

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ МЕКСИДОЛА И ГЕМИСУКЦИНАТА 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЛИПОФУСЦИНА В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОЙ ПЕРМАНЕНТНОЙ ИШЕМИИ

Н. Р. Мирзоян¹, Н. А. Багдасарян¹, К. Б. Алиханян¹, В. С. Меликсетян¹,
М. Г. Багдасарян¹, А. М. Кухтарова²

В опытах на крысах установлено, что курсовое 6- и 12-дневное применение мексидола или гемисукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (в дозах 200 мг/кг, внутривенно) предотвращает избыточное накопление липофусцина в ткани мозга после локальной перманентной ишемии, вызванной перевязкой средней мозговой артерии, как в интактном, так и в поврежденном полушариях головного мозга. Мексидол вызывает выраженное снижение уровня липофусцина после 12 дней введения, тогда как гемисукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин приводит к значительному снижению концентрации липофусцина уже после 6-дневного лечения.

Ключевые слова: локальная перманентная ишемия головного мозга у крыс; липофусцин; мексидол; гемисукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большое количество используемых в клинике лекарственных средств для лечения ишемических поражений мозга, поиск новых веществ с более высокой эффективностью продолжается.

Общеизвестно, что при ишемии в мозговой ткани наблюдается повышение концентрации субстратов перекисного окисления липидов [12]. Показано, что в зоне ишемии усиливается образование активных форм кислорода, накапливаются прооксиданты, в результате чего угнетается физиологическая защитная функция клеток головного мозга, в том числе и активность антиоксидантных ферментов [4].

Известно, что пигмент липофусцин, который является продуктом повреждений тканей, вызванных свободными радикалами, с возрастом накапливается в лизосомах постмитотических клеток (нейронах, кардиомиоцитах). Избыточное количество липофусцина в нейронах может, в свою очередь, вызывать необратимые повреждения клеток [10]. Показано, что механизмы формирования и состав лизосомальных пигментов, которые образуются в процессе старения и в результате ишемических повреждений, схожи [9, 13].

Результаты исследований [1] выявили повышение уровня липофусцина в тканях головного мозга как при

локальной ишемии головного мозга, вызванной перевязкой средней мозговой артерии, так и в условиях хронической ишемизации мозговой ткани, вызванной гипокинезией.

В связи с этим интерес представляет изучение влияния на уровни липофусцина производных оксипиридина — мексидола, относящегося к группе антигипоксантов с ноотропными, анксиолитическими свойствами и широко используемого в клинической практике, и гемисукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, проявившего в экспериментах способность увеличивать мозговой кровоток и нейропротекторную активность [2, 3, 7].

Целью нашего исследования явилось сравнительное изучение содержания липофусцина в мозговой ткани в условиях локальной перманентной ишемии под влиянием мексидола и гемисукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводились на 70 белых беспородных крысах-самцах массой 200–250 г (виварий Ереванского медицинского университета им. М. Гераци, Ереван). Животных содержали на общем рационе вивария, протокол № 4 от 18.12.2012 г. Этического комитета Ереванского медицинского университета им. М. Гераци.

Модель локальной ишемии мозга воспроизводилась перевязкой левой средней мозговой артерии по [6, 15]. Операция по перевязке артерии проводилась под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг, внутривенно).

¹ Ереванский государственный медицинский университет им. Мхитара Гераци, 0025, Ереван, ул. Корюна, 2.

² ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

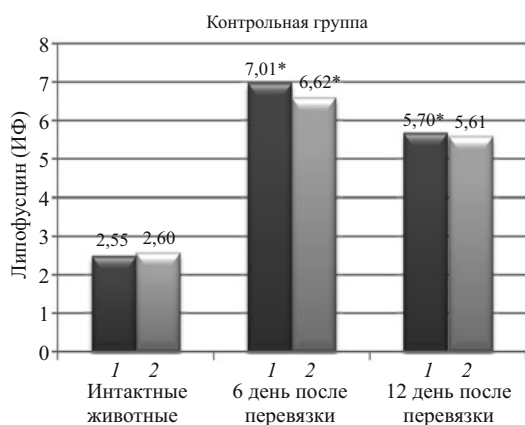


Рис. 1. Содержание липофусцина в левом и правом полушариях мозга интактных крыс и животных, перенесших перевязку средней мозговой артерии (на 6 и 12 день): 1 – левое полушарие, 2 – правое полушарие.

