кислоте и 0,8% раствору ТБК добавляли 1 мл гомогената. Пробы помещали на кипящую водяную баню на 30 минут, охлаждали, экстрагировали 5 мл бутанола, перемешивали и оставляли на 30 минут. Далее пробы центрифугировали 2 минуты при 3000 об/мин.

Центрифугат фотометрировали при длине волны 532 нм.

Концентрацию МДА рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{МДА}} = E_{\text{оп.}} \cdot 85,47 \text{ (нМоль/мл плазмы)},$$

где D – оптическая плотность опытного образца.

$$C_{\text{МДА}} = \left(\frac{D}{1,56 \times 10^5} \right) \times 5(\text{мл}) / 0,1(\text{г ткани}) / 1000 \text{ (моль/г ткани)},$$

АО ФЕРМЕНТЫ

1. Супероксиддисмутаза



Разложение перекиси водорода

2. Каталаза



3. Глутатион-пероксидаза



Восстановление окисленного глутатиона

4. Глутатион-редуктаза



ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ

(Моин В.М., 1986)

- Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Россия), центрифуга лабораторная ОПН-3 (Россия), гомогенизатор МШ-2 (Россия), термостат водяной EL-20 (Votice, Польша)
- В реакции использовали 1 мл 4,8 ммоль/л раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл 20 ммоль/л раствора ГПТБ, которые прибавляли к супернатанту. Белки осаждали 50% раствором трихлоруксусной кислоты, смесь центрифугировали 10 минут 3000 об/мин.; к 0,1 мл образовавшегося супернатанта добавляли 5 мл 0,1 М трис-хлоридного буфера с pH 8,5 и 0,1 мл 0,01 моль/л раствора Элмана.
- В контрольную пробу плазму или гомогенат вносили непосредственно перед осаждением белков.
- Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$Акт. = \frac{(E_{max} - E_{оп}) / E_{max} \times 4,8}{0,01} \quad \text{мкМоль/мин на г ткани,}$$

где $E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы,
 E_{max} – оптическая плотность контрольной пробы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

(Костюк В.А., Потапович А.И., 1984)

- Спектрофотометр СФ-46 (Ломо, Россия), центрифуга лабораторная ОПН-3 (Россия), гомогенизатор МШ-2 (Россия)
- Аутоокисление кверцетина (1,4 мкмоль/л) проводили при комнатной температуре в 0,015 моль/л фосфатном буфере pH 7,8, содержащем 0,08 ммоль/л этилендиаминтетраацетат в конечном объеме 3,5 мл. Реакцию начинали внесением в среду инкубации кверцетина в 0,1 мл диметилсульфоксида.

Степень ингибирования (в %) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ инг} = 100 - \left(\frac{\Delta E_{\text{вещ}}}{\Delta E_{\text{контр}}} \times 100 \right)$$

$\Delta E_{\text{вещ}}$ – изменение оптической плотности за 10 минут в опытной пробе, содержащей вещество,

$\Delta E_{\text{кверц}}$ – изменение оптической плотности за 10 минут в контрольной пробе, не содержащей вещества.

Природные антиоксиданты также являются мощными ингибиторами СРО.

Наиболее часто определяют активность α -токоферола (витамина Е), так как его показатель является хорошим прогностическим и диагностическим тестом при ряде заболеваний.

Для определения витамина Е в крови используют различные методы: фосфорно – молибденовый, азотнокислый, дипиридиловый и другие, основанные на способности восстанавливать хлорное железо в присутствии индикаторов, при этом образуется розовая окраска, интенсивность которой определяется спектрофотометрически.

Основной трудностью определения витамина Е в крови является его выделение путем хроматографии на колонке, потому что этот процесс наиболее длителен и требует большого количества дефицитных реактивов.



Методы поиска и изучения противогипоксических средств

Острая гипобарическая гипоксия

- В основе ОГБГ лежит снижение pO_2 во вдыхаемом воздухе при уменьшении общего парциального давления.
- Моделируется на мышах или крысах в проточной барокамере при температуре 20-22°C (Лукьянова Л.Д., 1990). Создается разрежение атмосферы, вызывающее гибель животных, которое для мышей составляет 170-186 мм рт.ст. (примерно соответствует высоте 11 000 метров).
- Время жизни (Тж, мин) на «смертельной площадке» - от момента подъема на «площадку» до появления второго агонального вдоха либо летального исхода.

•Эффективность оценивается по коэффициенту защиты (Кз), вычисляемому по изменению Тж опытных животных на «высоте» относительно Тж контрольных:

•Исследуемые вещества вводятся внутрижелудочно за 1 час или в/бр за 30 мин. до начала эксперимента.

Острая гистотоксическая гипоксия

- ОГТГ является следствием инактивации цитохромоксидазы – фермента терминального участка дыхательной цепи.
- Для моделирования ОГТГ на мышах используется цианид калия в дозе 9 мг/кг (ЛД₁₀₀) (Кораблев М.В., Лукиенко П.К., 1976) однократно внутрибрюшинно.
- Расчеты эффективности действия препаратов производят по выживаемости (Вж, %).

Острая гемическая гипоксия

- В основе ОГеГ лежит уменьшение кислородной емкости гемоглобина.
- Она вызывается превращением оксигемоглобина в метгемоглобин. При этом возникает сочетание гемической и тканевой гипоксии.
- Для моделирования у мышей использовался нитрит натрия NaNO_2 , который вводили внутрибрюшинно в дозе 220 мг/кг (LD_{100}). (Рощина Л.Ф., Островская Р.У., 1981).
- Эффективность антигипоксического действия веществ оценивали по изменению времени жизни (Тж) мышей в минутах относительно контроля.

Модель ишемии-гипоксии головного мозга

- Ишемию создают билатеральным лигированием (перевязкой) общих сонных артерий (A. carotis communis) крысы (наркоз кетамин, внутрибрюшинно в дозе 80 мг/кг) (Мирзоян Р.С. и др., 2000).
- Вещества вводятся крысам в/бр за 30 минут до перевязки
- Регистрируется выживаемость животных на 1, 2 и 3-е сутки после проведения билатеральной окклюзии