* Статистически достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

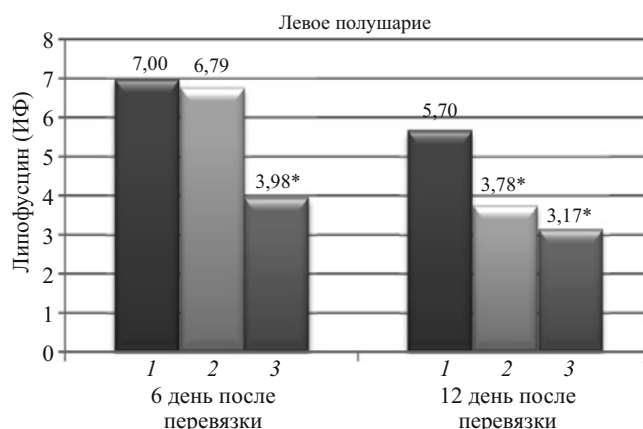


Рис. 2. Изменение содержания липофусцина в левом полушарии мозга крыс при введении мексидола и гемисукцината (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина) на фоне перевязки средней мозговой артерии у крыс: 1 – контроль, 2 – мексидол, 3 – гемисукцинат.

* Статистически достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Количественное определение липофусцина в мозговой ткани проводилось методом флуоресцентной спектроскопии, на основании его способности флуоресцировать в области 420 – 470 нм при возбуждающей длине волны 340 – 370 нм. Мозговую ткань (массой 0,2 г) животных, декапитированных под нембуталовым наркозом (45 мг/кг, внутривенно), гомогенизировали со скоростью 1300 об/мин в смеси растворителей (хлороформ — метанол [2:1, v:v] в соотношении 20:1 [v:w]) в течение 1 мин при комнатной температуре [13]. К гомогенату (после экстракции водорастворимых компонентов равным объемом дистиллированной воды, центрифугирования со скоростью 3000 об/мин 1 – 2 мин отделения хлороформного слоя) для устранения мутности раствора добавляли метанол из расчета 0,1 мл метанола на 1 мл полученного раствора. От жирорастворимых компонентов, способных помешать измерению (ретинол), избавлялись экспозицией полученного раствора под интенсивным УФ-светом в течение 3 мин [11]. Интенсивность флуоресценции (ИФ) хлороформных экстрактов, полученных из гомогенизированной мозговой ткани, измеряли на флуоресцентном спектрофотометре MF-2A, Hitachi, Ltd Tokyo, Japan при возбуждающей длине волны 365 нм и излучаемой длине волны 470 нм. Калибровка флуориметра раствором 0,1 мкг/мл хинина сульфата (х.ч.) в 0,1 н. растворе серной кислоты (ИФ = 60 – 90) проводилась непосредственно перед измерением [14].

В первой серии опытов (10 крыс) определялась концентрация липофусцина в мозговой ткани интактных крыс. Во второй и третьей сериях экспериментов (по 10 крыс) содержание липофусцина изучалось у крыс после перевязки средней мозговой артерии на 6 и 12 день после окклюзии средней мозговой артерии, когда, согласно имеющимся литературным данным, в

структуре ткани головного мозга крыс наблюдаются наиболее выраженные изменения [5, 9].

В последующих 4 сериях опытов (по 10 животных) исследовали количественное содержание липофусцина в мозговой ткани крыс, перенесших операцию по перевязке средней мозговой артерии, которым вводили мексидол или гемисукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в дозах 200 мг/кг (внутрибрюшинно) через 30 мин после перевязки, а затем ежедневно 1 раз в сутки в течение 6 и 12 дней, соответственно. За контрольные принимались данные первых 3 серий эксперимента.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel 2010 методом однофакторного дисперсионного анализа по ANOVA [8], с оценкой достоверности по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе интактных животных (1 серия, $n = 10$) средний уровень липофусцина в мозговой ткани составлял $(2,52 \pm 0,7)$ ИФ в левом полушарии и $(2,60 \pm 0,58)$ ИФ в правом полушарии (рис. 1).

Во второй серии опытов на 6 день после перевязки средней мозговой артерии показано статистически достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня липофусцина в ткани головного мозга (левое полушарие $(7,01 \pm 1,32)$ ИФ; правое полушарие $(6,62 \pm 1,25)$ ИФ), по сравнению с показателями животных интактной группы (рис. 1).

На 12 день после ишемического поражения (третья серия, $n = 10$) наблюдалось понижение уровня липофусцина, по сравнению с 6 днем, которое, тем не менее, превышало показатели, отмечаемые у интактных крыс (левое полушарие $(5,7 \pm 1,34)$ ИФ, $p < 0,05$; пра-

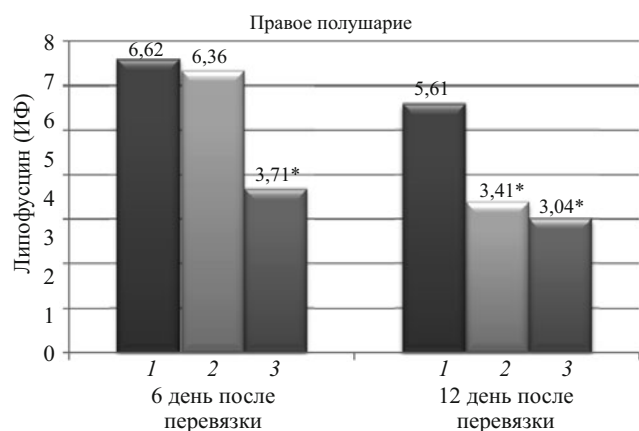


Рис. 3. Изменение содержания липофусцина в правом полушарии мозга крыс при введении мексидола и гемисукцината (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина) на фоне перевязки средней мозговой артерии у крыс: 1 – контроль, 2 – мексидол, 3 – гемисукцинат.

* Статистически достоверно по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

вое полушарие ($5,61 \pm 1,14$) ИФ, $p < 0,1$) (рис. 1). Полученные нами данные второй и третьей серий экспериментов согласуются с результатами исследований [1], установивших, что при окклюзии левой средней мозговой артерии в обоих полушариях мозга наблюдается достоверное увеличение содержания липофусцина.

Далее изучалось влияние 6-дневного введения мексидола и гемисукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (по 200 мг/кг, внутривенно) на содержание липофусцина в ткани мозга крыс, перенесших локальную ишемию. Оказалось, что в этих условиях под влиянием мексидола уровень пигмента в мозговой ткани почти не изменился, по сравнению с группой нелеченных крыс (левое полушарие: $6,79 \pm 1,46$) ИФ; правое полушарие $6,36 \pm 1,6$) ИФ) (рис. 2, 3). Иная картина наблюдалась в мозговой ткани крыс, которым вводили гемисукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (5-я серия экспериментов, $n = 10$). У этих животных на 6 день после применения препарата наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) понижение уровня липофусцина (левое полушарие $3,98 \pm 1,19$) ИФ; правое полушарие $3,71 \pm 1,1$) ИФ).

После 12-дневного введения как мексидола, так и гемисукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина в тех же дозах количество липофусцина в мозговой ткани заметно понизилось, по сравнению с группой животных, которые после перевязки средней мозговой артерии не получали вышеуказанные препараты. Уровень липофусцина при применении мексидола составлял в левом полушарии ($3,78 \pm 1,1$) ИФ ($p < 0,05$), в правом полушарии ($3,41 \pm 0,84$) ИФ ($p < 0,05$). При использовании гемисукцината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина были получены следующие результаты: ($3,17 \pm 0,81$) ИФ в левом полушарии ($p < 0,05$) и

($3,04 \pm 0,84$) ИФ в правом полушарии ($p < 0,05$) (рис. 2, 3).

Таким образом, на основании результатов проведенных экспериментов можно заключить, что курсовое лечение как мексидолом, так и гемисукцинатом 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина приводит к предотвращению повышения уровней пигмента липофусцина, обусловленного локальной перманентной ишемией головного мозга.

При этом курсовое введение мексидола снижает количество липофусцина только на 12 день после начала лечения, тогда как гемисукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина начинает понижать количество липофусцина в мозговой ткани на более ранних сроках ишемии — уже на 6 день лечения.

ВЫВОДЫ

1. Локальная перманентная ишемия, вызванная перевязкой средней мозговой артерии крыс, сопровождается повышением содержания липофусцина в ткани левого и правого полушарий большого мозга на 178 % ($p < 0,05$) и 155 % ($p < 0,05$), соответственно.

2. Мексидол 200 мг/кг (внутрибрюшинно 12 дней) предупреждает повышение уровня липофусцина в обоих полушариях мозга, что согласуется с его нейропротекторной и противоишемической активностью.

3. Гемисукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (200 мг/кг внутривенно) предотвращает повышение уровня липофусцина в головном мозге крыс как на 6, так и на 12 день после окклюзии средней мозговой артерии.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Г. Баласаян, Ш. Г. Африкян, Т. С. Григорян, *PhysioMedi*, **1**, 7 – 12 (2013).
2. Т. С. Ганьшина, А. А. Горбунов, А. В. Гнездилова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(8), 17 – 22 (2011).
3. В. Б. Кузин, И. В. Чечет, О. Ю. Чечет, *Психофармакология и биологическая наркология*, **7**, Спец. выпуск, ч. 1 (2007), с. 1755.
4. Ю. В. Медведев, А. Д. Толстой, *Гипоксия свободные радикалы в развитии патологических состояний организма*, Москва (2000), сс. 129 – 131.
5. Р. С. Мирзоян, А. В. Топчян, А. С. Канаян и др., *Вестн. РАМН*, **11**, 46 – 51 (1998).
6. А. В. Топчян, Р. С. Мирзоян, М. Г. Баласаян, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **59**(5), 62 – 64 (1996).
7. А. В. Чугунов, П. Р. Камчатнов, Н. А. Михайлова, *Журнал невр. и псих.*, **10**(2), 65 – 68 (2009).
8. “Analyzing ANOVA Designs”, *Biometrics Information Handbook*, **5**, 9 (1995).
9. Н. В. Anderton, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **352**(1363), 1781 – 1792 (1997).
10. U. T. Brunk and A. Terman, *Eur. J. Biochem.*, **269**(8), 1996 – 2002 (2002).
11. E. Cadenas, K. J. Davies, *Free Radic. Biol. Med.*, **29**(3 – 4), 222 – 230 (2000).
12. V. Castagne, M. Gautschi, K. Lefevre, et al., *Prog. Neurobiol.*, **59**(4), 397 – 423 (1999).
13. A. S. Scallany, K. L. Ayaz and L.-Ch. Su, *J. Nutr.*, Oct; **107**(10), 1792 – 1799 (1977).

14. B. L. Fletcher, C. J. Dillard, A. L. Tappel, *Anal. Biochem.*, **52**(1), 1 – 9 (1973).
15. A. Tamura, I. Graham, J. McCulloch, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1**(1), 53 – 60 (1981).

Поступила 22.06.15

THE INFLUENCE OF MEXIDOL AND 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINE HEMISUCCINATE ON LIPOFUSCIN CONTENT IN RAT BRAIN UNDER LOCAL PERMANENT ISCHEMIA CONDITIONS

**N. R. Mirzoyan¹, N. A. Bagdasaryan¹, C. B. Alikhanyan¹, V. S. Meliksetyan¹,
M. G. Bagdasaryan¹, and A. M. Kukhtarova²**

¹ Department of Clinical Pharmacology, M. Heratsi Yerevan State Medical University, Koryun str. 2, 0025 Yerevan, Republic of Armenia;

² Institute of Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

Experiments on rats showed that 6- and 12-day course treatment by mexidol or 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine hemisuccinate (at doses 200 mg/kg, i.p.) prevented the lipofuscin level increase in rat brain tissue, caused by occlusion of the left middle cerebral artery, both in the damaged and intact (right) cerebral hemispheres. Mexidol significantly decreased the concentration of lipofuscin after 12-days treatment, whereas 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine hemisuccinate markedly decreased lipofuscin levels already after 6-day treatment.

Keywords: mexidol; 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine hemisuccinate; lipofuscin; local permanent ischemia; rats.